

Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud

(nombre del programa universitario de investigación de la Digi)

Caracterización de lectinas de pepinos de mar (clase *Holothuroidea*)

provenientes del Caribe de Guatemala

nombre del proyecto de investigación

4.8.63.0.25

Partida presupuestaria

B29-2022

código del proyecto de investigación

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas IIQB

unidad académica o centro no adscrito a unidad académica avaladora

Coordinador: Christian Daniel Farfán Barrera M.A.

Investigadora: Licda. María Alejandra Dávila Tejeda

Investigadora: Licda. Ana Gabriela Dávila Recinos

nombre del coordinador del proyecto y equipo de investigación contratado por Digi

Ciudad de Guatemala, 17 de febrero de 2023

lugar y fecha de presentación del informe final dd/mm/año

Autoridades

Dra. Alice Burgos Paniagua

Directora General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar

Coordinador General de Programas

Dra. Hilda Valencia de Abril

Coordinadora del Programa de Investigación Interdisciplinaria en Salud

Autores

Nombre del coordinador del proyecto: Christian Daniel Farfán Barrera M.A.

Nombre del investigador: Omar Ernesto Velásquez González M.Sc.

Nombre del investigador: Lic. José Roberto Ortiz Aldana

Nombre de la investigadora: Licda. María Alejandra Dávila Tejeda

Nombre de la investigadora: Licda. Ana Gabriela Dávila Recinos

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación (Digi), 2022. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Esta investigación fue cofinanciada con recursos del Fondo de Investigación de la Digi de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través de la partida presupuestaria 4.8.63.0.25 con código B29-2022 en el Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud.

Los autores son responsables del contenido, de las condiciones éticas y legales de la investigación desarrollada.



Universidad de San Carlos de Guatemala

Dirección General de Investigación



1 Índice general

2 Resumen y palabras claves	7
3 Introducción	8
4 Planteamiento del problema	9
5 Delimitación en tiempo y espacio	11
5.1 Delimitación en tiempo	11
5.2 Delimitación espacial	11
6 Marco Teórico	12
6.1 Proteínas y su importancia	12
6.2 Lectinas	12
6.3 Oligomerización de lectinas	16
7 Estado del arte	17
8 Objetivos	23
8.1 Objetivo General	23
8.2 Objetivos Específicos	23
9 Hipótesis	24
10 Materiales y métodos	24
10.1 Área de estudio	24
10.2 Obtención de datos	25
10.3 Materiales	27
10.4 Criterio para revisión de aplicaciones de lectinas	27

<u>10.5 Criterio para elaboración de guía de extracción de lectinas</u>	<u>28</u>
<u>11 Resultados, discusión de resultados, conclusiones y recomendaciones</u>	<u>28</u>
<u>11.1 Resultados</u>	<u>28</u>
<u>11.2 Discusión de resultados</u>	<u>48</u>
<u>11.3 Conclusiones</u>	<u>49</u>
<u>11.4 Recomendaciones</u>	<u>49</u>
<u>12 Referencias</u>	<u>50</u>
<u>13 Apéndice</u>	<u>58</u>
<u>14 Aspectos éticos y legales</u>	<u>59</u>
<u>15 Vinculación</u>	<u>59</u>
<u>16 Estrategia de difusión, divulgación y protección intelectual</u>	<u>59</u>
<u>17 Aporte de la propuesta de investigación a los ODS</u>	<u>59</u>
<u>18 Orden de pago final</u>	<u>60</u>
<u>19 Declaración del Coordinador del proyecto de investigación</u>	<u>60</u>
<u>20 Aval de la directora del instituto, centro o departamento de investigación o coordinador de investigación del centro regional universitario</u>	<u>61</u>
<u>21 Visado de la Dirección General de Investigación</u>	<u>62</u>

Listado de Tablas

<u>Tabla 1: Coordenadas geográficas de los sitios visitados y observados</u>	<u>24</u>
<u>Tabla 2: Especies registradas en los sitios de muestreo de Bahía de Amatique, 2022</u>	<u>29</u>
<u>Tabla 3: Abundancia relativa de Holoturoideos en Bahía de Amatique, 2022</u>	<u>33</u>

Listado de Figuras

<u>Figura 1: Puntos de Observaciones</u>	<u>11</u>
--	-----------

<u>Figura 2: Experimento de Hemoaglutinación</u>	<u>14</u>
<u>Figura 3: Representación de lazos y cintas de lectina extraída de <i>Crenomytilus grayanus</i></u>	<u>18</u>
<u>Figura 4: Representación de cintas y lazos de CEL-I extraída de <i>Cucumaria echinata</i></u>	<u>18</u>
<u>Figura 5: Representación de cintas y lazos de CEL-III extraída de <i>Cucumaria echinata</i></u>	<u>19</u>
<u>Figura 6: Representación de cintas y lazos de CEL-IV</u>	<u>20</u>
<u>Figura 7: Representación de cintas y lazos de la lectina extraída de <i>Crassostrea gigas</i></u>	<u>20</u>
<u>Figura 8: Representación de cintas y lazos de la lectina extraída de <i>Anthopleura japónica</i></u>	<u>21</u>
<u>Figura 9: Representación de cintas y lazos de la lectina extraída de esponja de mar <i>Cinachyrella sp.</i></u>	<u>22</u>
<u>Figura 10: Lectina obtenida de <i>Mytilus californianus</i></u>	<u>22</u>
<u>Figura 11: Mapa de ubicación de los sitios visitados y de observación de pepino de mar</u>	<u>25</u>
<u>Figura 12: Buceo exploratorio con metodología del Buzo errante en Bahía de Amatique, Izabal, 2022</u>	<u>26</u>
<u>Figura 13: Transectos lineales para estimación de abundancia relativa de pepinos de mar</u>	<u>26</u>
<u>Figura 14: Observación de pepinos de mar de la clase <i>Holothuroidea</i> en la Bahía de Amatique, Izabal, 2022</u>	<u>27</u>
<u>Figura 15: Organismos de <i>Holothuria mexicana</i></u>	<u>30</u>
<u>Figura 16: Organismo de <i>Holothuria floridana</i></u>	<u>30</u>
<u>Figura 17: Organismos de <i>Isostichopus badionotus</i></u>	<u>31</u>
<u>Figura 18: Variación de color de <i>Isostichopus badionotus</i></u>	<u>31</u>
<u>Figura 19: Organismos de <i>Astichopus multifidus</i></u>	<u>32</u>
<u>Figura 20: Abundancia relativa por sitio de muestreo, Bahía de Amatique, 2022</u>	<u>33</u>
<u>Figura 21: Abundancia relativa por especie de muestreo, Bahía de Amatique, 2022</u>	<u>34</u>

<u>Figura 22: Abundancia relativa de especie por sitio de muestreo, Bahía de Amatique,</u>	
<u>2022</u>	<u>34</u>
<u>Figura 23: Densidad promedio de pepino de mar por sitio de muestreo. Bahía de Amatique,</u>	
<u>2022</u>	<u>35</u>
<u>Figura 24: Reuniones virtuales del grupo de investigación debido al cierre de la</u>	
<u>universidad</u>	<u>58</u>

2 Resumen y palabras claves

En la presente investigación se buscó describir y determinar posibles aplicaciones biológicas de los pepinos de mar del Caribe guatemalteco; al igual que monitorear las poblaciones encontradas en estudios anteriores. Además de revisiones de literatura, se llevaron a cabo monitoreos donde se utilizaron metodologías como la del buzo errante. Se observaron especies descritas anteriormente como *Holothuria mexicana*, *Holothuria floridana* e *Isostichopus badionotus*. También se observaron nuevas como *Astichopus multifidus*. Languajá es el punto con mayor densidad de organismos que podrían eventualmente ser colectados y analizados. Por último, se determinó que realizar extracciones y análisis de lectinas en Guatemala es algo factible que se podrá realizar en investigaciones en el futuro.

Palabras clave: Languajá, monitoreo, poblaciones, extracciones, oligomerización

Abstract and keywords

The present study sought to describe and determine possible biological applications of sea cucumbers in the Guatemalan Caribbean; as well as monitor the populations found in previous studies. Besides literature revisions, monitoring was carried out with methodologies such as roving diver survey. Many species previously described were observed such as *Holothuria mexicana*, *Holothuria floridana* and *Isostichopus badionotus*. New species were also found such as *Astichopus multifidus*. Languajá is the site with the largest abundance of organisms which could eventually be collected and analyzed. Finally, it was determined that it is possible to carry out extractions and analysis of lectins in Guatemala for future research.

Keywords: Languajá, monitoring, populations, extractions, oligomerization

3 Introducción

Las proteínas son, probablemente, los biopolímeros más versátiles y extendidos desde los virus y organismos unicelulares, hasta los más complejos. Sus funciones van desde catálisis de reacciones, estructurales, de movimiento y defensa, hasta regulación, transporte y almacenamiento, además, son prácticamente ubicuas en todos los organismos (McKee et al., 2014).

Las lectinas son proteínas de origen no inmunológico de amplia distribución en la naturaleza, las cuales reconocen y se asocian reversiblemente a carbohidratos y glicoconjugados, encontrándose libres o enlazadas a las superficies celulares a través de sitios específicos. La habilidad de aglutinar células distingue a estas macromoléculas de otras proteínas capaces de asociarse a carbohidratos (Breitenbach Barroso Coelho et al., 2018).

En la mayoría de los casos, las lectinas son di o multivalentes, y capaces de interactuar con carbohidratos o con glicoproteínas en solución o enlazadas a membranas celulares, formando diversos tipos de asociaciones intermoleculares reversibles. Debido a esta habilidad, las lectinas son fácilmente detectadas por ensayos de aglutinación (Mrázková et al., 2019).

Estas proteínas se encuentran involucradas de manera tanto significativa como complejamente en los procesos de inmunidad, sobre todo de inmunidad innata, con mecanismos dependientes de la lectina y el tejido en el que se encuentra. La primera forma de interacción es por simple aglutinación, ocasionando agregación celular del patógeno u ocasionando que los aglomerados sean fácilmente reconocidos y fagocitados. Sucede también activación en la vía de complemento, u opsonización para activación de la vía de complemento o la vía PI3K. La unión de algunas lectinas a ciertos organismos ocasiona un aumento en la permeabilidad de la membrana celular, causando una disrupción de su integridad. Finalmente, las lectinas pueden funcionar como reguladores de las respuestas inflamatorias durante una infección (Gupta & Surolia, 2007).

Es importante mencionar que se han reportado múltiples actividades biológicas de lectinas originadas de invertebrados marinos, tales como antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antitumorales, anticonceptivas y antiinflamatorias (Cheung et al., 2015). Además de los mecanismos moleculares que poseen las lectinas de cualquier origen también se ha reportado actividad mitogénica, quimiotaxis, producción de citoquina, proinflamatoria, reconocimiento de microorganismos parásitos y modulación

de canales iónicos (Filho et al., 2015). Finalmente, un uso importante que se le está dando a las lectinas está involucrado con su desarrollo como inmunomoduladores antivirales, en específico, de coronavirus y de SARS-CoV-2 (Zaporozhets & Besednova, 2020).

El estudio de proteínas activas en Guatemala es reducido. Se han reportado las características proteínicas del veneno de *Bothrops asper*, así como los efectos del uso de plantas medicinales tradicionalmente usadas en Centroamérica sobre los efectos coagulantes, fosfolipasa A2 y proteolítico de este veneno (Saravia-Otten et al., 2017). Existen además algunos estudios de proteómica, genómica y bioinformática, relacionados sobre todo con el virus de Chagas (Keller et al., 2017) y malaria (Taracena et al., 2019). Esto hace el estudio de las lectinas de las especies de invertebrados marinos endémicas de la región mesoamericana un nicho tanto atractivo como inexplorado, sobre todo a nivel de caracterización de la proteína propiamente dicha, cuya fase inicial es la caracterización de fracciones y actividades biológicas, como las propuestas en este documento.

Los invertebrados marinos mejor estudiados en Guatemala son los Pepinos de mar (Clase *Holothuroidea*) provenientes de la región del Caribe. Durante el año 2016 se realizó una evaluación poblacional en la Bahía de Amatique y la zona expuesta del Caribe de Guatemala, encontrándose siete especies, de las cuales las más abundantes fueron *Isotichopus badiotus* y *Holothuria mexicana*, y en menor medida *Actinopyga agassizi*, *Astichopus multifidus*, *Holothuria (Thymiosycia) thomasi* y un miembro de la familia Stichopodidae (Castillo-Avalos et al., 2018). Es importante mencionar que, de las especies encontradas, ninguna ha sido investigada para analizar y caracterizar las lectinas presentes en los organismos.

Por todo lo anterior, es importante conocer la naturaleza de las lectinas presentes en la clase *Holothuroidea* del Caribe de Guatemala. Esto se realizará mediante la observación de los pepinos de mar en la región de la Bahía de Amatique y la zona expuesta del Caribe de Guatemala, siendo estos King Fish, Faro Blanco, Faro Rojo, Bahía la Graciosa, Cabo Tres Puntas, Motaguilla adentro y Motaguilla afuera (Castillo-Avalos et al., 2018).

4 Planteamiento del problema

Las lectinas son proteínas de origen no inmune que poseen al menos un dominio de reconocimiento capaz de unir específica y reversiblemente mono u oligosacáridos, y cuya estructura puede o no

presentar cualquier otro dominio proteico (Peumans & van Damme, 1995). Son ubicuas en la naturaleza, fueron identificadas inicialmente en plantas de donde se han caracterizadas el mayor número de ellas, sin embargo, a la fecha se han aislado también de bacterias, virus y animales (Drickamer & Taylor, 1998; Gupta et al., 2012).

Las lectinas de diversos animales han mostrado actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral (Breitenbach Barroso Coelho et al., 2018). Una fuente prometedora de nuevas lectinas son los organismos marinos. Se estima que en hábitats marinos existen alrededor de 106 bacterias/mL, 109 virus/mL y 107 hongos/mL; la mayoría patógenos (Cheung et al., 2015) por lo que organismos que habitan en este medio han tenido que desarrollar mecanismos de defensa eficientes pues carecen de un sistema de defensa adaptativo y sólo cuentan con el innato que se considera de acción inmediata y que no genera memoria (Rinderle et al., 1989). En invertebrados se han identificado lectinas que pertenecen a las familias tipo C, tipo L, tipo P, tipo R, calnexina, intelectinas, galectinas y tipo quitinasa (Ellis et al., 2011).

En invertebrados marinos se ha observado un interesante comportamiento de oligomerización mediado por la interacción con su ligando. Tal es el caso de la lectina CEL-III del pepino de mar *Cucumaria echinata*. Esta es una lectina dependiente de iones Ca^{2+} que al interactuar con su ligando (N-acetil-D-galactosamina) inicia un proceso de oligomerización hasta formar un heptámero, ocurriendo un cambio conformacional en el dominio de oligomerización que expone los residuos hidrofóbicos formando un poro capaz de penetrar la pared celular de bacterias, provocando hemólisis (Unno et al., 2014).

Otro caso interesante es el de una lectina estudiada en nuestro grupo que se aisló del molusco marino *Mytilus californianus*. Esta presenta mecanismos de oligomerización inducidos por el reconocimiento de su ligando galactósido (galactosa, melibiosa, rafinosa y lactosa). Puesto que, dependiendo del oligosacárido, adquiere un arreglo cuaternario diferente que define su función biológica (García-Maldonado et al., 2017). Estos hallazgos son de suma importancia y resaltan la necesidad de profundizar en estos estudios con el fin de aportar información sobre los mecanismos de defensa de este tipo de organismos, los determinantes estructurales que dan lugar a la oligomerización de estas proteínas y cómo esta puede afectar su especificidad y su función biológica. El presente estudio se enfocará en las lectinas presentes en los pepinos de mar del Caribe de Guatemala (Castillo-Avalos et

al., 2018), puesto que estos han sido descritos con anterioridad a nivel nacional, pero no se han estudiado sus macromoléculas biológicamente activas.

5 Delimitación en tiempo y espacio

5.1 Delimitación en tiempo

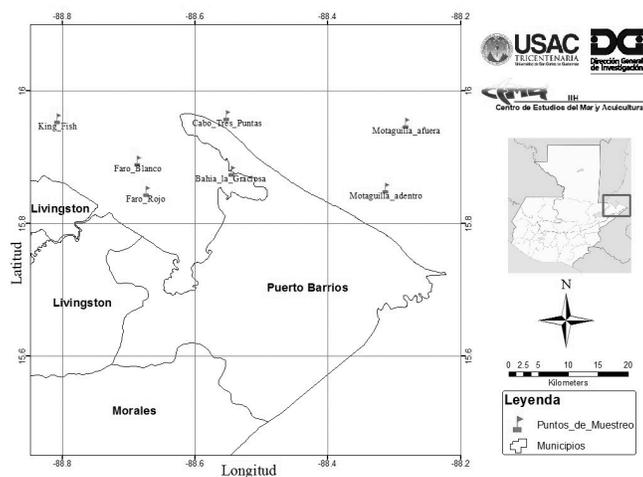
La investigación se iniciará en febrero de 2022, con observaciones de las especies de pepino de mar procedentes de la región del Caribe de Guatemala.

5.2 Delimitación espacial

Se realizarán observaciones en los mismos puntos estudiados en 2016 en la Bahía de Amatique y la zona expuesta del Caribe de Guatemala (Castillo-Avalos et al., 2018)), siendo estos Bajo del Canal, Faro Blanco, Faro Rojo y Languajá. En la Figura 1 se puede observar la ubicación geográfica y la geolocalización de la región. Todos los puntos de observación se encuentran a una profundidad igual o menor a 10 metros.

Figura 1

Puntos de Observaciones



6 Marco teórico

6.1 Proteínas y su importancia

Las proteínas son, probablemente, los biopolímeros más versátiles y extendidos desde los virus y organismos unicelulares, hasta los más complejos. Sus funciones van desde catálisis de reacciones, estructurales, de movimiento y defensa, hasta regulación, transporte y almacenamiento, además, son prácticamente ubicuas en todos los organismos (McKee et al., 2014).

Esta extensión y amplitud de funciones es una indicación de la complejidad que pueden tomar las diferentes proteínas. Formados solamente por unidades monoméricas de 20 aminoácidos comunes, el origen de dicha complejidad se encuentra en la jerarquía y organización que toman en diferentes niveles.

La alta complejidad de la estructura e interacciones de una proteína hacen preguntarse acerca de su origen. Se ha observado además que los tipos de estructura, aún con un origen tan amplio y extendido, son comparativamente pocas. Esto puede explicarse directamente por el camino evolutivo que las proteínas como tales han tenido, que subyace en las restricciones termodinámicas que prontamente obedecieron, por lo que es necesario profundizar en el tipo de estructuras que una proteína posee (Honda et al., 2008).

Dado que la diversidad de estructuras, funciones y aplicaciones de las proteínas es extremadamente basta, es conveniente describir la que se encontrarán bajo estudio en esta propuesta de investigación.

6.2 Lectinas

a) Descripción General

Las lectinas son proteínas de origen no inmunológico de amplia distribución en la naturaleza, las cuáles reconocen y se asocian reversiblemente a carbohidratos y glicoconjugados, encontrándose libres o enlazadas a las superficies celulares a través de sitios específicos. La habilidad de aglutinar células distingue a estas macromoléculas de otras proteínas capaces de asociarse a carbohidratos (Breitenbach Barroso Coelho et al., 2018).

Además, su origen no inmunológico las hace diferentes de las inmunoglobulinas que aglutinan células. Mientras los anticuerpos son similares en su estructura, las lectinas difieren en composición de

aminoácidos, la participación de metales en su estructura, su estructura tridimensional y peso molecular. Aún más, las lectinas existen tanto en animales, como en organismos sin sistemas inmunitarios adaptativos, como plantas y bacterias (Breitenbach Barroso Coelho et al., 2018).

La clasificación de las lectinas puede hacerse desde la forma específica de unión a un carbohidrato, siendo las merolectinas las lectinas que presentan un único sitio de unión, lo cual es poco común. Las hololectinas presentan dos o más sitios iguales de unión a carbohidrato, mientras que las superlectinas dos sitios distintos entre ellos de unión a carbohidrato. Finalmente, las quimerlectinas son proteínas de fusión, es decir, con una porción perteneciente a la lectina y otra a una sección con dominio funcional (Iordache et al., 2015).

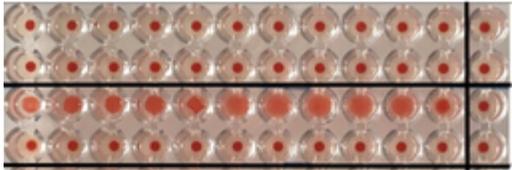
En cuanto a la especificidad a carbohidrato, pueden incluirse muy diversos monosacáridos, polisacáridos y glicoproteínas, encontrándose los más comunes a manosa, galactosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina y manano. Normalmente esta especificidad está relacionada a la función que tiene en el organismo, y las moléculas del organismo patógeno que reconocen. Por ejemplo, las lectinas que reconocen N-acetilglucosamina suelen funcionar como reconocimiento bacteriano, puesto que este carbohidrato se encuentra presente en la pared celular de las bacterias, formando parte del peptidoglicano (Iordache et al., 2015).

En la mayoría de los casos, las lectinas son di o multivalentes, y capaces de interactuar con carbohidratos o con glicoproteínas en solución o enlazadas a membranas celulares, formando diversos tipos de asociaciones intermoleculares reversibles. Debido a esta habilidad, las lectinas son fácilmente detectadas por ensayos de aglutinación. En la Figura 2 se muestra una imagen de un experimento clásico de hemaglutinación (Mrázková et al., 2019). En la franja superior de dicha figura se observa la sedimentación de los eritrocitos no aglutinados luego del tiempo de incubación. Debido a sus características, los eritrocitos se sedimentan luego de este tiempo. En la franja inferior se observa el comportamiento luego en presencia de una lectina hemaglutinante. Debido a la modificación en la aglutinación de las células, la sedimentación característica se modifica, obteniéndose una dispersión dentro del pozo. Conforme desciende la concentración de lectina, o se sustituye por una concentración adecuada del carbohidrato afín, se regresa al comportamiento inicial. Es importante mencionar que, aun siendo las lectinas específicas a monosacáridos y oligosacáridos, existen algunas que solamente

reconocen polisacáridos, e inclusive glicoproteínas, lo que les permite tener un rol importante en los mecanismos de inmunidad innata (Breitenbach Barroso Coelho et al., 2018).

Figura 2

Experimento de Hemoaglutinación



Nota. Fuente Mrázková et al., 2019. Bajo licencia Creative Commons

b) Rol de las Lectinas en la inmunidad

La actividad y aplicaciones biológicas de las lectinas es muy variadas. Entre muchas, se ha utilizado para reconocer carbohidratos expresados en células presentadoras de antígeno, para aumentar las respuestas inmunes y la eficacia de vacunas. La identificación de la interacción de las lectinas con bacterias abre una oportunidad para antibióticos nuevos asociados a estas moléculas (disminuyendo la resistencia a antibióticos), también se ha observado que están involucrados en el reconocimiento de micobacterias y en la inducción de inmunidad antimicrobiótica en infecciones de tuberculosis. También las siglecs (lectinas de unión a ácido siálico) son muy comunes en células inmunes y se caracterizan por la modulación de la endocitosis por parte de macrófagos. Las galectinas tienen una preferencia con N-acetilglucosamina (Lepenies & Lang, 2019).

Las lectinas en el sistema inmune forman parte de las vías de reconocimiento de receptores, en las vías de reconocimiento molecular asociados a patógenos y llegan a tener inclusive un rol en las vías moleculares asociadas a daño celular (Lepenies & Lang, 2019).

El papel que tienen las lectinas en el sistema inmunitario innato requiere especial atención. Este sistema forma parte del sistema inmune de los organismos vertebrados, siendo el sistema dominante o único en plantas, hongos, insectos y organismos primitivos. Por esta razón, estas proteínas se encuentran en múltiples tejidos, tales como suero, espacio alveolar, superficie de las mucosas, tejido hepático y endotelial (Gupta & Surolia, 2007).

El mecanismo de inmunidad de estas proteínas es tanto complicado como significativo, dependiendo de la lectina y el tejido en el que se encuentra. La primera forma de interacción es por simple aglutinación, ocasionando agregación celular del patógeno u ocasionando que los aglomerados sean fácilmente reconocidos y fagocitados. Sucede también activación en la vía de complemento, u opsonización para activación de la vía de complemento o la vía PI3K. La unión de algunas lectinas a ciertos organismos ocasiona un aumento en la permeabilidad de la membrana celular, causando una disrupción de su integridad. Finalmente, las lectinas pueden funcionar como reguladores de las respuestas inflamatorias durante una infección (Gupta & Surolia, 2007).

La discriminación entre lectinas propias y extrañas es una estrategia del sistema inmunológico encontrada tanto en vertebrados como invertebrados. En vertebrados, el reconocimiento es mediante ficolinas (proteínas similares a colágeno y fibrinógeno) así como a lectinas de unión a manosa. Se ha encontrado que el reconocimiento dispara el sistema de complemento en ascidios, indicando que el sistema de complemento probablemente tiene un rol fundamental en la inmunidad innata anterior a la evolución de un sistema adaptativo en vertebrados (Fujita, 2002).

c) Características de lectinas en invertebrados marinos

Los invertebrados marinos son una fuente especialmente importante de diversidad entre las lectinas con actividad inmunitaria innata. Esto es debido principalmente a dos motivos, primeramente, a la ausencia de un sistema inmunitario adaptativo desarrollado, ocasionando que el innato deba ser muy versátil. Por otro lado, la biodiversidad del medioambiente marino genera una gran cantidad de lectinas de tamaño pequeño, con alta especificidad por glicoconjugados (Cheung et al., 2015).

De manera similar a lo que ocurre en las lectinas en general, las lectinas de origen marino presentan características de reconocimiento de vías moleculares asociadas a patógenos, siendo las galectinas y las lectinas de tipo C las dominantes en invertebrados, disparando mayormente mecanismos de opsonización (Chatterjee & Adhya, 2013).

Es importante mencionar que se han reportado múltiples actividades biológicas de lectinas originadas de invertebrados marinos, tales como antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antitumorales, anticonceptivas y antiinflamatorias (Cheung et al., 2015). Además de los mecanismos moleculares que poseen las lectinas de cualquier origen también se ha reportado actividad mitogénica, quimiotaxis,

producción de citoquina, proinflamatoria, reconocimiento de microorganismos parásitos y modulación de canales iónicos (Filho et al., 2015). Finalmente, un uso importante que se le está dando a las lectinas está involucrado con su desarrollo como inmunomoduladores antivirales, en específico, de coronavirus y de SARS– CoV– 2 (Zaporozhets & Besednova, 2020).

En muchos casos, las actividades y el reconocimiento de distintos carbohidratos, especialmente para las lectinas provenientes de invertebrados marinos está relacionada con la oligomerización en diferente grado de las lectinas, generando estructuras cuaternarias muy activas (García-Maldonado et al., 2017).

6.3 Oligomerización de lectinas

Las proteínas oligoméricas son aquellas compuestas por más de una subunidad o cadena polipeptídica (Garratt & Bachega, 2013), este tipo de proteínas son sumamente abundantes en la naturaleza (Ali & Imperiali, 2005).

Los oligómeros, por definición, están formadas por dos o más cadenas polipeptídicas, por lo que poseen una estructura cuaternaria, que es considerado como el nivel más alto de organización dentro de la jerarquía de estructura de las proteínas. Las proteínas oligoméricas pueden estar formadas por copias idénticas de cadenas polipeptídicas, en este caso se les llama homooligómeros, y cuando al menos una de las cadenas polipeptídicas difiere de las demás, se conocen como heterooligómeros (Garratt & Bachega, 2013). Para que se puedan formar los oligómeros de proteínas es necesario que existan interacciones intercatenarias que pueden ser de dos naturalezas, covalentes y no covalentes (Gotte & Libonati, 2014).

La oligomerización de proteínas puede ocurrir naturalmente sin formación de enlaces covalentes a través de homo o heterooligomerización mediada por fuerzas intermoleculares (interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y/o puentes de hidrógeno específicos). Si la interfaz entre monómeros y protómeros es grande, casi todos los tipos de interacción pueden ocurrir y se encuentran conservadas más frecuentemente en las distintas especies con proteínas relacionadas evolutivamente (Gotte & Libonati, 2014).

Las interacciones por interfaces pequeñas, por otro lado, pueden ser cruciales para las formas activas en muchos tipos de proteínas, como enzimas y transportadores. Estas interacciones pueden ocurrir naturalmente por la secuencia y las características estructurales de las subunidades que forman los

complejos oligoméricos. En otros casos se pueden formar debido a cambios en el entorno, como pH, fuerza iónica, o como consecuencia del aumento de la concentración local de monómeros (Gotte & Libonati, 2014).

La oligomerización es un proceso que confiere ventajas estructurales a las lectinas, lo que permite regular de forma eficiente su función biológica. Estos mecanismos usualmente están regulados por interacciones como puentes disulfuro, interacciones electrostáticas e interacciones hidrofóbicas, esto favorece la disponibilidad de más sitios de reconocimiento a carbohidratos, ya que facilita la interacción con los azúcares que están presentes en la membrana de los patógenos. En algunos casos estos mecanismos provocan cambios conformacionales en donde se exponen regiones hidrofóbicas y así favorecen la formación del oligómero (García-Maldonado et al., 2017).

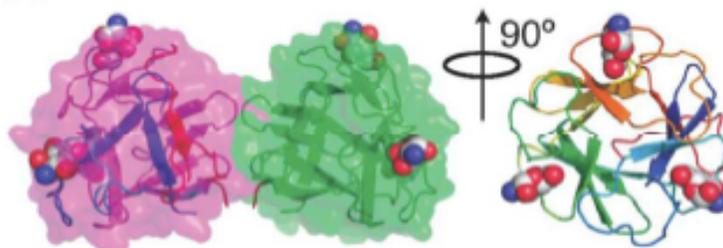
7 Estado del arte

La actividad biológica de una proteína debe ser explicada de manera estructural en última instancia. Aunque en una molécula pequeña es inmediato, en una proteína depende de su estructura tridimensional. Existen varios casos de lectinas en los que se encuentra totalmente descrita esta función a nivel de estructura terciaria y cuaternaria, explicando inclusive la función que tiene la oligomerización en el reconocimiento y la actividad de las lectinas involucradas. Estas se presentarán a continuación.

El organismo *Crenomytilus grayanus* tiene una lectina que se une a galactosa, N-acetilgalactosamina y globotriosa. En su estructura se observa un plegamiento de trébol beta que se dimeriza en una estructura cuaternaria en forma de mancuerna (Figura 3). Se trata de una estructura con una interfaz dimérica muy extensa, compuesta de 6 puentes de hidrógeno y múltiples interacciones intermoleculares, con un área de 710 \AA^2 . En particular, el apilamiento e intercalación de las cadenas laterales aromáticas de Phe94, Phe95 y Tyr149, junto con las interacciones hidrofóbicas entre Ala91, Met92, Leu147 y Ala150 son importantes para mantener el dímero estable. La interacción con galactosa, galactosamina y globotriosa está determinada por el microambiente de los sitios de unión (Liao et al., 2016).

Figura 3

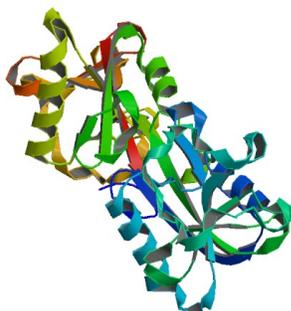
Representación de lazos y cintas de lectina extraída de *Crenomytilus grayanus*.



En el pepino de mar *Cucumaria echinata* están presentes tres lectinas, denominadas CEL-I, CEL-III y CEL-IV. La lectina CEL-I forma un homodímero mediado por puentes disulfuro (Figura 4), y contiene dos enlaces disulfuro intramoleculares. Esta proteína exhibe una alta citotoxicidad, lo cual sugiere su rol biológico es la de toxina de defensa contra depredadores. Dado que es inhibida por la presencia de GalNAc, esto indica que esta función es mediada por la asociación específica de carbohidratos en la superficie de la célula. Un mecanismo probable es que la asociación de CEL – I a la superficie de las células dispare la señalización intracelular, llevando a la muerte celular (Sugawara et al., 2004).

Figura 4

Representación de cintas y lazos de CEL-I extraída de *Cucumaria echinata*



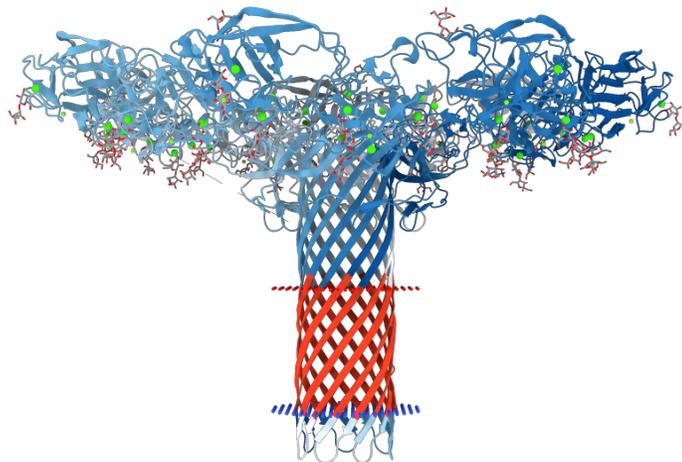
La lectina CEL-III reconoce galactósidos, oligomerizándose en un heptámero (Figura 5) que puede formar poros en las membranas celulares y causar hemólisis. La asociación de los carbohidratos induce cambios estructurales locales en los sitios de enlace a carbohidrato, en los subdominios 2α y 2β . La

unión de GalNAc induce también un ligero cambio en la cadena principal del dominio 3, el cual se relaciona con los cambios conformacionales de los carbohidratos específicos para inducir la oligomerización de la proteína (Unno et al., 2014).

Los residuos aminoacídicos conocidos por su importancia en la asociación a carbohidratos (como aspartatos y aromáticos) se encuentran altamente conservados en los cinco subdominios de la proteína. Esto está en consonancia con el hallazgo de la alta afinidad de esta proteína descrita por Unno y es ventajoso en la asociación cooperativa (Unno et al., 2014).

Figura 5

Representación de cintas y lazos de CEL-III extraída de Cucumaria echinata

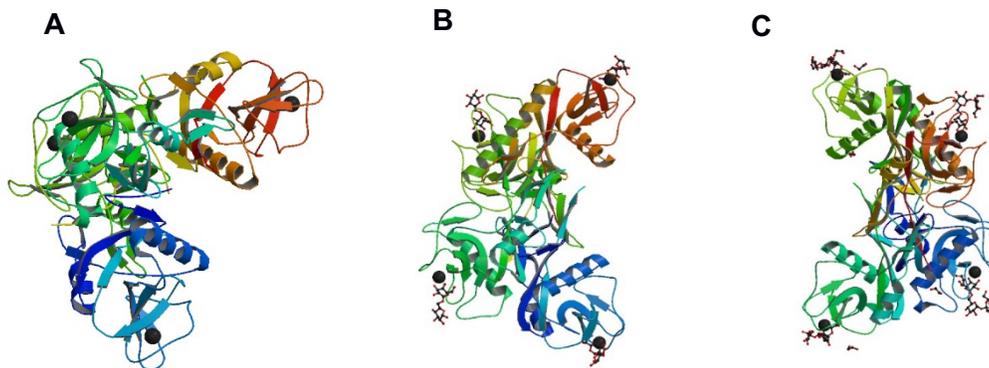


CEL-IV está compuesta por cuatro dominios de tipo C idénticos de reconocimiento de carbohidrato. La estructura obtenida por análisis de cristalografía de Rayos X indica que la estructura tetramérica es estabilizada por múltiples enlaces disulfuro entre los distintos dominios que se presentan en la Figura 6 (Hatakeyama et al., 2011).

Una molécula de carbohidrato pudo ser observada por cada subunidad en el complejo tetramérico en los cristales con rafinosa y melibiosa. Estas moléculas fueron reconocidas mediante la coordinación de enlaces con Ca^{2+} , así como redes de puentes de hidrógeno con los aminoácidos circundantes. La orientación de los carbohidratos es opuesta en cada subunidad, lo cual sugiere con la función de la agregación celular de microorganismos exógenos (Hatakeyama et al., 2011).

Figura 6

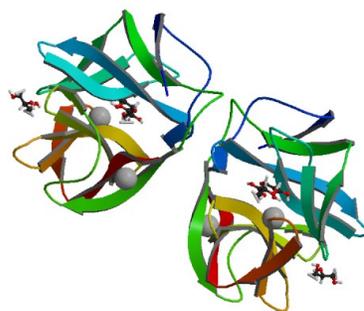
Representación de cintas y lazos de CEL-IV. (A) Estructura sin ligando (B) Estructura con melibiosa (C) Estructura con rafinosa



En el bivalvo *Crassostrea gigas* se encontró una lectina que pertenece a un tipo nuevo de familia de señalizaciones, lo que dan luz en los estudios funcionales de inmunidad innata (Figura 7). La proteína recombinante presenta una masa de 17 kDa, el análisis de Western Blot indica que en la solución existen formas monoméricas y diméricas, con una mayor proporción de la forma monomérica. En esta proteína se encontró que el sitio del ligando se encuentra en los bordes de los dos dominios, y los aminoácidos de dos dominios distintos se ensamblan juntos, para dar lugar al sitio de reconocimiento. Las cadenas laterales Asp22 y Lys43 se han encontrado que son esenciales para el reconocimiento de manosa (Unno et al., 2018).

Figura 7

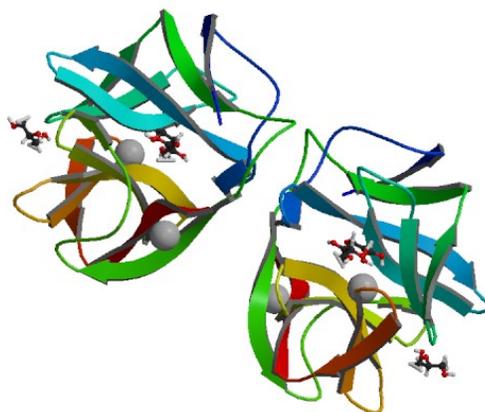
Representación de cintas y lazos de la lectina extraída de *Crassostrea gigas*



En la anémona *Anthopleura japónica* se encuentra una lectina de 18.5 kDa, que forma un dímero mediante enlace disulfuro (Figura 8), estrictamente específica a galactosa con enlace beta terminal. Este dímero presenta una forma única similar a “hélice tubular”. Los lugares de enlazamiento fueron localizados en las secciones terminales de ambas estructuras diméricas, con la orientación opuesta común en las lectinas diméricas (Unno et al., 2018).

Figura 8

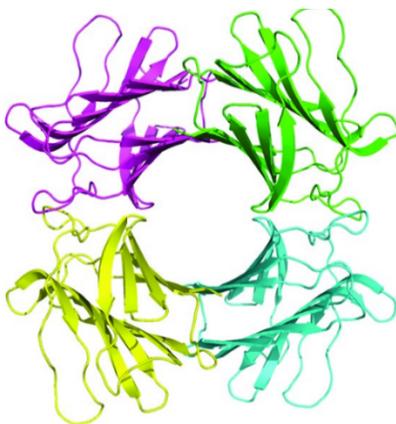
Representación de cintas y lazos de la lectina extraída de Anthopleura japónica



En la esponja de mar *Cinachyrella sp.* se encuentra una lectina que se une a N-acetilactosamina y reconoce carbohidratos de membrana celular que se expresan en metástasis, por lo que funciona para diferentes tipos de cáncer, incluidos los gliomas. La lectina presenta una estructura cuaternaria formada por un dímero de dímeros que es estabilizado por un puente disulfuro inusual (Figura 9), entre dos cisteínas adyacentes. Este puente crea un asa cerrada en la cadena polipeptídica, que permite cambios conformacionales, dependiente del potencial de óxido-reducción. Dos puentes de hidrógeno de la cadena principal unen la interfaz, pero el resto de los residuos son altamente hidrofóbicos (Freyman et al., 2012). Todo esto crea un motivo molecular similar a un agujero de dona, de 18 Å. Cada protómero presenta un sitio de unión a carbohidrato, el cual muestra una orientación contraria (Freyman et al., 2012).

Figura 9

Representación de cintas y lazos de la lectina extraída de esponja de mar Cinachyrella sp.

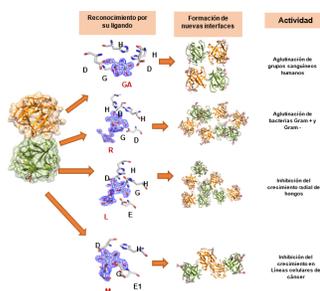


Por último, en el mejillón *Mytilus californianus* se encontró una lectina de unión a manosa (MCL) que tiene una masa molecular de 18 kDa, es específica por α -galactósidos y tiene una fuerte tendencia a formar oligómeros, siendo la forma dimérica la más abundante (García-Maldonado et al., 2017).

Se obtuvo de manera recombinante una isoforma de esta lectina, la cual presente tres aminoácidos diferentes (V107I, G130K y N141D) y reconoce los mismos galactósidos que la nativa, pero con diferente especificidad. El análisis cristalográfico de ambas lectinas mostró que poseen un plegamiento tipo trébol β con un sitio de reconocimiento a carbohidrato en cada sección del trébol. Se observó que en ausencia de su ligando ambas lectinas forman dímeros y que en presencia de ellos adquieren una estructura cuaternaria y función diferente, dependiendo del azúcar como se ilustra en la Figura 10 (García-Maldonado et al., 2017).

Figura 10

Lectina obtenida de *Mytilus californianus*



El estudio de proteínas activas en Guatemala es reducido. Se han reportado las características proteínicas del veneno de *Bothrops asper*, así como los efectos del uso de plantas medicinales tradicionalmente usadas en Centroamérica sobre los efectos coagulantes, fosfolipasa A2 y proteolítico de este veneno (Saravia-Otten et al., 2017). Existen además algunos estudios de proteómica, genómica y bioinformática, relacionados sobre todo con el virus de Chagas (Keller et al., 2017) y malaria (Taracena et al., 2019). La versatilidad y abundancia de invertebrados marinos, así como la falta de estudio de lectinas de estas especies en la región mesoamericana un nicho tanto atractivo como inexplorado, sobre todo a nivel de caracterización de la proteína propiamente dicha, cuya fase inicial es la caracterización de fracciones y actividades biológicas, propuesto en este documento.

Los invertebrados marinos mejor estudiados en Guatemala son los Pepinos de mar (Clase *Holothuroidea*) provenientes de la región del Caribe. Durante el año 2016 se realizó una evaluación poblacional en la Bahía de Amatique y la zona expuesta del Caribe de Guatemala, encontrándose siete especies, de las cuales las más abundantes fueron *Isotichopus badiotus* y *Holothuria mexicana*, y en menor medida *Actinopyga agassizi*, *Astichopus multifidus*, *Holothuria (Thymiosycia) thomasi* y un miembro de la familia Stichopodidae (Castillo-Avalos et al., 2018). Es importante mencionar que, de las especies encontradas, ninguna ha sido investigada para analizar y caracterizar las lectinas presentes en los organismos.

8 Objetivos

8.1 Objetivo General

Describir y determinar posibles aplicaciones biológicas de las lectinas de los pepinos de mar del caribe guatemalteco.

8.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar los pepinos de mar del filo Equinodermata y clase *Holothuroidea* de la Bahía de Amatique en el Caribe de Guatemala y su riqueza específica.
- b) Determinar las especies de pepinos de mar del filo Equinodermata y clase *Holothuroidea* en dos sitios de la Bahía de Amatique en el Caribe de Guatemala y su abundancia relativa.

c) Realizar una revisión de actividades biológicas de lectinas de invertebrados marinos (con especial enfoque en la clase *Holothuroidea*).

d) Desarrollar una guía de trabajo para el aislamiento de lectinas en pepinos de mar del caribe guatemalteco.

9 Hipótesis (no aplica)

10 Materiales y métodos

El enfoque de la investigación es cualitativo y a continuación se desglosan los materiales y métodos.

10.1 Área de estudio

El estudio se realizó dentro del área de la bahía de Amatique, ubicado en el caribe de Guatemala. La bahía de Amatique es receptora de agua dulce y sedimentos provenientes de dos cuencas, la cuenca del río Sarstún y la de Río Dulce (Ministerio de Ambiente y Recursos Naturales [MARN] et al., 2020). La bahía de Amatique tiene dos áreas marinas protegidas. La primera es el Área de Usos Múltiples Río Sarstún (AUMRS), y la segunda es el Refugio de Vida Silvestre Punta de Manabique (RVSPM). Estas áreas cuentan con presencia de arrecife con un estado de salud pobre, lo que se traduce en baja cobertura de corales, poca abundancia de peces y gran presencia de macroalgas. Esto es producto de la alta tasa de sedimentos lo que aumenta la turbidez de las aguas costeras (Avalos-Castillo et al., 2018). Se visitaron los siguientes sitios: 1) Bajo del Canal, 2) Faro blanco, 3) Faro Heredia o rojo, 4) Languajá (Tabla 1, Figura 11). Debido a la población encontrada, las observaciones y conteos se realizaron en los sitios de Faro Rojo y Languajá.

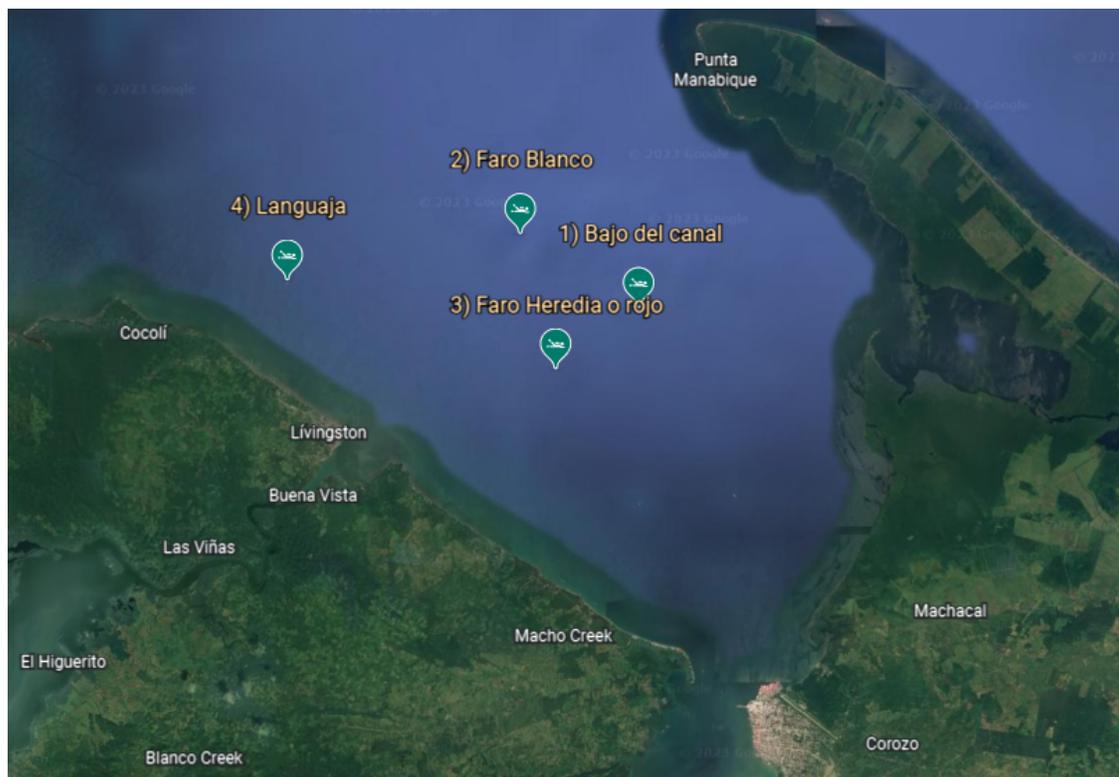
Tabla 1

Coordenadas geográficas de los sitios visitados y observados

Sitio	Latitud	Longitud
1) Bajo del canal	N 15°52.120'	W 88°38.615'
2) Faro Blanco	N 15°53.629'	W 88°41.119'
3) Faro Heredia o rojo	N 15°50'52.7"	W 88°40'22.1"
4) Languajá	N 15°52'40.9"N	W 88°46'02.8"

Figura 11

Mapa de ubicación de los sitios visitados y de observación de pepino de mar



10.2 Obtención de datos

Se realizaron tres visitas, la primera fue el 6 de mayo, la segunda se realizó el 6 y 7 de octubre, y la tercera visita fue el 28 de octubre de 2022. Durante el primer monitoreo se realizó únicamente la observación y documentación de 10 individuos.

Durante el segundo se realizó un conteo de abundancia con la metodología del buzo errante (Figura 12). Este método se realiza con buceos exploratorios durante un tiempo entre 30 a 60 minutos por sitio (dependiendo a la capacidad de cada buceador). Durante este tiempo, los pepinos de mar avistados se documentan por medio de fotografía para realizar un conteo de los individuos encontrados (Gálvez, 2022), así como para determinar las especies encontradas.

Figura 12

Buceo exploratorio con metodología del Buzo errante en Bahía de Amatique, Izabal, 2022



En cuanto al tercer monitoreo, se realizaron transectos lineales (Figura 13) en los sitios Faro rojo y Languajá, con el fin de describir la abundancia relativa. Para esto, se realizaron transectos lineales, de 30 metros de largo por 2 metros de ancho (60 m^2). Las profundidades variaron entre 5 a 15 metros de profundidad y las inmersiones se realizaron con ayuda de equipos de buceo, con duración de aproximadamente una hora. Se realizó un total de cuatro transectos cubriendo un área de 240 m^2 .

Figura 13

Transectos lineales para estimación de abundancia relativa de pepinos de mar



Finalmente, se hizo una observación y documentación de 22 individuos en el segundo monitoreo y de 16 individuos durante el tercer monitoreo (Figura 14). Los organismos fueron identificados a nivel de especie con la ayuda de descripciones de la región (Rivera-Téllez et al., 2021; Amador-Carrillo, 2017) y bibliografía nacional (Gálvez, 2022; Ávalos-Castillo et al., 2018).

Figura 14

Observación de pepinos de mar de la clase Holothuroidea en la Bahía de Amatique, Izabal, 2022



10.3 Materiales

- GPS Garmin GPS map 78
- Cámara GoPro Hero 7
- Cinta métrica de 30 m.
- Cinta métrica de 1.50 m.
- Equipos de buceo
- Guías de identificación
- Libreta de notas

10.4 Criterio para revisión de aplicaciones de lectinas

Las lectinas son proteínas que poseen al menos un sitio de reconocimiento capaz de unir específica y reversiblemente carbohidratos, son ubicuas en la naturaleza y en invertebrados marinos juegan un papel importante dentro de sus mecanismos de defensa ya que al carecer de un sistema de defensa adaptativo mediado por anticuerpos dependen exclusivamente de la respuesta inmune innata para defenderse de patógenos.

Dicha respuesta se basa principalmente en componentes celulares como los hemocitos y en un gran número de proteínas que forman parte de un componente humoral entre las que se encuentran las lectinas. Estas proteínas tienen la capacidad de reconocer los antígenos de superficie que son expresados en bacterias como los lipopolisacáridos y llevar a cabo mecanismos de aglutinación y de hemólisis. Debido a sus propiedades de especificidad y reconocimiento de glicanos se les ha atribuido una actividad antibacteriana, mitogénica, antifúngica, anticancerígena y antiviral. Lo que las convierte en biomoléculas con una amplia aplicación biomédica y biotecnológica.

La presente sección muestra las posibilidades de aplicación de las lectinas de invertebrados marinos, haciendo una revisión de literatura y proyectando la misma hacia la posibilidad de moléculas bioactivas en los organismos colectados.

10.5 Criterio para elaboración de guía de extracción de lectinas

Para realizar esta sección se hizo una revisión y contrastación de diversos procedimientos internos (obtenidos en la especialización de los investigadores) y se aplicó a los tipos de procesos que se pueden realizar en el laboratorio en Guatemala.

11 Resultados, discusión, conclusiones y recomendaciones

11.1 Resultados

a) Determinación de los pepinos de mar del filo *Equinodermata* y clase *Holothuroidea* de la Bahía de Amatique en el Caribe de Guatemala y su riqueza específica

Durante los monitoreos realizados se encontraron cuatro especies de pepinos de mar pertenecientes a dos familias (Tabla 2). Los sitios donde se registraron fueron Faro rojo, el bajo del canal y Languajá. En el sitio faro blanco no se registró ningún organismo perteneciente a la clase Holothuroidea.

Tabla 2

Especies registradas en los sitios de muestreo de Bahía de Amatique, 2022

Familia	Especie	Faro Rojo	Faro blanco	Bajo del canal	Languajá
<i>Holothuroidea</i>	<i>Holothuria</i> (Halodeima) <i>mexicana</i> (Ludwig, 1875)	X		X	X
	<i>Holothuria</i> (Halodeima) <i>floridana</i> (Pourtalès, 1851)	X			X
Stichopodidae	<i>Astichopus multifidus</i> (Sluiter, 1910)	X		X	X
	<i>Isostichopus badionotus</i> (Selenka, 1867)	X		X	X

b) Determinación las especies de pepinos de mar del filo Equinodermata y clase Holothuroidea en dos sitios de la bahía de Amatique en el Caribe de Guatemala y su abundancia relativa

A lo largo de los monitoreos realizados, se observaron 42 organismos pertenecientes a tres especies: *Holothuria* (*Halodeima*) *mexicana* (Figura 15), *Holothuria floridana* (Figura 16) e *Isostichopus badionotus* (Figuras 17 y 18). Por último, se observó la especie *Astichopus multifidus* (Figura 19).

Figura 15

Organismos de Holothuria mexicana



Figura 16

Organismo de Holothuria floridana



Figura 17

Organismos de Isostichopus badiotus



Figura 18

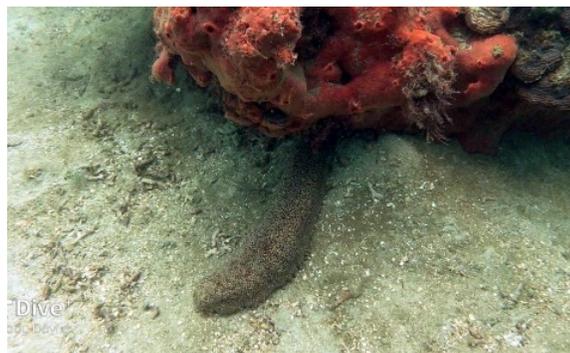
Variación de color de Isostichopus badiotus





Figura 19

Organismos de Astichopus multifidus



La abundancia relativa por sitio de muestreo durante el segundo monitoreo mostró que Languajá fue el sitio que presentó una mayor abundancia con 155 organismos contabilizados. Faro rojo presentó 30 pepinos de mar, Bajo del canal 20 individuos y en Faro Blanco no se registró ningún organismo (Tabla 3, Figura 20). En cuanto a las especies, la más abundante fue *I. badionotus* con 165 registros. El resto de las especies (*H. mexicana*, *A. multifidus* y *H. floridana*) presentaron abundancias menores a 20 organismos (Tabla 3, Figura 21). Es importante destacar que, *I. badionotus* fue el más abundante en Languajá, *A. multifidus* en Bajo del Canal, *H. mexicana* en Faro rojo (de forma poco significativa) y *H. floridana* fue el menos abundante que solo se encontró en Languajá y Faro rojo (Figura 22).

Tabla 3

Abundancia relativa de Holoturoideos en Bahía de Amatique, 2022.

Especie	Faro Rojo	Faro blanco	Bajo del canal	Languajá
<i>Holothuria (Halodeima) mexicana</i>	11	-	4	4
<i>Holothuria (Halodeima) floridana</i>	2	-	-	6
<i>Astichopus multifidus</i>	1	-	14	1
<i>Isostichopus badionotus</i>	19	-	2	144

Figura 20

Abundancia relativa por sitio de muestreo, Bahía de Amatique, 2022

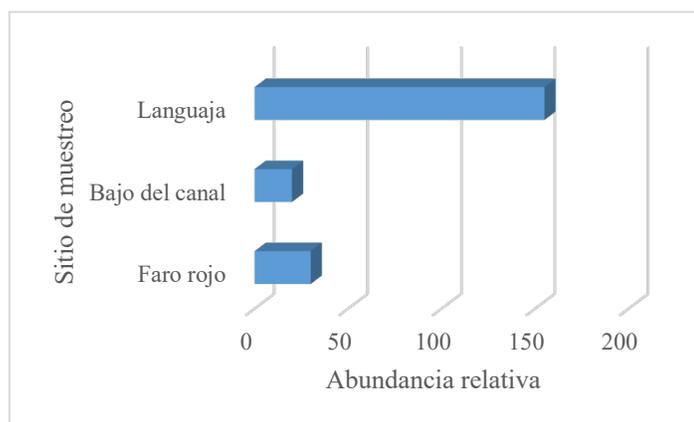


Figura 21

Abundancia relativa por especie de muestreo, Bahía de Amatique, 2022

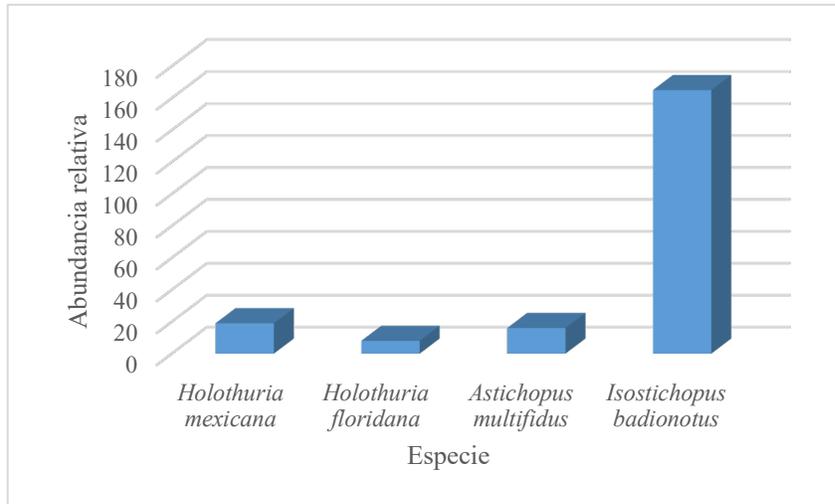
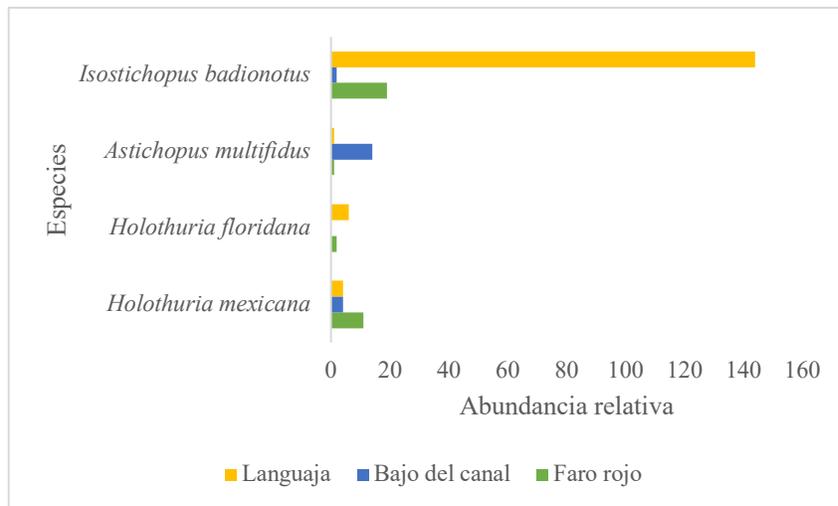


Figura 22

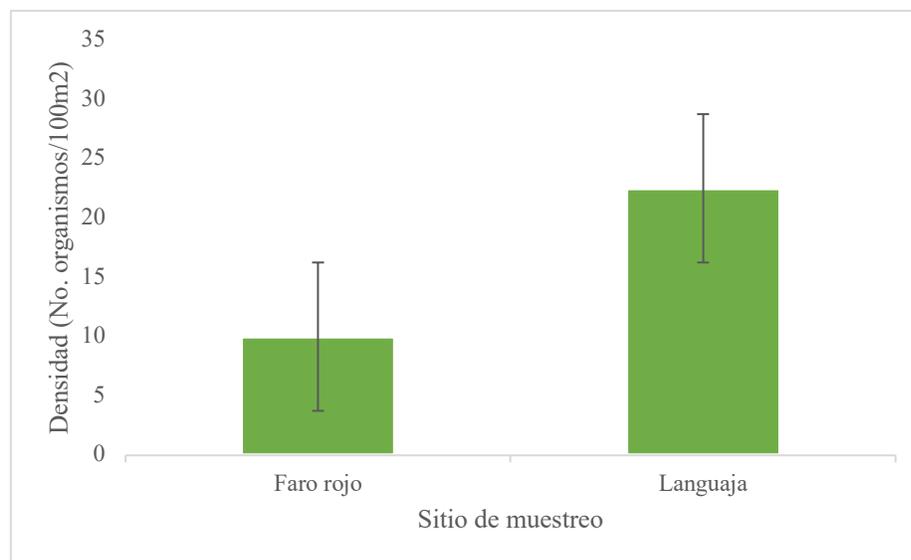
Abundancia relativa de especie por sitio de muestreo, Bahía de Amatique, 2022



Durante el tercer monitoreo se determinó la densidad de pepino de mar en los sitios de Languajá y Faro rojo. El sitio de Languajá presentó la mayor densidad de organismos con 22.5 organismos/100m². Faro rojo presentó una densidad de 10 organismos/100 m² (Figura 23).

Figura 23

Densidad promedio de pepino de mar por sitio de muestreo. Bahía de Amatique, 2022



c) Revisión de actividades biológicas de lectinas de invertebrados marinos (con especial enfoque en la clase *Holothuroidea*).

Muchas de las propiedades que poseen las lectinas las adquieren por medio de mecanismos de asociación (oligomerización) que a menudo es crítico para el reconocimiento y las funciones biológicas. Muchas de estas lectinas ya poseen una estructura cuaternaria formada por varias subunidades, pero otras adquieren dicho arreglo cuaternario al reconocer a su ligando por lo que es lógico deducir que podrían proporcionar un medio para aumentar el repertorio de reconocimiento de patógenos y conferir un alto nivel de especificidad de su respuesta inmune a los invertebrados marinos. Las lectinas son proteínas ubicuas en la naturaleza, se han clasificado según su origen, y dentro de esta clasificación con base en su especificidad por algún carbohidrato, o por su estructura (Gupta et al., 2012)

Gran número de bacterias y virus presentan lectinas en su superficie. La adhesión de microorganismos a los tejidos del hospedero es el prerequisite para que se inicien la mayoría de las infecciones. La asociación de organismos infecciosos es mediada por lectinas presentes en su superficie, ya que las lectinas se unen a los carbohidratos presentes en la superficie del tejido del hospedero.

Al principio de la década de los 80 se habían identificado únicamente bacterias específicas por manosa, las cuales las nombraron cepa de *Escherichia coli* ciliada tipo I. Después se descubrieron cepas de *E. coli* con diversas especificidades (Sharon, 2006). Esto incluye a las cepas urinarias que son específicas por galobiosa. También se han descrito bacterias con afinidad por otros azúcares, por ejemplo; *Neisseria gonorrhoea*, un patógeno genital, reconoce N-acetilactosamina; *Helicobacter pylori*, el agente causante de la úlcera péptica tiene especificidad por varios residuos de carbohidratos. Varias de estas lectinas reconocen Ácido N-acetilneuramínico (α 2-3), Gal β 4Glc (Sia3/Lac) y su análogo de N-acetilglucosamina (Sia3/LacNAc) (Sharon, 2006). Dentro del grupo de las lectinas de bacterias, las que están mejor caracterizadas son las lectinas de cilios de *E. coli* tipo I (específicas por manosa), las cuales consisten casi exclusivamente en un tipo de subunidad con una masa molecular de 17 kDa.

Los oligosacáridos presentes en las superficies de células animales se incorporan a la matriz extracelular y se unen a las glicoproteínas secretadas. Estos oligosacáridos pueden cumplir funciones estructurales, mediar el movimiento de glicoconjugados a la superficie celular o actuar como marcadores que median el reconocimiento entre células. Las funciones no estructurales de los carbohidratos generalmente requieren la participación de lectinas, en las que la actividad de unión al carbohidrato se atribuye a un dominio de reconocimiento de carbohidratos (DRC) (Drickamer & Taylor, 1998).

La clasificación de lectinas de animales más comúnmente utilizada es la de Drickamer, que fue propuesta en 1988, donde las agrupa en trece familias, con base en su secuencia de aminoácidos, especificidad y la estructura de sus DRC. De estas familias cuatro contienen lectinas que son predominantemente intracelulares y cuatro contienen lectinas que generalmente funcionan fuera de la célula. En el grupo de las lectinas intracelulares se encuentra la familia de las calnexinas, lectinas tipo M, tipo L y tipo P; estas lectinas están ubicadas en compartimentos luminales de la vía secretora y funcionan en el transporte, clasificación y selección de glicoproteínas en proceso de maduración.

En el grupo de las lectinas extracelulares se encuentran las lectinas tipo C, tipo R, siglecs y galectinas, estas lectinas se secretan en la matriz extracelular o se localizan en la membrana plasmática, por lo que pueden mediar una variedad de funciones como la adhesión y señalización celular, eliminación de glicoproteínas y reconocimiento de patógenos. Además, existen otras cinco familias que tienen

funciones complementarias y su función biológica aún sigue en estudio, estas son las lectinas tipo caja F, ficolinas, tipo quitinasas, tipo F e intelectinas (Drickamer & Taylor, 1998).

i) Lectinas Intracelulares

Calnexinas y Calreticulinas

Las calnexinas son chaperonas que se encuentran en el retículo endoplasmático, se presentan únicamente en organismos eucariotas, por otro lado, su homólogo, la calreticulina, se cree que está presente en organismos eucariotas que anteceden a los vertebrados. Ambas lectinas promueven el plegamiento correcto de las proteínas que entran en las vías secretoras de las proteínas blanco para su degradación. La calnexina se encuentra anclada a la membrana del retículo endoplasmático, por un dominio transmembranal, mientras que la calreticulina posee un péptido señal en el extremo C-terminal de retención al retículo endoplasmático. La estructura del dominio luminal de la calnexina consiste en un dominio membranal globular con un plegamiento tipo sándwich β , además posee un brazo que se proyecta fuera de la membrana. Este brazo también está presente en la calreticulina, pero es más pequeño. Los ligandos para estas lectinas son las glicoproteínas con N-glicosilaciones del tipo Glc1Man9GlcNAc2, estos glicanos son reconocidos por el dominio globular de sándwich β (Drickamer & Taylor, 1998; García-Maldonado et al., 2017).

Lectinas tipo M

Estas lectinas son miembros de la familia del grupo de las glicosil hidrolasas y tienen una relación cercana con las manosidasas del retículo endoplasmático y cis-Golgi. La función de estas lectinas es transportar a las N-glicoproteínas. A pesar de su relación con las manosidasas, éstas no presentan los residuos clave que están implicados en los procesos de catálisis, así como de un puente disulfuro que es esencial para la actividad catalítica (García-Maldonado et al., 2017).

Lectinas tipo L

Las lectinas de tipo L se pueden encontrar tanto en plantas (lectinas presentes en leguminosas) como en animales, pero tienen diferentes funciones biológicas. En los animales, se encuentran ancladas a la membrana y tienen la función de clasificar a las proteínas en los compartimientos luminales. Este tipo de proteínas poseen un plegamiento de tipo sándwich β , que a su vez puede contener un fragmento transmembranal que les permite anclarse a membranas del aparato de Golgi

y llevar a cabo sus funciones de transporte (Drickamer & Taylor, 1998; García-Maldonado et al., 2017).

Lectinas tipo P

El dominio de reconocimiento de estas lectinas es conservado y está presente tanto en vertebrados como en organismos ancestrales, como los cordados y las ascidias. Proteínas homólogas a éstas se encuentran presentes en invertebrados y en hongos, y son independientes de cationes. Estas proteínas participan en el reconocimiento de proteínas de lisosoma y de la manosa-6-fosfato (Drickamer & Taylor, 1998; García-Maldonado et al., 2017).

ii) Lectinas extracelulares

Lectinas tipo C

En estas lectinas, el reconocimiento a carbohidratos es dependiente de Ca^{2+} . Este dominio se encuentra en varias proteínas que llevan a cabo su función biológica reconociendo carbohidratos en la superficie celular y en el exterior de la célula. La unión con su ligando está mediada por el Ca^{2+} , el cual tiene la función de estabilizar la conformación local de la proteína formando enlaces de coordinación entre los residuos que se encuentran en la superficie de la proteína y los hidroxilos de los anillos de los azúcares (Drickamer & Taylor, 1998).

Lectinas tipo R

El dominio de reconocimiento a carbohidratos de esta familia es el único dominio de lectinas animales que se encuentra en procariontes, este dominio recibe el nombre de dominio B de la ricina. Este dominio une residuos de galactosa de las glicoproteínas que se encuentran en la superficie celular. El dominio de tipo R presenta una estructura de trébol β , en cada lóbulo del trébol se encuentran un sitio de reconocimiento a su ligando (Drickamer & Taylor, 1998).

Siglecs

Estas lectinas en su dominio de unión a carbohidratos cuentan con una arginina conservada, este residuo es esencial para establecer las interacciones electrostáticas con el ácido siálico, que es su ligando. Existen muy pocas lectinas del tipo siglec que no presentan esta arginina en el sitio de reconocimiento, por ejemplo, en la siglec 12 de humano, la unión está dirigida por dos residuos

aromáticos que establecen interacciones de apilamiento de anillos con el azúcar (Drickamer & Taylor, 1998; García-Maldonado et al., 2017).

Galectinas

El dominio de unión a carbohidrato de estas lectinas presenta una estructura tipo sándwich α/β . Estas lectinas reconocen principalmente galactósidos y tienen la capacidad de unir glicoconjugados en la superficie celular y la matriz extracelular (Drickamer & Taylor, 1998).

iii) Familias de lectinas con funciones complementarias

Lectinas tipo caja F

El dominio de reconocimiento de carbohidratos de estas lectinas está formado por cinco hebras β antiparalelas, formando un dominio tipo sándwich, en los extremos de este dominio se encuentran dos hélices α que corresponden a la región N y C-terminal; del lado opuesto de estas dos hélices se encuentra el sitio de reconocimiento formado por dos asas que conectan las hebras β tres y cuatro. Este sitio es específico para el disacárido quitobiosa (Drickamer & Taylor, 1998; García-Maldonado et al., 2017).

Ficolinas

Estas lectinas participan en procesos de inmunidad innata. La clasificación de estas lectinas aún no está bien definida, debido a que su dominio de unión a ligando tienen la capacidad de reconocer grupos acetilo en carbohidratos y en otros ligandos. La cadena polipeptídica de estas lectinas consiste en una región pequeña N-terminal, un dominio de tipo colágeno, una región que actúa como un cuello y una región de tipo fibrinógeno. La región de tipo colágeno hace que los monómeros de ficolina se asocien en trímeros, a su vez, el N-terminal contiene residuos de cisteína que permite que la asociación sea de forma covalente (Drickamer & Taylor, 1998; García-Maldonado et al., 2017).

Lectinas tipo Quitinasa

Estas lectinas tienen una estructura tipo barril $\alpha + \beta$. Las quitinasas se adhieren a la quitina, la cual está presente en hongos e invertebrados, el ligando que reconocen este tipo de lectinas son oligosacáridos formados por unidades de N-acetilglucosamina (Drickamer & Taylor, 1998).

Lectinas tipo F

Las lectinas tipo F o proteínas de unión a fucosa, poseen un dominio tipo F que comparten desde bacterias hasta vertebrados, sin embargo, presentan una distribución irregular a través de diferentes especies. El dominio de reconocimiento de carbohidratos de estas lectinas posee una estructura de barril β , un lado del barril tiene cinco asas que forman un anillo donde se ubica el sitio de unión a fucosa, un Ca^{2+} se une en este subdominio de asas para estabilizar esta región tan flexible y permitir la formación del oligómero (Drickamer & Taylor, 1998; García-Maldonado et al., 2017).

Intelectinas

Este tipo de lectinas han sido identificadas en cordados como la rana *Xenopus laevis* y las ascidias. Poseen un dominio con una longitud variable, un N-terminal no conservado y una extensión que contiene un péptido señal en el C-terminal para luego ser secretada fuera de la célula. El dominio de reconocimiento de carbohidratos de estas lectinas, no está relacionado en secuencia con alguna otra lectina, con excepción de 45 residuos del N-terminal, los cuales presentan similitud con el dominio globular del fibrinógeno, este tipo de dominios son dependientes de Ca^{2+} y reconocen monosacáridos como galactosa y algunas otras pentosas (Drickamer & Taylor, 1998; García-Maldonado et al., 2017).

iv) Oligomerización

La oligomerización de proteínas se define como la asociación de dos o más cadenas polipépticas, las cuales pueden ser iguales (una proteína homo-oligomérica) o diferentes (una proteína hetero-oligomérica). Las proteínas oligoméricas son muy abundantes en la naturaleza, ya que se estima representan un 35% de las proteínas celulares, la mayoría son homo-oligómeros siendo los estados más comunes el dímero y el tetrámero, y algunas coexisten en más de un estado oligomérico (experimentan transiciones reversibles en respuesta a estímulos); es relevante destacar que una fracción relativamente pequeña de estructuras oligoméricas tienen estequiometrías impares. El fenómeno de oligomerización surge de la formación de enlaces covalentes o interacciones débiles, y los mecanismos mediante los cuales ocurre incluyen el intercambio de dominios, la formación de puentes disulfuro, puentes salinos, la interacción hidrofóbica, modificaciones postraduccionales como fosforilaciones y glicosilaciones, e inducción por ligandos. Este comportamiento puede ser

considerado un avance desde la perspectiva evolutiva, ya que está relacionado con el control de la función y regulación biológica (Ali & Imperiali, 2005; Garratt & Bachega, 2013). Entre las ventajas que puede conferir la oligomerización se encuentran:

1. Estructuras más complejas pueden apoyar mejor la función, por ejemplo, mediante la introducción de un nuevo sitio activo en la interfaz entre subunidades.
2. Proteínas oligoméricas pueden regularse alostéricamente, introduciendo un nivel de control adicional.
3. Una proteína grande compuesta de múltiples subunidades cortas es más probable que se sintetice sin errores que una proteína de cadena única de tamaño comparable.
4. Permite que las proteínas formen estructuras grandes sin aumentar el tamaño del genoma.
5. Cuando el monómero y el oligómero difieren en actividad, se puede lograr una flexibilidad reguladora adicional controlando las condiciones de oligomerización.
6. Proteínas más grandes son más resistentes a la degradación y desnaturalización.

Existe una relación 4:1 entre homooligómeros y heterooligómeros. Sin embargo, esto no se ve reflejado en el Protein Data Bank (PDB) en donde las estructuras depositadas son mayoritariamente monómeros, esto puede deberse a que la cristalización de proteínas oligoméricas es más compleja en comparación de las otras formas oligoméricas (Goodsell & Olson, 2000).

Varios estudios se han enfocado en estudiar a las proteínas homooligoméricas, por ejemplo, las estructuras supramoleculares formadas por la asociación de proteínas consigo mismas. Una gran cantidad de elementos estructurales, mecánicos, fisicoquímicos y funcionales, han sido descubiertos como determinantes importantes ya que controlan la oligomerización (Gotte & Libonati, 2014). Por otro lado, la heterooligomerización es menos conocida. Las proteínas heterooligoméricas están formadas por cadenas con diferentes secuencias, las cuales muestran una ruta de asociación menos favorable estadística y fácilmente controlable, tanto cualitativa como cuantitativamente, en comparación con la homooligomerización de proteínas. Sin embargo, la heterooligomerización de las proteínas es un fenómeno muy importante en la formación de máquinas moleculares, como los motores hechos de proteína (quinesinas, microtúbulos), o alternativamente, pueden ser obtenidos artificialmente mediante el uso de reactantes asimétricos bifuncionales (Gotte & Libonati, 2014). Para que se puedan formar los oligómeros de proteínas es

necesario que existan interacciones intercatenarias que pueden ser de dos naturalezas, covalentes y no covalentes (Gotte & Libonati, 2014).

La oligomerización de las subunidades de lectina resulta en multivalencia, una propiedad que permite el entrecruzamiento, dirigir la disposición geométrica de los sitios de unión y confiere una mayor avidéz de la lectina para los glicanos; para aquellas lectinas que llevan múltiples sitios de reconocimiento a carbohidratos en cada polipéptido, estas propiedades se potencian aún más por la asociación de subunidades en especies oligoméricas. El fenómeno de oligomerización en lectinas a menudo es crítico para el reconocimiento y las funciones biológicas, y se ha reportado que podría proporcionar un medio para aumentar el repertorio de reconocimiento de patógenos de invertebrados marinos para conferir un alto nivel de especificidad de su respuesta inmune; la oligomerización puede presentarse tanto en lectinas que poseen dominios de oligomerización independientes, como en lectinas que se componen únicamente de su DRC (Lakhtin et al., 2007; Vasta et al., 2017).

Las lectinas de invertebrados marinos representan un grupo heterogéneo de proteínas, muchas de ellas oligoméricas, que varían ampliamente en tamaño, estructura, organización molecular y constitución de sus sitios de reconocimiento, y que se caracterizan por presentar especificidades definidas de carbohidratos. Se han aislado y caracterizado lectinas de más de 300 especies de invertebrados marinos, que incluyen esponjas (*Aphrocallistes vastus*, *Axinella polypoides*, *Geodia cydonium*), gusanos de mar (*Neanthes japonica*, *Urechis unicinctus*, *Amphitrite ornata*), artrópodos (percebes como *Megabalanus rosa* y *Balanus rostratus*, y el cangrejo herradura *Tachypleus tridentatus*), moluscos (abulones como *Haliotis laevis*, ostras, mejillones y liebres de mar) y equinodermos (estrellas de mar como *Asterina pectinifera*, pepinos y erizos de mar). A pesar de la diversidad de especies en las que las lectinas han sido aisladas, de muchas de estas lectinas solo se tienen datos limitados, tales como la descripción de su aislamiento, actividad y especificidad, y en algunos casos la estructura primaria y su actividad biológica; la falta de secuencias e información estructural impide clasificar completamente en familias a muchas de estas lectinas. En invertebrados marinos se han reportado a la fecha lectinas de las familias: tipo C, tipo L, tipo P, tipo R, Calnexina, Intelectinas, y Galectinas; sin embargo, las lectinas de estos organismos son estructuralmente diversas y también difieren de las identificadas en organismos

terrestres no solo desde el punto de vista de la estructura, sino también de aspectos funcionales, y como consecuencia un número significativo de lectinas de invertebrados marinos no pueden asignarse a ninguna de las clases conocidas descritas para lectinas de animales superiores, tal es el caso de las aisladas del cangrejo *T. tridentatus* las cuales están involucradas en los procesos de coagulación de la hemolinfa como mecanismo de defensa y las lectinas de la familia *Mytilidae* (Ang et al., 2014; Chernikov et al., 2013; García-Maldonado et al., 2017).

De algunos organismos se ha logrado la caracterización de más de una lectina, tal es el caso de cuatro lectinas de *Cucumaria echinata* dependientes de Ca^{2+} específicas para galactosa/GalNAc (CEL I, II, III y IV)77; cuatro lectinas dependientes de Ca^{2+} de *Stichopus japonicus* específicas de ácidos urónicos (SPL-1), GalNAc (SPL-2, SJL-I) y lactosa/melibiosa (SJL-II)(Unno et al., 2018) y dos lectinas de *Holothuria grisea*, HGA con actividad antiinflamatoria y HGA-2 (de Melo et al., 2014; Moura et al., 2013). De la esponja tropical *Cliona varians* se aisló CvL-1, una lectina tetramérica de subunidades de 28 kDa unidas por puentes disulfuro que se une a galactosa y tiene efecto citotóxico sobre bacterias patógenas Gram positivas, como *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (Moura et al., 2015), y CvL-2 una lectina trimérica con especificidad por galactósidos (Moura et al., 2015).

El análisis de lectinas aisladas de esponjas marinas ha demostrado que varias de ellas tienen subunidades unidas por puentes disulfuro, como *Cinachyrella alloclada* (Atta et al., 1989), *Pellina semitubulosa* (Engell et al., 1992) y *Cliona varians* (Moura et al., 2006). Otras lectinas oligoméricas, cuyas subunidades están unidas mediante puentes disulfuro son la lectina aislada de *Craniella australiensis* (CAL), una proteína trimérica de 54 kDa en solución que está compuesta por subunidades idénticas de 18 kDa; y la lectina PjLec aislada de la hemolinfa del camarón *Penaeus japonicus*, una proteína dodecamérica de 452 kDa en solución compuesta por subunidades de 37 kDa de peso molecular, que muestra especificidad por ManNAc y Neu5A, y la cual tiene un amplio espectro de actividades de aglutinación bacteriana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluidas dos especies de *Vibrio* (Yang et al., 2007).

La oligomerización de lectinas mediada por interacciones no covalentes también ha sido reportada. Tal es el caso de la lectina CaL de la esponja *Cinachyrella apion*, una proteína que en solución se encuentra como un octámero formado por subunidades de 15.5 kDa (Medeiros et al., 2010); la

lectina de la esponja *Haliclona cratera* que forma dímeros en solución y muestra especificidad por Gal y GalNAc (Pajic et al., 2002); la lectina de la ostra *Pinctada fucata martensii* que en solución se encuentra formando oligómeros de aproximadamente 22 subunidades idénticas de un peso molecular de 20 kDa (Suzuki & Mori, 1989); la lectina CCL de la esponja *Chondrilla caribensis* que es una proteína homotetramérica formada por subunidades de 15.4 kDa (Marques et al., 2018); la taquilectina-4 del cangrejo de herradura, una glicoproteína oligomérica de 470 kDa compuesta de 15-16 subunidades de 30 kDa y que tiene especificidad por L-Fuc y Neu5A (Saito et al., 1997); y la lectina aislada de la ostra *Pteria penguin* (PPL), la cual es un monómero de 21 kDa y, mediante experimentos de dispersión dinámica de la luz se reveló que forma un dímero unido no covalentemente a una concentración de NaCl 500 mM, a esta concentración de sal PPL mostró una actividad de aglutinación bacteriana 16 veces mayor en comparación con su actividad de aglutinación a 150 mM NaCl, por lo que estos resultados indican que PPL aumenta su actividad aglutinante por dimerización. A pesar de que se han reportado una gran cantidad de lectinas oligoméricas en invertebrados marinos, la información con la que se cuenta se limita a estimar el número de subunidades que forman los oligómeros en solución mediante cromatografía de exclusión molecular y análisis SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras, mientras que la información estructural y funcional relacionada con los arreglos cuaternarios de estas lectinas es carente.

En la esponja de mar *Cinachyrella sp.* Se encuentra una lectina que se une a N-acetilactosamina y funciona como un agente que hace metástasis, por lo que funciona para diferentes tipos de cáncer, incluidos los gliomas. La lectina presenta una estructura cuaternaria formada por un dímero de dímeros que es estabilizado por un puente disulfuro inusual, entre dos cisteínas adyacentes. Este puente crea una vuelta cerrada en la cadena polipeptídica, que permite cambios conformacionales, dependiente del potencial de óxido – reducción. Dos puentes de hidrógeno de la cadena principal unen la interfaz, pero el resto de los residuos son altamente hidrofóbicos. En este caso, crea un motivo similar a un agujero de dona, de 18 Å. Cada protómero presenta un sitio de unión a carbohidrato, el cual muestra una orientación contraria (Freymann et al., 2012).

d) Guía de trabajo para el aislamiento de lectinas en pepinos de mar del caribe guatemalteco**i) Protocolo general para la obtención de una lectina a partir de un extracto de un organismo marino**

El organismo se debe homogenizar con suficiente amortiguador de fosfatos 50 mM, NaCl 150 mM (PBS) a un pH fisiológico, generalmente se utiliza 7-8, el más común es 7.4, adicionando 1 mM de fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF) a 4°C (en hielo), estas condiciones son para inhibir proteasas y evitar la degradación de proteínas. La homogenización del organismo se puede realizar con un procesador de alimentos, ya la fuerza es suficiente para romper tejidos más no células. Los pulsos se llevan a cabo cada 5 s mientras se deja reposar 5 s, para evitar el calentamiento de la solución y la presencia de burbujas que puedan favorecer la precipitación de las proteínas. La mezcla se centrifuga a 16,000 g durante 1 hora a 4°C (puede ser desde 12,000 hasta 20,000 g). El precipitado se desecha y el sobrenadante se debe filtrar mínimo por 0.45 µm para evitar impurezas en la columna.

La mezcla se hace pasar por una resina dependiendo del ligando que se espera reconozca, para purificar mediante cromatografía de afinidad. La resina se tiene que equilibrar previamente con el amortiguador PBS filtrado (al menos 10 volúmenes). La fracción unida a la resina, se eluye con PBS que contenga 250 mM del azúcar de la resina, por ejemplo, si se utiliza una resina D-Galactosa, es conveniente eluir con una solución de PBS con D-Gal 250 mM (al menos 3 volúmenes), midiendo su absorbancia a 280 nm en el UV-vis en todo momento. La fracción eluida y que presenta absorbancia a 280 nm, se dializa con el amortiguador PBS utilizando una membrana de corte menor al peso de la proteína, la más utilizada es de 3.5 kDa para eliminar el azúcar, realizando recambios cada 2 horas durante al menos 16 horas. La pureza de la lectina se determina por electroforesis SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida, que puede ser del 12 al 16%.

ii) Evaluación de la actividad hemaglutinante de una lectina

Para evaluar la actividad hemaglutinante de una lectina es posible eritrocitos de conejo formalinizados (ECF), que se prepararon siguiendo el protocolo descrito por Fragkiadakis (2000) de microtitulación de 96 pozos con fondo en forma de “U”, en las cuales, se colocan 50 µL del amortiguador PBS en cada uno de los pozos. Inmediatamente, en el primero pozo de la fila se

añaden 50 μL de la lectina y se realizan diluciones dobles seriadas hasta el penúltimo pozo, desechando la última dilución en el último pozo. Finalmente, se añaden 50 μL de una suspensión al 2% v/v de ECF en 0.9% de NaCl, 0.05% NaN_3 . La placa se agita suavemente durante 10 min y después de 2 horas se determina el último pozo donde se observa actividad hemaglutinante. Una solución 1 mg/mL de aglutinina de *Triticum vulgaris* (WGA) se utilizó como control positivo y el amortiguador PBS como control negativo utilizando 50 μL de ambos para realizar las diluciones. El título hemaglutinante se reporta como el inverso de la última dilución donde existe actividad aglutinante visible (UAH) mientras que la actividad hemaglutinante específica es el título hemaglutinante entre la cantidad de proteína (mg) en el último pozo donde presentó actividad (UAH/mg).

iii) Protocolo para la formalización de eritrocitos de conejo

Es necesario recolectar sangre de un conejo en 2 litros de una solución de NaCl 0.9 % para homogenizar la suspensión, mantener a 4°C desde la recolección hasta su uso.

Centrifugar a 1,000 g durante 20 min, repitiendo este paso las veces que sea necesaria hasta observar un sobrenadante transparente. Una vez alcanzado este paso, se suspende con la menor cantidad de amortiguador de fosfatos 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4, lo suficiente para poder colectar y trasvasar los eritrocitos a un recipiente elongado, de preferencia una probeta.

Preparar una solución de formaldehído al 37%, pH 5.0, ajustar con un amortiguador de fosfatos 0.7 M a pH 7.0.

Colocar dicha solución de formaldehído en una membrana de diálisis de corte 12.5 kDa, tener cuidado de llenar solo dos terceras partes de la membrana.

En la bolsa de diálisis se colocan 25 mL de solución por cada 100 mL de solución de eritrocitos de conejo, se sumerge en la suspensión y se deja en agitación suave durante 12 h a 4°C, debe utilizarse un agitador magnético pequeño y la velocidad de la parrilla de agitación debe ser mínima, ya que movimientos mecánicos fuertes conducen a la ruptura de las células.

Trascurrido este tiempo, se perfora la membrana de diálisis con ayuda de una aguja, se hacen varios orificios para liberar el formaldehído y que este fluya más rápidamente. El formaldehído ayuda a

una mejor fijación de los azúcares presentes en la superficie de los eritrocitos. Dejar por 36 h a 4°C con agitación lenta.

La solución se centrifuga a 1,000 g por 20 min a 4°C. A las células sedimentadas se les lava con NaCl 0.9% hasta la completa eliminación de formaldehído ya que el sobrenadante se debe observar transparente.

Suspender los eritrocitos en un amortiguador de fosfatos 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4 y 2% de albumina de suero bovino (BSA). Es importante añadir la BSA lentamente, ya que tarda en disolver. Incubar por 24 h a 4°C con agitación suave.

Centrifugar a 1,000 rpm por 20 min, posteriormente lavar con NaCl 0.9% hasta lavar y eliminar el exceso de BSA, esto se logra hasta obtener un sobrenadante transparente. Entre cada uno de los lavados, se puede resuspender las células sedimentadas con ayuda de una micropipeta, pero esto tiene que ser de manera indirecta hasta resuspender.

Una vez eliminado el exceso de BSA, se realiza una solución 20% de ECF con NaCl 0.9% y 0.05% NaN₃, guardar a 4°C hasta su uso. En caso de que los ECF se rompan (es decir que no se vean sedimentados) lavar con esta misma solución a 1,000 g x 20-30 min, hasta que el sobrenadante este transparente y realizar nuevamente la solución al 20%.

Nota: es posible también utilizar eritrocitos de humano frescos, es recomendable tomar la muestra el mismo día a utilizar. La sangre se debe recolectar en un tubo vacutainer con anticoagulante (color lila) ya que contiene EDTA aplicado en las paredes del tubo. La sangre se trasvasa a un tubo falcón con ayuda de 50 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4, centrifugando durante 15 min a 1,500 rpm, el sobrenadante se desecha y el sedimento se lava nuevamente con 50 mL de una solución de NaCl 0.9% a 1,500 rpm durante 15 min, las veces que sean necesarias hasta obtener un sobrenadante transparente. La solución se resuspende para evaluar la cantidad necesaria para crear un sedimento de eritrocitos en cada placa, es decir, se prueban de 50 µL de la suspensión en un pozo y se observa el sedimento para crear la suspensión al 20 %.

11.2 Discusión de resultados

a) Determinación de los pepinos de mar del filo *Equinodermata* y clase *Holothuroidea* de la Bahía de Amatique en el Caribe de Guatemala y su riqueza específica

La composición de la población de pepinos de mar mostró que durante los monitoreos realizados se reporta una especie más de la que reporta Gálvez, (2022), que fue *A. multifidus*, el cual se reportó únicamente en el sitio de Bajo del canal. De forma contrastante, en este estudio se reportan tres especies menos que en el estudio de Avalos-Castillo y colaboradores (2018), quienes reportaron además a *Actinopyga agassizi* (Selenka, 1867), *Holothuria thomasi* (Pawson & Caycedo, 1980) y un individuo no identificado de la familia *Stichopodidae*.

b) Determinación las especies de pepinos de mar del filo *Equinodermata* y clase *Holothuroidea* en dos sitios de la bahía de Amatique en el Caribe de Guatemala y su abundancia relativa

En cuanto a la abundancia por sitio, se pudo observar que existen coincidencias con el estudio de Gálvez (2022) en cuanto a que Languajá es el punto que alberga la mayor cantidad de Holoturoideos. No obstante, existen diferencias entre Bajo del canal y Faro rojo en cuanto a sitios de mayor abundancia. Es importante mencionar en este caso que, el estudio de Gálvez ha sido más intensivo que el realizado durante esta investigación, porque en definitiva es un factor para tomar en cuenta. En comparación con Avalos-Castillo y colaboradores (2018), solo puede observarse que Faro blanco nunca ha sido un sitio de establecimiento de pepino de mar, y que Faro rojo tienen cierta diferencia de abundancia, sin embargo, cabe recalcar que el estudio de 2018 tuvo un mayor esfuerzo de muestreo.

En cuanto a la densidad, Se encontró que existen diferencias en cuanto a las densidades de organismos por 100 metros cuadrados, ya que en el estudio de Gálvez (2022) se reporta una densidad aproximada de 15.3 organismos/100m² en los sitios de Languajá y Faro rojo, mientras que durante estos monitoreos Languajá obtuvo hasta 22.5 organismos/100m². Distintamente, Faro rojo presentó una menor densidad. Las condiciones de muestreo (área evaluada y esfuerzo de muestreo) pueden ser causantes de las diferencias, así como la época, ya que el mes de monitoreo (octubre), coincide con el final de la época de agregaciones reproductivas.

c) Revisión de actividades biológicas de lectinas de invertebrados marinos (con especial enfoque en la clase *Holothuroidea*).

Dado que esta revisión es tipo expositiva, sin sección experimental, no puede contrastarse empíricamente. Sin embargo, es posible indicar que la gran variedad y diversidad, tanto de organismos colectados, como de tipos de lectinas que suelen presentarse en estos organismos, proporciona un marco único en la exploración de moléculas bioactivas nativas con propiedades antivíricas, antifúngicas, antimicrobianas, antibacterianas y con aplicaciones en biomarcación y posiblemente también en el tratamiento del cáncer.

d) Guía de trabajo para el aislamiento de lectinas en pepinos de mar del caribe guatemalteco

El presente protocolo puede ser aplicado específicamente para la extracción de lectinas de pepinos de mar en el caribe guatemalteco, puesto que ha sido adaptado adecuadamente.

11.3 Conclusiones

a) Durante los monitoreos se observó una especie en el área que no se había reportado anteriormente, la cual es *Astichopus multifidus*.

b) Durante los monitoreos se corroboró la presencia de especies que ya habían sido reportadas en investigaciones anteriores incluyendo a *Holothuria mexicana*, *Holothuria floridana* e *Isostichopus badiionotus*.

c) Languajá presentó la mayor densidad de organismos con 22.5 organismos/100m² y es un lugar adecuado en el momento que se decida hacer colectas de material para extracción de lectinas.

d) Es posible llevar a cabo extracciones de lectinas en Guatemala a partir de pepinos de mar del Caribe.

11.4 Recomendaciones

a) El proyecto fue afectado severamente por el cierre de la universidad, por lo que sus objetivos fueron modificados; sin embargo el objetivo original de coleccionar pepinos de mar y extraer lectinas a partir de ellos es realizable.

b) Seguir fomentando el apoyo con instituciones locales como Fundaeco para el desarrollo de actividades de investigación científica en el Caribe de Guatemala.

12 Referencias

- Ali, M. H., & Imperiali, B. (2005). Protein oligomerization: How and why. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 13(17), 5013–5020. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.05.037>
- Amador-Carrillo, S.R. (2017). Taxonomía de los pepinos de mar (Echinodermata: Holothuroidea) de la península de Yucatán y algunos de la University of Miami Deep Sea Expeditions. Tesis de Maestría. El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), México
- Ang, A. S. W., Cheung, R. C. F., Dan, X., Chan, Y. S., Pan, W., & Ng, T. B. (2014). Purification and characterization of a glucosamine-binding antifungal lectin from phaseolus vulgaris cv. Chinese Pinto Beans with antiproliferative activity towards nasopharyngeal carcinoma cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(2), 672–686. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0542-2>
- Avalos-Castillo, C., Ortíz-Aldana, J. R., Polanco-Vásquez, F., Pacay, A. (2018). Estado poblacional del pepino de mar (Clase Holothuroidea) en el Caribe de Guatemala. *Ciencia Tecnología y Salud*, 5(1), 34-42.
- Atta, A. M., Barral-Netto, M., Peixinho, S., & Sousa-Atta, M. L. (1989). Isolation and functional characterization of a mitogenic lectin from the marine sponge *Cinachyrella alloclada*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas*, 22(3), 379—385. <http://europepmc.org/abstract/MED/2804472>
- Breitenbach Barroso Coelho, L. C., Marcelino dos Santos Silva, P., Felix de Oliveira, W., de Moura, M. C., Viana Pontual, E., Soares Gomes, F., Guedes Paiva, P. M., Napoleão, T. H., & dos Santos Correia, M. T. (2018). Lectins as antimicrobial agents. *Journal of Applied Microbiology*, 125(5), 1238–1252. <https://doi.org/10.1111/jam.14055>
- Castillo-Avalos, C., Artíz-Aldana, J. R., Polanco-Vásquez, & Pacay, A. (2018). Estado poblacional del pepino de mar (Clase Holothuroidea) en el Caribe de Guatemala Artículo Científico/Scientific Article. *Ciencia, Tenología y Salud*, 5(June), 16–24.
- Chatterjee, B. P., & Adhya, M. (2013). Lectins with Varying Specificity and Biological Activity from Marine Bivalves. *Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications*, 41–68. <https://doi.org/10.1002/9781118375082.ch3>

- Chernikov, O. v., Molchanova, V. I., Chikalovets, I. v., Kondrashina, A. S., Li, W., & Lukyanov, P. A. (2013). Lectins of marine hydrobionts. *Biochemistry (Moscow)*, 78(7), 760–770. <https://doi.org/10.1134/S0006297913070080>
- Cheung, R. C. F., Wong, J. H., Pan, W., Chan, Y. S., Yin, C., Dan, X., & Ng, T. B. (2015). Marine lectins and their medicinal applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(9), 3755–3773. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6518-0>
- de Melo, A. A., Carneiro, Rô. F., de Melo Silva, W., Moura, R. da M., Silva, G. C., de Sousa, O. V., de Sousa Saboya, J. P., Nascimento, K. S. do, Saker-Sampaio, S., Nagano, C. S., Cavada, B. S., & Sampaio, A. H. (2014). HGA-2, a novel galactoside-binding lectin from the sea cucumber holothuria grisea binds to bacterial cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 64, 435–442. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.12.035>
- Drickamer, K., & Taylor, M. E. (1998). Evolving views of protein glycosylation. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(9), 321–324. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01246-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01246-8)
- Ellis, R. P., Parry, H., Spicer, J. I., Hutchinson, T. H., Pipe, R. K., & Widdicombe, S. (2011). Immunological function in marine invertebrates: Responses to environmental perturbation. *Fish and Shellfish Immunology*, 30(6), 1209–1222. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.03.017>
- Engell, M., Bachmannl, M., Schr, H., Rinkevich, B., Kljajic, Z., Uhlenbruck, G., & Mtillerl, W. (1992). A novel galactose-and arabinose-specific lectin from the sponge Pellina semitubulosa: isolation, characterization and immunobiological properties. In *Biochimie* (Vol. 74).
- Filho, S. M. G., Cardoso, J. D., Anaya, K., do Nascimento, E. S., de Lacerda, J. T. J. G., Mioso, R., Gadelha, T. S., & de Almeida Gadelha, C. A. (2015). Marine sponge lectins: Actual status on properties and biological activities. *Molecules*, 20(1), 348–357. <https://doi.org/10.3390/molecules20010348>
- Fragkiadakis, G. A. (2000). Isolation of lectins from hemolymph of decapod crustaceans by adsorption on formalinized erythrocytes. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 44(1–2), 109–114. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(00\)00089-0](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(00)00089-0)

- Freymann, D. M., Nakamura, Y., Focia, P. J., Sakai, R., & Swanson, G. T. (2012). Structure of a tetrameric galectin from *Cinachyrella* sp. (ball sponge). *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 68(9), 1163–1174. <https://doi.org/10.1107/S0907444912022834>
- Fujita, T. (2002). Evolution of the lectin - Complement pathway and its role in innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 2(5), 346–353. <https://doi.org/10.1038/nri800>
- Gálvez, G. (2022). Abundancia y Distribución de Pepino de Mar en el Caribe Guatemalteco. Informe final. Fundación para el Eco Desarrollo y la Conservación (FUNDAECO), Programa Mares Vivos. Guatemala.
- García-Maldonado, E., Cano-Sánchez, P., & Hernández-Santoyo, A. (2017). Molecular and functional characterization of a glycosylated Galactose-Binding lectin from *Mytilus californianus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 66, 564–574. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.057>
- Garratt, R. C., & Bachega, F. R. (2013). Encyclopedia of Biophysics. In *Encyclopedia of Biophysics*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-16712-6>
- Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2000). *STRUCTURAL SYMMETRY AND PROTEIN FUNCTION*. www.annualreviews.org
- Gotte, G., & Libonati, M. (2014). Protein Oligomerization. *Oligomerization of Chemical and Biological Compounds*. <https://doi.org/10.5772/57489>
- Gupta, G. S., Gupta, A., & Gupta, R. K. (2012). Animal lectins: Form, function and clinical applications. *Animal Lectins: Form, Function and Clinical Applications*, 9783709110, 1–1108. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1065-2>
- Gupta, G., & Surolia, A. (2007). Collectins: Sentinels of innate immunity. *BioEssays*, 29(5), 452–464. <https://doi.org/10.1002/bies.20573>
- Hatakeyama, T., Kamiya, T., Kusunoki, M., Nakamura-Tsuruta, S., Hirabayashi, J., Goda, S., & Unno, H. (2011). Galactose recognition by a tetrameric C-type lectin, CEL-IV, containing the EPN carbohydrate recognition motif. *Journal of Biological Chemistry*, 286(12), 10305–10315. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.200576>

- Honda, S., Akiba, T., Kato, Y. S., Sawada, Y., Sekijima, M., Ishimura, M., Ooishi, A., Watanabe, H., Odahara, T., & Harata, K. (2008). Crystal structure of a ten-amino acid protein. *Journal of the American Chemical Society*, *130*(46), 15327–15331. <https://doi.org/10.1021/ja8030533>
- Iordache, F., Ionita, M., Mitrea, L., Fafaneata, C., & Pop, A. (2015). Antimicrobial and Antiparasitic Activity of Lectins. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *16*(2), 152–161. <https://doi.org/10.2174/138920101602150112151907>
- Keller, J. I., Ballif, B. A., St Clair, R. M., Vincent, J. J., Monroy, M. C., & Stevens, L. (2017). Chagas disease vector blood meal sources identified by protein mass spectrometry. *PLoS ONE*, *12*(12), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189647>
- Lakhtin, V. M., Lakhtin, M. v., Pospelova, V. v., & Shenderov, B. A. (2007). Lectins of lactobacilli and bifidobacteria. II. Probiotic lectins of lactobacilli and bifidobacteria as possible signal molecules regulating inter- and intrapopulation relationships between bacteria and between bacteria and the host. In *Microbial Ecology in Health and Disease* (Vol. 19, Issue 3, pp. 153–157). <https://doi.org/10.1080/08910600701538257>
- Lepenies, B., & Lang, R. (2019). Editorial: Lectins and Their Ligands in Shaping Immune Responses. *Frontiers in Immunology*, *10*(October), 9–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02379>
- Liao, J. H., Chien, C. T. H., Wu, H. Y., Huang, K. F., Wang, I., Ho, M. R., Tu, I. F., Lee, I. M., Li, W., Shih, Y. L., Wu, C. Y., Lukyanov, P. A., Hsu, S. T. D., & Wu, S. H. (2016). A Multivalent Marine Lectin from *Crenomytilus grayanus* Possesses Anti-cancer Activity through Recognizing Globotriose Gb3. *Journal of the American Chemical Society*, *138*(14), 4787–4795. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b00111>
- Marques, D. N., Almeida, A. S. de, Sousa, A. R. de O., Pereira, R., Andrade, A. L., Chaves, R. P., Carneiro, R. F., Vasconcelos, M. A. de, Nascimento-Neto, L. G. do, Pinheiro, U., Videira, P. A., Teixeira, E. H., Nagano, C. S., & Sampaio, A. H. (2018). Antibacterial activity of a new lectin isolated from the marine sponge *Chondrilla caribensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, *109*, 1292–1301. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.140>

- McKee, T., McKee, J., Araiza Martínez, M., & Hurtado Chong, A. (2014). *Bioquímica* (M. M.-H. Interamericana., Ed.; Third).
- Medeiros, D. S., Medeiros, T. L., Ribeiro, J. K. C., Monteiro, N. K. V., Migliolo, L., Uchoa, A. F., Vasconcelos, I. M., Oliveira, A. S., de Sales, M. P., & Santos, E. A. (2010). A lactose specific lectin from the sponge *Cinachyrella* apion: Purification, characterization, N-terminal sequences alignment and agglutinating activity on *Leishmania* promastigotes. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 155(3), 211–216. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.10.016>
- Ministerio de Ambiente y Recursos Naturales, Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo y Rainforest Alliance. (2020). Diagnóstico de la zona marino-costera del Caribe de Guatemala. Documento para el diseño y desarrollo de un sistema de monitoreo, evaluación y reporte (MER) del Componente de Adaptación al Cambio Climático del Sistema Nacional de Información sobre Cambio Climático.
- Moura, R. da M., Aragão, K. S., de Melo, A. A., Carneiro, R. F., Osório, C. B. H., Luz, P. B., de Queiroz, A. F. S., dos Santos, E. A., de Alencar, N. M. N., & Cavada, B. S. (2013). *Holothuria grisea* agglutinin (HGA): The first invertebrate lectin with anti-inflammatory effects. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 27(6), 656–668. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2012.01073.x>
- Moura, R. M., Melo, A. A., Carneiro, R. F., Rodrigues, C. R. F., Delatorre, P., Nascimento, K. S., Saker-Sampaio, S., Nagano, C. S., Cavada, B. S., & Sampaio, A. H. (2015). Hemagglutinating/Hemolytic activities in extracts of marine invertebrates from the Brazilian coast and isolation of two lectins from the marine sponge *Cliona varians* and the sea cucumber *Holothuria grisea*. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 87(2), 973–984. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201520140399>
- Moura, R. M., Queiroz, A. F. S., Fook, J. M. S. L. L., Dias, A. S. F., Monteiro, N. K. V., Ribeiro, J. K. C., Moura, G. E. D. D., Macedo, L. L. P., Santos, E. A., & Sales, M. P. (2006). CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. *Comparative Biochemistry and Physiology - A*

- Molecular and Integrative Physiology*, 145(4), 517–523.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.08.028>
- Mrázková, J., Malinovská, L., & Wimmerová, M. (2019). Microscopy examination of red blood and yeast cell agglutination induced by bacterial lectins. *PLoS ONE*, 14(7), 1–23.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220318>
- Pajic, I., Kljajic, Z., Dogovic, N., Sladic, D., Juranic, Z., & Gasic, M. J. (2002). A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity. In *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* (Vol. 132).
- Peumans, W. J., & van Damme, E. J. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, 109(2), 347–352. <https://doi.org/10.1104/pp.109.2.347>
- Rinderle, S. J., Goldstein, I. J., Matta, K. L., & Ratcliffe, R. M. (1989). Isolation and characterization of amaranthin, a lectin present in the seeds of *Amaranthus caudatus*, that recognizes the T- (or cryptic T)-antigen. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(27), 16123–16131.
[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)71595-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)71595-0)
- Rivera-Téllez, E., López-Segurajáuregui, G., Fernández, T., Vázquez B., Mosig, P. (2021). Guía de identificación de los pepinos de mar de interés comercial en México. CONABIO. México
- Saito, T., Hatada, M., Iwanaga, S., & Kawabata, S. I. (1997). A newly identified horseshoe crab lectin with binding specificity to O- antigen of bacterial lipopolysaccharides. *Journal of Biological Chemistry*, 272(49), 30703–30708. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.49.30703>
- Saravia-Otten, P., Hernández, R., Marroquín, N., García, G., Mérida, M., Cruz, S., Orozco, N., Cáceres, A., & Gutiérrez, J. M. (2017). Inhibición de los efectos coagulante, fosfolipasa A2 y proteolítico del veneno de *Bothrops asper* por plantas usadas tradicionalmente en Centroamérica. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 4(2), 203–216.
<https://doi.org/10.36829/63cts.v4i2.355>
- Sharon, N. (2006). Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1760(4), 527–537.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.12.008>

- Sugawara, H., Kusunoki, M., Kurisu, G., Fujimoto, T., Aoyagi, H., & Hatakeyama, T. (2004). Characteristic recognition of N-acetylgalactosamine by an invertebrate C-type lectin, CEL-I, revealed by x-ray crystallographic analysis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(43), 45219–45225. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408840200>
- Suzuki, T., & Mori, K. (1989). A galactose-specific lectin from the hemolymph of the pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry*, 92(3), 455–462. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(89\)90116-8](https://doi.org/10.1016/0305-0491(89)90116-8)
- Taracena, M. L., Hunt, C. M., Benedict, M. Q., Pennington, P. M., & Dotson, E. M. (2019). Downregulation of female doublesex expression by oral-mediated RNA interference reduces number and fitness of *Anopheles gambiae* adult females. *Parasites and Vectors*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3437-4>
- Unno, H., Goda, S., & Hatakeyama, T. (2014). Hemolytic lectin cel-iii heptamerizes via a large structural transition from α -helices to a β -barrel during the transmembrane pore formation process. *Journal of Biological Chemistry*, 289(18), 12805–12812. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.541896>
- Unno, H., Nakamura, A., Mori, S., Goda, S., Yamaguchi, K., Hiemori, K., Tateno, H., & Hatakeyama, T. (2018). Identification, Characterization, and X-ray Crystallographic Analysis of a Novel Type of Lectin AJLec from the Sea Anemone *Anthopleura japonica*. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29498-0>
- Vasta, G. R., Mario Amzel, L., Bianchet, M. A., Cammarata, M., Feng, C., & Saito, K. (2017). F-Type Lectins: A highly diversified family of fucose-binding proteins with a unique sequence motif and structural fold, involved in self/non-self-recognition. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 8, Issue NOV). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01648>
- Yang, H., Luo, T., Li, F., Li, S., & Xu, X. (2007). Purification and characterisation of a calcium-independent lectin (PjLec) from the haemolymph of the shrimp *Penaeus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 22(1), 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.03.015>

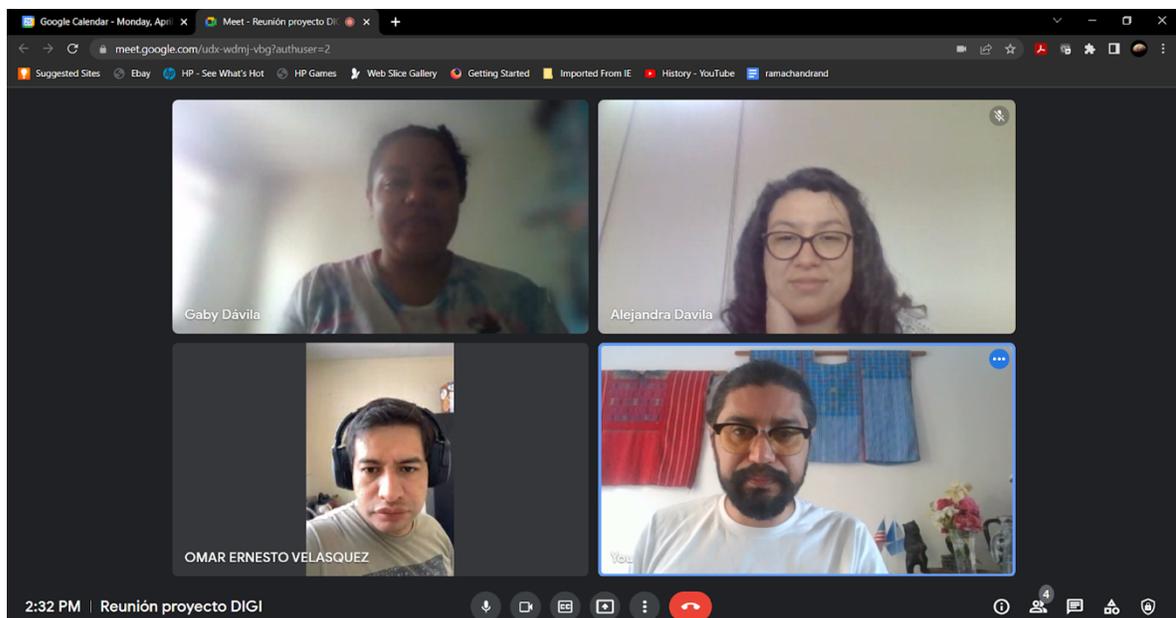
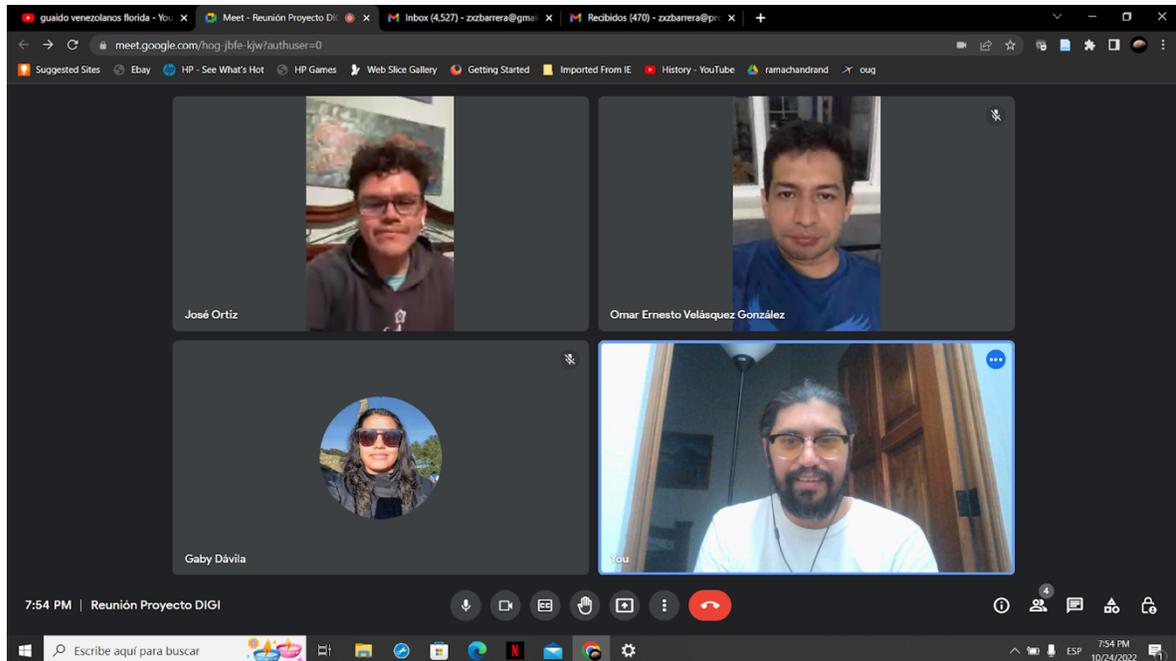
Zaporozhets, T. S., & Besednova, N. N. (2020). Biologically active compounds from marine organisms in the strategies for combating coronaviruses. *AIMS Microbiology*, 6(4), 470–494. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020028>

13 Apéndice

Apéndice I

Figura 24

Reuniones virtuales del grupo de investigación debido al cierre de la universidad



14 Aspectos éticos y legales (si aplica)

No aplica.

15 Vinculación

Fundación para el codesarrollo y la conservación -Fundaeco-

Colaboración entre dos unidades de la Universidad de San Carlos de Guatemala: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia; y Centro de Estudios de Mar y Acuicultura.

16 Estrategia de difusión, divulgación y protección intelectual

La presente investigación será presentada al menos en los Congresos Nacionales e Internacionales de Química. Se espera tener al final del proyecto información suficiente para realizar una publicación indizada en el área de productos naturales marinos o similar. Además, será utilizada tanto en los cursos de la Facultad de Farmacia como en el CEMA. Se realizará la publicación de un documento con fines pedagógicos con los resultados publicados y los fundamentos bioquímicos y metodológicos.

17 Aporte de la propuesta de investigación a los ODS:

Los ODS más directamente impactados por esta investigación son: 3 Salud y bienestar, 12 Producción y consumo responsable. Esto se debe a que se busca ver la posibilidad de contar con productos naturales de origen marino para el tratamiento de enfermedades; mientras que también se proponen vías para llevar a cabo dicha investigación de la manera que genere el menor impacto posible en la población de pepinos de mar del Caribe de Guatemala.

Informe final proyecto de investigación 2022

Dirección General de Investigación –DIGI-

18 Orden de pago final

Nombres y apellidos	Categoría (investigador /auxiliar)	Registro de personal	Procede pago de mes (Sí / No)	Firma
Licda. Ana Gabriela Dávila Recinos	Investigadora	20160594	Sí	
Licda. María Alejandra Dávila Tejeda	Investigadora	20220853	Sí	

19 Declaración del Coordinador del proyecto de investigación

El Coordinador de proyecto de investigación con base en el *Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación financiados por medio del Fondo de Investigación*, artículos 13 y 20, deja constancia que el personal contratado para el proyecto de investigación que coordina ha cumplido a satisfacción con la entrega de informes individuales por lo que es procedente hacer efectivo el pago correspondiente.

<p>Christian Daniel Farfán Barrera</p>	
Nombre del coordinador del proyecto de investigación	Firma
<p>Fecha: 17/02/2023</p>	

Informe final proyecto de investigación 2022

Dirección General de Investigación –DIGI-

20 Aval de la directora del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario

De conformidad con el artículo 13 y 19 del *Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación financiados por medio del Fondo de Investigación* otorgo el aval al presente informe mensual de las actividades realizadas en el proyecto (escriba el nombre del proyecto de investigación) en mi calidad de (indique: Director del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario), mismo que ha sido revisado y cumple su ejecución de acuerdo a lo planificado.

<p>Vo.Bo. Dra. María Eunice Enríquez Cottón</p> <p>Directora</p> <p>Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas</p>	<p> </p> <p>Dra. María Eunice Enríquez Cottón Directora</p> <p>Firma</p>
<p>Fecha: 17/02/2023</p>	

Informe final proyecto de investigación 2022

Dirección General de Investigación –DIGI-

21 Visado de la Dirección General de Investigación

<p>Vo.Bo. Dra. Hilda Valencia de Abril Coordinadora Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud -PUIIS-</p>	 <p>Firma</p>
<p>Fecha: 17/02/2023</p>	

<p>Vo.Bo. Ing. Agr. MARN Rufino Salazar Coordinador General de Programas Universitarios de Investigación</p>	 <p>Firma Ing. MARN Rufino Salazar Pérez Coordinador General de Programas de Investigación, DIGI-OSAC</p>
<p>Fecha: 17/02/2023</p>	