

24
38



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

OBTENCION DE Concanavalina-a- A PARTIR
DEL FRIJOL Canavalia ensiformis

ENRIQUE TONATIUH GUEMEZ SANDOVAL

CARRERA: INGENIERO QUIMICO

1 9 8 6



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

Resumen	10
Introducción	12
Generalidades	16
Materiales y Métodos	31
Resultados	53
Discusión y Conclusiones	75
Bibliografía	87

RESUMEN

R E S U M E N

La Concanavalina A es una proteína aislada del frijol Canavalia ensiformis, usada ampliamente en los laboratorios de investigación científica de México y el Mundo. En este trabajo se hace un estudio sobre la factibilidad de producir la mencionada proteína en los laboratorios del país que la utilicen con frecuencia, con ventajas como la de evitar la salida de divisas por concepto de su importación y la de servir como material didáctico en la preparación de jóvenes bioquímicos.

Los métodos empleados fueron el clásico de Sumner basado en precipitaciones selectivas con sales neutras hasta lograr la Con A cristalizada y el segundo, mucho mas moderno, basado en la afinidad selectiva de la Con A a polímeros de carbohidratos usando el comercial de Sephadex. Las pruebas para determinar actividad y fuerza de las preparaciones de Con A, se basaron en hemaglutinaciones con eritrocitos de varias especies animales, precipitaciones específicas con glucógeno, efecto de algunos metales en la actividad aglutinante e inhibiciones específicas.

INTRODUCCION

I N T R O D U C C I O N

Existe en el país una demanda de reactivos biológicos, cuyo consumo se ha visto incrementado en los últimos años en laboratorios e instituciones de los sectores público y privado dedicados a la investigación. Esta demanda se cubre en su totalidad en el extranjero, lo cual representa una salida de divisas continua y creciente, que podría ser disminuída por lo menos en parte por el aparato productivo nacional o por los mismos laboratorios que consumen dichos reactivos, ya que la tecnología y metodología son conocidos y están al alcance de la mano, contamos con materia prima en abundancia y personal calificado nacional.

Debido a la actual situación de crisis económica por la que atraviesa el país, en donde hay por un lado carencia de divisas, que día a día se encarecen y por otro lado la desviación de recursos hacia actividades prioritarias diferentes de las científicas, que junto con un marcado retraso en lo que respecta a la investigación tanto científica como tecnológica, acentúan nuestras carencias, se hace necesario ahora mas que nunca tratar de generar o adaptar tecnologías adecuadas a las condiciones del país, que le proporcionen

los medios para cubrir sus necesidades aprovechando integralmente los recursos naturales propios, evitando de este mismo modo la fuga de divisas por concepto de importación de productos y tecnologías.

Dentro de la investigación científica, existen campos como el de la medicina, en varias de sus ramas, la bioquímica, la biología y otros, que dependen en gran medida de una amplia gama de reactivos que no son producidos en el país, debido a que, como ya dijimos, no hay investigación encaminada a generar o adaptar tecnologías para su producción a pesar de contar con el equipo, la materia prima y la mano de obra calificada. El equipo habitual de un laboratorio dedicado a la investigación en el área de bioquímica, puede ser utilizado en un momento dado para la producción de algunos reactivos de uso común en el mismo, los cuales se pueden obtener a un bajo costo, alta calidad y disponibilidad inmediata. Esta producción para autoconsumo, aún cuando no desplazaría completamente a los reactivos comerciales, representa una alternativa para proporcionar el material requerido, con las características antes mencionadas y sin afectar las actividades sustantivas de investigación; así mismo, dentro de esta producción se podría considerar un sobrante destinado

al intercambio de reactivos con laboratorios que tengan proyectos de investigación similares, o bien para obtener otro tipo de material como bibliografía, equipo y accesorios, especímenes biológicos y otros.

Dentro de este marco de referencia, se propone en el presente trabajo, la producción a nivel laboratorio, de Concanavalina A, una lectina de uso común en los la laboratorios antes mencionados y que creemos es un buen ejemplo de lo que se podría hacer con otros reactivos en un esfuerzo por paliar la crítica situación por la que atraviesa la investigación científica en México.

GENERALIDADES

LAS LECTINAS

Las lectinas son proteínas de origen no inmune, que tienen la capacidad de aglutinar células y/o precipitar polisacáridos y glucoconjugados. Fueron detectadas por primera vez, hace casi un siglo, cuando Stillmark reportó la aglutinación de eritrocitos por extractos salinos de algunas plantas.

En 1888 este investigador, estudiando los efectos tóxicos del extracto de las semillas de Ricinus comunis, encontró que éste aglutinaba glóbulos rojos, tanto humanos como de otras especies animales. Al estudiar el fenómeno mas a fondo, encontró una proteína altamente tóxica y con la capacidad de aglutinar eritrocitos, a la que llamó Ricina. Poco tiempo después de este descubrimiento, Hellin, que trabajaba en la misma Universidad que Stillmark, encontró otra lectina en las semillas de Abrus precatorius, a la que nombró Abrina.

Estas dos proteínas llamaron la atención del médico alemán Paul Ehrlich, quien en la última década del siglo pasado sentó las bases de la inmunología, usando a la ricina y a la abrina en sus experimentos en lugar de las toxinas bacterianas que eran de uso común en esa época.

Años después, Landsteiner y Raubitschek, observaron que la actividad hemaglutinante de los extractos obtenidos a partir de diferentes vegetales variaba según la especie de las que se obtenían los glóbulos rojos, lo que sugería una especificidad de las lectinas.

En 1919, Sumner obtiene la Concanavalina A, aislada a partir del frijol Canavalia ensiformis, que fué la primera aglutinina obtenida en forma cristalina (47). Sin embargo a pesar de haber sido aislada en ese año, no fué sino hasta 1936 cuando Sumner y Howell encontraron que la hemaglutinina de Canavalia ensiformis y la Concanavalina A eran la misma proteína, además observaron que esta reaccionaba con el glucógeno precipitándolo y que la aglutinación de eritrocitos, era inhibida con azúcares, lo cual sugería que la aglutinación se debía a la interacción entre la Concanavalina A y los carbohidratos presentes en la membrana celular (48).

En 1949 Boyd y Reguera descubren la existencia de aglutininas específicas para grupo sanguíneo humano, al encontrar que el extracto del frijol Phaseolus limensis aglutinaba preferentemente glóbulos rojos del grupo "A". En 1952 Watkins y Morgan confirman la suposición de que la aglutinación se debe a la interacción lectina-carbohidrato celular con estudios de inhibición de aglutinación y encontraron la relación que existía entre

los carbohidratos y los grupos sanguíneos y concluyeron que la α -N-acetil galactosamina es el determinante antigénico del grupo A y la L-fucosa del grupo O (52). En el caso de las lectinas no específicas para grupo sanguíneo, determinaron que estas interactuaban con receptores carbohidrato diferentes de los determinantes de grupo sanguíneo del Sistema ABO y que estaban presentes en todos los eritrocitos.

En 1954 Boyd y Sharpleigh, basándose en la capacidad de algunas aglutininas de reaccionar específicamente con los distintos grupos sanguíneos humanos propusieron el nombre de lectinas, derivado del latín Legere, que significa escoger, para agrupar en un sólo nombre a todas las proteínas con las características antes descritas (6). Hasta ese momento, las lectinas eran manejadas con diferentes nombres como aglutininas, hemaglutininas, faseolinas (por haber sido aisladas a partir de frijoles del género Phaseolus), fitohemaglutininas por ser obtenidas de plantas, proteínas tipo anticuerpo por la semejanza de sus propiedades con las proteínas de esa otra clase; sin embargo, ninguno de estos nombres agrupaba a todas las lectinas dado que se referían a una propiedad o a un origen en particular. El nombre de lectinas fué adoptado por la mayoría de la

comunidad científica dedicada a su estudio, a pesar de que existen algunos grupos que todavía hoy no están de acuerdo con esta nomenclatura y definición (14)

El descubrimiento de lectinas específicas para grupo sanguíneo humano, dió un gran impulso a su estudio, ya que se vió la posibilidad de usarlas como reactivos para tipificación sanguínea en el laboratorio clínico; sin embargo, los descubrimientos que propiciaron el uso común de las lectinas en los laboratorios de investigación científica, se produjeron casi diez años mas tarde, uno en 1960 y otro en 1963,

En 1960, Nowell demostró que la lectina obtenida del frijol Phseolus vulgaris, conocida comunmente como fitohemaglutinina (PHA) tenía un efecto mitogénico en linfocitos, esto es, al interaccionar la lectina con los linfocitos, éstos son estimulados y de ser células en reposo pasan a ser linfoblastos, células en crecimiento que finalmente se dividen por mitosis. Este descubrimiento abrió una amplia gama de posibilidades, principalmente para estudios cromosómicos.

Posteriormente en 1963, Aub descubre que un extracto de germen de trigo que él pensaba contenía una lipasa, aglutinaba células cancerosas. Al analizar mejor este extracto, encontró que una lectina (WGA), era la

causante de esa aglutinación. A partir de esta observación, se empezó a experimentar con otras lectinas y se encontró la misma propiedad en algunas que eran de mas facil obtención, lo que propició como ya dijimos, que su uso se extendiera en los laboratorios de investigación en el área biológica.

Debido a las propiedades descritas anteriormente, las lectinas son ampliamente usadas en la actualidad en diversos campos de la medicina, como la genética, la oncología, el laboratorio clínico y otros; y en investigaciones relacionadas con el aislamiento de glucoproteínas, el estudio de la estructura de la membrana celular, la separación de poblaciones de células y áreas afines de la bioquímica y la biología.

Revisiones mas a plias sobre la historia y generalidades de las lectinas pueden ser encontradas en (28), (29), (41) y (33).

T A B L A I

PRINCIPALES EFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS LECTINAS

- Aglutinación de eritrocitos y otro tipo de células.
- Estimulación mitogénica de linfocitos.
- Inhibición de la fagocitosis.
- Inhibición de la formación de vacuolas en macrófagos.
- Efecto inmunosupresor.
- Toxicidad.
- Inhibición del crecimiento y migración de células tumorales.
- Inhibición de la liberación de insulina en islotes pancreáticos.
- Efecto tipo insulina en células grasas.
- Inhibición del crecimiento de hongos.

Tabla tomada de (28). Lis, H. y N. Sharon. Lectins: Their Chemistry and Application to Immunology, en the Antigens. Ed. M. Sela. Academic Press, New York (1973).

LA CONCAVALINA A

La Concanavalina A (Con A) es una lectina que se extrae de la semilla de la leguminosa Canavalia ensiformis, conocida como Jack bean o frijol diente de caballo, en la que se encuentra en una proporción alta, llegando a constituir hasta el 2 o 3% en peso de la semilla, dependiendo esto del origen de las mismas (48, 2). Fué aislada por Sumner en 1919 (47) quien la obtuvo en forma cristalina, pero no fué sino hasta 1936 cuando se le identificó con la hemaglutinina de C. ensiformis (48).

La Con A aglutina eritrocitos de diversas especies como caballo, perro, gato, conejo, cobayo y rata (48), algunas bacterias (48), células embriónicas, espermatozoides, algunos virus, linfocitos (10), timocitos (7), hemocitos (54), blastocitos (11) y ciertos tipos de células transformadas y malignas mientras que no aglutina a sus contrapartes normales (23) y precipita ciertos tipos de α -glucanos, como glucógenos, amilopectinas, dextranes y mananes (15), lipopolisacáridos (18), vesículas de glucolípidos-fosfolípidos (50) y glucoproteínas (17) en una reacción similar en muchos aspectos a la reacción antígeno-anticuerpo (15).

Ha sido usada además entre otras cosas para la identificación de glucoproteínas (19), para el estudio de fenómenos membranales como permeabilidad iónica (13), potencial de membrana (12) y actividad enzimática (34); para estudiar la movilidad de los receptores superficiales en distintos tipos de células (21), la actividad enzimática en células transformadas (9), para el estudio del proceso de activación de las plaquetas (39) y para el desarrollo de ensayos inmuno-enzimáticos (32).

La interacción Concanavalina A - carbohidrato es muy específica, debiendo tener estos últimos residuos α -D-glucopiranosil, α -D-manopiranosil, β -Dfructofuranosil o α -D-arabinofuranosil en la terminal no reductora de la cadena polisacárida (15). El sitio de unión de carbohidrato de la Concanavalina A es complementario a los grupos hidroxilo C-3, C-4 y C-6 de los anillos α -D-glucopiranosil y α -D-manopiranosil (43). Los anillos de 5 miembros, aún cuando también reaccionan con la Con A, interaccionan mucho más débilmente que los anillos piranosidos. Con estudios de inhibición de la interacción polisacárido-Concanavalina A se ha demostrado que los mejores inhibidores son el metil α -D-manopiranosido y el metil α -D-glucopiranosido, siendo también inhibidores aunque en menor escala manosa, glucosa, fructosa, arabinosa y algunos disacáridos como maltosa e isomaltosa (43).

La Concanavalina A es una proteína constituida por protómeros de P.M. 26 000 (33) de una sola cadena polipeptídica compuesta de 237 aminoácidos (51) que tiene un sitio de unión para carbohidrato, uno para Mn^{2+} y 1 para Ca^{2+} y ambos iones son necesarios para la interacción de la Con A con carbohidratos (25).

La molécula requiere que el ion Mn^{2+} o bien algún otro metal de transición como Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} o Cd^{2+} , que también nos dan una molécula activa, se una a esta antes que el ion Ca^{2+} , ya que la unión del Mn^{2+} induce un cambio conformacional en la proteína que crea el sitio de unión para el Ca^{2+} , y ambos iones le dan una estabilidad conformacional a toda la molécula que posibilita la interacción con carbohidratos (5).

Los protómeros de la Concanavalina A forman dímeros y tetrámeros, dependiendo esto de las condiciones de pH y temperatura en que se encuentre: a pH fisiológico, la Con A es un tetrámero; a pH menor a 5.6 es predominantemente un dímero y a pH mayor de 7 se ha observado la formación de agregados poliméricos mayores (24). La temperatura también influencia la transición dímero-tetrámero de la Con A: a pH 6.3 y 4°C solo hay

dímero; al aumentar la temperatura a 36°C la molécula es casi totalmente tetramérica. A pH 7.2 la transición se completa a 25°C (22). Las propiedades de unión a carbohidratos no son afectadas por la transición dímero-tetramero. Algunos cambios químicos como acetilación o succinilación de la proteína tampoco afectan la unión a carbohidratos, habiéndose obtenido derivados acetilados y succinilados de la Con A tan activos como la lectina sin modificar.

Si bien las propiedades aglutinantes de la Con A fueron estudiadas en un principio con eritrocitos, los estudios más recientes han sido enfocados a la actividad que presenta con linfocitos y células transformadas. La Con A es un potente mitógeno que estimula a linfocitos a transformarse en linfoblastos (10) durante este proceso el núcleo de la célula aumenta de tamaño y los cromosomas se convierten en estructuras discretas, por lo que la Con A constituye una herramienta importante para análisis cromosómicos y estudios inmunológicos.

La Con A también ha mostrado capacidad para aglutinar células leucémicas (38) y células transformadas por diferentes agentes carcinogénicos como Rayos X, químicos, virus polioma y otros, mejor que a sus contrapartes

normales (23). Además de aglutinar a este tipo de células in vitro, la Con A también afecta su desarrollo in vivo, pues se ha logrado la destrucción de tumores producidos artificialmente en cobayos con inyecciones de la lectina (42).

Así mismo la Concanavalina A ha demostrado ser una valiosa herramienta en el estudio de células tumorales de diversos tipos (30), en la inducción del efecto citotóxico de macrófagos hacia tumores (53) y para la estimulación del sistema inmune in vivo (27).

La Concanavalina A también tiene una gran utilidad al ser immobilizada uniéndola covalentemente a un soporte cromatográfico como la sepharosa, y el complejo Con A-sepharosa ha sido usado para aislar diversos compuestos, entre los que tenemos, aparte de los mencionados con anterioridad en el texto, a alérgenos (26) complejos inmunológicos (20) inmunoglobulinas normales y cancerosas (36) complejos enzima-anticuerpo (3) para el subfraccionamiento de membranas plasmáticas (40, 37) y para purificar anticuerpos dirigidos al propio sitio activo de Con A.

Por todas estas propiedades y por ser la lectina de la que más conocimiento se tiene, tanto desde el punto de vista fisicoquímico, como biológico y estructural,

por la alta concentración en que se encuentra en el frijol del que se extrae y por la relativa facilidad para obtenerla en forma pura, la Concanavalina A es probablemente la lectina mas usada en los laboratorios dedicados a la investigación en ciencias biológicas en todo el mundo.

T A B L A 2

PRINCIPALES PROPIEDADES QUIMICAS Y BIOLÓGICAS DE LA
CONCAVALINA A

Peso molecular (monómero): 26 000

Agregados: Dímeros y tetrameros.

Actividad mitogénica: Positiva.

Especificidad de tipo sanguíneo humano: ninguna.

Ligando específico: α -D-Manosa (α -D-Glucosa, β -D-fructosa).

Sitios de unión de carbohidrato: 1 por monomero

Iones Asociados: Mn^{2+} Ca^{2+} y otros como Zn^{2+} , Ni^{2+}
y Cd^{2+}

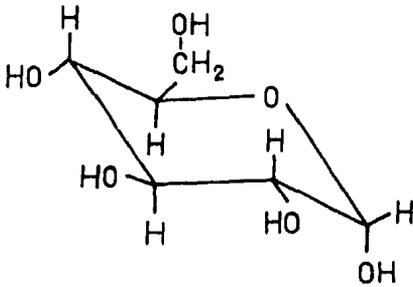
Isolectinas: 0

Contenido cisteína: 0%

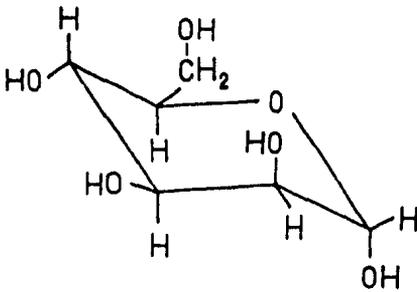
Contenido carbohidrato: 0%.

Tabla tomada de (33). Monsigny, M. et. al. Lectins as
Tools to Study Cell Surface Membranes, en Interdisciplinary Training
Course: Structure and Functions of
Biological Membranes. Molecular As-
pects. Orleans, Sept. 1977.

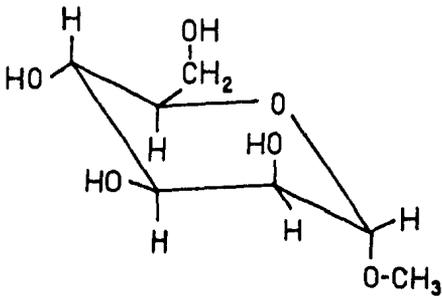
FIGURA 1
ESTRUCTURA DE LOS PRINCIPALES LIGANDOS ESPECIFICOS DE LA
CONCAVALINA A



α - D - GLUCOSA



α - D - MANOSA



METIL α - D , MANOSIDO

MATERIALES

Y

MÉTODOS

EXTRACCION DE CONCAVALINA A. POR EL METODO DE SUMNER
Y HOWELL (48)

Los frijoles se descascaran y muelen hasta obtener una harina fina. Se toman 100g. y se ponen a remojar en 500 ml. de una solución de acetona al 32% con agitación magnética en frío durante 6-8 horas, se filtra en frío con papel Whatman No. 1 (en todas las operaciones de filtración se usa este papel.) El residuo se mezcla ahora con 500 ml. de etanol al 30% y se agita durante 6-8 horas. Se pone a filtrar. La Concanavalina A se extrae del residuo con 400 ml. de una solución de NaCl 1.0%/Fosfato 0.1%, agitando durante 6-8 horas en frío. Se filtra también en frío y se re-extrae el resíduo con 250 ml. de NaCl 5% durante 6-8 horas. Se filtra y se deshecha el residuo. Se mezclan los dos últimos filtrados, se les agrega unas gotas de tolueno y se pone a dializar en papel de diálisis comercial, contra agua destilada, durante 48 horas, cambiando varias veces el agua de diálisis. Se centrifugan los cristales de Con A y se lavan una vez con agua destilada. Los cristales son disueltos en una pequeña cantidad (30-40ml) de HCl 0.1N y se dejan reposar de 20 a 30 min. se agrega un poco de solución de fosfatos 0.1M pH neutro y en seguida NaOH 0.1N hasta antes de la precipitación de la Con A. Se filtra y se pone a dializar contra agua

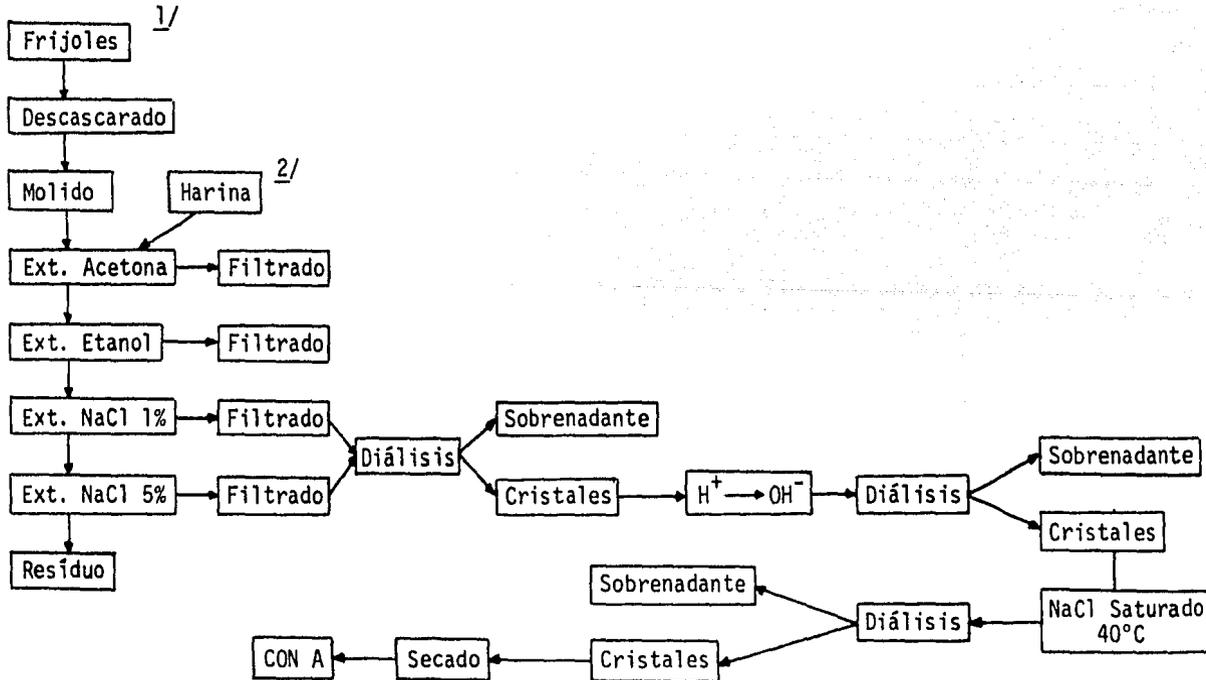
destilada durante 24 horas con varios cambios de agua. Se centrifugan los cristales de Con A.

Estos cristales son purificados disolviéndolos en aproximadamente 50 ml. de NaCl saturado a 40°C. Esta solución se filtra para eliminar material insoluble. La Con A puede conservarse en esta solución o bien se pueden obtener los cristales dializando contra agua de tilada durante 48 horas cambiando varias veces el agua. Los cristales se separan por centrifugación y se secan en un desecador con CaCl_2 al vacío. El diagrama de bloques de la extracción de Con A se muestra en la Figura 2.

F I G U R A 2

DIAGRAMA DE FLUJO DE LA EXTRACCION Y PURIFICACION DE CONCANAVALINA A METODO DE SUMNER Y HOWELL (48)

33.



1/ Frijoles Canavalia ensiformis cosechados en el C.I.B., B.C.S.

2/ Harina de Canavalia ensiformis Comercial (Jack Bean Meal, Sigma Chem. Co., Cat. J.0125).

OBTENCION DE CONCAVALINA A POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

(18)

Aprovechando la habilidad de la Concanavalina A para unirse reversiblemente a dextranes, una familia de α -glucanos que contienen predominantemente uniones glucosídicas α -D (1-6) y tomando en cuenta que estos se encuentran disponibles en el mercado (Sephadexes, Pharmacia Fine Chemicals) se ha aislado y purificado a la lectina por adsorción específica seguida de la elución de la proteína con un carbohidrato de bajo peso molecular que compite y separa a la Concanavalina A del adsorbente (2). Otros autores separan la Con A con un buffer de pH bajo en lugar del carbohidrato específico (35). El procedimiento para la obtención de Con A por cromatografía de afinidad es el siguiente:

100 g. de harina de C. ensiformis son mezclados con 500ml. de NaCl 0.15M y se agita magnéticamente en frío (4°C) durante toda la noche, La mezcla se filtra; el filtrado se guarda y el residuo se reextrae con otros 500 ml. de sol. salina en las mismas condiciones.

Se filtra otra vez, se juntan los filtrados y se centrifugan a 9 500 rpm durante 30 min. en una centrifuga refrigerada. Se decanta el sobrenadante y se le agrega

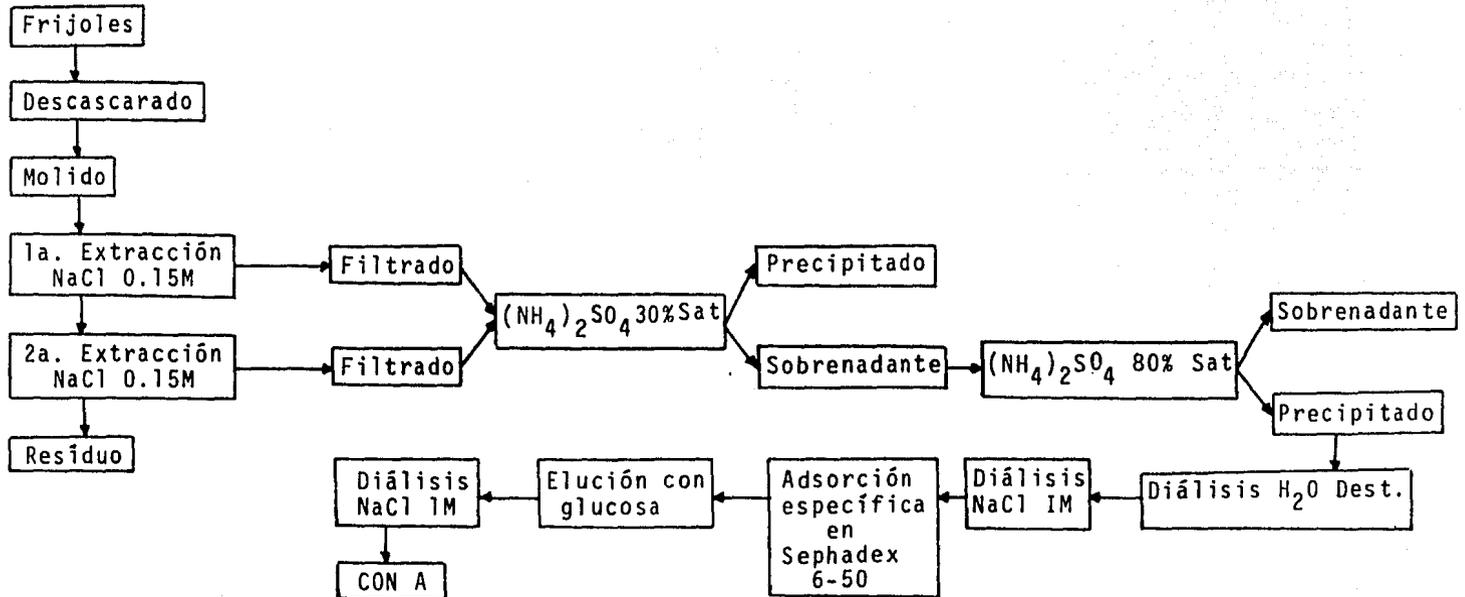
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta el 30% de saturación (176 g/lt). Se ajusta el pH a 7 con NH_4OH diluído y se mantiene con agitación magnética durante dos horas a temperatura ambiente (25°C). El precipitado formado se remueve por centrifugación y se descarta. Al sobrenadante se le agrega el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ necesario para ponerlo al 80% de saturación de esta sal (356g/lt). Se ajusta el pH a 7 como se indicó anteriormente y se deja reposando a temperatura ambiente para permitir la precipitación de proteínas. El precipitado se colecta por centrifugación, se suspende en agua (500 ml) y se dializa extensivamente contra agua destilada y finalmente contra NaCl 1.0M. El contenido de la bolsa de dialisis se centrifuga para separar el material insoluble y el sobrenadante es usado en la adsorción específica en Sephadex. Se usa una columna de 4 cm. X 60 cm. empacada con Sephadex G-50 (Pharmacia, Fine o Medium) equilibrada con NaCl 1.0M para la adsorción de la Con A. La solución de proteínas se pasa por la columna con un flujo aproximado de 30ml/hr. En el efluente de la columna se monitoréa el contenido de proteína por absorbancia a 280 nm. Cuando se termina de aplicar la solución de proteínas, la columna se lava con NaCl

1.0M durante 40 horas o hasta que ya no se detecte la salida de proteínas de la columna (absorbancia a 280 nm ≤ 0.1) después se aplica a la columna una solución de glucosa 0.1 M en NaCl 1.0M para eluir a la Con A. Se monitorea la salida de Con A por absorbancia a 280 nm. y se colectan las fracciones con una absorbancia mayor a 0.1. Estas fracciones se juntan y se dializan contra NaCl 1.0M con 18-20 cambios en una semana. La Con A se puede guardar en NaCl 1M a 4°C, en NaCl 0.15M a -20°C o liofilizada.

FIGURA 3

DIAGRAMA DE FLUJO DE LA EXTRACCION Y PURIFICACION DE CONCAVALINA A
 METODO DE AGRAWAL Y GOLDSTEIN (2)

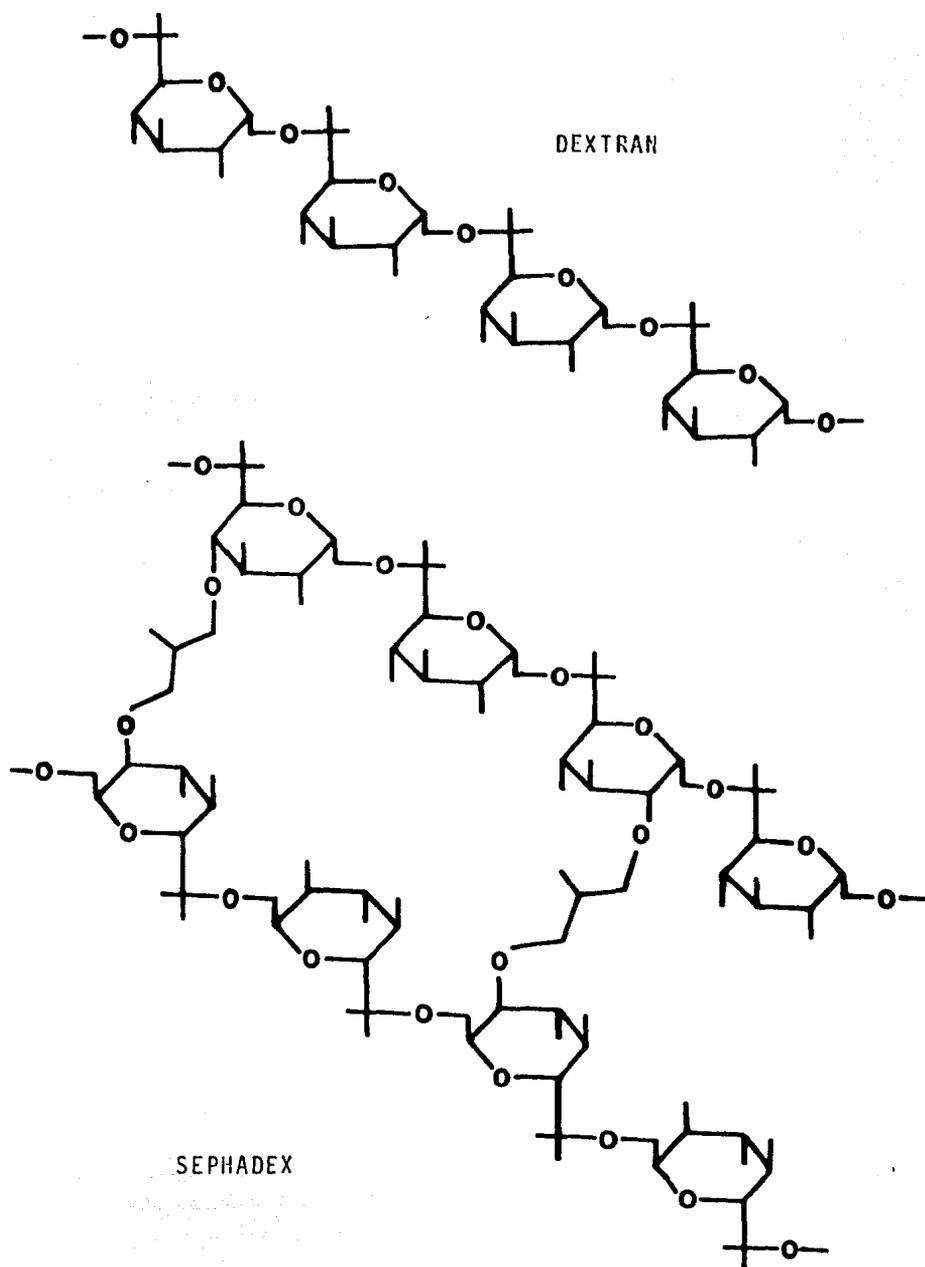
37.



1/ Frijoles Canavalia ensiformis cosechados en el C.I.B., La Paz, B.C.S. 1983.

FIGURA 4

ESTRUCTURA DE LOS CARBOHIDRATOS DEXTRAN Y SEPHADEX



PUREZA INMUNOLOGICA

Se hicieron pruebas de doble difusión en placas de Agar preparado al 1.5% en PBS 0.025M pH 7.2 con 0.02% de azida de sodio como conservador. Se observó el número de bandas producidas al reaccionar las muestras de Con A con el suero de un conejo inoculado con una muestra de Con A sin purificar y comparando con el resultado obtenido con una muestra de Concanavalina A comercial (Con A Type IV, Sigma Chem. Co., St. Louis Mo., U. S. A.).

TECNICA PARA LA FORMALINIZACION DE ERITROCITOS

Sustancias

Formaldehido (Grado reactivo, J.T. Baker, México)

PBS pH 7.2 (Solución amortiguadora de fosfatos)

Eritrocitos

Sol. salina isotónica (0.9% NaCl).

Procedimiento

Los eritrocitos colectados en presencia de anticoagulante (EDTA 10%) son lavados varias veces con PBS hasta que el sobrenadante queda claro (incoloro). El lavado se hace centrifugando los eritrocitos 3 min.

1 500 rpm y decantando el sobrenadante, resuspender en PBS y centrifugar otra vez y así sucesivamente.

A un volumen de eritrocitos frescos empacados por centrifugación (3 min. 1 500 rpm) se les agregan 8 volúmenes de formaldehido al 3% frío (10°C) y la mezcla se mantiene a 4°C durante 24 horas, con agitación suave. Después se agregan 2 volúmenes de formaldehido al 40% frío (10°C) y se sigue con la agitación suave en frío por otras 24 hrs. los eritrocitos se lavan 10 veces con 8-10 volúmenes de sol. salina y al final se resuspenden en 6-8 volúmenes de sol. salina. Estos eritrocitos se pueden guardar a 4°C, congelar a -20°C o liofilizarse y pueden ser usados durante varios meses.

PRUEBAS DE HEMAGLUTINACION

En una placa de aglutinación (Microtiter Plate) se hacen diluciones en serie 1:2 de una solución de Con A en PBS 0.025M pH7.2 de concentración conocida, midiendo la proteína con el método de Lowry. A cada pozo se les agrega 10 μ l. de eritrocitos de ratón o de otras especies animales, formalinizados al 2.0% en PBS 0.025M. pH 7.2; se agita la placa y se deja reposar de 3 a 4 horas a temperatura ambiente y se lee el título de la muestra o máxima dilución que causa aglutinación de los eritrocitos.

INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION

Se utiliza el mismo procedimiento que en la prueba anterior, pero agregando a cada pozo 10 μ l. de solución de sacárido 0.6M en PBS 0.025M pH 7.3 e incubando a temperatura ambiente durante 1 hora antes de agregar los eritrocitos. La lectura se hace de la misma forma que en la prueba de hemaglutinación.

PRECIPITACION CON GLUCOGENO

A 1 ml. de la solución de cada muestra de Con A se les agrega 1 ml. de solución de glucógeno (Oyster, Sigma Chem. Co. St. Louis Mo. U.S.A.) de una concentración de 1mg/ml. Se esperó 24 horas a que la reacción se llevara a cabo completamente, se centrifugó el precipitado y se pusieron placas de hemaglutinación con el sobrenadante, siguiendo el procedimiento indicado con anterioridad.

METODO DE LOWRY PARA DETERMINACION DE PROTEINAS (31)

Sustancias:

Solución A: Na_2CO_3 2% en NaOH 0.1N

Solución B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1%

Solución C: Tartrato de Sodio y Potasio 1%

Solución D: Reactivo Folin-Ciocalte u/fenol IN
(Sigma de México)

Reactivo de Lowry: Se mezclan 100 ml. Sol. A. + 1 ml.
Sol. B + 1 ml. Sol. C

Procedimiento:

Se prepara un estandar de albúmina bovina (Sigma Chem. Co.) con concentraciones de 20, 40, 60, 80, 100 y 120 microgramos por mililitro.

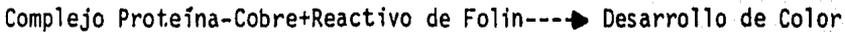
Las muestras de concentración desconocida se diluyen para tener una concentración aproximada entre 50 y 100 microgramos/ml.

Poner 1 ml. de cada dilución mas 3 ml. de reactivo de Lowry en cada tubo y agitar en vortex. Reposar 10 min.

Añadir a cada tubo 0.3 ml. de la sol. D y agitar vigorosamente en vortex. Reposar una hora.

Leer absorbancia a 590 nm.

Las principales reacciones involucradas en este método son las siguientes:



Junto con este método se usó en algunos casos un Lowry modificado (Alicia Gamboa, comunicación personal) cuya principal diferencia son los volúmenes de reactivos usados; esta variante se describe a continuación.

METODO MODIFICADO DE LOWRY PARA DETERMINACION DE PROTEINAS
(ALICIA GAMBOA, COMUNICACION PERSONAL)

Sustancias:

Solución A; $\text{Na}_2 \text{CO}_3$ 2% en NaOM 0.1N

Solución B: Tartrato de sodio y potasio 2%

Solución C: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1%

Solución D: Reactivo de Folin-Ciocalteu/fenol 1N
(Sigma de México) diluido 1:1 (preparar exactamente antes de usarse).

Reactivo de Lowry: mezclar 98 ml. Sol. A + 1 ml.
Sol. B + 1 ml. Sol. C.

Procedimiento:

Preparar el estándar y las diluciones de muestras de acuerdo al método anterior.

Se ponen 0.4 ml. de cada dilución + 2 ml. de reactivo de Lowry en cada tubo y agitar vigorosamente en vortex, reposar 10 min.

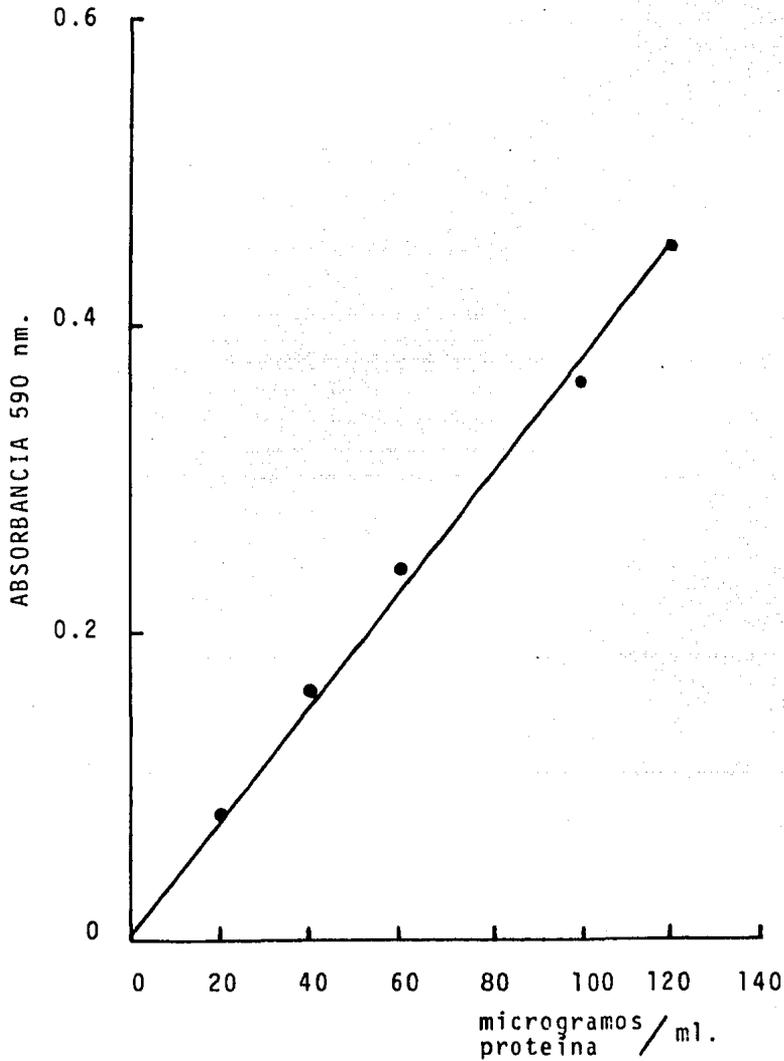
Añadir 0.2 ml. de la sol. D. y agitar vigorosamente en vortex, reposar 30 min.

Leer absorbancia a 590 min.

En ambos casos se grafican las lecturas de absorbancia contra las concentraciones del estándar para extrapolar luego las lecturas de las muestras y calcular su concentración.

FIGURA 5

METODO LOWRY PARA DETERMINACION DE PROTEINAS



Curva patrón para la determinación de proteínas por el Método Lowry (31), se utilizó albúmina bovina (Sigma Chem. Co.) como estándar.

TECNICA PARA LA PREPARACION, TERIDO Y CONSERVACION DE PLACAS DE INKUNODIFUSION EN AGAR. (U. MED. EXP., F. DE MEDICINA, U.N.A.M.)

Preparación de las placas

Sustancias:

Agar bacteriológico (BIOXON)
Azida de sodio (Sigma de México)
PBS pH 7.2

Procedimiento:

Se prepara el agar al 1.5% en PBS con 0.02% de Azida de sodio para evitar contaminación. La mezcla se calienta con agitación continua hasta que queda cristalina y sin burbujas de aire y se pasa a cajas de Petri, se deja a temperatura ambiente a que solidifique el gel.

Corrido de las Placas

Sustancias:

Suero de conejo
Muestras de Con A
Horadador

Procedimiento:

El suero de conejo se obtiene sangrando un conejo

inoculado con una muestra de Con A sin purificar. Se deja reposar la sangre a temperatura ambiente, a que se forme el coagulo y se separa el suero. Se divide en fracciones de 2 ml. que se congelan hasta su uso.

Al gel de agar se le hacen las horadaciones necesarias, de aproximadamente 4 mm. de diámetro y separadas una distancia de 4 mm., se colocan las muestras en los pozos, teniendo cuidado de que no se reboquen. En la tapa de la caja de Petri se coloca un papel filtro húmedo, se cubre el gel, y se deja a temperatura ambiente a que las muestras difundan (24 a 48 horas, dependiendo de la reacción de precipitación).

Tinción de las Placas

Sustancias:

- Azul de coomassie.
- Ac. acético (J. T. Baker).
- Etanol (J. T. Baker).
- Agua destilada.
- Sol. salina (0.9% NaCl)

Procedimiento;

Cuando se considera que la reacción de precipitación

ha terminado, la caja de Petri se sumerge en sol. salina, se despega el gel y se saca de la caja. El gel se deja lavando durante 48 horas, con varios cambios de solución en el transcurso de este tiempo, para eliminar proteínas solubles. El último cambio se hace con agua destilada para fijar las bandas.

Colocar el gel sobre un vidrio plano y ponerle un papel filtro encima perfectamente adherido, haciendo perforaciones en los lugares donde se encuentran los pozos del gel. Dejarlo a temperatura ambiente durante 24 horas a que se seque el gel. Pasado este tiempo despegar el papel con cuidado, si es necesario mojarlo.

Teñir el gel con una solución preparada mezclando 1g. azul de coomasie, 100 ml. ácido acético, 450 ml. etanol y 450 ml. agua destilada. Se tiñe hasta que las bandas adquieran el tono deseado.

Las placas de agar se lavan con una solución de 100 ml. ácido acético, 250 ml. etanol y 600 ml. agua destilada. Lavarlas hasta que la solución ya no se pinte de azul.

Conservación de las Placas

Sustancias:

Acido acético (J. T. Baker).

Glicerina.

Procedimiento:

Una vez teñidas las bandas, las placas se sumergen en una solución de ácido acético 2%/glicerina 5% durante 24 horas, después de lo cual se dejan secar al aire.

RESULTADOS

R E S U L T A D O S

Las Figuras 2 y 3 nos muestran los diagramas de flujo de los procedimientos usados para la extracción y purificación de Concanavalina A, basados en los métodos de Sumner y Howell(48) y Agrawal y Goldstein (2) respectivamente. Aunque sólo en un método se usó tanto frijoles enteros como harina comercial (Jack Bean Meal, Sigma Chem. Co. Cat J-0125), ambos procesos de extracción se pueden iniciar con los dos tipos de materia prima mencionados.

Al iniciar la extracción de Con A, nos encontramos con el problema de que la filtración del extracto de harina era muy lenta, lo que podría redundar en un daño a la proteína, debido al tiempo que tarda en completarse, por lo que se pensó que moliendo los frijoles en mortero de mano, la molienda nos daría un grano mas grande que evitaría los problemas de filtración. En la tabla 3 se comparan los resultados obtenidos en ambas extracciones y considerando que el rendimiento de la extracción de proteínas así como la actividad biológica del extracto salino eran mucho mayores partiendo de harina, decidimos iniciar las extracciones subsecuentes con este tipo de molienda, la cual es usada como materia prima

en los métodos de extracción mencionados anteriormente (48) y (2).

Los dos primeros pasos en la extracción de Con A por el método de adsorción específica en Sephadex (2) implican el fraccionamiento de proteínas con sulfato de amonio. Agrawal y Goldstein (2) encontraron que aproximadamente dos terceras partes de la actividad de la Con A se hallaba entre el 50% y 60% de saturación de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ y el resto distribuido del 30% al 80% de saturación de la misma sal. En la tabla 4 comparamos la actividad hemaglutinante de las distintas fracciones del fraccionamiento de proteínas con sulfato de amonio, y podemos observar que efectivamente la mayor parte de la proteína activa precipita entre el 30% y el 80% de saturación, quedando sólo una pequeña porción de la actividad en las fracciones 0-30% y >80% de saturación.

Sumner y Howell (48) observaron que la Concanavalina A formaba precipitados con una serie de polisacáridos entre los que se encontraban los dextranos. Agrawal y Goldstein (1), aprovechando la existencia en el mercado de geles de dextran (Sephadexes, Pharmacia Fine Chem.) los utilizaron para la purificación de la proteína. Entre los distintos dextranos, que se diferencian

por el grado de "cross-linking", encontraron que el mas apropiado era el Sephadex G-50, ya que era el mas eficiente en la remoción de proteínas no adsorbidas y permitía los flujos mas altos, lo cual aceleraba el procedimiento de purificación. El Sephadex G-25 no adsorbía a la Con A; el Sephadex G-200 contiene el mayor número de sitios de unión para la Con A, lo cual hace un buen medio para concentrarla, pero la desventaja es que requiere flujos muy lentos. En la figura 6, tenemos la gráfica de la cromatografía de afinidad, que corresponde a un diagrama clásico de la purificación de Con A en Sephadex (2) (1); en él se observan dos picos que aparecen después de la inyección de la muestra y que corresponden a proteínas que no tienen afinidad por el Sephadex y por lo tanto salen de la columna en el lavado con la solución de NaCl 1.0M. Se observan dos picos, ya que es muy probable que el Sephadex actúe también como tamiz molecular, lo que provocaría que unas proteínas tardaran mas en salir que otras. Después de un tiempo (48 hrs.) durante el cual, la columna se lava para eliminar cualquier proteína que no se haya adsorbido al Sephadex, se aplica una solución de glucosa (2) (1) para inhibir la interacción Con A-Sephadex y despegar a la proteína, lo cual nos da el tercer pico que aparece en el diagrama.

Como prueba adicional para la comprobación de la presencia de Concanavalina A en las fracciones que nos interesaban y aprovechando su habilidad para precipitar glucógeno, reportada primeramente por Sumner y Howell (48) y estudiada mas a fondo por J. A. Cifonelli (8) se usó la precipitación de glucógeno de ositión (Sigma Chem. Co.), que había mostrado buena actividad hacia la Con A (8) en placas de agar, método usado por Agrawal y Goldstein (2). La tabla 5 nos muestra los resultados de esta prueba, concordando éstos con lo esperado, de acuerdo a las pruebas de hemaglutinación referidas con anterioridad.

Con el objeto de iniciar la extracción de Concanavalina A a partir de frijoles cosechados en el país, en el campo experimental del Centro de Investigaciones Biológicas de B.C.S., se cosecharon frijoles Canavalia ensiformis, de la siembra de frijoles adquiridos en el extranjero (Jack Beans, Sigma Chem. Co.)

Utilizando el método de Sumner y Howell, se compararon las extracciones de Con A a partir de harina de frijoles cosechados en el país y de harina comercial (Jack

Bean Meal, Sigma Chem. Co.) (Tabla 6). Los rendimientos de Con A son semejantes, siendo tal vez el renglón con una diferencia mas significativa el de las proteínas cristalizables, que corresponden a la Con A cruda; si bien éste dato sugeriría a primera vista la conveniencia de usar harina comercial dado un mejor rendimiento de proteínas cristalizables y por lo tanto de Con A, las pruebas de pureza y homogeneidad en placas de inmunodifusión, aportan datos adicionales sobre este punto.

En las figuras 7 y 8 podemos observar la secuencia de la purificación de Con A por el método de Sumner y Howell con respecto a la pureza y homogeneidad de las muestras cristalizadas durante el proceso y comparadas con una muestra de Con A comercial, usando el método de inmunodifusión, al irse purificando la Con A, el número de bandas de precipitación va disminuyendo, lo cual nos indica una disminución de materiales contaminantes, hasta llegar a la Con A purificada que nos da una sólo banda al igual que la muestra de Con A comercial (Con A Type IV, Sigma Chem Co.), lo que nos permite suponer un grado de pureza semejante.

Sumner y Howell (48) reportaron la capacidad de la Concanavalina A para aglutinar eritrocitos de algunas especies animales, mientras que con las dos otras especies no interactuaba. Algunos resultados nuestros en este punto, se presentan en la Tabla 7, en la que podemos observar que la Con A aglutina mejor los eritrocitos de burro que los de otras especies, y que no aglutina los eritrocitos de cabra. Estos datos concuerdan con los reportados por Sumner y Howell (48).

I. J. Goldstein et. al. (16) y L.L. So e I. J. Goldstein (43) estudiaron la inhibición de la reacción con A-Dextran por medio de distintos azúcares (monosacáridos, oligosacáridos y azúcares modificados) y encontraron que los que mejor inhibían la interacción Lectina-polisacárido eran: metil α -D-manopiranosido, metil α -D-glucopiranosido, metil α -L-sorbopiranosido, D-manosa, D-fructosa, D-glucosa, en orden decreciente de potencia inhibitoria. De estos azúcares tomamos al metil α -D-manósido, a la manosa y a la glucosa para hacer pruebas de inhibición de hemaglutinación. En la tabla 8 tenemos los resultados de estas pruebas y podemos ver que los azúcares utilizados inhiben drásticamente la aglutinación de eritrocitos por Con A,

mostrando patrones de inhibición casi idénticos la manosa y el metil α -D-Manósido y resultando la glucosa el inhibidor menos potente de los tres.

En la tabla 9 se observa el efecto de la adición de glucógeno a una solución de Con A en el poder hemaglutinante de proteína. L.L.So e I.J.Goldstein (44) utilizaron un método de precipitación de Con A con dextran como un modelo para el estudio de las reacciones antígeno-anticuerpo, para estudios estructurales de polisacáridos y para el monitoreo de la purificación de Con A y determinaron algunas de las variables que influyen en la reacción. Al interaccionar la Con A con el glucógeno se forma un precipitado insoluble que ocasiona la disminución de la concentración de Con A y por lo tanto la disminución del título de aglutinación. El hecho de que el título de aglutinación baje tan drásticamente como lo muestra la tabla, indica que toda o la mayor parte de la Con A en solución precipita, la que nos ayuda a evaluar la pureza y homogeneidad de nuestras preparaciones.

Para comprobar la efectividad de los métodos de conservación y la estabilidad de Con A se guardaron muestras

de la lectina obtenida por adsorción en Sephadex en NaCl 1.0M/4°C y en congelación (-20°C) durante 75 días, al término de los cuales se les hizo pruebas de hemaglutinación para ver si conservaba su actividad biológica. En ambos casos la Con A presenta un discreto aumento en su actividad, siendo un poco mayor en el caso de la conservación en NaCl 1M 4°C (Tabla 10); esta diferencia de títulos podría ser causa de las condiciones en que se desarrollaron los experimentos, pero en todo caso la Con A almacenada en estas condiciones conserva su actividad biológica en este lapso.

Debido al conocimiento que se tiene de la necesidad de iones como Mn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} y otros para que la Con A pueda reaccionar con carbohidratos (25) (2), y aumentan su actividad biológica (49) tratamos a las muestras de Con A con una solución $MnCl_2-ZnCl_2$ a una concentración final de 1 mM. En esa misma tabla 10 podemos ver que el efecto de los iones en el poder hemaglutinante de la Con A es muy ligero, lo que nos hace pensar que se obtuvo una lectina casi intacta con actividad biológica plena, dotada naturalmente de los microelementos.

Con el objeto de encontrar una fuente alterna de Con A en las leguminosas del estado de Oaxaca, se hizo un estudio preliminar con frijoles de la leguminosa Canavalia villosa (recolectados en las cercanías de la Cd. de Oaxaca e identificados por el Biol. Alejandro Cisneros). En la figura 9 se observa el resultado de la placa de inmunodifusión con el extracto salino de los frijoles C. villosa, en donde se observa la posible presencia de una proteína similar a la Con A en esas semillas. Este hallazgo inicial, queda sujeto a comprobación sobre las propiedades de las proteínas presentes en esa semilla y su similitud biológica con la Con A.

T A B L A 3

COMPARACION DEL TAMAÑO DE PARTICULA EN LA EFICIENCIA DE
EXTRACCION DE CON A

	Frijoles Molidos (Harina) <u>1/</u>	Frijoles Triturados <u>2/</u>
Peso	100 g.	100 mg.
Vol. Extracto	750 ml.	800 ml.
Conc. Proteínas	23.15 mg/ml.	9.25 mg/ml.
Proteínas totales	17.43 g.	7.4 g.
Título Hemaglutinación	1024	512
Unidad Hemaglutinante	22.6 μ g.	18.0 μ g.
Act. específica UH/mg. prot.	44.247	55.35
UH Tot.	7.7 x 10 ⁵	4.09 x 10 ⁵

1/ Harina de frijoles de Canavalia ensiformis obtenida con el molino "Will Mill" (VWR).

2/ Triturados en mortero manual.

T A B L A 4

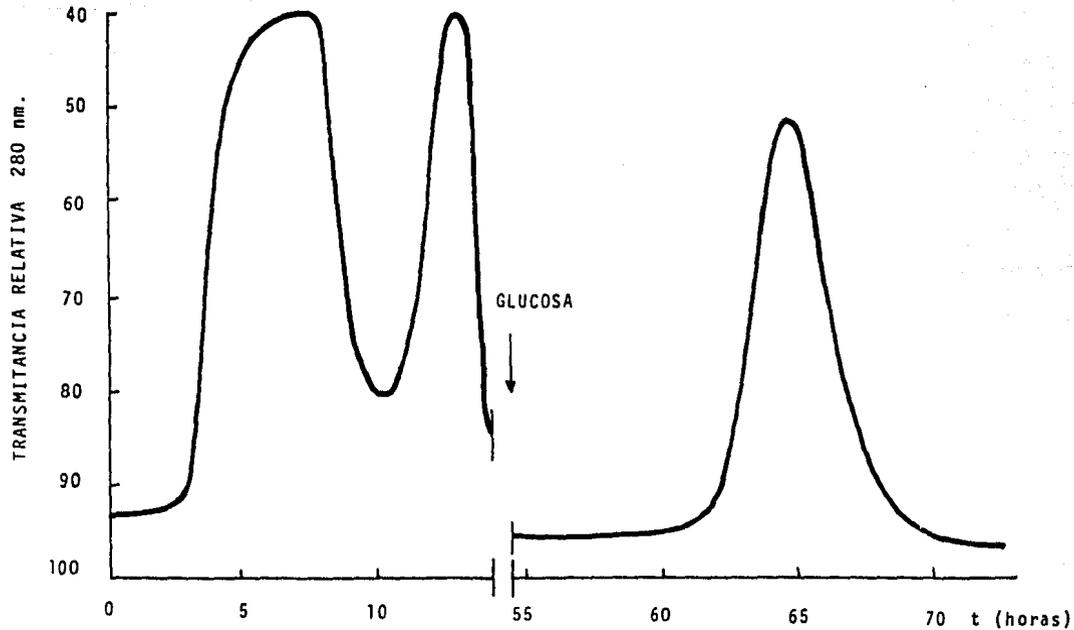
ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DISTINTAS FRACCIONES DE LA PURIFICACION DE CON A
 METODO DE AGRAWAL Y GOLDSTEIN (2)

	Títulos Hemaglu- tinación	Act. específica UH/mg Prot.	Act. Total UH	Actividad recuperada %
Precipitado 30 % Sat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	8192	1428	1.3×10^6	2.3
Sobrenadante 30 % Sat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	131072	11111	52.8×10^6	97.2
Precipitado 80 % Sat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	131072	21739	24.7×10^6	45.5
Sobrenadante 80 % Sat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	512	170	0.17×10^6	0.5

FIGURA 6

64.

PURIFICACION DE CONCAVALINA A EN SEPHADEX G-50 (2)



Cromatografía de las proteínas precipitadas entre 30% y 80% de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, en una columna de Sephadex G-50 (Pharmacia Fine Chemicals) (4 cm. ϕ x 90 cm.). La flecha indica la adición de glucosa 0.1M. Los dos primeros picos corresponden a proteínas que no se absorben al Sephadex. El pico que aparece después de la adición de glucosa corresponde a la Concanavalina A.

T A B L A 5

PRECIPITACION DE GLUCOGENO ^{1/} EN PLACAS DE AGAR POR
DISTINTAS FRACCIONES DE LA PURIFICACION DE CON A
POR EL METODO DE AGRAWAL Y GOLDSTEIN (2).

	Reacción de Precipitación
Extracto Salino	+
Precipitado 30% Sat. (NH ₄) ₂ SO ₄	-
Sobrenadante 30% Sat. (NH ₄) ₂ SO ₄	+
Precipitado 80% Sat. (NH ₄) ₂ SO ₄	+
Sobrenadante 80% Sat. (NH ₄) ₂ SO ₄	-
Fracción eluída de la columna de Sephadex con glucosa (Con A)	+

(+) - Positiva (Hay precipitación)

(-) - Negativa (No hay precipitación)

^{1/} Oyster, Sigma Chem. Co.

T A B L A 6

DISTRIBUCION Y RENDIMIENTO DE LOS COMPONENTES DE C. ensiformis EN LAS FRACCIONES DE LA EXTRACCION DE CON A POR EL METODO DE SUMNER Y HOWELL (48).

Fracción	P e s o	
	Muestra I	Muestra II
Harina	100 g.	100 g.
Material extraído con acetona	13.4 g.	10.8 g.
Material extraído con alcohol	5.71 g.	7.2 g.
Proteínas no cristalizadas	3.64 g.	2.78 g.
Proteínas cristalizables (Con A)	2.5 g.	3.5 g.
Residuo	59.2 g.	60.4 g.

Muestra I - Harina de frijoles cosechados en el C.I.B. B.C.S.

Muestra II - Harina comercial (Jack Bean Meal Sigma Chem. Co., Cat. J-0125).

F I G U R A 7

PUREZA DE LAS PREPARACIONES CRISTALIZADAS DE CON A POR INMUNODIFUSION, COMPARADAS CON UNA MUESTRA COMERCIAL PURA (METODO DE SUMNER Y HOWELL (48)).



Suero Anti Con A

No. Bandas

1 - Con A Type IV (Sigma Chem. Co.)	1
2 - Con A 1a. Cristalización	3
3 - Con A 2a. Cristalización	2
4 - Con A 3a. Cristalización	1
5 - Con A Type IV (Sigma Chem. Co.)	1

La Con A se extrajo de frijoles cultivados en el Campo Experimental del C.I.B., B.C.S. (1983)

F I G U R A 8

PUREZA Y HOMOGENECIDAD DE LAS PREPARACIONES CRISTALIZADAS DE CON A POR INMUNODIFUSION A PARTIR DE HARINA COMERCIAL DE SIGMA CHEM. Co. (METODO DE SUMNER Y HOWELL (48).



Suero Anti Con A

- 1 - Con A Type IV (Sigma Chem. Co.)
- 2 - Con A 1a. Cristalización
- 3 - Con A 2a. Cristalización
- 4 - Con A 3a. Cristalización
- 5 - Con A Type IV (Sigma Chem. Co.)

La Con A se preparó a partir de harina de C. ensiformis comercial (Jack Bean Meal, Sigma Chem. Co.)

T A B L A 7

AGLUTINACION CON EXTRACTO SALINO DE C. ensiformis Y
 CON A (1a. CRIST.) DE ERITROCITOS FORMALINIZADOS DE
 DIVERSAS ESPECIES ANIMALES.

Especie	Título
Borrego	1024
Vaca	1024
Burro	8192
Conejo <u>1/</u>	3200
Ratón <u>1/</u>	2048
Cabra <u>1/</u>	0

El título es la máxima dilución que causa aglutinación
 de los eritrocitos.

1/ Se usó Con A, la. cristalización.

T A B L A 8

AGLUTINACION DE ERITROCITOS DE RATON FORMALINIZADOS CON DIFERENTES MUESTRAS DE CON A CON Y SIN INHIBIDORES.

	Sin Inhibidor	Glucosa 0.1M	Manosa 0.1M	Me-Manósido 0.1M
2a. Cristalización Lote 1	4096	32	2	2
1a. Cristalización Lote 2	2048	16	2	2
2a. Cristalización Lote 2	2048	0	0	0
1a. Cristalización Lote 3	2048	2	4	4
2a. Cristalización Lote 3	4096	32	0	0
1a. Cristalización Lote 4	2048	32	2	0

Las muestras fueron obtenidas por el Método de Sumner y Howell (48). Se incubaron 1 hr, con el carbohidrato antes de poner los eritrocitos.

Los lotes 1, 2 y 3 corresponden a frijoles cultivados en el campo experimental del C.I.B., B.C.S.

El lote 4 es de harina de C. ensiformis Comercial (Jack Bean Meal, Sigma Chem. Co.)

El título es la máxima delución que causa la aglutinación de los eritrocitos.

T A B L A 9

AGLUTINACION DE ERITROCITOS DE RATON FORMALINIZADOS CON DIFERENTES MUESTRAS DE CON A, ANTES Y DESPUES DE PRECIPITARLOS CON GLUCOGENO.

	Solución	Sobrenadante
	Antes de Agregar Glucógeno	Después de agregar Glucógeno
2a. Cristalización Lote 1	4096	64
1a. Cristalización Lote 2	2048	32
2a. Cristalización Lote 2	2048	8
1a. Cristalización Lote 3	2048	16
2a. Cristalización Lote 3	4096	64
1a. Cristalización	2048	32

El título es la máxima dilución que causa aglutinación de los eritrocitos.

Los lotes 1, 2 y 3 corresponden a extracciones de frijo les cultivados en el campo experimental del C.I.B., B.C.S. de acuerdo al método de Sumner y Howell (48). El lote 4 es de harina de C. Ensiformis comercial (Jack Bean Meal, Sigma Chem. Co.)

T A B L A 10

CONSERVACION DE CON A

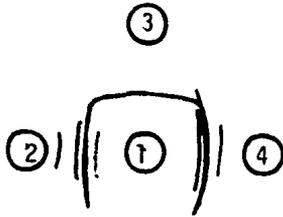
	1 Día	75 Días
	Congelación -20 °C	
Con A	512	1024
Con A Mn ²⁺ Zn ²⁺	1024	1024
	NaCl 1M 4e	
Con A	512	2048
Con A Mn ²⁺ Zn ²⁺	1024	4096

El título es la máxima dilución que causa aglutinación de eritrocitos de carnero formalinizados.

La Con A se obtuvo por el método de Agrawal y Goldstein (2)

Los iones se agregaron como MnCl₂ y ZnCl₂ a una concentración final 1mM.

F I G U R A 9

PLACA DE INMUNODIFUSION CON UN EXTRACTO DE CANAVALIA
VILLOSA

- 1 - Suero Anti Con A
- 2 - Extracto Salino C. ensiformis
- 3 - Con A Type IV (Sigma Chem. Co.)
- 4 - Extracto Salino C. villosa

Las semillas de C. villosa fueron colectadas cerca de la Ciudad de Oaxaca (Paraje la Cumbre) y clasificadas por el Biol. Alejandro Cisneros.

D I S C U S I O N

Y

C O N C L U S I O N E S

DISCUSION Y CONCLUSIONES

En este trabajo se describen los resultados de diversos experimentos a nivel laboratorio con el propósito de aislar, purificar y ensayar Concanavalina A y disponer de una producción continua de la proteína para ponerla a disposición de los usuarios nacionales en el área de investigación científica y clínica, a fin de evitar su adquisición en el extranjero y la salida de divisas del país.

En este camino se plantearon varias alternativas que se fueron analizando y seleccionando según nuestros fines específicos: en primer lugar fué necesario seleccionar la materia prima (frijoles de *Canavalia ensiformis*) a partir de la cual iniciar los trabajos. Ya que los datos existentes sobre extracción de Con A se refieren a material de importación, nos encontramos en la situación de decidir si preparábamos Con A a partir de material importado o por el contrario optar por la propagación de la planta localmente y cosechar la semilla a partir de la cual aislar y purificar la proteína en cuestión.

Aunque ambas vías son factibles, en el primer caso se tiene la desventaja de depender de materia prima de

importación -cuyo precio y calidad están fuera de nuestro control- pero teniendo por otro lado la ventaja de contar con el mismo material que usan los grupos y entidades internacionales que producen y venden Concavalina A (Sigma, Pharmacia, Miles, etc.) de escoger el camino mas incierto y largo de sembrar y cosechar las semillas, se garantiza el suministro de éstas, pero surge la incertidumbre sobre rendimientos, costos y calidad, con la ventaja de crear empleos adicionales y evitar fuga de divisas.

Los datos que se presentan aquí despejan algunas dudas sobre el problema de la procedencia de la materia prima para la preparación de Con A. Se hicieron experimentos de aislamiento, purificación y ensayo, tanto con lotes de materia prima importada como con lotes de frijoles sembrados y cosechados en el país, comparando rendimientos y calidad del producto a un nivel primario. La materia prima de importación se adquirió de la casa Sigma Chemical Co., St. Louis Mo., U.S.A., en forma de harina Jack Bean. Para la obtención de materia prima nacional, se hizo un sembradío de 100 plantas -utilizando semillas importadas de la casa comercial mencionada anteriormente- en el predio "El Comitán", perteneciente al Centro de Investigaciones Biológicas de Baja California Sur, A. C.,

en La Paz, B.C.S.; se cosecharon varios kilos de semilla (el desarrollo del trabajo agrícola no se incluye en este estudio) con ambos materiales se hicieron los experimentos y resultados descritos antes.

Podemos concluir que tanto una como otra, dan lugar a materia prima idónea para la producción de Con A; los pasos y operaciones de aislamiento y purificación operan indistintamente. El rendimiento parece un poco menor en la materia prima nacional, lo cual puede que no sea muy crítico en los costos finales. Aunque la Con A obtenida a partir de harina importada reaccionó adecuadamente con los antisueros analíticos, se nota una multiplicación aparente de componentes en las fracciones finales de la 3a. cristalización (Ver Fig. 8) que no se detectan en la preparación equivalente obtenida de frijoles locales, en donde la Con A aparece homogénea (Ver Fig.7). Si bien la primera idea que surge es la de contaminantes antigénicos diferentes a la Con A, aún presentes, en realidad el patrón inmunológico obtenido sugiere una disociación de la Con A en dímeros o monómeros. Es sabido que la Concanavalina A se puede disociar en condiciones relativamente suaves de pH y temperatura (24-22) por lo que este fenómeno podría explicar la multiplicidad de bandas obtenidas con las preparaciones purificadas a partir de

harina comercial, cuya obtención no está bajo nuestro control. Sobre este aspecto sería necesario hacer otras pruebas como electroforesis en acrilamida y estimación de pesos moleculares, ya que la situación no es desventajosa y da la oportunidad de preparar no sólo Con A tetramérica, sino preparaciones estables de Con A dimérica y monomérica de posible demanda y aún no disponibles comercialmente. En cualquier caso, nuestros datos apuntan la ventaja de usar frijoles cosechados en el país en lugar de la harina importada para preparar Con A homogénea de 3a. cristalización.

En cuanto a pureza, vale la pena recordar los trabajos de Sophianopoulos (46) que indican la presencia persistente de una impureza en muy baja concentración en la Con A preparada como aquí se informa y detectada por electroforesis en acrilamida. En nuestro caso no llegamos a repetir sus trabajos, por lo que "a priori" queda la posibilidad sobre las trazas de impurezas, lo cual queda por resolverse en experimentos futuros en nuestro grupo de trabajo (Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M.)

De los diferentes métodos descritos por diversos autores para la obtención y purificación de Con A escogimos dos

de ellos, tomando en cuenta las siguientes consideraciones de orden económico y práctico: el método de Sumner y Howell, -donde describió esta proteína y sus principales propiedades biológicas- aunque muy antiguo, es casi clásico, tratándose de uno de los pioneros en química de proteínas de gran prestigio y tiene las ventajas de ser sencillo y barato, requiere de reactivos e instrumental, hoy por hoy, al alcance aún de instituciones modestas como la nuestra (C.I.B.-U.A.B.J.O.), además las operaciones y decisiones que incluye el método, constituyen una práctica muy útil en la preparación de recursos humanos jóvenes en estas especialidades tan poco fomentadas en nuestras escuelas de química, y el estudio a fondo sobre la preparación, purificación y ensayo de Con A -una de las proteínas mejor conocidas en la actualidad y cuyo interés y empleo no decrece, sino parece inclusive aumentar día con día- representa un excelente camino en este sentido, con dividendos educativos muy estimables. El otro método seleccionado es mucho más moderno y se basa en el aprovechamiento de una propiedad biológica de la lectina -la afinidad por un ligando específico- en lugar de una propiedad química proteica general -solubilidad- para la purificación específica y rápida de Con A. Este método es el de Agrawal y Goldstein, que usaron un

Dextran comercial (Sephadex G-50) como absorbente de afinidad. Las ventajas de este procedimiento sobre el de Sumner y Howell son obvias, pero las desventajas también saltan a la vista: es más costoso, requiere de reactivos especializados de importación y, aunque no es indispensable, sería conveniente contar con un colector de fracciones cromatográfico dotado de monitores y registradores automáticos para un mejor control del proceso de absorción específica (Ver Fig. 6) sobre este punto y siguiendo los lineamientos de este estudio, parece recomendable en una fase productiva, preparar Con A siguiendo el método de Sumner y Howell (barato y sencillo) para lotes de Con A con una primera calidad y usar el método de Agrawal y Goldstein, cuando las condiciones económicas lo permitan, para refinar las preparaciones de Con A por cromatografía de afinidad, ya que seguramente algunos usuarios demandarían este tipo de preparados.

Aunque nosotros no tuvimos oportunidad de probar el procedimiento de Sophianopoulos (46), para la purificación de Con A, el método en sí mismo no parece excesivamente complejo y se puede recomendar en primera instancia, en caso de contar con el instrumental de electroforesis necesario para las pruebas de calidad, para obtener a la Concanavalina A con el grado de pureza descrita por este autor.

En lo que respecta a los cofactores (metales), cuya participación es necesaria para lograr una proteína activa y sobre cuya naturaleza e interacción con la Con A existe amplia literatura (25), nos concretamos por ahora a efectuar algunas mediciones preliminares de interés práctico, como fue estimar si la adición de metales divalentes -en nuestro caso manganeso y zinc- mejoraban la actividad de la Con A y ayudaban a su mejor conservación. Los resultados expuestos en la Tabla 10, sugieren que este es el caso, ya que en la Con A conservada en congelación a -20°C y mejor aún en la Con A conservada simplemente en un refrigerador doméstico a 4°C en $\text{NaCl } 1\text{M}$, la adición de Mn y $\text{Zn } 1\text{mM}$ ayuda a conservar y aún aumentar modestamente la actividad biológica de la proteína almacenada por mas de dos meses.

Varias fueron las propiedades biológicas que se evaluaron en los lotes de Con A preparados por nosotros, cuyos resultados mas significativos se presentaron. En las tablas 5 y 9 se detallan resultados de precipitación de glucógeno. Las bases químicas de este fenómeno descubierto por Sumner y Howell ya han sido estudiadas y descritas ampliamente (8-45)). En la tabla 5 se confirma esta propiedad en las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación de Con A por el método de

Agrawal y Goldstein, desde el extracto crudo, hasta el material separado de la columna de cromatografía de afinidad con glucosa y que constituye la Con A propiamente. Así mismo, los datos de esta tabla, junto con los de la Tabla 4, confirman la distribución de la Con A en las fracciones de precipitación con sulfato de amonio como lo indican los autores del método y la reproducibilidad de la marcha en nuestros laboratorios. En la Tabla 9, se comprobó también la propiedad de la Con A de formar un precipitado insoluble con glucógeno, con distintas fracciones de la purificación de Con A por el método de Sumner y Howell.

Otras dos propiedades biológicas evaluadas, fueron la de aglutinación de eritrocitos de diversas especies animales causada por la Con A y la inhibición de esta aglutinación usando monosacáridos (glucosa y manosa) y un derivado (metil manósido) (Tablas 7 y 8). Estas propiedades fueron estudiadas en un principio por Sumner y Howell, quienes observaron que la Con A glutinaba eritrocitos de varias especies en varios grados, desde los eritrocitos de cabra que no eran aglutinados, hasta los de caballo que eran aglutinados con una cantidad de Con A ínfima. En la tabla 7 se confirma esta inespecificidad de la Concanavalina A. Sumner y Howell también observaron que la aglutinación de eritrocitos era

inhibida por la presencia de sacarosa y posteriormente So y Goldstein hicieron estudios mas a fondo sobre la inhibición de la interacción Con A-polisacáridos con carbohidratos de diversos tipos. Una gran cantidad de Mono y oligoscáridos, así como azúcares modificados, mostraron capacidad para inhibir a la lectina; seleccionamos entre éstos a los que resultaron ser los mejores inhibidores e hicimos las pruebas correspondientes cuyos resultados fueron mostrados en la Tabla 8. Los resultados concuerdan con las observaciones de So y Goldstein, siendo los 3 carbohidratos que probamos buenos inhibidores de la actividad de la Con A, en nuestro caso con respecto a la capacidad de la Con A para aglutinar eritrocitos.

Dado que por lo menos en lo que respecta al estado de Oaxaca, no está reportada la presencia de Canavalia ensiformis en forma silvestre o cultivada, se hizo un estudio muy breve y preliminar para intentar establecer la presencia de Con A en las semillas de Canavalia villosa (presentes en la flora del Estado de Oaxaca) los resultados muestran cierta similitud antigénica entre los extractos de ambas plantas, pero se hacen necesarios estudios mas a fondo para poder determinar si hay Con A

en la Canavalia villosa o bien son sólo proteínas similares dado su parentesco taxonómico.

Por todo lo expuesto anteriormente, podemos concluir que la posibilidad de producir Concanavalina A en el país de tan buena calidad como la de importación es un hecho, pudiéndose producir con el equipo elemental de un laboratorio de investigación a partir de materia prima nacional, pudiendo servir de preparación para jóvenes interesados en la bioquímica o la química de proteínas y abriendo el camino para que no sólo éste, sino otros reactivos que en la actualidad son importados sean producidos en los laboratorios que los utilizan o que tengan las facilidades para su producción y puedan luego distribuirlos a quien los necesite.

COMENTARIO FINAL

Durante la realización de este trabajo llegó a nuestras manos una publicación (4) de un grupo de trabajo de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, concerniente a la purificación de Concanavalina A de frijoles Canavalia ensiformis silvestres colectados en los alrededores de la Ciudad de Villahermosa, Tab. Cuyo estudio cuidadoso no nos permitió establecer comparaciones útiles con nuestra investigación, debido a la ausencia de información analítica y de las especies silvestres utilizadas.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. AGRAWALL, B.B.L. y I.J. Goldstein. Specific Binding of Concanavalin a to Cross-Linked Dextran Gels. *Biochem. J.* 96,23c (1965).
2. AGRAWAL, B.B.L. y I.J. Goldstein. Protein-Carbohydrate Interaction. VI. Isolation of Concanavalin A by Specific Absortion on Cross-Linked Dextran Gels. *Biochem. Biophys. Acta.* 147, 262 (1967).
3. ARENDS, J. Purification of Peroxidase-Conjugated Antibody for Enzyme Immunoassay by Affinity Chromatography on Concanavalin A. *J. Immunol. Meth.* 25, 171 (1979).
4. BEAUREGARD, J.J., y E. Bratoeff. Canavalia Ensiformis (I) DC o Frijol Silvestre Diente de Caballo, en: *Malezas Silvestres Tropicales*, U.J.A.T. (1983).
5. BECKER, J.W., et. al. The Covalent and Three Dimensional Structure of Concanavalin A. III. Structure of the Monomer and its Interactions with Metals and Saccharides. *J. Biol. Chem.* 250, 1513 (1975).
6. BOYD, W.C. y E. Shalpleigh. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins) *Science.* 119, 419 (1954).
7. CAPO, CH., et. al. Concanavalin A Mediated Tymocity Agglutination: A Model for a Cuantitative Study of Cell Adhesion. *J. Cell Sci.* 56, 21 (1982).
8. CIFONELLY, J. A., et. al. The Reaction Between Concanavalin A and Glycogen. *J. Amer. Chem Soc.* 78, 2485 (1956).
9. DONAHUE, T.M., et. al. Concanavalin A Alters the Turnover Rate of Tyrosine Aminotransferase in Cultured Hepatoma Cells. *Biochem. Biophys. Acta.* 721, 94 (1982).
10. DOUGLAS, S.D., etc. al. Human Lymphocyte Response to Phytomitogens in Vitro: Normal, Agammaglobulinemic and Paraproteinemic Individuals. *J. Immunol.* 103, 1185 (1969).
11. FEIN, A., et. al. Concanavalin A Agglutinability and Immunoaderent Properties of rat Blastocyst. *Gynecol. Obstet. Invest.* 15, 49 (1983).
12. FELBER, S.M. y M.D. Branda. Early Plasma-Membrane Potential Changes During Stimulation of Lymphocytes by Concanavalin A. *Biochem, J.* 210, 885 (1983).

13. FELBER, S.M. y M.D. Branda. Concanavalin A Causes an Increase in Sodium Permeability and Intracellular Sodium Content of Pig Lymphocytes. *Biochem. J.* 210, 893 (1983).
14. FRANZ, H. y P. Ziska. Affinitins: Combining Sites Containing Proteins, en: *Lectins-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, Vol. 1. Walter de Gruyter, Berlin-New York (1981).
15. GOLDSTEIN, I.J., et. al. Protein Carbohydrate Interaction. I. The Interaction of Polysaccharides with Concanavalin A. *Biochem. Biophys. Acta* 97, 68 (1965).
16. GOLDSTEIN, I.J., et. al. Protein Carbohydrate Interaction. II. Inhibition Studies on the Interaction of Concanavalin A with polysaccharides. *Biochem. J.* 4, 876 (1965).
17. GOLDSTEIN, I.J., et. al. Protein Carbohydrate Interaction. XIX. The Interaction of Concanavalin A with IgM and the Glycoprotein Phytohemagglutinins of the Waxbean and the Soybean. *J. Immunol.* 103, 695 (1969).
18. GOLDSTEIN, I.J. y A.M. Staub. Interaction of Concanavalin A with Polysaccharides of Salmonellae. *Immunochem.* 7, 315 (1970).
19. HAWTIKES, R. Identification of Concanavalin A Binding Proteins after Sodium Dodecyl Sulfate Gel Electrophoresis and Protein Blotting. *Anal. Biochem.* 123, 143 (1982).
20. HEIMER, R. y G. Klein. The Affinity of Soluble Immune Complexes for Concanavalin A. *Scand. J. Immunol.* 7, 315 (1978).
21. HENIS, Y.I. y E.L. Elson. Differences in the Response of Several Cell Types to Inhibition of Surface Receptors Mobility by Local Concanavalin A Binding. *Exp. Cell. Res.* 136, 189 (1981).
22. HUET, C., et. al. Temperature Effects on the Concanavalin A Molecule and on Concanavalin A Binding. *Biochem. Biophys. Acta.* 365, 28 (1974).
23. INBAR, M. y L. Sachs. Interaction of the Carbohydrate Binding Protein Concanavalin A with Normal and Transformed Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 63, 1418 (1969).
24. KALB, A.J. y A. Lustig. The Molecular Weight of Concanavalin A. *Biochem. Biophys. Acta.* 168, 366 (1968).
25. KALB, A.J. y A. Levitzky. Metal-Binding Sites of Concanavalin A and their role in the Binding of α -Methyl-D-Glucopyranoside *Biochem. J.* 109, 669 (1968).

26. KARLSTAM, B. y B. Nilsson. Characterization of Grass Polen Allergens. By Affinity Chromatography on Concanavalin-A-Sepharose. *J. Immunol. Meth.* 54, 119 (1982).
27. KELKAR, S.D. Protection Against Japanese Encephalitis Virus in Infant Mice by Concanavalin A. *Ind. J. Med. Res.* 76, 47 (1982).
28. LIS, H. y N. Sharon. Lectins: Their Chemistry and Application to Immunology, en: *The Antigens*. Ed. M. Sela. Academic Press. New York (1973).
29. LIS, H. y N. Sharon. *Ann. Rev. Biochem. The Biochemistry of Plant Lectins (Phytohemagglutinins)* 42, 541 (1973).
30. LIWNER, B.H. Mitogenic Lectin Receptors of Nervous System Tumors. *J. Neuropath. Exp. Neur.* 41, 281 (1982).
31. LOWRY, O.H., et. al. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951).
32. MOHE, J. y H. Franz. Some Properties of Con-A-Antibody Conjugates. *Acta. Histochem.* 71, 23 (1982).
33. MONSIGNY, M., et. al. Lectins as Tools to Study Cell Surface Membranes, en *Interdisciplinary Training Course: Structure and Functions of Biological Membranes. Molecular Aspects*. Orleans, Sept. 1977.
34. OHTSU, Y., et. al. Effect of Concanavalin A on the Activity of Membrane Bound and Detergent Solubilized Mg²⁺ ATPase. *Biochem. Biophys. Acta.* 690, 69 (1982).
35. OLSON, M.O.J. e I.E. Liener. Some Physical and Chemical Properties of Concanavalin A, The Phytohemagglutinin of the Jack Bean. *Biochem.* 6, 105 (1967).
36. RAY, P.K. y S. Raychadhuri. Differential Binding Affinity of Immobilized Concanavalin A-Sepharose 4B for Normal and Myelomatous Immunoglobulins. *Biomed.* 36, 206 (1982).
37. RESCH, K., et. al. Separation of Tight Side Out Oriented Subfractions from Purified Thymocyte Plasma Membranes by Affinity Chromatography on Concanavalin A-Sepharose Anal. *Biochem.* 117, 282 (1981).
38. SAINIS, K.B., et. al. The Status of Concanavalin A Receptors on the Lymphocytes of Leukemic Akr. Mice: Inhibition of Redistribution by High Concentrations of the Lectin. *Cancer Biochem. Biophys.* 6, 101 (1982).
39. SANTORO, S.A. Differential Effects of Concanavalin A and Succinyl Concanavalin A on the Macromolecular Events of Platelet Activation. *Biochem. Biophys. Acta.* 757, 101 (1983)

40. SCHROEDER, F., et. al. LM Fibroblast Plasma Membrane Subfractionation by Affinity Chromatography on Con-A-Sephrose. *Biochem. Biophys. Acta.* 690, 231 (1982).
41. SHARON, N. y Lis, H. Lectins: Cell Agglutinating and Sugar Specific Proteins. *Science* 177, 949 (1972).
42. SHOHAM, J., et. al. Differential Toxicity on Normal and Transformed Cells in vitro and Inhibition of Tumor Development in vivo by Concanavalin A. *Nature.* 227, 1244 (1970).
43. SO, L.L., e I.J. Goldstein. Protein Carbohydrate Interaction. IX. Application of the Quantitative Hapten Inhibition Technique to Polysaccharide-Concanavalin A Interaction. Some Comments on the Forces Involved in Concanavalin A-Polysaccharide Interaction. *J. Immunol.* 99, 158 (1967).
44. SO, L.L., e I.J. Goldstein. Protein Carbohydrate Interaction. IV. Application of the Quantitative Precipitin Method to Plysaccharide-Concanavalin A Interaction. *J. Biol. Chem.* 242, 1617 (1967).
45. SO, L.L., e I.J. Goldstein. Protein-Carbohydrate Interaction. XVII. The Effect of Polysaccharide Molecular Weight on the Concanavalin A-Polysaccharide Precipitation Reaction. *J. Immunol.* 102, 53 (1969).
46. SOPHIANOPOULOS, A.J., y J.A. Sophianopoulos. Preparation of Homogeneous Concanavalin A Prep. *Biochem.* 11, 413 (1981)
47. SUMNER, J.B. The Globulins of the Jack Bean. *Canavalia Ensiformis.* *J. Biol. Chem.* 37, 137 (1919).
48. SUMNER, J.B. y S.F. Howell. The Identification of the Hemagglutinin of the Jack Bean with Concanavalin A. *J., Bacteriol.* 32, 227 (1936).
49. SUMNER, J.B. y S.F. Howell. The Role of Divalent Metals in the Reversible Inactivation of Jack Bean Hemagglutinin. *J. Biol. Chem.* 115, 583 (1936).
50. SUNDLER, R. Agglutination of Glycolipid-Phospholipid Vesicles by Concanavalin A. *Febs Letter.* 141, 11 (1982).
51. WANG, J.L., et. al. The Covalent and Three Dimensional Structure of Concanavalin A. I. Amino Acid Sequence of Cyanogen Bromide Fragments F₁ and F₂. *J. Biol. Chem.* 250, 1490 (1975).
52. WATKINS, W.M. y W.T.J. Morgan. Neutralization of the Anti-H Agglutinin in Eel Serum by Simple Sugars. *Nature* 169, 825 (1952).

53. YEN, S., et. al. The Activation of Cloned Macrophages by Concanavalin A for Tumoricidal Effect: Assessment of tumor Cell Cytotoxicity by a Clonogenic Assay. J. Cell Phystol. 110, 1 (1982).
54. YOSHINO, T.P. Lectin Induced Modulation of Snail Hemocyte Surface Determinants: Clearance of Con A Receptor Complexes Develop. Comp. Immun. 6, 451 (1982).