

EFFECTO DE LA CONCANAVALINA A SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS α -AMILASA PANCREÁTICA Y TRIPSINA EN POLLOS DE ENGORDE

The Effect of Concanavalin A on Pancreatic Amylase and Trypsin Activity in Broiler Chickens

Milagro Valentina León Toro^{1*}, Emma Elena Rueda de Arvelo², María Virginia Castañeda Delgado², Adriana Méndez Ochoa¹ y Coromoto Claret Michelangeli Betancourt¹

¹Centro de Bioquímica Nutricional, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela. Maracay, estado Aragua. *E-mail: leonmil@rect.ucv.ve. ²Laboratorio de Enzimología y Toxicología, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela. Maracay, estado Aragua.

RESUMEN

Con el propósito de determinar el efecto de la Concanavalina A (Con A) sobre la actividad de las enzimas α -amilasa pancreática y tripsina en pollos de engorde de 3 y 6 semanas de edad, se realizaron dos experimentos bajo condiciones *in vitro*. En el primero, la actividad de la enzima α -amilasa pancreática fue determinada en muestras de mucosa duodenal, para lo cual se diseñaron 5 tratamientos: ausencia de Con A (T0), presencia de Con A (T1), Con A preincubada durante 30 minutos con la enzima (T2) o con el sustrato (T3) y Caseína (T4). En el segundo experimento se evaluó el efecto de la Con A sobre la actividad de la tripsina en homogenados de páncreas, aplicando 2 tratamientos: presencia de Con A (T0) y ausencia de Con A (T1). La Con A se utilizó a una concentración semejante a la del sustrato correspondiente para cada enzima. Los resultados fueron analizados a través del Análisis de Varianza de Kruskal-Wallis. La Con A inhibió significativamente la actividad específica de la enzima α -amilasa pancreática, tanto en la tercera como en la sexta semana de edad. No hubo diferencia en la actividad de la enzima entre semanas. La preincubación de la lectina con la enzima afectó significativamente la actividad de la α -amilasa pancreática. No hubo efecto de la preincubación de la lectina con el sustrato. La tripsina no fue inhibida por la Con A bajo las condiciones del ensayo, posiblemente asociado al efecto inhibitorio de la actividad biológica que ejerce la caseína sobre la Con A.

Palabras clave: Concanavalina A, amilasa pancreática, tripsina, pollos de engorde.

ABSTRACT

Two trials were conducted to assess the effect of Concanavalin A on pancreatic α -amylase and trypsin activity in broiler chickens (3 and 6 week old). Pancreatic α -amylase activity was determined in mucous duodenal, applying 5 treatments: Control (without Con A, T0), Con A (T1), Con A preincubated during 30 minutes with enzyme (T2), Con A preincubated during 30 minutes with substrate (T3) and Casein (T4). In the second experiment, the effect of Con A on trypsin activity was studied in pancreas homogenate, applying 2 treatments: Control (without Con A, T0) and Con A (T1). The Con A was used in a similar concentration to corresponding substrate for each enzyme. The results were analyzed through Kruskal-Wallis. The Con A significantly inhibited specific activity of pancreatic α -amylase during the third and sixth week of age. There was no difference in the activity of the enzyme between weeks. The preincubation of lectin with enzyme significantly affected pancreatic α -amylase. There was not effect of preincubation of lectin with substrate. Trypsin was not inhibited by Con A under experimental conditions, possibly due to inhibitory effect of biological activity that exerts the casein on Con A.

Key words: Concanavalin A, pancreatic amylase, trypsin, broiler chickens.

INTRODUCCIÓN

Los efectos de las lectinas dietarias sobre el tracto digestivo han sido extensamente revisados [17, 21]. La lectina purificada a partir de semillas de *Phaseolus vulgaris* (PHA)

presenta una alta resistencia a la proteólisis digestiva *in vivo*, manteniéndose completamente activa durante su paso a través del sistema digestivo en ratones [12]. Estudios con segmentos de intestino aislados de ratas han demostrado que la PHA interfiere con la absorción de glucosa [7] y puede unirse a las membranas de las células epiteliales del intestino delgado, dependiendo del patrón de glicosilación, provocando severos daños en la mucosa intestinal de ratas [15] y cerdos [2]. Asimismo, la PHA puede interactuar con enzimas hidrolasas del borde en cepillo afectando su actividad [8]. Recientemente se ha comprobado que la exposición durante 3 días a la lectina PHA administrada en la dieta induce cambios en la maduración de las proteínas integrales de la membrana del enterocito en ratas jóvenes [14] pudiendo ser ésta una de las causas por las cuales es afectada la actividad de algunas enzimas digestivas. Al igual que la PHA, la lectina del frijol rojo (RKB) disminuyó significativamente las actividades de las enzimas α -amilasa pancreática y α -amilasa salival reduciendo la tasa de digestibilidad *in vitro* del almidón de trigo 27.

Al ser suministrada en la dieta, cantidades significativas de Concanavalina A, la lectina presente en la *Canavalia ensiformis*, pudo ser recuperada en las heces de ratas que recibieron una dosis única de 40 mg de Con A. La recuperación de la lectina en las heces durante 4 días fue progresiva hasta alcanzar el 90% del total de la lectina suministrada, demostrándose que ésta, al igual que la PHA y otras lectinas, son en alto grado resistentes a la acción de las enzimas digestivas durante su tránsito a través del tracto gastrointestinal [18]. Si en el tracto digestivo de los animales las lectinas permanecen activas, ellas podrían reaccionar con algunos componentes de la digesta, secreciones, glicoconjugados bacterianos o dietarios y/o con las membranas de las células epiteliales, dependiendo de su especificidad de unión a carbohidratos, e interferir así con el normal funcionamiento del sistema digestivo [21].

Al llegar al lumen intestinal, la Con A puede interactuar con la membrana de la mucosa afectando los procesos que suceden a este nivel, tales como mecanismos de transporte e hidrólisis final de moléculas provenientes de la dieta [10]. En ratas se afectó la absorción de algunos nutrientes como el calcio y la sacarosa [1] y disminuyó significativamente la actividad de las enzimas sacarasa, fosfatasa alcalina y leucina aminopeptidasa [18].

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la lectina Concanavalina A (Con A) sobre la actividad de las enzimas digestivas pancreáticas α -amilasa y tripsina en pollos de engorde de 3 y 6 semanas de edad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las semillas de *Canavalia ensiformis*, variedad Tovar, fueron suministradas por el laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela (UCV).

El aislamiento de la Con A y las determinaciones enzimáticas se llevaron a cabo en el laboratorio de Enzimología y Toxicología y en el Centro de Bioquímica Nutricional, de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UCV.

Los análisis de electroforesis fueron realizados en el laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Agronomía de la UCV.

Reactivos

Los reactivos utilizados fueron adquiridos de Sigma.

Aislamiento y Purificación de la Concanavalina A

El aislamiento y purificación de la Con A se realizó mediante la precipitación selectiva con sulfato de amonio y cromatografía de afinidad [9], liofilizada en un equipo Labconco LYPH-Lock 6, EUA, y almacenada a -20°C hasta su utilización.

Determinación de la pureza de la Concanavalina A

La pureza de la Con A fue establecida por SDS-PAGE al 15% comparando con un patrón comercial de Con A marca Sigma y confirmada por hemaglutinación, al medir la capacidad de producir aglutinación de una suspensión de eritrocitos frescos de conejo al 2% en NaCl 0,9% después de 60 minutos de incubación a temperatura ambiente y comparada con la producida por la Con A, adquirida comercialmente de Sigma. A fin de comparar la capacidad hemaglutinante de la Con A en solución salina fisiológica y en presencia de las soluciones amortiguadoras utilizadas en las determinaciones de las correspondientes enzimas, se determinó la capacidad hemaglutinante de la Con A en presencia de 10 mg/mL de caseína y en presencia de Tris-HCl 160 mM a pH 7,5.

Manejo de los animales y dieta

Pollos de un día de edad, de la línea comercial Ross, adquiridos en la granja avícola "La Caridad", estado Aragua, Venezuela, fueron alojados en jaulas metálicas colectivas, con suministro de agua y alimento concentrado comercial *ad libitum*, para suplir todos sus requerimientos nutricionales [20]. A las 3 y 6 semanas de edad, un total de 30 pollos/edad, fueron sometidos a ayuno durante 12 horas y sacrificados por dislocación cervical. Segmentos duodenales y el páncreas fueron removidos rápidamente, sumergidos en solución salina fisiológica a $0-4^{\circ}\text{C}$ y procesados de inmediato para obtener el homogenado respectivo.

Preparación del homogenado del páncreas

Todo el procedimiento se realizó entre 0 y 4°C . Para formar cada muestra, el páncreas de 5 pollos fue homogeneizado empleando un homogeneizador de tejido, marca Elvehjem, EUA, a máxima velocidad por 3 minutos en 4 mL/g de solución salina fisiológica, filtrado a través de un liencillo y el extracto almacenado en alícuotas a -20°C hasta su uso para las determinaciones enzimáticas, en un período no mayor de 15 días en ambos casos a fin de evitar pérdida de actividad [5].

Preparación del homogenado de la mucosa duodenal

Todo el procedimiento se realizó entre 0 y 4°C. Los segmentos duodenales de 5 pollos para cada muestra, separados de acuerdo a Siddons [24], fueron perfundidos con solución salina fisiológica, cortados longitudinalmente y colocados sobre una placa de vidrio para extraer la mucosa, empleando una lámina de vidrio. La mucosa fue sumergida en 20 mL/g de un buffer conteniendo 50 mM de manitol y 2 mM de HEPES a pH 7,1 y homogeneizada a máxima velocidad por 1 minuto empleando un homogeneizador de tejido, marca Elvehjem, EUA. Se almacenaron alícuotas de los homogenados respectivos a -20°C con fines de determinaciones enzimáticas.

Determinaciones Enzimáticas

α -Amilasa: La actividad de la enzima α -amilasa pancreática (EC 3.2.1.1) se determinó en muestras de homogenado de la mucosa duodenal [23]. Brevemente, el homogenado de la mucosa duodenal (50 μ L) fue incubado durante 15 minutos a 41°C en una mezcla de reacción conteniendo 100 μ L de buffer Tris-HCl 160 mM a pH 7,5 y 200 μ L de almidón al 0,15% en ácido sórbico saturado, empleado como sustrato. La reacción se detuvo agregando 100 μ L de HCl 0,5 N, añadiéndose seguidamente 2 mL de agua destilada y 100 μ L de solución de yodo 0,01 N. La cantidad de almidón degradado por la amilasa se determinó por espectrofotometría, midiendo la disminución de la coloración azul del complejo iónico almidón-yoduro a 620 nm. Los valores obtenidos fueron comparados con los de una curva estándar elaborada a partir de una solución de almidón al 0,15%. La actividad de la α -amilasa pancreática se expresó como μ g de almidón degradado/min/mg de proteína [23].

Tripsina: La actividad de la enzima tripsina (EC 3.4.21.4) se determinó en muestras de homogenado de páncreas 13, para lo cual 100 μ L del homogenado fue incubado durante 15 minutos a 41°C con 200 μ L del sustrato caseína al 1% en buffer fosfato de sodio 0,1M, pH 7,4. La reacción se detuvo con la adición de 1 mL de ácido tricloroacético al 5% p/v y la mezcla fue filtrada en papel Whatman 42. Se hicieron reaccionar 250 μ L del filtrado con 1250 μ L de Na₂CO₃ 0,2 M y 250 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu, diluido 1:5 en agua destilada. Después de una incubación durante 20 minutos a 41°C se midió la absorbancia a 625 nm. La actividad de la tripsina se expresó como Unidades de Actividad Proteolítica (UAP) calculada a partir de la ecuación propuesta por Namoto y Narahashi [19].

Todos los análisis enzimáticos se realizaron por triplicado y en todos los casos se elaboraron blancos con igual procedimiento, en los cuales las muestras fueron añadidas después de detener la reacción.

Proteína

La concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford 3 utilizando el buffer correspondiente como blanco y albúmina sérica bovina como estándar.

Descripción de los experimentos

Experimento 1: Con el objetivo de determinar el efecto de la Con A sobre la actividad de la enzima α -amilasa pancreática y la posible interacción de la lectina con la enzima o el sustrato correspondiente, se aplicaron 5 tratamientos: ausencia de Con A (T0), presencia de Con A (T1), Con A preincubada durante 30 minutos con la enzima antes de iniciar la reacción (T2), Con A preincubada durante 30 minutos con el sustrato antes de iniciar la reacción (T3) y presencia de caseína (T4). Todos los tratamientos se aplicaron *in vitro* en muestras de homogenado duodenal de pollos de 3 y 6 semanas de edad. La actividad de la enzima α -amilasa y la concentración de proteínas fueron determinadas para los diferentes tratamientos y edades de los pollos.

Experimento 2: El efecto de la Con A sobre la actividad de la tripsina se estudió en muestras de homogenado de páncreas de pollos de 3 y 6 semanas de edad, aplicando 2 tratamientos: ausencia de Con A (T0) y presencia de Con A (T1). Al igual que en experimento 1, se realizaron determinaciones de las actividades de la enzima tripsina y concentración de proteínas en los homogenados respectivos.

En todos los casos, las soluciones de Con A fueron preparadas en NaCl 0,9%. La Con A se utilizó en una concentración semejante a la del sustrato correspondiente para cada enzima (1,5 mg/mL para α -amilasa y 10 mg/mL para tripsina). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Análisis Estadístico

Los resultados fueron expresados como el promedio \pm la desviación estándar y analizados estadísticamente a través del Análisis de Varianza de Kruskal-Wallis y la prueba de rangos promedios a un nivel de significancia de 0,05 [25], utilizando el programa Statistix, versión 8 [26]. El uso de estadísticas no paramétricas se debió al hecho de que la distribución probabilística de los valores no se ajustó a una distribución normal [25].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pureza de la Con A

La FIG. 1 muestra el análisis de SDS-PAGE de la Con A aislada, purificada y liofilizada en comparación con la Con A utilizada como patrón (Sigma, St. Louis, EUA). En ambos casos se observa claramente una banda bien definida que se corresponde al valor de 30 kDa de la Con A monomérica. Así mismo se observan dos pequeñas franjas de un PM aproximado a 20 y 24 kDa, correspondientes a polipéptidos de Con A, tal como fue encontrado por otros autores [4, 11].

Estos resultados demuestran que la Con A purificada en el presente trabajo se encuentra libre de contaminación por otras fracciones proteínicas y su pureza es similar a la Con A comercial, garantizando que los resultados obtenidos son debidos a la presencia de la lectina, descartándose la interferencia de otros posibles factores.

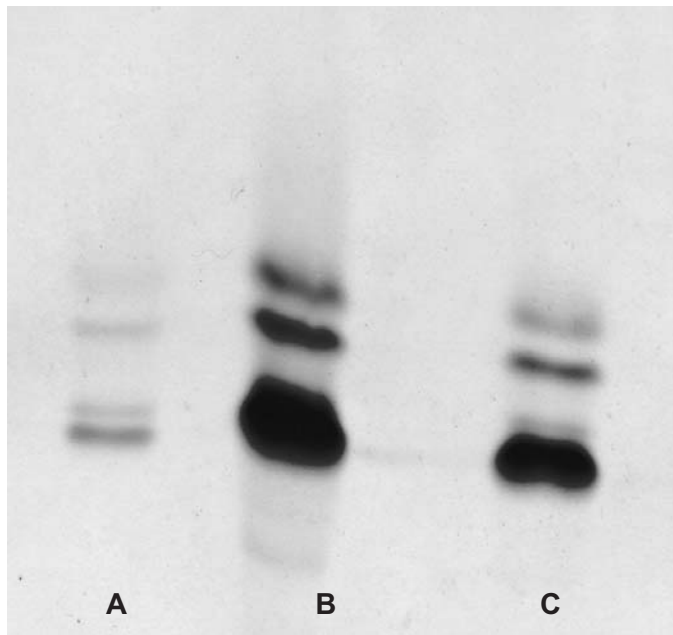


FIGURA 1. SDS-PAGE DE LA CON A AISLADA EN COMPARACIÓN CON LA COMERCIAL / SDS-PAGE OF CON A ISOLATED IN COMPARISON WITH COMMERCIAL CON A.

**Carril A: Con A Sigma®.
Carriles B y C: Con A aislada.**

Título hemaglutinante de la Con A

El título hemaglutinante de la Con A aislada, expresado como porcentaje del total de hemaglutinación, fue semejante al de la Con A comercial (TABLA I). No se manifestó actividad hemaglutinante de la Con A en presencia de caseína al 1%, posiblemente debido a que esta última es una glicoproteína cuyos residuos de carbohidratos pueden ser reconocidos por los sitios activos de la lectina e impedir su acción hemaglutinante. Este efecto puede ser de gran aplicación práctica al elaborar dietas con materias primas alternativas que contengan esta clase de lectina, ya que al adicionar caseína en la ración puede neutralizarse su efecto anti nutricional. No obstante este aspecto requiere mayores estudios.

Efecto de la Con A sobre las actividades enzimáticas

En la TABLA II se presentan los resultados obtenidos al incubar los homogenados duodenales sometidos a los diferentes tratamientos: en ausencia de Con A (T0), en presencia de Con A (T1), preincubando la enzima con Con A durante 30 minutos (T2), preincubando el sustrato con Con A durante 30 minutos (T3), en presencia de una concentración de caseína igual a la del sustrato (T4).

La actividad de la enzima α -amilasa pancreática, determinada en el homogenado de mucosa duodenal, tanto a la ter-

TABLA I
VALORES DE TÍTULO HEMAGLUTINANTE¹ DE LA CON A AISLADA Y COMERCIAL / CON A HEMAGGLUTINATION ACTIVITY

Medio de Incubación	Con A			
	Aislada		Sigma®	
	Celdas con actividad ²	%	Celdas con actividad ²	%
NaCl 0,9%	+22	91,7	+23	95,8
Tris-HCl 160 mM pH 7,5	+23	95,8	+23	95,8
Caseína 1%	0	0	0	0

¹Capacidad de producir aglutinación de una suspensión de eritrocitos frescos de conejo al 2% después de 60 minutos de incubación a temperatura ambiente. ² De un total de 24 celdas incubadas con diluciones de una solución de Con A preparada en NaCl 0,9% a una concentración inicial de 1mg de Con A/mL. 6 Repeticiones.

TABLA II
EFFECTO DE LA CON A SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA α -AMILASA PANCREÁTICA EN HOMOGENADO DE MUCOSA DUODENAL DE POLLOS DE 3 Y 6 SEMANAS DE EDAD / EFFECT OF CON A ON PANCREATIC α -AMILASE ACTIVITY IN DUODENAL HOMOGENATO FROM 3 AND 6 WEECK OLD CHICKEN

Edad (semanas)	Actividad de la α -amilasa pancreática (μ g de almidon/min/mg de proteína)				
	T0	T1	T2	T3	T4
3	44,3 ^a ± 6,7	22,5 ^b ± 5,1	25,9 ^b ± 10,0	42,4 ^a ± 6,6	41,2 ^a ± 6,7
6	41,1 ^a ± 5,2	23,2 ^b ± 3,2	22,9 ^b ± 7,9	25,8 ^b ± 6,4	33,1 ^{ab} ± 6,9

T0= Sin Con A (control). T1= Con Con A. T2= Enzima preincubada durante 30 minutos con Con A. T3= Sustrato preincubado durante 30 minutos con Con A. T4= Caseína. Los resultados están expresados como promedios ± desviación estándar. Letras diferentes en una misma fila o columna indican diferencias significativas (P<0,05). Para cada tratamiento se realizaron 18 repeticiones.

cera como a la sexta semana de edad, fue significativamente menor en relación con el control ($P < 0,05$), tanto en presencia de Con A (T1) como al preincubar la enzima con la lectina (T2), con reducciones de 49,2 y 41,5% en la tercera semana y 43,4 y 44,2% en la sexta semana. La disminución de la actividad de la amilasa pancreática al preincubarla en presencia de Con A durante 30 minutos, sugiere que la lectina puede unirse a la enzima, por ser ésta una glicoproteína que contiene residuos de glucosa. Al preincubar la Con A con el almidón, sustrato de la enzima amilasa pancreática, a la tercera semana de edad, no se observó el efecto inhibitorio de la Con A sobre la enzima; no obstante, en las muestras de la sexta semana, se observó una inhibición de la actividad enzimática. Ha sido demostrado que la Con A se une a los residuos de carbohidratos del epitelio del intestino delgado [22]. Estos azúcares afines con la Con A forman parte de la estructura de las mucinas secretadas por el epitelio intestinal [26].

Por otra parte, estudios previos han revelados cambios con la edad del patrón de secreción de estas mucosustancias del tracto intestinal de las aves [6], observándose una disminución de la secreción de estas mucinas a partir de la tercera semana de edad [16]. Esta característica de las aves pudiera explicar el efecto inhibitorio de la Con A sobre la amilasa a la sexta semana de edad, tomando en cuenta que a esa edad hay una disminución significativa de las mucinas en el intestino y por lo tanto menos residuos de oligosacáridos que ocupen los sitios de unión de la Con A pudiendo existir más moléculas de Con A en forma libre capaces de unirse a la enzima y ejercer su acción inhibitoria. La inclusión de caseína en el medio de reacción, no tuvo efecto sobre la actividad de la α -amilasa pancreática. Resultados semejantes fueron obtenidos al determinar el efecto de la Con A y de la lectina del frijol rojo (LFR) sobre la actividad *in vitro* de la amilasa pancreática porcina y amilasa salival humana, reportando una disminución significativa en las actividades enzimáticas, como consecuencia de una inhibición no competitiva de ambas lectinas sobre ambas enzimas, lo que incide negativamente en la digestión de los carbohidratos de la dieta [28].

TABLA III
EFFECTO DE LA CON A SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA TRIPSINA EN HOMOGENADO DE PÁNCREAS DE POLLOS DE 3 Y 6 SEMANAS DE EDAD / EFFECT OF CON A ON TRYP SIN ACTIVITY IN PANCREATIC HOMOGENATE FROM 3 AND 6 WEECK OLD CHICKEN

Edad (semanas)	Actividad de la tripsina (Unidades de Actividad Proteolítica/mLx10 ³)	
	T0	T1
3	2,3 ^{ab} ± 0,5	2,2 ^b ± 0,4
6	2,7 ^a ± 0,5	2,7 ^{ab} ± 0,3

T0= Sin Con A (Control). T1= Con Con A. Los resultados están expresados como promedios ± desviación estándar. Letras diferentes en una misma fila o columna de cada grupo indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Para cada tratamiento se realizaron 15 repeticiones.

El efecto de la Con A sobre la actividad específica de la tripsina en homogenados de páncreas de pollos de 3 y 6 semanas de edad se presenta en la TABLA III. No se encontraron diferencias entre los tratamientos ni entre semanas. La tripsina no fue inhibida por la Con A bajo las condiciones del ensayo, dado que la tripsina no es una glicoproteína.

CONCLUSIONES

La Con A inhibió la actividad específica de la enzima α -amilasa pancreática en homogenado de mucosa duodenal de pollos de 3 y 6 semanas de edad.

La preincubación de la lectina con la enzima α -amilasa pancreática durante 30 minutos antes de iniciar la reacción afectó su actividad en mayor medida que la preincubación con el sustrato almidón.

La tripsina no fue inhibida por la Con A bajo las condiciones del ensayo.

La caseína inhibe la actividad hemaglutinante de la Con A.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) de la Universidad Central de Venezuela (UCV) por el aporte financiero a través del proyecto N° PI.11.10.4885.2001 y la Ayuda Institucional N° AI.11.00.5081-2002. Al laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Agronomía de la UCV por los análisis de electroforesis y el suministro de las semillas de *Canavalia ensiformis*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AYYAGARI, R.; RAGHUNATH, M.; NARASINGA, B. Early effects and the possible mechanism of the effect of Concanavalin A (Con A) and Phaseolus vulgaris lectin (PHA-P) on intestinal absorption of calcium and sucrose. **Plant Foods Human Nutr.** 43:63-70. 1993.
- [2] BEGBIE, R.; KING, T. The interaction of dietary lectin with porcine small intestine and production of lectin-specific antibodies. In: Bog-Hansen, T. y Brevoroviccz, J. (Eds.), **Lectins. Biology, Biochemistry and Clinical Biochemistry.** New York. 15-27 pp. 1985.
- [3] BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analyt. Biochem.** 72: 248-254. 1976.
- [4] CHRISPEELS, M.; HARTL, P.; STURM, A.; FAYE, L. Characterization of the endoplasmic reticulum-associated precursor of concanavalin A. Partial amino acid sequence and lectin activity. **J. Biolog. Chem.** 261(22): 10021-10024. 1986.

- [5] DAVIES, M.I.; MOTZOK, I. Properties of chick intestinal phytase. **Poult. Sci.** 51: 494-501. 1972.
- [6] DIBNER, J.J. KITCHELL, M.L.; ATWELL, C.A.; IVEY, F.J. The effect dietary of ingredient and age on the microscopy of gastrointestinal tract in poultry. **J. Appl. Poult. Res.** 5:70-77. 1996.
- [7] DONATUCCI, D.A.; LIENER, I.E.; GROSS, C.J. Binding of navy bean (*Phaseolus vulgaris*) lectin to the intestinal cells of the rat and its effect on the absorption of glucose. **J. Nutr.** 117:2154-2160. 1987.
- [8] ERICKSON, R.H.; KIM, J.; SLEISENGER, M.H.; KIM, Y. Effects of lectins on the activity of brush border membrane-bound enzymes of rat small intestine. **J. Pediat. Gastroenterol. Nutr.** 4:984-991. 1985.
- [9] GANEM, F.A.; MARTÍN, O. Lectina concanavalina A: obtención y purificación. **Univer. Diagnóst.** 1(1):1-41. 2000.
- [10] GELBERG, H.; WHITELEY, H.; BALLARD, G.; SCOTT, J.; KUHLENSCHMIDT, M. Temporal lectin histochemical characterization of porcine small intestine. **Am. J. Vet. Res.** 53(10):1873-1880. 1992.
- [11] HAGUE, D.R. Studies of storage proteins of higher plants. **Plant Physiol.** 55:636-642. 1975.
- [12] HARA, T.; MUKUNOKI, Y.; TSUKAMOTO, I.; MIYOSHI, M.; HASEGAWA, K. Susceptibility of kintoki bean lectin to digestive enzymes *in vitro* and its behaviour in the digestive organs of mouse *in vivo*. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.** 30:381-394. 1984.
- [13] KREJPCIO, Z.; WÓJCIAK, R. The influence of Al³⁺ ions on pepsin and trypsin activity *in vitro*. **Polish J. Environm. Stud.** 11(3): 251-254. 2002.
- [14] KRUSZEWSKA, D.; KIELA, P.; LJUNGH, A.; ERLWANGER, K.H.; WESTROM, B.R.; LINDEROTH, A.; PIERZYNOWSKI, S.G. Enteral crude red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) lectin-phytohemagglutinin-induces maturational changes in the enterocyte membrane proteins of suckling rats. **Biol. Neon.** 84(2):152-158. 2003.
- [15] LAFONT, J.; ROUANET, J.; GABRION, J.; ASSOUAD, J.; ZAMBONINO, J.; RESANCON, P. Duodenal toxicity of dietary *Phaseolus vulgaris* lectins in the rat: An integrative assay. **Digest.** 41:83-93. 1988.
- [16] MÉNDEZ, A.; GARCÍA, G. Patrón de secreción de mucosustancias en el tracto intestinal de pollos de engorde durante su ciclo productivo. **Rev. Fac. Cs. Vets. UCV.** 42(3-4):101-108. 2001.
- [17] MÉNDEZ, A.; VARGAS, R. E.; SIVOLI, L.; MICHELANGELO, C. La Concanavalina A reduce la Energía Metabolizable Verdadera del maíz. **Zoot. Trop.** 22(3):251-263. 2004.
- [18] NAKATA, S.; KIMURA, T. Effect of ingested toxic bean lectins on the gastrointestinal tract in the rat. **J. Nutr.** 115: 1621-1629. 1985.
- [19] NAMOTO, M.Y.; NARAHASHI, Y. A proteolytic enzyme of *Streptomyces giseus*. I Purification of a protease of *Streptomyces giseus*. **J. Biochem.** 46(4):653-657. 1959.
- [20] NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Poultry**, 9th Ed. Rev. National Academy Press, Washington, DC. 19 – 34pp. 1994.
- [21] PUSZTAI, A. Plant Lectins. Cambridge University Press. 1^a Ed. Gran Bretaña 263 pp. 1991.
- [22] PUSZTAI, A.; EWEN, S.W.B; GRANT, G.; PUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M.; RUBIO, L.A.; BARDOCZ, S. Plant (Food) lectins as signal molecules: Effects on the morphology and bacterial ecology of the small intestine. In: Kilpatrick, D.C., Van Driessche, E. and Bog-Hansen, T.C. (Eds.), **Lectin Reviews**. Vol. 1. 1-15 pp. St. Louis, Sigma. 1991.
- [23] RICE, E. W. Improved spectrophotometric determination of Amylase with a new stable starch substrate solution. **Clin. Chem.** 5:592-596. 1959.
- [24] SIDDON, R.C. Intestinal disaccharidase activities in the chick. **Biochem. J.** 112: 51-59. 1969.
- [25] SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. **Statistical Methods**. The Iowa State University Press. 7th Ed. Ames, Iowa, USA. 215-233 pp.1980.
- [26] STATISTIX. An interactive statistics program for microcomputers. Version 1, 1. Analytical Software. IBM version. 1995.
- [27] SPICER, S.S. Diamine methods for differentiating mucosubstances histochemically. **J. Histochem. Cytochem.** 13:211 - 234. 1965.
- [28] THOMPSON, L.U.; GABON, J.E. Effect of Lectins on Salivary and Pancreatic Amylase Activities and the Rate of Starch Digestion. **J. Food Sci.** 52(4):1050-1053.1987.