

Caracterización de la actividad biológica del extracto crudo proteico de la estrella de mar *Luidia magnifica*

Biological activity characterization of the protein crude extract from the starfish
Luidia magnifica

María Ivonne García-Quezada¹, Cristian Moisés Galván-Villa¹, Alfonso Enrique Islas-Rodríguez², Laura Guadalupe Medina-Ceja² y Judith Sánchez-Rodríguez^{3*}

¹Departamento de Ecología Aplicada, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Carretera a Nogales Km. 15.5, Las Agujas Nextipac, CP 45110, Zapopan, Jalisco, México

²Departamento de Biología Celular y Molecular, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Carretera a Nogales Km. 15.5, Las Agujas Nextipac, CP 45110 Zapopan, Jalisco, México

³Unidad Académica de Sistemas Arrecifales Puerto Morelos, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Prolongación Niños Héroes S/N, Puerto Morelos, CP 77580 Quintana Roo, México

*Autor corresponsal: judithsa@cmarl.unam.mx

Abstract. Echinoderms have been recognized as a rich source of novel bioactive molecules with promising pharmacological applications in the field of biomedical research. In this framework, the objective of the present study was to evaluate the biological activity of the starfish *Luidia magnifica* protein extract through cytolytic and antimicrobial bioassays. The crude extract was obtained from the arms of the starfish, which demonstrated antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Candida albicans* (MIC= 1.04 mg mL⁻¹ and 0.52 mg mL⁻¹, respectively), a significant dose-dependent hemolytic activity (94.8% and EC₅₀= 2.929 mg mL⁻¹) towards human erythrocytes, as well as cytotoxic activity against C6 rat glioma line, producing a cellular inhibition of 52% and cell viability of 32% at a concentration of 20 mg mL⁻¹ using the neutral red and crystal violet methods, respectively. Results suggest that the starfish *L. magnifica* represents a potential source of biologically active substances that could be precursors of compounds for the treatment of diseases.

Key words: Echinoderms, protein extract, bioactivity, hemolysis, cytotoxicity

Resumen. Los equinodermos han sido reconocidos como una fuente rica de moléculas activas, con aplicaciones farmacológicas prometedoras en el campo de las investigaciones biomédicas. El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad biológica del extracto de naturaleza proteica de la estrella de mar *Luidia magnifica* mediante bioensayos citolíticos y citotóxicos. A partir de los brazos de la estrella de mar se obtuvo el extracto crudo, que demostró actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* y *Candida albicans* (CMI= 1,04 mg mL⁻¹ y 0,52 mg mL⁻¹, respectivamente), actividad hemolítica dosis dependiente (94,8% y EC₅₀= 2,929 mg mL⁻¹) sobre eritrocitos humanos, así como actividad citotóxica frente a la línea celular de glioma de rata C6, produciendo una inhibición celular de 52% y 32% de viabilidad celular, a una concentración de 20 mg mL⁻¹ con los métodos de tinción rojo neutro y cristal violeta, respectivamente. Los resultados sugieren que la estrella de mar *L. magnifica* representa una fuente potencial de sustancias biológicamente activas que pudieran ser precursores de compuestos para el tratamiento de enfermedades.

Palabras clave: Equinodermos, extracto proteico, bioactividad, hemólisis, citotoxicidad

INTRODUCCIÓN

La búsqueda exhaustiva de nuevas fuentes de compuestos bioactivos ha aumentado gradualmente acorde al incremento de enfermedades emergentes y al creciente desarrollo de resistencia a los fármacos actuales, por lo que la investigación se ha extendido hacia el océano debido a su amplia diversidad biológica (Jha & Zi-Rong 2004, Montaser & Luesch 2011). Los organismos marinos son una fuente importante de compuestos bioactivos, dado que muestran una gran variabilidad química en respuesta al medio competitivo en el que están inmersos (Datta *et al.* 2015). Así, han desarrollado herramientas bioquímicas y fisiológicas como mecanismos de defensa ante depredadores u organismos patógenos (Simmons *et al.* 2005).

Recientemente, los equinodermos han recibido atención especial como una fuente inexplorada de sustancias activas con importantes propiedades antimicrobianas, antivirales, antiprotozoarias y anticancerígenas (Gomes *et al.* 2014, 2016). A menudo, los compuestos bioactivos son parte de su sistema inmune innato (Gross *et al.* 1999). Al ser organismos bentónicos, están expuestos constantemente a grandes concentraciones de bacterias, virus y hongos patógenos, por lo que su supervivencia depende de su sistema inmunitario, el cual está compuesto de una serie de respuestas no específicas, humorales y celulares, que son el resultado evolutivo de la necesidad de defenderse (Li *et al.* 2010). En el caso de los equinodermos, las respuestas celulares se llevan a cabo mediante varios tipos de celomocitos (Matranga 1996,



Smith *et al.* 2010); mientras que la inmunidad humoral está mediada por una amplia variedad de moléculas secretadas, mayormente de naturaleza proteica que se encuentran en el fluido celómico y son capaces de reconocer sustancias extrañas, neutralizar o destruir patógenos, opsonizar y ayudar en la cicatrización de heridas (Gross *et al.* 1999, Ramírez-Gómez & García-Arrarás 2010). Entre ellas, las lectinas, hemolisinas, citocinas, lisozimas, proteínas complementarias y péptidos antimicrobianos muestran una alta especificidad de acción, estabilidad estructural, una mayor incidencia de bioactividad y una menor probabilidad de generar resistencia. Tales características han favorecido su investigación y explotación como potenciales agentes terapéuticos (Kelly 2005, Arizza & Schillaci 2016).

Para el grupo de los equinodermos, las investigaciones se han centrado principalmente en la extracción de metabolitos secundarios, como las saponinas y sus diversas bioactividades (Xu *et al.* 2011). Por otro lado, la caracterización de los extractos proteicos y el aislamiento de péptidos bioactivos son relativamente escasos. Los péptidos antimicrobianos exhiben efectos microbicidas, propiedades antiinflamatorias y antitumorales, tales como strongilocinas 1-2 y centrocinas 1-2 obtenidas a partir de *Strongylocentrotus droebachiensis* (Li *et al.* 2008, 2010); paracentrina 1 de *Paracentrotus lividus* (Schillaci *et al.* 2014) y PpCrAMP de *Patiria pectinifera* (Kim *et al.* 2018). También se han identificado lisozimas en *Holothuria polii* (Canicatti & Roch 1989) y *Asterias rubens* (Jolles & Jolles 1975) con actividad antibacteriana y hemolítica. Se ha visto que las hemolisinas de *Marthasterias glacialis* (Canicatti 1989) y *Asterias forbesi* (Leonard *et al.* 1990) presentan un efecto hemolítico sobre eritrocitos. Las lectinas muestran actividad antiinflamatoria (Moura *et al.* 2013), antibacteriana (Gowda *et al.* 2008), antitumoral y hemolítica (Sallay *et al.* 2000). Otros péptidos aislados muestran propiedades antivirales, antioxidativas, antidiabéticas, antitumorales e inmunomoduladoras (Macedo *et al.* 2021). Estos hallazgos resaltan la importancia del estudio de los equinodermos como fuentes promisoras de péptidos bioactivos, que pudiesen tener aplicabilidad como agentes terapéuticos.

Luidia magnifica es una estrella de mar (Asteroidea: Luidiidae) nativa de las islas de Hawái y Filipinas (Fisher, 1906) y recientemente se registró su presencia en la bahía de Santiago, en Manzanillo, Colima, donde es considerada una especie exótica introducida en el Pacífico mexicano (Galván-Villa *et al.* 2024). El conocimiento respecto a la bioprospección y caracterización de compuestos bioactivos de *L. magnifica* es nulo. Solamente, existen reportes previos de otras especies de *Luidia* que se enfocan en extractos de naturaleza no proteica, principalmente asterosaponinas

(Iorizzi *et al.* 2001, Anbukkarasu *et al.* 2014, Parajuli *et al.* 2023). Ante ello el objetivo de este trabajo fue evaluar mediante bioensayos de actividad antimicrobiana, hemolítica, de fosfolipasas y citotóxica, el potencial del extracto crudo proteico de *L. magnifica* como fuente de compuestos bioactivos, con la finalidad de proporcionar una visión general de sus propiedades biológicas para futuras investigaciones de aislamiento de compuestos.

MATERIALES Y MÉTODOS

RECOLECTA DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

En noviembre de 2018, organismos de *Luidia magnifica* se recolectaron en la playa Club de Yates, Manzanillo, Colima (19°06'04"N; 104°21'4,8"O), mediante buceo autónomo a una profundidad de 8 m. Los ejemplares se colocaron inmediatamente en hielo para ser transportados al laboratorio de Péptidos Naturales del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, donde posteriormente se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento.

PREPARACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO

La extracción de compuestos proteicos se realizó siguiendo el método modificado de Mercado *et al.* (2005). Se tomaron los brazos de dos organismos que pesaron en total 40 g, se trituraron con nitrógeno líquido en un mortero y el polvo resultante se resuspendió en ácido acético al 11% (1:10), seguido de agitación en vórtex durante 5 min. El homogeneizado se sonicó (Ultrasonic, Cole-Parmer®, modelo 08895-52) tres veces durante 30 s. Posteriormente se centrifugó (centrífuga refrigerada Eppendorf®, modelo 5810R) a 11.000 x g, 30 min y el precipitado se desechó. El sobrenadante obtenido se esterilizó mediante filtración con membranas de 0,22 µm (Coté 1999) y se congeló a -20 °C. Este sobrenadante corresponde al extracto crudo I, el cual se utilizó para las pruebas de actividad antimicrobiana. Posteriormente, una parte del sobrenadante se liofilizó a presión reducida en el equipo Labconco® Freeze Dry System, modelo 77500, a una temperatura de -50 °C. El extracto liofilizado se denominó extracto crudo II, el cual se utilizó para los ensayos de actividad hemolítica, actividad de fosfolipasas y actividad citotóxica.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La cuantificación de proteínas se determinó mediante el método de Bradford (1976), con albúmina de suero bovino (BSA) de Bio-Rad como estándar.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE

El análisis electroforético se realizó según el método de Laemmli (1970). La muestra a una concentración de 75 mg mL⁻¹ se desnaturalizó en tampón de carga en una relación 1:1 a 95 °C durante 5 min. Posteriormente, el gel de poliacrilamida al 16%, cargado con 18 µL de muestra, se corrió a 170 V durante 1 h con amortiguador Tris-Glicina (pH 8,3) (Bio-Rad®). Las bandas de proteínas se visualizaron con solución de tinción azul de Coomassie G-250 (Bio-Rad®). Las masas moleculares aparentes de las proteínas se estimaron en comparación con los estándares (Dual Xtra Standards, Bio-Rad®).

ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

El bioensayo se realizó con el método de microdilución convencional de Ong *et al.* (2002) frente a las cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC®6538™) (G+), *Escherichia coli* (ATCC®9637™) (G-) y *Candida albicans*. La predicción del crecimiento microbiano se determinó por el método de Dalgaard *et al.* (1994) para la obtención de datos de recuento viables en el ensayo para cada cepa. La exposición de las concentraciones del extracto (0,008, 0,016, 0,033, 0,065, 0,13, 0,26, 0,52 y 1,04 mg mL⁻¹) contra cada una de las cepas se realizó en microplacas de 96 pozos (Corning® No. 3696) y se incubaron a 37 °C por 30 min. Posteriormente, las distintas concentraciones del extracto y un control negativo (cepa sin extracto) fueron cultivadas en cajas de Petri con agar Muller-Hinton o agar Dextrosa Sabourad y se incubaron durante 24 h. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó mediante el ensayo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Los bioensayos se realizaron por triplicado para cada cepa.

ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

La actividad hemolítica del extracto crudo se determinó según el método descrito por Rottini *et al.* (1990), con algunas modificaciones. La sangre obtenida de un donador sano se colocó en solución de Alsever (dextrosa 0,1 M, NaCl 0,07 M, citrato de sodio 0,027 M y ácido cítrico 0,002 M, pH=7,4). La suspensión se centrifugó a 3.000 rpm por 5 min y el sobrenadante se decantó. Este paso se repitió tres veces consecutivas y el pellet de eritrocitos se resuspendió en solución Alsever. Los experimentos se normalizaron con respecto a la hemólisis nula (0%) y total (100%), diluyendo las muestras de eritrocitos en solución de Alsever y agua desionizada, respectivamente, y ajustando la A₄₁₅ a 1 cuando se produjo la lisis total. Los eritrocitos se incubaron a 37 °C durante 30 min en la presencia de distintas concentraciones del extracto crudo (1, 2, 3, 4 y 5 mg mL⁻¹). Las muestras se centrifugaron a 3.000 rpm por 5 min y la concentración de hemoglobina liberada se midió espectrofotométricamente a 415 nm con un lector de ELISA (Stat Fax® modelo 4200).

Se calculó el porcentaje de actividad hemolítica (% HA) y la concentración efectiva (EC₅₀).

ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASAS A₂

La actividad de fosfolipasas A₂ se determinó midiendo el halo de actividad enzimática del extracto crudo, en medio de cultivo de agarosa enriquecido con yema de huevo, con modificaciones al método de Habermann & Hardt (1972) y Schumacher *et al.* (1992).

Para la preparación de los geles, se mezclaron tres soluciones (SA, SB y SC), con las proporciones siguientes: 0,5 mL de SA (yema de huevo en 0,86% NaCl), 50 mL de SB (0,3 g agarosa en 50 mL Tris-HCl pH 7,95) y 0,5 mL de SC (0,147 g CaCl₂ en 100 mL H₂O). La solución resultante se vertió en cajas de Petri. Cuando el gel se solidificó se hicieron orificios. Las distintas concentraciones del extracto (5, 10, 30, 70, 140 y 300 mg mL⁻¹) se colocaron en los pozos por triplicado. Se utilizó agua desionizada como control negativo y veneno de abeja como control positivo. Los registros de medición del diámetro del halo se realizaron a las 6, 12, 24 y 48 h. La actividad enzimática (Pz) se obtuvo al dividir el diámetro del pozo entre el diámetro del halo de acuerdo con el método descrito por Price *et al.* (1982).

CITOTOXICIDAD. CULTIVO CELULAR

Las células de glioma de rata C6 (ATCC® CCL-107™) se cultivaron en condiciones estériles en frascos de 75 cm² con medio DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), penicilina-estreptomina y anfotericina-B al 1%. Se mantuvieron a 37 °C, 1 atm de presión y 5% de CO₂. Para la propagación, las células se separaron y se recolectaron con una solución de tripsina al 0,25% cuando alcanzaron una confluencia del 70-90%.

ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

La prueba de citotoxicidad se realizó en microplacas de 96 pozos (Corning® No. 3696) que contenían aproximadamente 5.000 células por pozo. Las suspensiones celulares se incubaron durante 24 h en las condiciones mencionadas anteriormente (confluencia de 80%). Posteriormente, el medio se retiró y se reemplazó con las diferentes concentraciones del extracto 3, 5, 10 y 20 mg mL⁻¹. Las microplacas se incubaron en dos tiempos de exposición (24 y 48 h). Se utilizó medio DMEM sin extracto como control negativo. Se realizaron cuatro experimentos independientes para cada concentración.

VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular se determinó mediante dos métodos de tinción, la tinción con Cristal Violeta (CV) y tinción con Rojo Neutro (RN). La tinción CV se realizó de acuerdo con la metodología de Chiba *et al.* (1998), para lo cual, se añadieron 50 µL (Sigma CO775) en cada pozo y después de 15 min de

agitación, el colorante se extrajo con ácido acético al 10% y la absorbancia se midió a 570 nm con un lector de microplacas. La tinción con RN se realizó mediante el protocolo de Repetto *et al.* (2008), se agregaron 100 μL de RN-Medio 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Sigma-Aldrich N4638) a cada pozo y después de 2 h de incubación el líquido se desechó y reemplazó con una solución de etanol para extraer el colorante y registrar la absorbancia a 540 nm.

El porcentaje de viabilidad celular (% VC) y porcentaje de inhibición de crecimiento celular (% IC) se calcularon mediante las siguientes ecuaciones:

$$\% VC = \left(\frac{DO_e}{DO_c} \right) \times 100$$

$$\% IC = 100 - \left(\frac{DO_e}{DO_c} \right) \times 100$$

Dónde:

DO_e: Promedio de los pozos tratados con las concentraciones del extracto

DO_c: Promedio de los pozos control

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresaron como la media \pm desviación estándar (DE). Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza ANDEVA de una vía con un nivel de significancia del 95% (Zar 2010), seguido de la prueba Dunnett para comparaciones múltiples (Atil & Unver 2001). Los análisis se realizaron con el programa MINITAB® 17 Statistical Software (Minitab, LLC).

RESULTADOS

El extracto crudo (EC) de *Luidia magnifica* tuvo un peso seco de 1,0142 g y un rendimiento de 2,54%, el cual se calculó con base al peso húmedo (100%) y peso seco del material biológico.

ANÁLISIS DE PROTEÍNA

La concentración de proteína obtenida del extracto crudo fue de 1,077 mg mL^{-1} . El rendimiento de la proteína fue del 1,28%, calculado a partir del peso seco (100%) y la cantidad de proteína del extracto. El análisis de electroforesis proporcionó una visión preliminar de los componentes proteicos del extracto. El perfil del EC detectó un gran número de proteínas y péptidos que variaron de 8-217 kDa, se revelaron cuatro proteínas principales claramente definidas a 8, 19, 25, 40 y 53 kDa (Fig. 1).

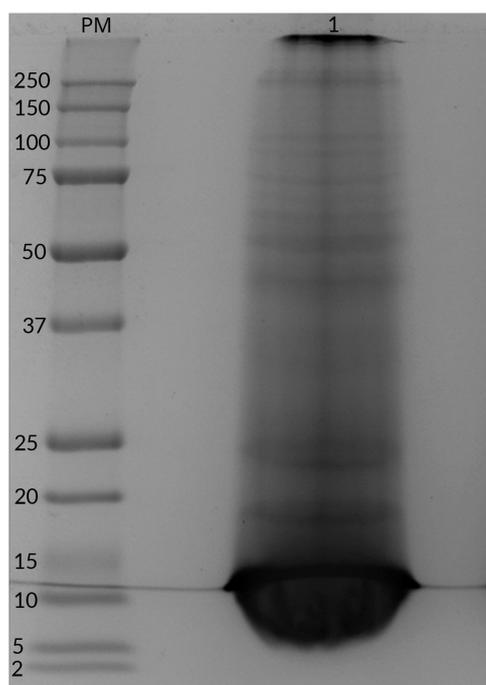


Figura 1. Análisis electroforético SDS-PAGE. Perfil de proteínas del extracto crudo de *Luidia magnifica*. Gel de poliacrilamida al 16%. PM corresponde a los pesos moleculares del estándar de proteína Dual-Xtra Standars. Carril 1 Extracto crudo (75 mg mL^{-1}). Las bandas de proteínas se visualizaron con una solución de tinción azul de Coomassie G-250 / SDS-PAGE electrophoretic analysis. Protein profile of the crude extract of *Luidia magnifica*. Polyacrylamide gel at 16%. PM corresponds to the molecular weights of the Dual-Xtra Standards protein standard. Lane 1 Crude extract (75 mg mL^{-1}). Protein bands were visualized with Coomassie G-250 blue staining solution

ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Los resultados mostraron que el extracto crudo de *Luidia magnifica* exhibe actividad antimicrobiana contra la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* y el hongo *Candida albicans* con una inhibición típica de dosis-respuesta (Fig. 2A-B), reduciendo significativamente los recuentos microbianos ($P < 0,05$). La CMI fue de 1,04 mg mL^{-1} y 0,52 mg mL^{-1} para *E. coli* y *C. albicans*, respectivamente. En contraste, el extracto no fue activo frente a *Staphylococcus aureus*, ya que el crecimiento de UFC no tuvo variaciones significativas respecto al control (Fig. 2C).

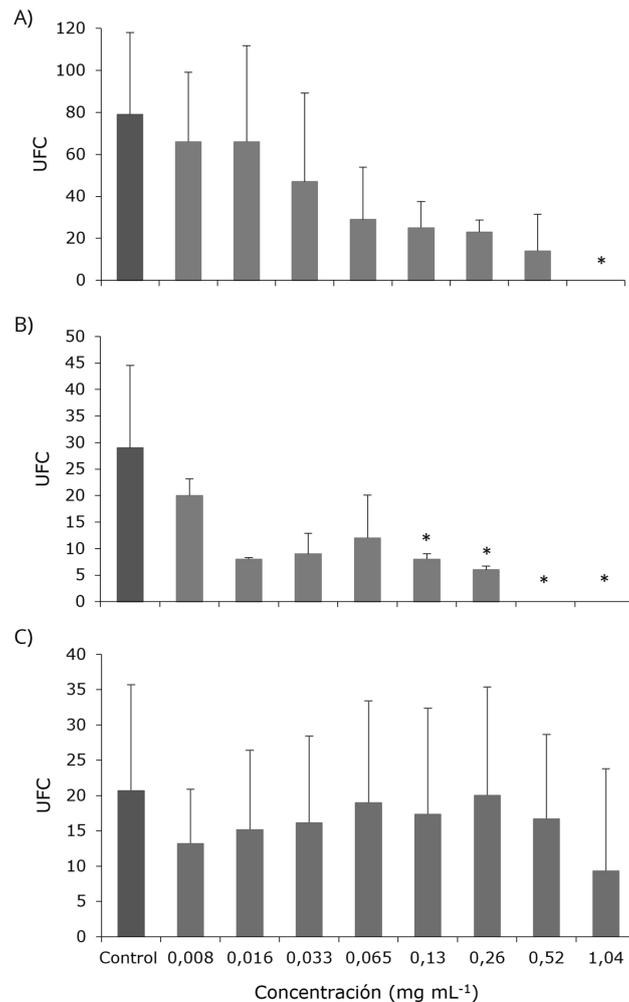


Figura 2. Actividad antimicrobiana del extracto de *Luidia magnifica* contra distintas cepas. A) *Escherichia coli*, B) *Candida albicans*, C) *Staphylococcus aureus*. UFC: Unidades Formadoras de Colonias. Datos expresados como la media \pm DE, n= 3 (ANDEVA y prueba a posteriori Dunnett, *P < 0,05) / Antimicrobial activity of *Luidia magnifica* extract against different strains. A) *Escherichia coli*, B) *Candida albicans*, C) *Staphylococcus aureus*. UFC: Colony Forming Units. Data expressed as mean \pm SD, n= 3 (ANOVA and a posteriori Dunnett's test, *P < 0.05)

ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

El extracto crudo indujo una actividad hemolítica dependiente de la concentración (expresada como el porcentaje de concentración de hemoglobina liberada) en eritrocitos humanos. El 94,8% de hemólisis se alcanzó a una concentración de 5 mg mL⁻¹. La concentración efectiva media (EC₅₀) calculada fue de 2,929 mg mL⁻¹ (Fig. 3).

ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASAS

El extracto crudo presentó una baja actividad enzimática (Pz= 0,72) a una concentración de 300 mg mL⁻¹, debido a que causó la formación de un halo difuso a las 48 h de exposición. Se presentó un aumento de turbidez, lo cual indica la presencia de fosfolipasas de tipo C. Las concentraciones restantes no indujeron actividad enzimática, evidenciándose en la ausencia de formación del halo, en comparación con el control positivo (veneno de abeja).

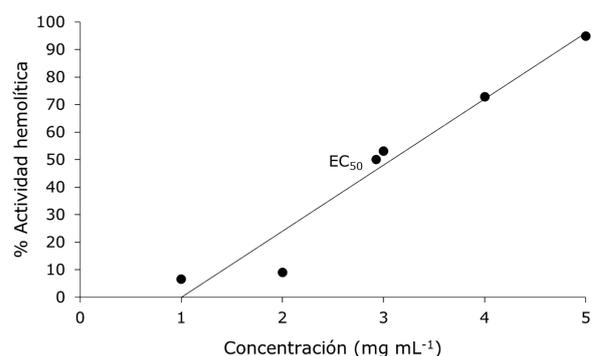


Figura 3. Actividad hemolítica del extracto crudo de *Luidia magnifica* sobre eritrocitos humanos. Está representada la concentración efectiva al 50% (EC₅₀). Datos expresados como la media \pm desviación estándar, n= 3 / Hemolytic activity of *Luidia magnifica* crude extract on human erythrocytes. The 50% effective concentration (EC₅₀) is represented. Data expressed as mean \pm standard deviation, n= 3

CITOTOXICIDAD

El método de tinción RN proporcionó una estimación de la inhibición celular bajo los efectos citotóxicos del extracto de *L. magnifica*, reflejándose en un aumento gradual en la inhibición conforme a las distintas concentraciones del extracto. A una concentración de 20 mg mL⁻¹, el extracto alcanzó un 38% de inhibición a las 24 h y 52% a las 48 h (Fig. 4).

Los resultados del método de CV mostraron una disminución de la viabilidad celular dependiente de la concentración, así como del tiempo de exposición. A una concentración de 20 mg mL⁻¹, el extracto disminuyó significativamente la viabilidad de la línea celular C6 a 60% a las 24 h y 32% a las 48 h (Fig. 5). Se encontraron diferencias

significativas entre los tiempos de exposición de 24 h ($F = 32,75$, g.l. = 4, $P = 0,0001$) y 48 h ($F = 277,91$, g.l. = 4, $P = 0,0001$) en las diferentes concentraciones.

La exposición de la línea celular C6 al extracto crudo ocasionó efectos evidentes en su morfología y en su densidad. En la Figura 6 se observa el grupo control (A) con la morfología típica de la línea celular, con forma fusiforme y prolongaciones citoplasmáticas alargadas y presentan una densidad homogénea. Al ser expuestas al extracto se observan cambios en su forma, ahora redondeadas y muestran una densidad irregular con espacios vacíos. Los cambios se tornan más evidentes conforme la concentración del extracto aumenta (Fig. 6B-D).

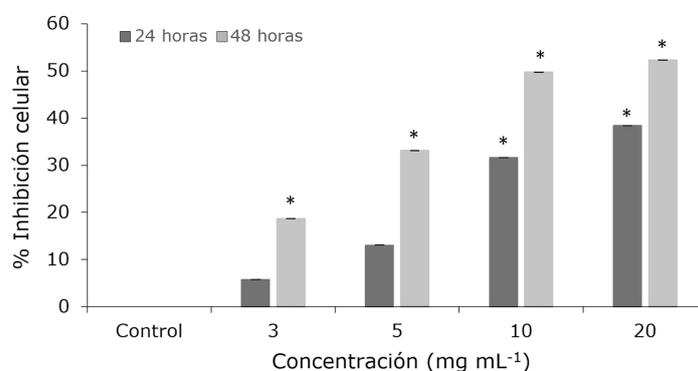


Figura 4. Citotoxicidad del extracto crudo de *Luidia magnifica* sobre la inhibición celular de C6 durante 24 y 48 h, utilizando el método de tinción Rojo Neutro. Datos expresados como la media \pm DE, n = 4. Las diferencias significativas se definieron como $*P < 0,05$ (ANDEVA y prueba a posteriori Dunnett), en comparación con los valores del control no tratado (0%) / Cytotoxicity of *Luidia magnifica* crude extract on C6 cell inhibition for 24 and 48 h, using the Neutral Red staining method. Data expressed as mean \pm SD, n = 4. Significant differences were defined as $*P < 0.05$ (ANOVA and a posteriori Dunnett's test), compared to untreated control values (0%)

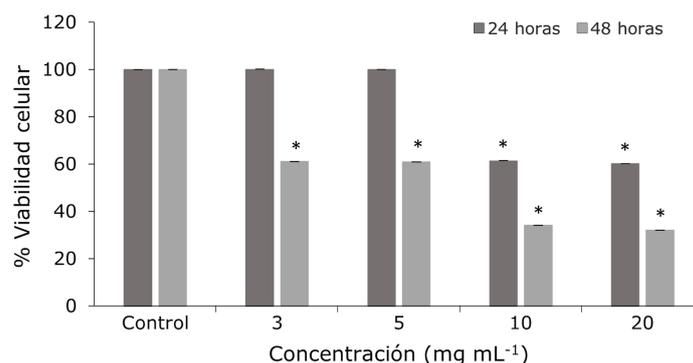


Figura 5. Viabilidad celular de C6 bajo el efecto citotóxico del extracto crudo de *Luidia magnifica* durante 24 y 48 h, utilizando el método de tinción Cristal Violeta. Datos expresados como la media \pm DE, n = 4. Las diferencias significativas se definieron como $*P < 0,05$ (ANDEVA y prueba a posteriori Dunnett), en comparación con los valores del control no tratado (100%) / C6 cell viability under the cytotoxic effect of *Luidia magnifica* crude extract for 24 and 48 h, using Crystal Violet staining method. Data expressed as mean \pm SD, n = 4. Significant differences were defined as $*P < 0.05$ (ANOVA and a posteriori Dunnett's test), compared to untreated control values (100%)

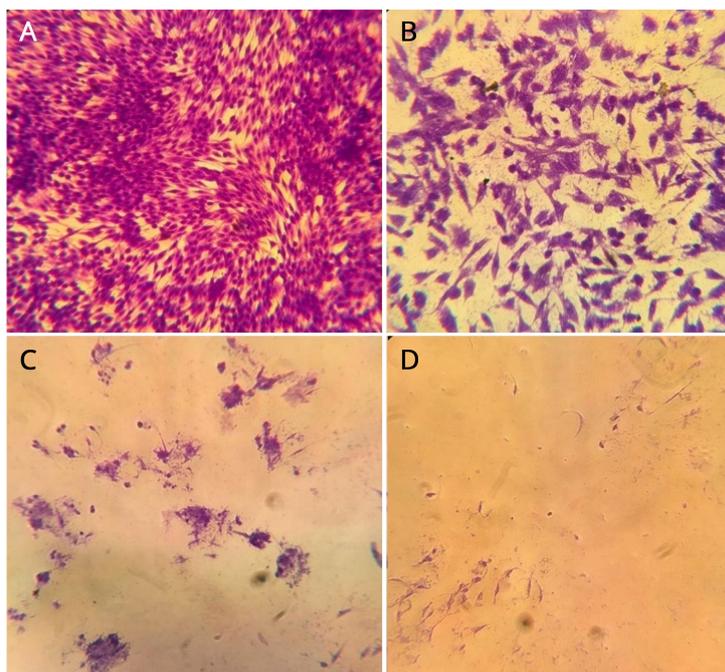


Figura 6. Cambios morfológicos en células de glioma de rata C6 expuestas a diferentes concentraciones del extracto crudo de *Luidia magnifica* teñidas con Cristal Violeta. A) Control, B) 5 mg mL⁻¹, C) 10 mg mL⁻¹, D) 20 mg mL⁻¹. Ampliación: 20x / Morphological changes in C6 rat glioma cells exposed to different concentrations of *Luidia magnifica* crude extract stained with Crystal Violet. A) Control, B) 5 mg mL⁻¹, C) 10 mg mL⁻¹, D) 20 mg mL⁻¹. Magnification: 20x

DISCUSIÓN

En este estudio se evaluaron por primera vez las propiedades bioactivas del extracto crudo de la estrella de mar *Luidia magnifica* con un enfoque en los constituyentes de naturaleza proteica del extracto. El análisis de la electroforesis reveló que el extracto contiene compuestos proteicos con pesos moleculares entre 8 kDa y 217 kDa. Con base en los estudios de otros equinodermos, se conoce que se han aislado péptidos antimicrobianos (PAM) con pesos moleculares entre 1-20 kDa (Arizza & Schillaci 2016), lisozimas de 15,5 kDa (Jolles & Jolles 1975), lectinas que corresponden a una masa molecular entre 105-220 kDa (Kamiya *et al.* 1992, Moura *et al.* 2013), hemolisinas entre 40-80 kDa (Canicatti & Ciulla 1988, Osada *et al.* 1993) y fosfolipasas A (PLA) que se presentan como proteínas de bajo peso molecular (12-20 kDa) (Kishimura 2012). El extracto crudo de *L. magnifica* reveló bandas cercanas a dichos pesos moleculares, lo cual pudiese evidenciar su presencia como componentes proteicos.

La actividad antimicrobiana se ha descrito previamente en una amplia gama de especies de equinodermos (*e.g.*, Canicatti & Roch 1989, Stabili *et al.* 1996, Haug *et al.* 2002), incluso se ha demostrado que tienen efectos antibacterianos más potentes que los de otros grupos taxonómicos como Porifera, Mollusca, Bryozoa o Annelida (Rinehart *et al.* 1981, Ridzwan *et al.* 1995).

En el presente estudio, se reportó la inhibición de la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* y el hongo *Candida albicans* a partir del extracto crudo de *L. magnifica*. Diversos estudios se han llevado a cabo con otras especies de equinodermos, que demuestran un repertorio de inhibición contra ciertos microorganismos patógenos. Los extractos acuosos de la estrella de mar *Oreaster reticulatus* y del erizo *Diadema antillarum* presentan actividad contra *S. aureus* y *Klebsiella pneumoniae* (Franco *et al.* 2015). Mientras que, el extracto del pepino de mar *Isostichopus badionotus* es activo frente a las cepas *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. epidermis*, *S. aureus* y *Vibrio cholerae* a una concentración de proteína de 1 mg mL⁻¹ (Moguel-Salazar *et al.* 2013). Un resultado similar se evidenció para el extracto de *L. magnifica*, el cual ocasionó inhibición en el crecimiento de *E. coli* a una concentración de proteína de 1,04 mg mL⁻¹. Sin embargo, resultó inactivo contra la bacteria Gram-positiva *S. aureus*, contrario a lo reportado para las especies de equinodermos mencionadas anteriormente. Estudios han sugerido la posibilidad de que los extractos de equinodermos presentan selectividad contra cepas específicas en términos de propiedades antibacterianas, atribuida a distintos factores como la naturaleza del organismo, la presencia de más de un compuesto activo y/o a efectos antagónicos o sinérgicos (Franco *et al.* 2015, Andriani *et al.* 2018).

Entre las moléculas con actividad antimicrobiana aisladas de equinodermos se encuentran las saponinas (Shimada 1968), naftoquinonas (Service & Wardlaw 1984), lisozimas (Canicatti & Roch 1989) y los péptidos antimicrobianos (PAM) (Li *et al.* 2010). En este estudio, el método de extracción estuvo dirigido hacia los componentes proteicos, lo que permite descartar la presencia de otros metabolitos secundarios. Por tanto, es probable que algunas de las moléculas activas de naturaleza proteica sean responsables del efecto antimicrobiano. Particularmente, los péptidos antimicrobianos (PAM) han generado gran atención debido a su potente actividad contra bacterias, virus y hongos (Li *et al.* 2015). En la estrella de mar *Patiria pectinifera* se realizó la purificación y caracterización de un PAM de 4,0278 kDa con actividad antimicrobiana (Kim *et al.* 2018). Por lo cual, es importante continuar con estudios para aislar e identificar este tipo de moléculas a partir de *L. magnifica*.

En equinodermos, la actividad hemolítica se atribuye a varios compuestos, incluyendo las hemolisinas (Canicatti 1989), lectinas (Hatakeyama *et al.* 1994) y saponinas (Hashimoto 1979). El extracto crudo de *L. magnifica* mostró una actividad hemolítica en una típica dosis-respuesta. A una concentración de 5 mg mL⁻¹ se produjo el 94,8% de hemólisis. Datos similares se han reportado en otras especies de estrellas de mar.

A partir del extracto crudo de la estrella *Echinaster sepositus* se detectó una actividad lítica del 100 ± 0,05% a una concentración de proteína 0,2 mg mL⁻¹ en glóbulos rojos humanos (Stabili *et al.* 2018). En general, la actividad hemolítica es común en extractos de equinodermos que muestran una alta actividad antimicrobiana, como consecuencia de la formación de canales transmembranales que ocasionan la lisis celular (Haug *et al.* 2002). Desde un punto de vista farmacéutico, resulta una ventaja cuando los compuestos bioactivos no tienen efectos citotóxicos, como la actividad hemolítica, que pudiesen comprometer la integridad de células normales (Haug *et al.* 2002). Además, es un ensayo útil para demostrar las propiedades líticas de los extractos. Dicha actividad puede dirigirse contra células malignas de mamíferos (Li *et al.* 2010). Con base en estas evidencias, estudios adicionales son necesarios para determinar el compuesto responsable del efecto lítico del extracto de *L. magnifica*.

La actividad enzimática de fosfolipasas A del extracto crudo de *L. magnifica* fue baja. En otros estudios se ha reportado la presencia de fosfolipasas del tipo A₂ (PLA₂) en diferentes especies de estrellas de mar en extractos de órganos viscerales (Okabe & Noma 1973, Koyama *et al.* 2004, Kishimura & Hayashi 2005), lo cual sugiere que la clase Asteroidea es una fuente notable de fosfolipasas. Estas son enzimas lipolíticas de bajo peso molecular que tienen un rol en el proceso digestivo (Dennis 1983), además cuentan con importantes actividades biológicas como antivirales (Wijanarko *et al.* 2018), antibacterianas (Ibrahim *et al.* 2013),

antiinflamatorias (Folmer *et al.* 2010) y hemolíticas (Shiomi *et al.* 1998). La escasa actividad enzimática del extracto de *L. magnifica* puede ser explicada por diferencias en la composición del extracto y en el método cualitativo empleado, en el cual no se especificaron condiciones particulares para maximizar la actividad enzimática.

Se han dirigido esfuerzos significativos hacia el estudio de organismos marinos para aislar compuestos potenciales para el desarrollo de nuevos agentes anticancerígenos, con la finalidad de combatir la resistencia de los fármacos quimioterapéuticos convencionales, los efectos secundarios adversos y la falta de efectividad de las terapias (von Schwarzenberg & Vollmar 2013). En el presente trabajo se reporta por primera vez la citotoxicidad del extracto crudo de *L. magnifica* sobre una línea celular tumoral. La disminución de la viabilidad de las células de glioma de rata C6 fue dependiente de la concentración y del tiempo de exposición con una concentración inhibitoria (IC₅₀) de 20 mg mL⁻¹. Estudios previos con equinodermos han establecido la toxicidad de extractos crudos en diferentes líneas celulares tumorales. El extracto de la estrella *Acanthaster planci* inhibe el crecimiento de células de cáncer de mama MCF-7 en una típica dosis respuesta (IC₅₀ = 15,6 µg mL⁻¹) e induce la apoptosis (Mutee *et al.* 2012). El extracto proteico del pepino de mar *Holothuria leucospilota* resultó efectivo contra las líneas tumorales HepG2, A549 y Panc02 a una IC₅₀ de 17,175 µg mL⁻¹, 10,658 µg mL⁻¹ y 17,481 µg mL⁻¹, respectivamente (Ru *et al.* 2022). Estos resultados indicarían que para alcanzar la IC₅₀ de *L. magnifica* se requiere una concentración más elevada; esto porque se necesitaron dosis mayores del extracto para provocar efectos similares.

En conclusión, el extracto crudo de naturaleza proteica de la estrella de mar *Luidia magnifica* exhibe propiedades citolíticas y citotóxicas. Presenta actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* y *Candida albicans*, induce un efecto hemolítico significativo contra eritrocitos humanos y una actividad antitumoral contra la línea celular glioma de rata C6. Los resultados respaldan que *L. magnifica* representa una fuente potencial para el reconocimiento de sustancias biológicamente activas. La purificación subsecuente y la evaluación adicional de los compuestos activos son necesarias para determinar su aplicabilidad como agentes terapéuticos.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio se logró gracias al apoyo financiero del Proyecto GEF-invasoras de CONABIO No. 00089333, financiado por el Fondo Mundial del Medio Ambiente (GEF, por sus siglas en inglés) y ejecutado por el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD). Agradecemos a todo el equipo del Programa de Detección de Especies Marinas Invasoras (ProDEMI) de la Universidad de Guadalajara por el apoyo en el trabajo de campo. A Eduardo Ríos, Leopoldo Díaz y Emilio Michel por sus comentarios en la versión preliminar de este documento. A Gerardo Catana por su apoyo durante el diseño experimental.

LITERATURA CITADA

- Anbukkarasu S, B Subramanian, N Elayaperumal & M Masilamani. 2014.** Antimicrobial properties of partially purified extract of starfish *Luidia maculata*. *International Journal of Natural Products Research* 4(4): 100-104.
- Andriani Y, NHM Lazim, A Asari, F Mohamad, T Sifzizul, TST Muhammad, N Ismail, M Taib, H Amir, A Ahmad & H Mohamad. 2018.** Evaluation of selected echinoderms from peninsular Malaysia for cytotoxicity against HepG2 cells, antioxidant and antibacterial activities, and their metabolites profiling. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 8(10): 32-38.
- Arizza V & D Schillaci. 2016.** Echinoderm antimicrobial peptides: The ancient arms of the deuterostome innate immune system. In: Ballarin L & M Cammarata (eds). *Lessons in immunity: from single-cell organisms to mammals*, pp. 159-176. Academic Press, New York.
- Atil H & Y Unver. 2001.** Multiple comparisons. *Journal of Biological Sciences* 1(8): 723-727.
- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1/2): 248-254.
- Canicatti C. 1989.** Evolution of the lytic system in echinoderms. II. Naturally occurring hemolytic activity in *Marthasterias glacialis* (Asteroidea) coelomic fluid. *Comparative Biochemistry and Physiology* 93(3): 587-591.
- Canicatti C & D Ciulla. 1988.** Studies on *Holothuria polii* (Echinodermata) coelomocyte lysate II. Isolation of coelomocyte hemolysins. *Developmental & Comparative Immunology* 12(1): 55-63.
- Canicatti C & P Roch. 1989.** Studies on *Holothuria polii* (Echinodermata) antibacterial proteins. I. Evidence for and activity of a coelomocyte lysozyme. *Experientia* 45: 756-759.
- Chiba K, K Kawakami & K Tohyama. 1998.** Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicology in Vitro* 12: 251-258.
- Coté RJ. 1999.** Sterilization and filtration. *Current Protocols in Cell Biology* 1(1): 1-21.
- Dalgaard P, T Ross, L Kamperman, K Neumeyer & TA McMeekin. 1994.** Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *International Journal of Food Microbiology* 23(3-4): 391-404.
- Datta D, SN Talapatra & S Swarnakar. 2015.** Bioactive compounds from marine invertebrates for potential medicines - An overview. *International Letters of Natural Sciences* 7: 42-61.
- Dennis EA. 1983.** Phospholipases. In: Boyer PD (ed). *The enzymes*. Lipid enzymology 16: 307-353. Academic Press, New York.
- Folmer F, M Jaspars, M Schumacher, M Dicato & M Diederich. 2010.** Marine natural products targeting phospholipases A2. *Biochemical Pharmacology* 80(12): 1793-1800.
- Franco O, G Patiño & A Ortiz. 2015.** Actividad antibacteriana y antifúngica de la estrella de mar *Oreaster reticulatus* (Valvatida: Oreasteridae) y de los erizos de mar *Mellita quinquiesperforata* (Clypeasteroidea: Mellitidae) y *Diadema antillarum* (Diadematoidea: Diademataidae) del Caribe Colombiano. *Revista de Biología Tropical* 63(2): 329-337.
- Galván-Villa CM, FA Solís-Marín, K Lopez, J Cobb, L Díaz-Pérez, CR Rezende-Ventura, N Slivak, CT Ford & DA Janies. 2024.** Occurrence of the Indo-West Pacific starfish *Luidia magnifica* (Echinodermata: Asteroidea) in the Mexican Pacific and a possible introduction to the Caribbean region. *Marine Biodiversity* 54(1). <doi.org/10.1007/s12526-023-01397-2>
- Gomes AR, AC Freitas, TAP Rocha-Santos & AC Duarte. 2014.** Bioactive compounds derived from echinoderms. *Royal Society of Chemistry* 4(56): 29365-29382.
- Gomes AR, AC Freitas, AC Duarte & TAP Rocha-Santos. 2016.** Echinoderms: a review of bioactive compounds with potential health effects. In: Rahman AU (ed). *Studies in Natural Products Chemistry* 49: 1-54. Elsevier, Amsterdam.
- Gowda NM, U Goswami & MI Khan. 2008.** Purification and characterization of a T-antigen specific lectin from the coelomic fluid of a marine invertebrate, sea cucumber (*Holothuria scabra*). *Fish & Shellfish Immunology* 24(4): 450-458.
- Gross PS, WZ Al-Sharif, LA Clow & LC Smith. 1999.** Echinoderm immunity and the evolution of the complement system. *Developmental and Comparative Immunology* 23(4-5): 429-442.
- Habermann E & KL Hardt. 1972.** A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. *Analytical Biochemistry* 50(1): 163-173.
- Hashimoto Y. 1979.** Marine toxins and other bioactive marine metabolites, 369 pp. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- Hatakeyama T, H Kohzaki, H Nagatomo & N Yamasaki. 1994.** Purification and characterization of four Ca²⁺-dependent lectins from the marine invertebrate, *Cucumaria echinata*. *Journal of Biochemistry* 116: 209-214.
- Haug T, AK Kjuul, OB Styrvoid, E Sandsdalen, ØM Olsen & K Stensv. 2002.** Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *Journal of Invertebrate Pathology* 81(2): 94-102.
- Ibrahim RF, N Widhyastuti, IKE Savitri, M Sahlan & A Wijanarko. 2013.** Antibacterial investigated of phospholipase A2 from the spines venom of crown of thorns starfish *Acanthaster planci*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 4(2): B1-B5.
- Iorizzi M, S DeMarino & F Zollo. 2001.** Steroidal oligoglycosides from the asteroidea. *Current Organic Chemistry* 5: 951-973.
- Jha RK & X Zi-Rong. 2004.** Biomedical compounds from marine organisms. *Marine Drugs* 2(3): 123-146.
- Jolles J & P Jolles. 1975.** The lysozyme from *Asterias rubens*. *European Journal of Biochemistry* 54(1): 19-23.

- Kamiya H, K Muramoto, R Goto & M Sakai. 1992.** Lectins in the hemolymph of a starfish, *Asterina pectinifera*: purification and characterization. *Developmental & Comparative Immunology* 16(2-3): 243-250.
- Kelly MS. 2005.** Echinoderms: their culture and bioactive compounds. In: Matranga V (ed). *Echinodermata. Progress in molecular and subcellular biology* 39: 139-165. Springer, Berlin.
- Kim CH, HJ Go, HY Oh, JB Park, TK Lee, JK Seo, MR Elphick & GN Park. 2018.** Identification of a novel antimicrobial peptide from the sea star *Patiria pectinifera*. *Developmental and Comparative Immunology* 86: 203-213.
- Kishimura H. 2012.** Enzymatic properties of starfish phospholipase A2 and its application. In: Kim SK (ed). *Marine medicinal foods. Implications and applications - Animals and microbes. Advances in Food and Nutrition Research* 65: 437-456. Elsevier, Waltham.
- Kishimura H & K Hayashi. 2005.** Characterization of phospholipase A2 from the pyloric caeca of two species of starfish, *Coscinasterias acutispina* and *Plazaster borealis*. *Food Chemistry* 92(3): 407-411.
- Koyama N, H Kishimura & K Hayashi. 2004.** Partial purification and characteristics of phospholipase A2 from pyloric caeca of starfish *Plazaster borealis*. *Bulletin of Fisheries Sciences, Hokkaido University* 55(1): 11-16.
- Laemmli UK. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Leonard LA, JD Strandberg & JA Winkelstein. 1990.** Complement-like activity in the sea star, *Asterias forbesi*. *Developmental & Comparative Immunology* 14(1): 19-30.
- Li C, T Haug, OB Styrvold, TØ Jørgensen & K Stensvåg. 2008.** Strongylocins, novel antimicrobial peptides from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Developmental and Comparative Immunology* 32(12): 1430-1440.
- Li C, T Haug & K Stensvåg. 2010.** Antimicrobial peptides in echinoderms. *Invertebrate Survival Journal* 7(7): 132-140.
- Li C, HM Blencke, T Haug & K Stensvåg. 2015.** Antimicrobial peptides in echinoderm host defense. *Developmental and Comparative Immunology* 49(1): 190-197.
- Macedo MWFS, NBD Cunha, JA Carneiro, RAD Costa, SAD Alencar, MH Cardoso, OL Franco & SC Dias. 2021.** Marine organisms as a rich source of biologically active peptides. *Frontiers in Marine Science* 8: 667764. <doi.org/10.3389/fmars.2021.667764>
- Matranga V. 1996.** Molecular aspects of immune reactions in Echinodermata. In: Rinkevich B & WEG Müller (eds). *Invertebrate Immunity. Progress in molecular and subcellular biology* 15: 235-247. Springer, Berlin.
- Mercado L, P Schmitt, SH Marshall & G Arenas. 2005.** Gill tissues of the mussel *Mytilus edulis chilensis*: A new source for antimicrobial peptides. *Electronic Journal of Biotechnology* 8(3): 284-290.
- Moguel-Salazar F, E Ortiz-Vázquez, R Rodríguez-Canul & L Olivera-Castillo. 2013.** Antimicrobial activity of aqueous extracts of sea cucumber (*Isostichopus badionotus*) from the coast of Yucatan, Mexico. *African Journal of Microbiology Research* 7(28): 3621-3626.
- Montaser R & H Luesch. 2011.** Marine natural products: a new wave of drugs? *Future Medicinal Chemistry* 3(12): 1475-1489.
- Moura RDM, KS Aragão, AA de Melo, RF Carneiro, CB Osório, PB Luz, AFS de Queiroz, EA dos Santos, NMH de Alencar & BS Cavada. 2013.** *Holothuria grisea* agglutinin (HGA): the first invertebrate lectin with anti-inflammatory effects. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 27(6): 656-668.
- Mutee AF, SM Salhimi, FC Ghazali, FM Al-Hassan, CP Lim, K Ibrahim & MZ Asmawi. 2012.** Apoptosis induced in human breast cancer cell line by *Acanthaster planci* starfish extract compared to tamoxifen. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 6(3): 129-134.
- Okabe H & A Noma. 1973.** Studies on the phospholipase A2 in pyloric caeca of the starfish *Asterina pectinifera*. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 110(3): 263-271.
- Ong P, T Ohtake, C Brandt, I Strickland, M Boguniewicz, T Ganz & DY Leung. 2002.** Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *New England Journal of Medicine* 347(15): 1151-1160.
- Osada M, T Ito, T Matsutani & K Mori. 1993.** Partial purification and characterization of hemolysin from the coelomic fluid of *Strongylocentrotus nudus*. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 105(1): 43-49.
- Parajuli K, N Fahim, S Mumu, R Palu & A Mustafa. 2023.** Antibacterial potential of *Luidia clathrata* (sea star) tissue extracts against selected pathogenic bacteria. *PLoS ONE* 18(3): e0281889. <doi.org/10.1371/journal.pone.0281889>
- Price MF, AND Wilkinson & LO Gentry. 1982.** Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia-Journal of Medical and Veterinary Mycology* 20(1): 7-14.
- Ramírez-Gómez FJ & JE García-Arrarás. 2010.** Echinoderm immunity. *Invertebrate Survival Journal* 7(2): 211-220.
- Repetto G, A Peso & JL Zurita. 2008.** Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. *Nature Protocols* 3(7): 1125-1131.
- Ridzwan BH, MA Kaswandi, Y Azman & M Fuad. 1995.** Screening for antibacterial agents in three species of sea cucumbers from coastal areas of Sabah. *General Pharmacology* 26(7): 1539-1543.
- Rinehart KL, PD Shaw, LS Shield, JB Gloer, GC Harbour, MES Koker, D Samain, RE Schwartz, AA Tymiak, DL Weller, GT Carter, MHG Munro, RG Hughes, HE Renis, EB Swynenberg, DA Stringfellow, JJ Vavra, JH Coats, GE Zurenko, SL Kuentzel, LH Li, GJ Bakus, RC Brusca, LL Craft, DN Young & JL Connor. 1981.** Marine natural products as sources of antiviral, antimicrobial and antineoplastic agents. *Pure & Applied Chemistry* 53(4): 795-817.

- Rottini G, A Dobrina, O Forgiarini, E Nardon, GA Amirante & P Patriarca. 1990.** Identification and partial characterization of a cytolytic toxin produced by *Gardnerella vaginalis*. *Infection and Immunity* 58(11): 3751-3758.
- Ru R, Y Guo, J Mao, Z Yu, W Huang, X Cao, H Hu, M Meng & L Yua. 2022.** Cancer cell inhibiting sea cucumber (*Holothuria leucospilota*) protein as a novel anti-cancer drug. *Nutrients* 14(4): 786. <doi: 10.3390/nu14040786>
- Sallay I, S Moriwaki, O Nakamura, S Yasuda, M Kimur, N Yamasak, K Itoh & H Ohba. 2000.** Interaction of the hemolytic lectin, CEL-III, with cultured human leukemic cell lines. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 9(6): 877-883.
- Schillaci D, MG Cusimano, A Spinello, G Barone, D Russo, M Vitale, D Parrinello & V Arizza. 2014.** Paracentrin 1, a synthetic antimicrobial peptide from the sea-urchin *Paracentrotus lividus*, interferes with staphylococcal and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *AmB Express* 4(78): 1-9.
- Schumacher MJ, JO Schmidt, NB Egen, KA Dillon & BA Tucson. 1992.** Biochemical variability of venoms from individual European and Africanized honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 90(1): 59-65.
- Service M & AC Wardlaw. 1984.** Echinochrome-A as a bactericidal substance in the coelomic fluid of *Echinus esculentus* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 79(2): 161-165.
- Shimada S. 1968.** Antifungal steroid glycoside from sea cucumber. *Science* 163(3874): 1462-1462.
- Shiomi KA, A Kazama, K Shimakura & Y Nagashima. 1998.** Purification and properties of phospholipases A2 from the crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci*) venom. *Toxicon* 36(4): 589-599.
- Simmons TL, E Andrianasolo, K Mcphail, P Flatt & WH Gerwick. 2005.** Marine natural products as anticancer drugs. *Molecular Cancer Therapeutics* 4(2): 333-343.
- Smith LC, J Ghosh, KM Buckley, LA Clow, NM Dheilly, T Haug, JH Henson, C Li, CM Lun, AJ Majeske, V Matranga, SV Nair, JP Rast, DA Raftos, M Roth, S Sacchi, CS Schrankel & K Stensvåg. 2010.** Echinoderm immunity. In: Söderhäll K (ed). *Invertebrate immunity* 708: 260-301. Springer, Boston.
- Stabili L, P Pagliara & P Rocm. 1996.** Antibacterial activity in the coelomocytes of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 113(3): 639-644.
- Stabili L, MI Acquaviva, RA Cavallo, C Gerardi, M Narracci & P Pagliara. 2018.** Screening of three echinoderm species as new opportunity for drug discovery: their bioactivities and antimicrobial properties. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2018(1): 1-8.
- von Schwarzenberg K & AM Vollmar. 2013.** Targeting apoptosis pathways by natural compounds in cancer: marine compounds as lead structures and chemical tools for cancer therapy. *Cancer Letters* 332(2): 295-303.
- Wijanarko A, K Lischer, H Hermansyah, DK Pratami & M Sahlan. 2018.** Antiviral activity of *Acanthaster planci* phospholipase A2 against human immunodeficiency virus. *Veterinary World* 11(6): 824-829.
- Xu T, B Yang, X Lin, X Zhou, X Yang & Y Liu. 2011.** Chemical constituents and bioactivities of starfish. *Chemistry & Biodiversity* 8(5): 740-791.
- Zar JH. 2010.** *Biostatistical analysis*, 944 pp. Prentice-Hall/Pearson, Upper Saddle River.

Recibido el 9 de noviembre de 2022
Aceptado el 28 de diciembre de 2023

Editor: Pilar Muñoz Muga

RBMO CITATION STYLE

García-Quezada MI, CM Galván-Villa, AE Islas-Rodríguez, LG Medina-Ceja & J Sánchez-Rodríguez. 2024. Caracterización de la actividad biológica del extracto crudo proteico de la estrella de mar *Luidia magnifica*. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 59(2): 126-136. <<https://doi.org/10.22370/rbmo.2024.59.2.4807>>