

AÇÃO DO COLÁGENO EXTRAÍDO DE TENDÕES BOVINOS
(Colágeno tipo I) NA RECUPERAÇÃO DE LESÕES DA MUCOSA DUODENAL
INDUZIDAS POR LECTINAS DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris*).
MODELO EXPERIMENTAL EM RATOS

30/92

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

AÇÃO DO COLÁGENO EXTRAÍDO DE TENDÕES BOVINOS
(Colágeno tipo I) NA RECUPERAÇÃO DE LESÕES DA MUCOSA DUODENAL
INDUZIDAS POR LECTINAS DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris*).

Parecer

MODELO EXPERIMENTAL EM RATOS.

Este exemplar corresponde a edição final da tese defendida por Ivan Domingos Carvalho Santos e aprovada pela comissão julgadora em 28.8.92.

IVAN DOMINGOS CARVALHO SANTOS

NUTRICIONISTA



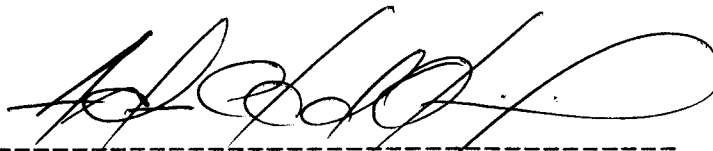
ORIENTADOR: PROF. DR. ADMAR COSTA DE OLIVEIRA

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. BENEDICTO DE CAMPOS VIDAL

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de
Mestre em Ciência da Nutrição.

1992

BANCA EXAMINADORA



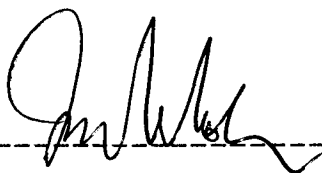
Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira

(orientador)

suplente

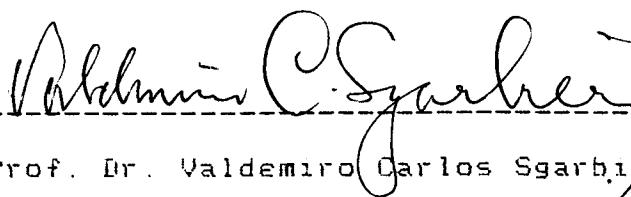
Prof^a. Dr^a. Débora de Queiroz Tavares

(membro)



Prof. Dr. João José Fagundes

(membro)



Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri

(membro)

Campinas, 28 de agosto de 1992.

Para Kika, companheira de todas
as horas.

E para meus filhos, Irena e
Tomás, pela ausência necessária.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira, por sua orientação dedicada e precisa, e ainda pela grande amizade.

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, pela co-orientação competente e amigável.

Ao Prof. Hernandes Carvalho do Departamento de Biologia Celular, do Instituto de Biologia da Unicamp, pelas discussões técnicas, pelo auxílio na confecção das fotos e pela amizade.

À Técnica Sra. Luiza Foggetti Burghi, do Departamento de Biologia Celular, do Instituto de Biologia Celular da Unicamp pelo auxílio na confecção dos cortes histológicos e pela amizade.

Aos Técnicos Sr. Mário Bianchi e Sra. Maria Souza da Silva, do Departamento de Biologia Celular, do Instituto de Biologia da Unicamp, pelo apoio no laboratório e pela amizade.

Aos colegas Paula, Ricardo, Ronaldo, Paulo, Flávia, Semíramis, Mabel, Marie, Hilda, e Claire, pelo incentivo amigável, fundamental na realização deste trabalho.

Às funcionárias Liana, Cristina, Liette, Aracilda, Cleusa e Cidinha, fundamentais em vários momentos.

À Universidade Federal de Pelotas e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo suporte oferecido.

Às famílias Vendruscolo e Mizosoe pela amizade e pelo apoio dispensado em vários momentos.

À ABIA, Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação, pelo fornecimento das capas e cópias deste trabalho.

Aos professores, funcionários, colegas e a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

ÍNDICE GERAL.....	8
ÍNDICE DE TABELAS.....	11
ÍNDICE DE FIGURAS.....	12
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	18
INTRODUÇÃO.....	21
REVISÃO DA LITERATURA.....	24
MATERIAL E MÉTODOS.....	40
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS.....	11
ÍNDICE DE FIGURAS.....	12
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	18
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1. Considerações sobre o uso do colágeno como recuperador de lesões.....	24
2.2. Utilização do colágeno como recuperador de lesões do trato gastrointestinal.....	29
2.3. Considerações sobre a ação das lectinas de feijão sobre o trato gastrointestinal.....	31
2.4. Modelos utilizados para estudos de doenças ulcerativas da mucosa do trato gastrointestinal.....	37

3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1.	Material.....	40
3.1.1.	Fonte de lectinas.....	40
3.1.2.	Fonte de colágeno.....	40
3.1.3.	Animais.....	40
3.2.	Métodos.....	41
3.2.1.	Extração e reconstituição das fibras colágenas puras (gel de colágeno).....	41
3.2.2.	Determinações químicas.....	42
3.2.2.1.	Composição centesimal.....	42
3.2.3.	Ensaio biológico.....	44
3.2.3.1.	Preparo das dietas.....	44
3.2.3.2.	Período de ocorrência das lesões.....	49
3.2.3.3.	Período de tratamento e recuperação dos ratos.....	50
3.2.4.	Teste <i>in situ</i>	53
3.2.5.	Preparação e examinação histológicas.....	53
3.2.5.1.	Fixação e inclusão do material.....	53
3.2.5.2.	Cortes histológicos.....	54
3.2.5.3.	Coloração histológica.....	54
3.2.6.	Contagem de células caliciformes.....	55
3.2.7.	Tratamento estatístico.....	56

4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.1.	Resultados obtidos do ensaio biológico.....	57
4.1.1.	Crescimento ponderal dos animais.....	57
4.2.	Resultados obtidos na examinação histológica.....	59
4.3.	Resultados obtidos na contagem de células caliciformes.....	78
4.4.	Resultado obtido no teste <i>in situ</i> de aderência do gel de colágeno à mucosa duodenal dos ratos.....	82
5.	CONCLUSÕES.....	84
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Formulação da mistura salina utilizada para o preparo da dieta ulcerativa (DU).....	46
Tabela 2. Formulação da mistura vitamínica utilizada para o preparo da dieta ulcerativa (DU).....	47
Tabela 3. Formulação da dieta ulcerativa (DU) utilizada no ensaio biológico.....	48
Tabela 4. Contagem de células caliciformes, valores médios e desvios-padrão obtidos para 18 campos microscópios em uma área de $3,249 \times 10^3 \text{ um}^2$, obtidos de 3 ratos por tratamento. Estes tratamentos foram: alimentados com dieta não-purificada de fórmula fechada (DC); alimentados com dieta de feijão cru (DU); tratados com gel de colágeno e alimentados em dieta não-purificada de fórmula fechada (colágeno + DC); e tratados com água destilada esterilizada e alimentados em dieta não purificada de fórmula fechada (água + DC).....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Protocolo para a extração e reconstituição das fibras colágenas.....	43
Figura 2. Protocolo para o ensaio biológico.....	52
Figura 3. Variação do peso médio de ratos Wistar em 4 tratamentos: () alimentados com dieta não-purificada de fórmula fechada (DC), () alimentados com dieta ulcerativa (DU), () tratados com colágeno e alimentados com dieta não-purificada de fórmula fechada (colágeno + DC), () tratados com água e alimentados com dieta não-purificada de fórmula fechada (água + DC).....	58
Figura 4. Representação diagramática de várias regiões da cripta de Lieberkuhn, vilosidade e o estado das células constituintes.	60
Figura 5. Corte histológico do duodeno de ratos alimentados em dieta não-purificada de fórmula fechada (DC); A: VL-vilosidades, CC-células caliciformes, LK-glândula de Lieberkuhn, LM-lâmina própria, MU-muco. HE, 220X. B: CA-célula absortiva, NCA-núcleo de célula absortiva, BE-bordo estriado, VS-vaso sanguíneo, CB-citoplasma basófilo.....	62

Figura 6. Corte histológico do duodeno de ratos alimentados em dieta não-purificada de fórmula fechada (DC); A: CA-célula absortiva, NCA-núcleo de célula absortiva, CB-citoplasma basófilo, BE-bordo estriado. AT, 560X. B: BEB-bordo estriado birrefringente. AT (microscopia de polarização). AT, 560X. C: BE-bordo estriado, CC-célula caliciforme. PAS, 220X.....63

Figura 7. Corte histológico do duodeno de ratos alimentados em dieta ulcerativa (DU); A: SC-solução de continuidade, R-ruptura. HE, 220X B: maior aumento de A, SC-solução de continuidade, L-linfócito. HE, 560X.....65

Figura 8. Corte histológico do duodeno de ratos alimentados em dieta ulcerativa (DU); A: NE-necrose. AT, 220X. B: FB-falhas na birrefringência. AT (microscopia de polarização), 220X. C: CCV-células caliciformes sem PAS-positivo, MU-muco. PAS, 220X.....67

Figura 9. Corte histológico do duodeno de ratos, após 24 horas da primeira intubação com gel de colágeno; A: SM-submucosa, CM-camada muscular. HE, 35X. B: maior aumento de A. HE, 220X.....69

Figura 10. Corte histológico do duodeno de ratos, após 24 horas da primeira intubação com gel de colágeno; A: BE-bordo estriado. AT (microscopia de polarização), 220X. B: PAS, 220X.....70

Figura 11. Corte histológico do duodeno de ratos, após 24 horas da primeira intubação com água destilada esterilizada; A: VLR-vilosidades rompidas. HE, 35X. B: maior aumento de A, R-ruptura, SC-solução de continuidade. HE, 220X.....72

Figura 12. Corte histológico do duodeno de ratos, após 24 horas da primeira intubação com água destilada esterilizada; A: R-ruptura, N-necrose. AT, 220X. B: FB-falhas na birrefringência. AT (microscopia de polarização), 220X. C: PAS, 220X.....73

Figura 13. Corte histológico do duodeno de ratos, após 48 horas da primeira intubação com água destilada esterilizada A: R-ruptura. HE, 220X. B: FB-falhas na birrefringência. AT (microscopia de polarização), 220X. C: PAS, 220X.....75

Figura 14. Corte histológico de duodeno de ratos, após 72 horas da primeira intubação com água destilada esterilizada; A: HE,35X. B: maior aumento de A, r-ruptura, NE-necrose. HE, 220X. C: FB-falhas na birrefringência. AT (microscopia de polarização), 220X.77

Figura 15. Corte histológico do duodeno de ratos, após teste *in situ* para exame de aderência do gel de colágeno à mucosa intestinal; FC-fibras colágenas, AD-aderência do colágeno, BE-bordo em escova. AT (microscopia de polarização), 220X.....83

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estudar uma nova utilização ao tendão bovino, subproduto da indústria animal, mais particularmente ao colágeno tipo I extraído, purificado e reconstituído na forma de gel, visando sua aplicação no tratamento de ulcerações do trato gastrintestinal (duodeno).

Para se obter o colágeno, os tendões foram colocados em solução de ácido acético adicionada de pepsina, seguida de homogeneização por 48 horas (10-12°C), para logo após ser centrifugada. O material não colagênico insolúvel foi descartado e as fibras colágenas reconstituídas a partir do sobrenadante por adição de NaCl para completa precipitação destas fibras.

As lesões do trato gastrintestinal de ratos Wistar, foram obtidas pela ação tóxica de lectinas, quando os animais passaram a ser alimentados com dieta contendo feijão (*Phaseolus vulgaris*, cv Aroana) cru. Esses feijões foram moídos e analisados quanto à composição centesimal, e empregados como única fonte protéica na formulação da dieta, em ensaio randomizado. No período de aclimação (4 dias) os animais foram mantidos em dieta não-purificada de fórmula fechada (DC) e água. O grupo controle após esse período, continuou nesta dieta até o final do experimento enquanto o grupo a ser testado passou a receber a dieta contendo o feijão cru (DU). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura e ciclo de luz em gaiolas individuais, e receberam as dietas e água *ad libitum*.

Após 09 dias , com a morte de 25% dos ratos, sabendo-se que desta forma ter-se-ia animais lesionados e em estado grave, foi encerrado o período da ocorrência das lesões e sacrificados alguns animais dos dois grupos (controle e lesão) e extraídos os duodenos para posterior exame histológico. Os animais restantes foram divididos em dois grupos, sendo um tratado com gel de colágeno e outro com água destilada esterilizada por intubação oro-gástrica nos tempos 0, 24 e 48 horas, sendo, desta forma coletados os duodenos para histologia, em 24, 48 e 72 horas desde a primeira intubação. Durante e após período de intubação, os animais restantes, 4 por tratamento, foram alimentados com dieta DC e água *ad libitum*, por mais 22 dias, em um experimento de crescimento.

Os resultados obtidos na análise de crescimento ponderal mostraram que os animais, após terem tido um ganho de peso de aproximadamente 30% no período de aclimatação, passaram a perder peso quando alimentados com dieta DU, chegando esta perda ser de aproximadamente 31%. Quando retirados desta dieta, tratados com gel de colágeno ou água e alimentados com dieta DC, esses animais voltaram a ganhar peso e chegaram ao final dos 35 dias, com os tratados com colágeno não apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparados aos controles.

Os resultados obtidos do exame histológico da mucosa duodenal dos ratos alimentados com dieta DU apresentaram lesões generalizadas, modificando a morfologia tecidual das vilosidades, glândulas de Lieberkuhn e atingindo até mesmo a lâmina própria.

Observou-se que aqueles animais que foram tratados com gel de colágeno apresentaram integridade morfológica na mucosa duodenal já nas primeiras 24 horas após intubação, o mesmo não ocorrendo com os tratados com água que, mesmo em 72 horas, ainda apresentavam lesão no ápice das vilosidades. Foi observado também, por teste *in situ*, que o colágeno adere à superfície do trato gastrointestinal.

A contagem do número de células caliciformes das vilosidades representada pelo material PAS-positivo nas mesmas, mostrou que em ratos tratados com colágeno, em 24 horas, a quantidade destas células não difere ($p < 0,05$) dos controles; em 48 horas este número é maior na metade inferior das vilosidades, e em 72 horas, maior na metade inferior, superior e no total das vilosidades. Estes resultados demonstram não haver uma diminuição de células caliciformes, mas um esgotamento das mesmas interrompendo sua produção de muco. Os ratos tratados com água, somente em 72 horas, e, na metade superior das vilosidades, apresentaram quantidade semelhante aos controles.

Os resultados indicaram uma utilização promissora do gel de colágeno purificado, obtido de tendões bovinos (colágeno tipo I), com vistas à recuperação de lesões do trato gastrointestinal.

ABSTRACT

The effect of collagen extracted from bovine tendons (Type I collagen) in the recuperation of lesions of duodenal epithelium induced by bean (*Phaseolus vulgaris*) lectins.

Experimental model in the rat.

The present thesis aimed at studying the utilization of type I collagen from bovine tendons, a by-product of animal industry, in the treatment of gastrointestinal (duodenum) lesions in rats. The collagen was extracted, purified and reconstituted in a gel form.

Tendon collagen was obtained by extraction in acetic acid solution containing pepsin, and lightly homogenization at 10-12 °C for 48 h, followed by centrifugation. The precipitate, considered to be insoluble collagen or a non-collagen material, was discarded and collagen fibers were reconstituted from the supernatant by adding NaCl to achieve precipitation.

The lesions of gastrointestinal tract of Wistar rats were caused by the action of active lectins from raw common dry beans (*Phaseolus vulgaris*, cv. Aroana). Raw common bean was offered to the rats in an otherwise balanced diet (DU) as the sole protein source, in a randomized assay. Another group of rats (control) was fed a non-purified diet of closed formula (DC)

during the assay. The rats were caged individually and maintained on the experimental diets and water *ad libitum*. The temperature and light cycle of the animal laboratory were controlled. Within 9 days of the assay, 25% of the rats receiving raw bean died, and the surviving rats become seriously ulcerated. The duodenum of some control and ulcerated rats was dissected at this time for histological examination. The surviving rats were then divided in two groups: one received the collagen and other received distilled water by gastric intubation at time 0, 24 and 48 h. At 24, 48 and 72 h after the first intubation, the duodenum of the rats were dissected for histological examination. During and after the intubation procedures, the remaining animals, 4 per treatment, were fed DC and water *ad libitum* for 22 days, in a growth experiment.

The rats fed DU showed 31% loss of body weight, and a subsequent restoration of the normal growth when the toxic effect of bean lectins have been removed by feeding DC. Nevertheless, the rats treated with collagen showed a better weight recovery than those treated with distilled water, and at the end of the experiment their weights did not differ ($p < 0,05$) from control rats.

Histological findings showed ulceration of duodenum in rats fed DU and in some cases, the lesions reached also the *lamina propria*. However, the duodenum of rats treated with collagen showed normal morphological characteristics in the first 24 h *post cibum*, whereas the rats treated with distilled water

still exhibited lesions in the apical portion of the villi 72 h after intubation.

The counting of duodenum goblet cells was made in the upper half, lower half and entire villi, by observation of the PAS-positive material. An exhaustion of PAS-positive material of goblet cells was observed in the damaged villi of rats fed DU. After 24 h of the first intubation of collagen, the quantity of these cells did not differ ($p < 0,05$) from the control rats, whereas those rats treated with distilled water reached the control rats only after 72 h, in the upper portion of villi.

The data reported in the present research, permitted drawing the conclusion that the purified collagen gel, extracted from bovine tendons (Type I collagen), has a promising utilization in the recovery of lesions of the gastrointestinal tract by gastric intubation.

1. INTRODUÇÃO

O colágeno, um dos principais componentes do tecido conjuntivo (ASGHAR & HERICKSON, 1982; PIEZ, 1984), garante a estrutura extracelular dos animais metazoários chegando a perfazer no homem 33% de sua massa protéica (GRANT *et alii*, 1979). Na indústria animal é tratado como subproduto, chegando a produção brasileira de tendões (fonte rica em colágeno tipo I), ligamentos e vergalhos, à cifra de 4.876 toneladas (BRASIL, 1985).

O colágeno tem sido há muito tempo, por ser uma proteína de baixo custo, motivo para estudos e controvérsias. Já no fim do século 18, a Academia Francesa de Ciências nomeou uma comissão para que estudasse o valor nutritivo deste produto, pois existia uma recomendação de usá-lo, na forma de gelatina, como substância básica na dieta de populações carentes (SANTOS, 1990). Atualmente sabe-se que o colágeno é deficiente em alguns aminoácidos essenciais como por exemplo: metionina, lisina e treonina, e praticamente desprovido de triptofano (McClain *et alii*, 1971, apud ASGHAR & HENRICKSON, 1982), o que faz com que o seu valor nutricional seja muito baixo. Entretanto vem sendo muito empregado em produtos médicos e cirúrgicos (CHVAPIL *et alii*, 1973), principalmente como espuma liofilizada (VIDAL, 1991) na área de controle de hemorragias (CHVAPIL & HOLUSA, 1968; HAIT, 1970; VIDAL, 1991). Para estes empregos tem-se obtido colágeno a partir de tendões, e isto deve-se ao fato destes serem menos gordu

rosos e possuírem de 80-90% da proteína (VIDAL & CARVALHO, 1990). Tal uso é possível por ser o colágeno um produto de baixa imunogenicidade (CHVAPIL *et alii*, 1973), ter ação quimiostática sobre células (VIDAL, 1987; VIDAL, 1991), plaquetas, sendo que estas após a adesão se rompem dando início ao fenômeno da hemostasia, e fibroblastos que o invadem a partir de tecidos vizinhos, acelerando desta forma, o processo de cicatrização (CHVAPIL *et alii*, 1973; VIDAL, 1991). Assim, o colágeno facilita a interação de células com o material extracelular, função esta, de grande importância durante o evento de manutenção da integridade dos tecidos(KLEINMAN *et alii*, 1981; YAMADA, 1983).

É fato conhecido as dificuldades existentes na recuperação de lesões causadas por doenças do trato gastrintestinal. Apesar da constante renovação celular da mucosa, sendo o "turnover" para ratos de 2 a 3 dias (CHENG & LEBLOND, 1974; CHENG & BJERKNES, 1982; MAYHEM & CARSON, 1989), facilitando desta forma a cicatrização quando injuriada (FEIL *et alii*, 1989), nas doenças do trato gastrintestinal esta rápida renovação celular torna-se muitas vezes prejudicial, como na gastrite crônica e atrófica, por exemplo, onde glândulas gástricas, parietais, principais e endócrinas ficam excluídas desta acelerada atividade mitótica (WHITEHEAD *et alii*, 1972). Faz-se necessário uma camada mucóide sobre a mucosa lesada, para servir de barreira ao tecido alcalino exudado, na obtenção de uma rápida e normal restituição (FEIL *et alii*, 1989). Sabe-se que o colágeno sólido microfibrilar (Avitene, FMC Corporation, Princeton, NJ) quando

utilizado na proteção de úlceras estomacais provocadas, demonstrou excelentes resultados de cura (LINSCHER *et alii*, 1982; LINSCHER *et alii*, 1988).

Por isso propõe-se, no presente trabalho, o uso do colágeno de tendões bovino, purificado e na forma de gel (VIDAL & CARVALHO, 1990), na recuperação de lesões do trato gastrintestinal de ratos. Para tanto, logo após lesionar o trato gastrintestinal dos animais por lectinas ativas, alimentando-os com dieta de feijão (*Phaseolus vulgaris*, cv Aroana) cru (KING *et alii*, 1980; KING *et alii*, 1986; DURIGAN *et alii*, 1987; OLIVEIRA *et alii*, 1989), tratá-los com o gel de colágeno através de intubação oro-gástrica. Durante todo o processo, de ocorrência das lesões e da intubação, sacrificar alguns animais e, em tempos determinados, coletar amostras do duodeno para exame histológico através de microscopia óptica, observando as lesões ocorridas pela ação das lectinas, a recuperação da mucosa lesada e a aderência do colágeno às vilosidades.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Considerações sobre o uso do colágeno como recuperador de lesões.

O colágeno, componente essencial do tecido conjuntivo, é uma das mais antigas proteínas, filogeneticamente, surgida nas mais antigas espécies de invertebrados (PIKKARAINEN & KULONEN, 1969). Embora com a evolução para formas mais elevadas da vida animal, variações na quantidade e sequência de aminoácidos da cadeia peptídica do colágeno tenham ocorrido, a composição essencial e a estrutura conformacional, a qual é única para esta proteína, manteve-se preservada (CHVAPIL *et alii*, 1973).

As pesquisas feitas com colágeno nos últimos vinte anos, acumulando dados sobre sua estrutura química, bioquímica e biológica, comprovaram a importância, quase que universal, desta proteína. As primeiras pesquisas com o colágeno foram empreendidas pelas indústrias de cola e couro; os princípios de curtimento, contribuíram muito para o entendimento do "cross-linking". De modo que, a correlação entre a degradação do "cross-linking" e o poder elástico foi básico para o entendimento das propriedades mecânicas desta proteína fibrilar.

Por ser o colágeno amplamente distribuído no corpo, certos tecidos, por ter alto conteúdo desta proteína, são utilizados na produção de produtos médicos e não-médicos como por exemplo, suturas cirúrgicas absorvíveis e revestimento de salsi

chas, ambos feitos de intestinos de carneiro e/ou boi. Vidal (1991), ressalta que uma das mais antigas utilidades do colágeno, em uso médico, tenha sido o "Gelfoam", o qual nada mais é do que o colágeno desnaturado (gelatina) em forma de espuma liofilizada. O mesmo autor relata ainda que o maior emprego da proteína tem sido como esponja de colágeno na área de controle de hemorragias.

É sabido que o tecido conjuntivo como um todo forma um sistema integrado, cujas funções principais são baseadas em interações entre células, entre células e matriz e entre os tecidos. Recentemente Moore e colaboradores (1992), relataram estudo onde, usando porção distal do íleo de porquinho da índia, como modelo *in situ*, examinaram os requerimentos para a interação das células epiteliais e a membrana basal, durante restituição das lesões epiteliais do intestino. Os autores observaram uma notável habilidade de restituição do epitélio intestinal, em face das maiores perturbações da matriz essencial. Estes autores, sugerem que a interação do colágeno endógeno com as células epiteliais é de suma importância para esta restituição após lesão, e que o colágeno é rapidamente produzido no local da lesão permitindo desta forma, uma restituição normal.

Estudos realizados por Vidal (1989) ressaltam que o colágeno, como integrante da matriz extracelular, interage com as células por meio de seus receptores e executa várias funções, formando uma unidade com um sistema de realimentação (feedback) que mantém sua homeostasia. O autor propõe um mecanismo transduc

tor, dependente da estrutura própria das fibras e/ou feixes de colágenos, como o responsável pela liberação de sinais ao nível celular. Estes sinais seriam gerados por propriedades piezelétricas do complexo molecular das fibras de colágeno e pelo aparecimento de grupos reativos polares gerados por deslocamentos intra e intermoleculares. O autor sugere ainda que, para que isso ocorra, ou seja, a comunicação célula-fibra, é necessário que as fibras tenham uma organização ordenada.

Ainda segundo trabalhos realizados pelo mesmo autor (VIDAL, 1984), o colágeno é uma proteína que possui uma formação de alta ordem molecular, como ocorre com os tendões, considerados superestruturas altamente hierarquizadas, nas quais as fibras de colágeno se agregam de maneira helicoidal formando cabos que, por sua vez, se entrelaçam formando também uma rede helicoidal. Os proteoglicanos tem suas cadeias de glicanas (GAGA) acompanhando as fibras de colágeno, ocorrendo paralelamente a estas. Mais recentemente (VIDAL, 1989), o autor pode concluir que também os resíduos de carboidratos do colágeno orientam-se paralelamente ao eixo da molécula de tropocolágeno.

Os fatores que propiciam a utilização do colágeno como recuperador de tecidos vem sendo relatado por diversos autores. O colágeno possui baixa imunogenicidade, isto é, elicita pouca ou nenhuma formação de anticorpos (CHVAPIL *et alii*, 1973), fato comprovado recentemente por Vidal (1991), analisando o enxerto de placas ou feltros de colágeno puro em seres humanos, especialmente colágeno do tipo I, extraído da pele e tendões.

O colágeno é um excelente agente quimiotático, isto é, possui a capacidade iônica de atrair substâncias como corpúsculos sanguíneos e, até mesmo, células. Desta forma o colágeno atrai fibroblastos e plaquetas, agentes fundamentais na recuperação tecidual quando da ocorrência de lesões. Além desta ação quimiotática sobre corpúsculos e células, o colágeno adere sobre a superfície dos mesmos, na maioria das vezes através de fibronectinas (KLEINMAN *et alii*, 1981; ENGVALL *et alii* & BELL, 1982; YAMADA, 1983). Mais recentemente, Ruoslahti e Pierschbacher (1987), revisando sobre adesão de células na matriz extracelular, relataram a existência de receptores na superfície celular, onde reconhecem, em componentes da matriz, como fibronectinas, vitronectinas, osteopontinas e colágenos, a sequência tripeptídica-RGD (Arg-Gly-Asp).

Desta forma, o colágeno age como um excelente indutor da agregação plaquetária (CHVAPIL & HULOSA, 1968; CHVAPIL *et alii*, 1973; HAIT, 1970; VIDAL, 1991), onde funciona como sítio de ligação para as plaquetas. Estas, em resposta, se alteram imediatamente e drasticamente, começam a inchar, tornam-se pegajosas, sofrem quebra em suas estruturas internas e liberam entre outras coisas, tromboxana A, ADP e fosfolípidos, agentes fundamentais na vasoconstrição, na aderência de novas plaquetas e na ativação da protrombina em trombina (GUYTON, 1989) tornando-se desta maneira, um acelerador da coagulação sanguínea, pelo mecanismo intrínseco.

Vidal (1991) ressaltou o fato do colágeno, como glicoproteína, ter a capacidade não só de aderir as células em sua superfície, mas também de induzir a diferenciação celular. O mesmo autor, para tanto, inseriu esponjas de colágeno em músculo da pantorrilha de ratos, após intervenção propositadamente traumática para produzir hemorragia, e detectou ação hemostática. Logo no terceiro dia já foram encontrados fibroblastos e células mononucleadas que proliferaram dos tecidos vizinhos, aderiram e invadiram o implante colagênico. Até o quarto e quinto dias, as malhas ancoraram a fibrina formada e seus espaços encheram-se de neutrófilos. Fenômenos de remodelação ocorreram em 21 dias e os próprios fibroblastos removeram, metabolizaram ou reabsorveram o colágeno implantado, fazendo, desta forma, com que a malha colagênica fosse totalmente eliminada. O autor alerta que o curso descrito depende da extensão e da massa de material implantado, pois os géis quando injetados, apesar de apresentarem as mesmas características, a remodelação torna-se um pouco mais demorada, uma vez que os fibroblastos penetram mais lentamente em sua massa. Vidal, (1989) sugere a hipótese de que os resíduos de galactose e galactose-glicose desempenhariam papel relevante nos fenômenos de reconhecimento-adesão e também a agregação do próprio colágeno, fato comprovado por observação da diminuição do grau de agregação das fibras e adesão das plaquetas ao colágeno quando da oxidação deste por ácido periódico.

2.2. Uso do colágeno como recuperador de lesões do trato gastrintestinal.

Uma das principais razões de ocorrência das lesões, da dificuldade de curá-las, e da manutenção da integridade da mucosa do trato gastrintestinal, é a falta de um material mucóide que dê proteção e condições da própria célula poder se recuperar (FEIL, 1989). O muco, produzido pelas glândulas do aparelho digestivo, juntamente com o bicarbonato, tem como principal função a de proteger a mucosa do trato gastrintestinal (FLEMSTRON, 1986); suas glicanas-ácidas assumem forma filamentar orientada e se ligam a superfície dos enterócitos (VIDAL & MELLO, 1974). Há semelhança entre estas glicanas-ácidas e as existentes no tendão; desta forma, é de se esperar que o gel de colágeno, obtido de tendões (colágeno tipo I), em substituição ao muco, além de agir da maneira como já mencionado, tenha uma ação mecânica de proteção às células da mucosa intestinal.

Devido à estrutura do colágeno ser formada por cadeias de tripla-hélices intramoleculares, estáveis por aminoácidos rígidos prolina e hidroxiprolina, que limitam sua rotação, e ainda ligações cruzadas intercadeias entre os resíduos de lisina e hidroxilisina, protegendo-o da ação de proteases (HAY, 1981; ASGHAR & HENRICKSON, 1982; PIEZ, 1984; MURRAY *et alii*, 1990) e até mesmo da collagenase pancreática, cuja ação é muito limitada (SGARBIERI, 1987), é também de se esperar que o mesmo permaneça no intestino o tempo necessário para desenvolver sua ação de re

cuperador de lesões.

Linscheer e colaboradores (1982), utilizando um modelo com cães, estudaram o efeito do colágeno sólido microfibrilar (MC) Avitene em úlceras estomacais provocadas. Inicialmente os cães sofriam laparotomia (abertura da cavidade abdominal) e logo após, usando uma técnica de biopsiar por sucção, eram feitas 24 úlceras. Após a ocorrência do sangramento espontâneo, metade das úlceras, ao acaso, eram enchidas com o MC e este material era em seguida fixado e coberto por um "spray" atomizado de trombina crioprecipitada (TAC). O estômago então era fechado. Um total de 10 cães foram sacrificados após 1, 3, 6, 14 e 21 dias para estudo de efeito do MC na cura das úlceras por microscopia óptica. Em adição, em 3 cães, 50% das úlceras eram agravadas por pulverização de HCl (0,1N) mais pepsina (16mg/dL) após 3 dias. A maior parte dos MC não se soltaram das úlceras e mostraram-se excelentes organizadores de fibroblastos. Após 3 dias, o epitélio gástrico começava a crescer sobre as fibras de colágeno exógeno e estas praticamente desapareciam na completa cura das úlceras após 3 semanas. Na proteção contra pulverização com HCl-pepsina, somente em torno de 24% das úlceras pré-tratadas sangraram. Os autores concluíram que o colágeno demonstrou não atrasar a cura, não criar corpos estranhos, e revelou-se ainda, um excelente tampão contra o sangramento e um ótimo organizador de fibroblastos. Os autores sugeriram ainda o mesmo processo de tratamento por MC para ser usado em pacientes usando canal gastroscópico.

Em 1988, Linscheer e colaboradores, em modelo experimental semelhante, compararam a eficiência na cura das úlceras entre o colágeno sólido (CS), colágeno líquido (CL) e sem colágeno (NC). Três dias após, as úlceras foram injuriadas com "spray" de pepsina-ácida com finalidade de provocar um ressangramento. Avaliaram ainda a necessidade de fixar o colágeno com TAC, fixado somente metade dos grupos CS, CL e NC. Por exame histológico, os autores constataram que apenas 25% das úlceras CS sangravam contra 94,1% e 83,6% dos tratados com CL e NC, respectivamente e que a proteção era independente da TAC. Concluindo desta forma, ser o colágeno, na forma sólida, um excelente protetor contra o ressangramento provocado por pepsina-ácida.

2.3. Considerações sobre a ação de lectinas de feijão (*Phaseolus vulgaris*), sobre o trato gastrintestinal de animais.

Em artigo de revisão Tobin e Carpenter (1978) relatam que muitas variedades de feijões da espécie *Phaseolus vulgaris*, são fontes significantes de proteína em largos segmentos populacionais do mundo. Oliveira (1986) comenta o fato do Brasil estar entre os maiores produtores e consumidores de feijão (*Phaseolus vulgaris*) do mundo e que, considerando os alimentos isolados, constitui a maior fonte protéica consumida em todas as suas regiões. O mesmo autor relata ainda que os primeiros ensaios biológicos, com vistas a determinar o valor nutritivo das proteí

nas do feijão, mais particularmente da faseolina e da farinha integral foram obtidos por Osborne e Mendel, em 1919, e cedidos para publicação a Johns e Finks, em 1920. Aqueles pesquisadores verificaram que ratos perdiam peso rapidamente e morriam, quando colocados em dietas contendo faseolina crua como fonte protéica.

Atualmente sabe-se que além da deficiência em metionina, seu principal aminoácido limitante (BALDI & SALAMINI, 1973), o feijão possui fatores antinutricionais, como inibidores de enzimas proteolíticas e lectinas (hemaglutininas).

A presença de hemaglutininas em *Phaseolus vulgaris* foi reconhecida em 1908 por Landsteiner e Raubistschek, mas evidências diretas de que as mesmas seriam a causa responsável pela toxicidade do feijão cru foi pioneiramente descrito por Jaffé e colaboradores, em 1955 apud Liener (1986), e mais tarde comprovado por muitos pesquisadores (KING *et alii*, 1980; DURIGAN *et alii*, 1987; OLIVEIRA *et alii*, 1989) de que as lectinas são as maiores responsáveis pelo baixo valor nutritivo destas leguminosas em sua forma crua.

A proposta original de Jaffé e colaboradores, em 1955 apud Liener (1986), da toxicidade de dietas contendo lectinas foi comprovada isolando uma fração protéica de feijão preto, a qual foi chamada Phaseolotoxina A; este preparado que tinha atividade aglutinante em eritrócitos de coelho, foi tóxico quando injetado em camundongo, e inibiu o crescimento de ratos, quando incorporado às dietas.

Atualmente, sabe-se que lectinas são um grupo de proteínas ou glicoproteínas, que ocorrem naturalmente e abundantemente nas plantas, particularmente na família das leguminosas, e são também encontradas em alguns tecidos de invertebrados (LIENER, 1991). O nome lectina deriva do latim "lectio, onis", que significa escolha, seleção. É um termo que reflete o fato destas glicoproteínas, de origem não-imune, ligarem-se a grupos específicos de carboidratos aglutinando células e/ou precipitando glicoconjugados (KING *et alii*, 1980; KING *et alii*, 1986; GOLDSTEIN & PORETZ, 1986). Esta especificidade por grupos de carboidratos tem dado às lectinas utilidades como integrante de técnicas histoquímicas no estudo da composição glicídica de compostos celulares, por exemplo (FREEMAN *et alii*, 1980; POSEL *et alii*, 1988; KIIERNAN, 1990).

King e colaboradores (1980) conduziram uma série de estudos detalhados que definem e identificam as lectinas como um dos principais fatores responsáveis pela toxicidade associada com o consumo de *Phaseolus vulgaris*, na forma crua. Estes autores alimentando ratos, com dietas de feijão cru e/ou fazendo aplicações intragástricas com lectinas isoladas, estudaram a ação das mesmas através de histologia por microscopia óptica e eletrônica. Os pesquisadores concluíram que as lectinas após se ligarem, por mecanismo ainda não conhecido, à superfície das células intestinais, acarretam mudanças morfológicas na bordadura em escova, com consequente desenvolvimento anormal das microvilosidades e ainda ocorrendo ruptura das mesmas. Ressaltam ainda que se estes ani-

mais continuarem sob a ação das lectinas por vários dias, ocorre um crescimento bacteriano na superfície intestinal, aumentando desta forma, as lesões nas microvilosidades, e ocasionando um crescimento no número de eosinófilos na lâmina própria, sugerindo desta maneira, uma resposta imunológica (possivelmente envolvendo IgE) à presença de irritantes na mucosa.

King e colaboradores (1986) trabalharam na localização de lectinas de feijão, por técnica de marcação com ouro coloidal para microscopia eletrônica, em células epiteliais de intestino delgado de ratos. Detectaram estas lectinas na superfície da mucosa e em outros corpos multivesiculares das regiões apicais e médias dos enterócitos lesados, e em outros corpos multivesiculares e lisossomas nas regiões apical e periféricas do citoplasma de células caliciformes. Os autores citam ainda trabalhos realizados por Freed (1982) e Fuzstai e Greer (1984) onde relacionaram lectinas e outras sementes protéicas de serem estimuladores da secreção intestinal de muco, sugerindo desta forma, sem explicar o mecanismo, que isto ocorra pelo fato das lectinas poderem ser absorvidas pelas células intestinais. Fuzstai e colaboradores (1986) relacionaram que efeitos similares podem, em parte, explicar o aumento no peso intestinal de ratos alimentados por feijão. Consideram ainda a possibilidade das lectinas, após serem absorvidas pelas células intestinais, passarem à circulação, para agir tóxicamente em outros tecidos. No mesmo trabalho os autores comentam que logo após a administração intragástrica de lectina de feijão cru, cai rapidamente o nível de insulina no sangue, de

monstrando haver uma disfunção hormonal.

Rubio e colaboradores (1989) pesquisando alterações histológicas no pâncreas e intestinos de galinhas, produzidas por lectinas proveniente de dieta de feijão cru, notaram hipertrofia no pâncreas, diminuição das microvilosidades e hiperplasia de células caliciformes.

Trabalho realizado por Durigan e colaboradores (1987), mostrou que o efeito antinutricional das lectinas em ratos é reversível, pois após os animais serem retirados da dieta contendo feijão cru, como única fonte protéica, e passando a ser alimentados com dieta contendo como proteína somente caseína, voltam a ganhar peso. Weinman e colaboradores (1989) administrando, por via intragástrica, lectinas de feijão cru em ratos, estudaram, através de microscopia eletrônica, a recuperação das microvilosidades nos intestinos. Os autores concluíram que as lesões apareciam logo após 2 horas, limitando-se às microvilosidades, rompendo e diminuindo as mesmas, e desaparecendo após 20 horas da aplicação.

Oliveira e colaboradores (1989) investigaram o crescimento ponderal e lesões no epitélio intestinal de ratos alimentados com dieta contendo feijão cru e de ratos intubados, de forma intragástrica, com lectina isolada (Concanavalina A). Após ocorrência das lesões, os animais foram retirados destes tratamentos e passaram a ser alimentados com dieta comercial e dieta contendo caseína como fonte protéica. A seguir, alguns animais de cada grupo foram sacrificados e dissecados o duodeno e a porção

medial do jejuno, para análise morfológica do epitélio por microscopia óptica. Nos grupos tratados com lectinas foram detectadas soluções de continuidade na bordadura em escova das células epiteliais, ulceração e colapso dos vilos, expondo a lâmina própria e redução no número das células caliciformes, que foi demonstrado pela ausência de material PAS-positivo, particularmente nas regiões onde ocorriam as principais lesões. Após 22 dias da retirada dos animais da ação das lectinas estes apresentaram normalidade na morfologia da mucosa intestinal. Os autores alertaram para o fato do desaparecimento das células caliciformes, que poderia ser por exaustão das mesmas, mas o mecanismo preciso não foi esclarecido.

Almeida e colaboradores (1991), estudando o efeito de diferentes tratamentos por calor na atividade antinutricional de lectinas de *Phaseolus vulgaris* em intestino de ratos, concluíram que ocorre um processo inflamatório do epitélio e aderência de bactérias. Os autores comentam, ao contrário do encontrado por Oliveira e colaboradores (1989), sem explicar a metodologia usada, que a densidade de células caliciformes nas criptas e vilosidades, é semelhante àquela dos controles, ou seja, não ocorreu diminuição no número de células caliciformes quando da ação das lectinas.

2.4. Modelos utilizados para estudos de doenças ulcerativas da mucosa do trato gastrointestinal.

Para estudar as doenças do aparelho digestivo, particularmente lesões e cura da mucosa gastrointestinal, existem inúmeros modelos onde se utilizam diferentes animais.

Wallace e MacNaughton (1988) descrevem um modelo utilizando ratos onde danificaram o trato gastrointestinal dos mesmos com um fator de ativação plaquetária (PAF). Os animais foram privados de alimentos durante 18-22h antes de começar o experimento. Após, os ratos são anestesiados com pentobarbital sódico e a artéria carótida canulada para medição da pressão arterial sistêmica. Uma agulha de padrão 25 é inserida em uma veia da cauda do animal para a administração de 100mg/Kg do PAF, por 20 minutos. Esta dosagem é suficiente para produzir necroses gástricas.

Sellers e colaboradores (1987) utilizaram-se de etanol para lesar o epitélio gástrico de ratos e analisar a formação de uma base fibrilar gelatinosa no reparo do mesmo. Os animais, após jejum, foram anestesiados com pentobarbital. O estômago foi exposto e o esôfago e duodeno ligados, excluindo vasos sanguíneos maiores e nervos. A aplicação de etanol 70% por 45 segundos foi suficiente para destruir 96% do epitélio superficial.

Rachmilewitz e colaboradores (1989) induziram inflamação no cólon de ratos, administrando por via intraluminal 0,25 mL de etanol 50% contendo 30 mg de ácido trinitrobenzenosul

fônico. Esta solução foi introduzida, via cateter de 3 mm de diâmetro, através do ânus.

Donohue-Shea e colaboradores (1990) descreveram a utilização do ácido acetil salicílico em primatas machos Rhesus (*Macaca mulatta*) para estudar a indução de mudanças nas funções gástricas ocasionando destruição da mucosa gástrica.

Linscheer e colaboradores (1982), como já descrito, usaram cães para estudar a utilização do colágeno como recuperador de úlceras. Os animais foram anestesiados, sofreram laparotomia e, em seguida, as úlceras estomacais eram provocadas através de uma técnica de biopsiar por sucção. Logo após a aplicação do colágeno, os estômagos eram suturados e, no prazo de 3 dias, os animais foram sacrificados.

Rifkin e Fekety (1985) comentaram a utilização de antibióticos na indução de enterocolites em alguns animais, como hamsters, ratos e coelhos. Os autores ressaltam também, que este tipo de técnica pode muitas vezes ocasionar a morte destes animais.

Moore e colaboradores (1992) fazendo uso de 0,06-0,09% de Triton X-100, um detergente capaz de ocasionar lesão formando uma cavidade nas vilosidades, estudaram *in vitro*, a capacidade de restituição do epitélio intestinal de porcos.

Oliveira e colaboradores (1989) estudaram a ação tóxica de lectinas ativas do feijão (*Phaseolus vulgaris*) cru na mucosa intestinal de ratos. Para tanto os autores alimentaram os animais com dietas, onde a única fonte protéica era a proveniente

do feijão. Foram detectadas lesões muito características como destruição de microvilosidades, ulceração, colapso e sinais de inflamação nas vilosidades. Foi detectado ainda que estas lesões eram reversíveis, ou seja, após os animais serem retirados desta dieta e colocados em dieta comercial, apresentavam recuperação do crescimento e as lesões, após 21 dias, desapareciam, com os animais, desta forma, apresentando morfologia tecidual semelhantes àqueles que permaneceram durante todo o experimento alimentados com dieta controle.

A decisão de escolher, para o presente trabalho, este modelo de provocar lesões na mucosa do trato gastrintestinal de ratos e após tratá-los com gel de colágeno, foi tomada porque o mesmo apresenta algumas características como: lesões semelhantes às encontradas em estudos histológicos de duodenites, como já visto por Greenlaw e colaboradores (1980); lesões reversíveis, facilitando desta forma, a análise da ação recuperativa do colágeno; modelo relativamente simples e de fácil obtenção do material a ser utilizado, como as dietas ulcerativas, preparadas no próprio Laboratório de Ensaios Biológicos do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos e dos ratos Wistar, que são produzidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material.

3.1.1. Fonte de lectinas ativas.

Neste trabalho utilizou-se como fonte de lectinas ativas, grãos de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) cru, cultivar Aroana 80, procedente do Instituto Agrônômico de Campinas (IAC), Campinas, SP.

3.1.2. Fonte de colágeno.

Utilizou-se tendões bovinos.

3.1.3. Animais.

Utilizou-se 46 ratos heterogenéticos albinos machos da linhagem Wistar, S.P.F. 4 estrelas, recém-desmamados, procedentes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas, originários de matrizes recebidas em 1987 do Zentralinstitut für Versuchstierzucht (Central Institut for Laboratory Animal Breeding, Hannover, República Federal da Alemanha).

O manuseio com os ratos, obedeceu a Lei nº 6.638, de 08 de maio de 1979, publicada no Diário Oficial da União, onde a Legislação Brasileira estabelece normas para a prática didático-

-científica da vivissecação de animais e determina outras providências.

Ao serem recebidos, no Laboratório de Ensaios Biológicos do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP, os ratos tinham 21-23 dias e pesavam $55,4 \pm 5,1g$. Os animais foram colocados em gaiolas de crescimento individuais e mantidos durante 4 dias com água e dieta não-purificada de fórmula fechada, Nuvilab CR1 (Nuvital Nutrientes Ltda., Estrada da Ribeira, nº 3001, Km 3, Curitiba, Paraná). O laboratório era mantido com temperatura controlada, de $22^{\circ}C$ e ciclos de luz e escuro alternados a cada 12 horas (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 1977). Este período destinou-se à aclimação dos animais ao laboratório, permitindo, desta forma, o controle de possíveis doenças e que, ao início do ensaio, estivessem maiores e com pesos semelhantes, de $83,4 \pm 4,3g$.

3.2. Métodos.

3.2.1. Extração e reconstituição das fibras colágenas puras (gel de colágeno).

Para extração do colágeno, os tendões bovinos foram colocados em uma solução de ácido acético a 2% contendo $1mg/mL$ de pepsina (Merck, 80 FIP/Ug, $1200E/g$), seguida de leve homogeneização em Ultra-Turrax. Após 48 horas no refrigerador ($10-12^{\circ}C$), a solução foi centrifugada ($15.000 \times g$ por 30 min.). O precipi

tado, considerado colágeno insolúvel ou material não colagênico, foi descartado e as fibras colágenas reconstituídas a partir do sobrenadante transparente, por adição de NaCl (concentração final 2,5M) para completa precipitação das fibras colágenas (VIDAL & CARVALHO, 1990).

O protocolo para a extração e reconstituição das fibras colágenas, encontra-se na Figura 1.

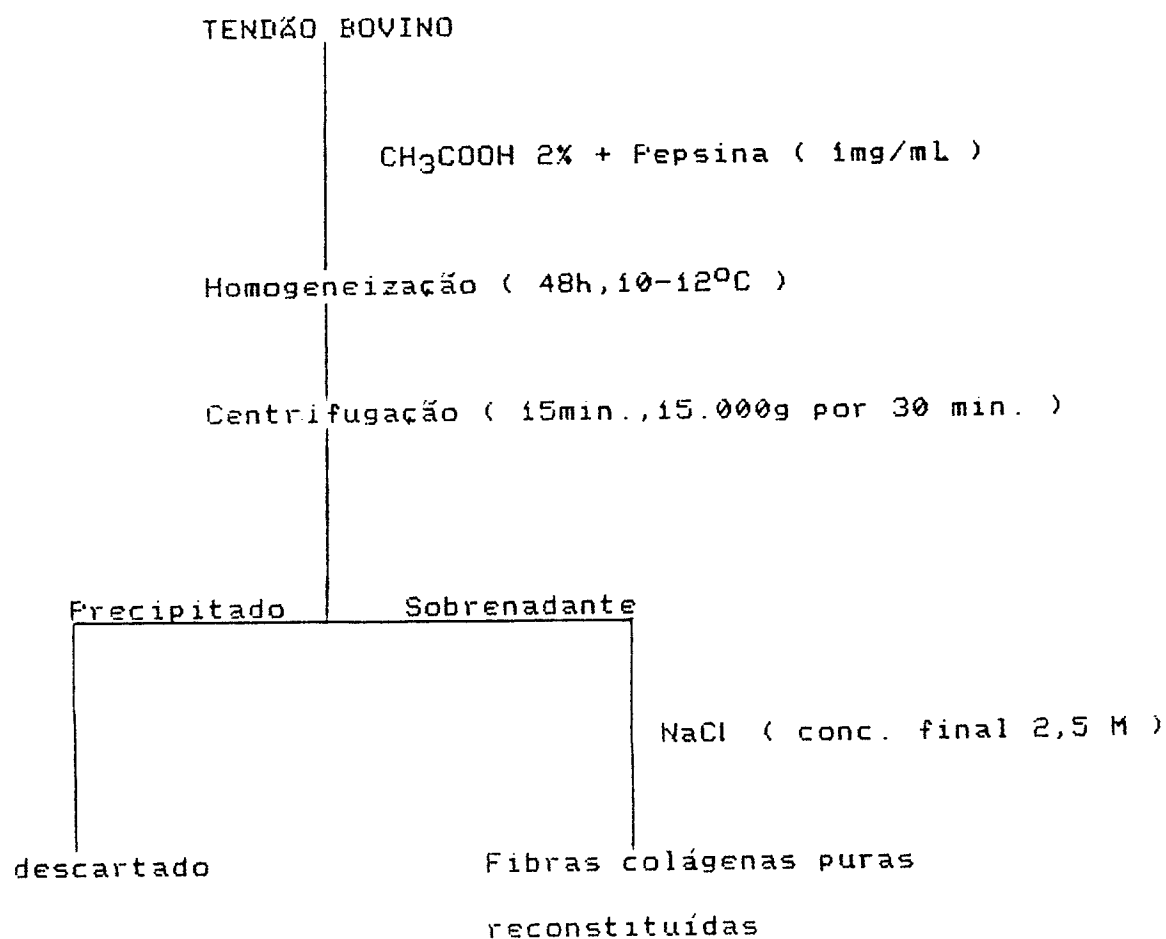
3.2.2. Determinações químicas.

3.2.2.1. Nitrogênio. Determinado pelo método semi-micro Kjeldahl, usando sulfato de potássio (K_2SO_4), sulfato de cobre ($CuSO_4$), e dióxido de titânio (TiO_2), segundo Williams (1973), como catalizadores da digestão das amostras.

3.2.2.2. Composição centesimal. Foram feitas as seguintes determinações para o estudo da composição centesimal:

- a) Proteína bruta. Por multiplicação dos teores de nitrogênio obtidos pelo fator de conversão 6,25 (PAULL & SOUTHGATE, 1978).
- b) Lípidos totais. Segundo Bligh e Dyer (1959).
- c) Umidade. Por gravimetria, método 14.003 segundo a Association of Official Analytical Chemists-AOAC (1980).
- d) Cinzas (PEARSON, 1976).
- e) Carboidratos, por diferença.

FIGURA 1. Protocolo para a extração e reconstituição das fibras colágenas puras*.



*Segundo VIDAL & CARVALHO (1990)

3.2.3. Ensaio Biológico.

3.2.3.1. Preparo das dietas. Como dieta controle (DC), foi utilizado dieta não purificada de fórmula fechada, NUVILAB CR1 (Nuvital Nutrientes Ltda., Estrada da Ribeira, nº 3001, Km 3, Curitiba, Paraná), autoclavada e seca à temperatura de 65°C. Já a dieta ulcerativa (DU) foi preparada segundo AOAC (1975), onde a única fonte protéica foi o feijão (*Phaseolus vulgaris*, cv Aroana) cru. Este feijão foi moído em moinho de facas Ika - Universal Muhle M 20 (Ika - Werk 7813 Staufen im Breisgau, Germany), até a obtenção de uma granulação de 60 mesh conferida por peneira Granutest (Telastem Peneiras para Análises Ltda.). Após a determinação da composição química centesimal do feijão, onde encontrou-se os valores de, $26,38 \pm 0,59\%$ (Nx6,25) para proteína; $1,32 \pm 0,09\%$ para lípides totais; $8,56 \pm 0,08\%$ para umidade; $3,84 \pm 0,09\%$ para cinzas; e 59,91% para carboidratos (por diferença), foi preparada uma dieta com 10% de proteína, representadas por aquelas existentes no feijão, completando 8% de lípides com óleo de milho refinado São Francisco (Refinadora de Oleos Brasil Ltda., Rua Amazonas nº 77, São Caetano do Sul, São Paulo, Brasil) e ainda, 5% de mistura salina (United States Pharmacopoeia-USP XIX, AOAC, 1975) e 2% de mistura vitamínica (NUTRITIONAL BIOCHEMICALS CORPORATION, 1977/78) para fortificação da dieta. As formulações das misturas salina e vitamínica podem ser vistas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. A seguir a dieta foi completada a 100% com carboidratos, sendo 25% como sacarose, açúcar refinado União (Companhia União dos Refinadores - Açúcar e Café,

rua Assis Carneiro nº 80, Rio de Janeiro, Brasil) e 75% como amido de milho Maizena (Maizena Durya - Refinações de Milho Brasil Ltda., rua Paulo Bueno nº 2935, Mogi Guaçu, São Paulo, Brasil), de forma que as dietas apresentaram-se isoprotéicas e isocalóricas, tendo uma composição química centesimal de, $10,25 \pm 0,54\%$ para proteína; $8,31 \pm 0,10\%$ para lípides; $7,12 \pm 0,11\%$ para umidade; $4,56 \pm 0,04\%$ para cinzas; e 69,76% para carboidratos.

A formulação da dieta ulcerativa pode ser vista na Tabela 3, descrita conforme American Institute of Nutrition (1984).

TABELA 1. Formulação da mistura salina* utilizada para o preparo da dieta.

COMPONENTE	FÓRMULA	PERCENTAGEM
Carbonato de cálcio	CaCO_3	38,140
Fosfato di-potássico	K_2HPO_4	38,900
Cloreto de Sódio	NaCl	13,930
Sulfato de magnésio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,730
Sulfato ferroso	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,700
Iodeto de potássio	KI	0,079
Sulfato de manganês	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,400
Sulfato de zinco	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,050
Cloreto de cobalto	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,002
Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,040

*Conforme USP XIX (AOAC, 1975)

TABELA 2. Formulação da mistura vitamínica* utilizada para o preparo da dieta.

COMPONENTE	PERCENTAGEM
Concentrado de vitamina A (200.000 UI/g)	2,948
Concentrado de vitamina D (400.000 UI/g)	0,163
Alfa-tocoferol	3,276
Ácido ascórbico	29,486
Inositol	3,276
Cloreto de colina	49,144
Menadiona	1,474
Ácido p-aminobenzóico	3,276
Niacina	2,948
Riboflavina	0,655
Hidrocloreto de piridoxina	0,655
Hidrocloreto de tiamina	0,655
Pantotenato de cálcio	1,965
Biotina	0,013
Ácido fólico	0,058
Vitamina B ₁₂	0,001

* Conforme NBC (1977/78)

TABELA 3. Formulação da dieta ulcerativa utilizada no ensaio biológico.

COMPONENTE	DIETA
<i>X</i>	
Feijão comum	379,1
óleo vegetal*	75,0
Mistura salina**	50,0
Mistura vitamínica.#	20,0
Carboidrato (q.s.p.)##	1.000,0

* de milho "São Francisco".

** USP XIX (AOAC, 1975).

NBC (1977/78).

Amido de milho "Maizena" e açúcar refinado "União" 3:1 p/p.

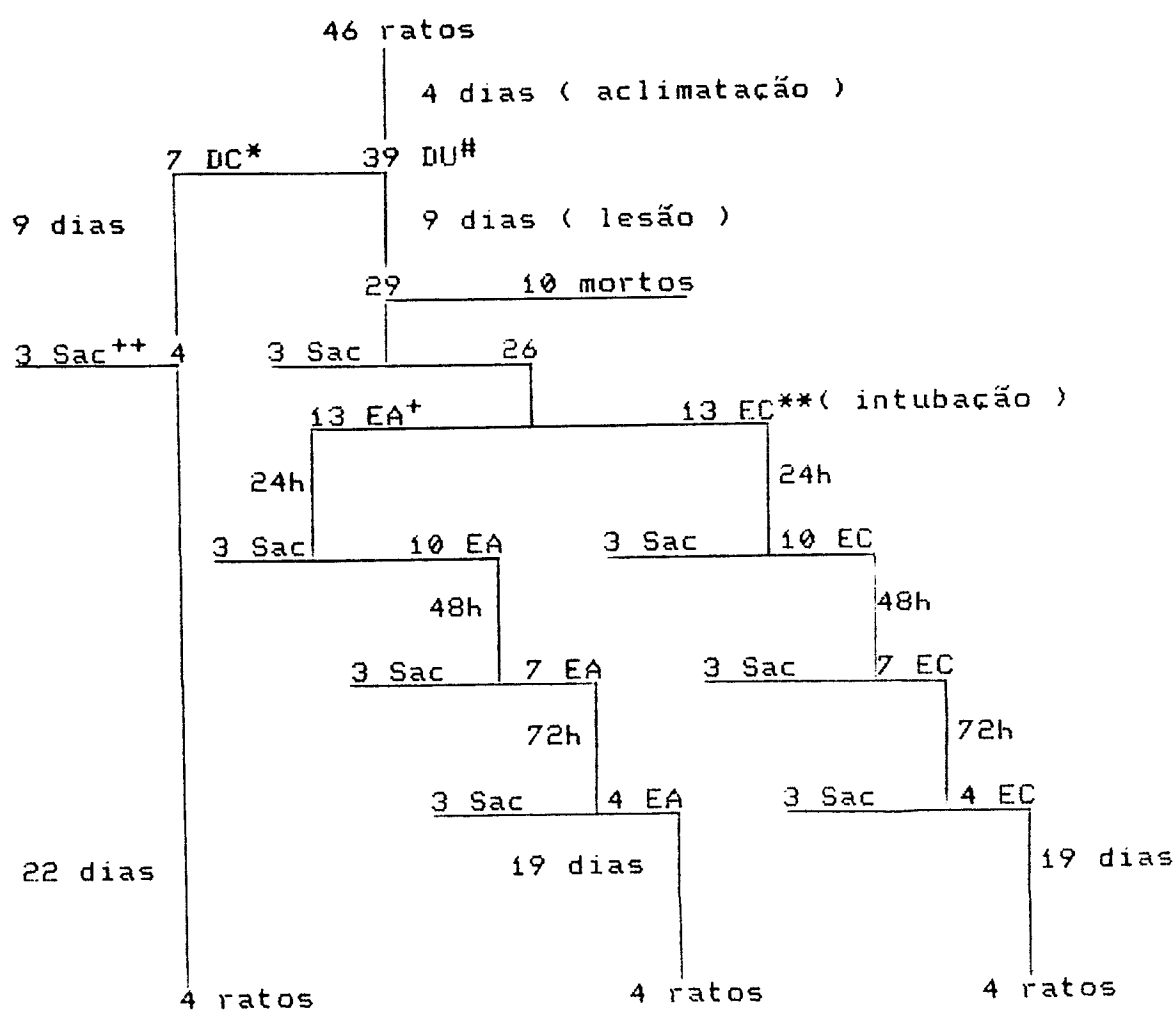
3.2.3.2.Período de ocorrência das lesões. Após o período de aclimação (4 dias) no Laboratório de Ensaios Biológicos, 7 animais permaneceram alimentados com dieta DC, formando um grupo controle do experimento,e 39 animais passaram a ser alimentados com a dieta DU, onde a única fonte protéica era proveniente do feijão cru, com a finalidade de lesionar a mucosa gastrintestinal dos mesmos (OLIVEIRA *et alii*, 1989). Passados 09 dias, com a morte de 10 ratos alimentados com a dieta DU, perfazendo assim 25% dos 39 ratos iniciais tinha-se a certeza de que os animais teriam lesões graves*. Em seguida foram sacrificados, em atmosfera de éter etílico p.a., e dissecados os duodenos de 3 ratos com lesão e de 3 ratos controles. O restante dos animais foram novamente pesados e aqueles com lesões divididos em 2 grupos de 13 ratos cada um.

* Nesse sentido, foi realizado experimento preliminar, cujos resultados foram apresentados no I Congresso de Farmácia do Cone Sul, Gramado, Rio Grande do Sul, Set. 1991, e publicados em Caderno de Farmácia, Porto Alegre, 2 :D13-D15, 1991.

3.2.3.3. Período de tratamento e recuperação dos animais. Os 4 ratos do grupo controle, permaneceram sendo alimentados com dieta DC, até o final do experimento. Os 2 grupos de animais ulcerados foram retirados da dieta DU onde, um grupo foi tratado por meio de intubação com 1,5ml de gel de colágeno e o outro com 1,5ml de água destilada esterilizada (grupo testemunha). Estas intubações foram feitas por via oro-gástrica, através de uma sonda retal Ibrasgamma nº 04 (Ibras- CBD Indústrias Cirúrgicas e ópticas S.A., Campinas, São Paulo), adaptada à agulha de uma seringa hipodérmica de 5 mL, usada como reservatório e medidor de volume do gel de colágeno e/ou água a serem administrados. Os animais no momento da intubação foram anestesiados com éter etílico e, logo após, permaneceram em jejum durante 3 horas, passando a seguir, a ser alimentados com dieta DC. Após 24 horas, todos os ratos foram pesados e 3 de cada tratamento foram sacrificados e dissecado o duodeno para histologia. Novamente os animais restantes foram intubados, repetindo o processo já descrito anteriormente. Todo esse procedimento, pesagem, intubação e dissecação, foi repetido no dia seguinte completando um terceiro dia de tratamento. No quarto dia os animais são somente pesados e dissecados os duodenos de 3 ratos por tratamento, completando, desta forma, amostras histológicas do duodeno para 24, 48 e 72 h após o primeiro tratamento. O restante dos animais (4 por grupo) ficaram recebendo dieta DC durante mais 19 dias, completando assim 35 dias de experimento para o crescimento ponderal dos ratos.

O protocolo para o ensaio biológico, ou seja, dos períodos de aclimação, lesão, tratamento e crescimento ponderal, pode ser visto na Figura 2.

FIGURA 2. Protocolo para o Ensaio Biológico.



* DC - dieta não purificada de fórmula fechada

DU - dieta de feijão cru

+ EA - tratados com água

**EC - tratados com colágeno

++Sac- sacrificados

3.2.4. Teste *in situ*. Visualização da aderência do colágeno às vilosidades.

Após sacrificar 3 ratos, pesando $84,2 \pm 3,5$ g, em atmosfera de éter etílico, foram removidos seus respectivos duodenos e colocados em solução fisiológica. A seguir, usando uma seringa hipodérmica foi aplicado, lentamente, o gel de colágeno, de forma a simular o trajeto regular do quimo pelo intestino, da seguinte maneira: começando pela região óstio-pilórica, fazendo com que o gel percorresse toda a luz do duodeno, até o seu aparecimento na região da flexura duodeno-jejunal, tendo-se assim, a certeza de um preenchimento total do duodeno pelo gel de colágeno. Após o material foi rapidamente fixado, para posterior exame histológico, obedecendo as técnicas que serão descritas a seguir em 3.2.5.

3.2.5. Preparação e examinação histológica.

3.2.5.1. Fixação e inclusão do material. O duodeno dissecado foi imediatamente fixado por 24h em paraformaldeído 2,5% contendo 0,2% de glutaraldeído em tampão fosfato 0,1M pH 7,4. Após, o material foi incluído em cápsulas de gelatina a 2,5% e refixado por 24h em formaldeído 1 N. Depois foi lavado em água corrente e desidratado com sucessivos banhos de álcool, em tempos determinados, de concentrações iguais a 70,80,95 e 100% respectivamente. Logo após, foi clarificado em xilol para histologia e incluído a 58°C, em "Paraplast plus" (mistura de parafina, polímeros plásticos e dimetil-sulfóxido) com 1% de cera de abelha.

3.2.5.2. Cortes histológicos. Os cortes transversais foram obtidos com espessura de 5 μ m, feitos em micrótomo rotativo de marca Ancap modelo 781.

3.2.5.3. Coloração histológica. As lâminas foram desparafinadas em xilol (2 banhos à temperatura de 58°C), hidratadas, começando com solução álcool-xilol 1:1, seguido de sucessivos banhos de álcool (100 - 70%) e finalizando com água destilada. A seguir, coradas com: hematoxilina e eosina (HE); azul de toluidina (AT) 0,025% pH 4,2, com finalidade de evidenciar poliânions - ácidos nucleicos e glicosaminoglicanas ácidas e carboxiladas (MELLO & VIDAL, 1980; KIIERNAN, 1990); "periodic acid-Shiff" (PAS) corando glicogênio, polissacarídeos neutros e glicoproteínas (material PAS - positivo) para estudo de células caliciformes e superfície celular (MELLO & VIDAL, 1980; PEARSE, 1985). Através de microscopia óptica foi feita análise da morfologia das vilosidades e de suas superfícies, as quais correspondem às microvilosidades. Por microscopia de polarização foi analisado a birrefringência da superfície das vilosidades, determinando sua integridade e a aderência do colágeno (MELLO & VIDAL, 1980).

3.2.6. Contagem de células caliciformes das vilosidades.

Em cortes corados com PAS contou-se a quantidade de células caliciformes por campo microscópico. Determinou-se que cada campo microscópico equivaleria à metade superior e/ou inferior de uma área de $3,249 \times 10^3 \text{ um}^2$ em um aumento de 125X. A determinação desta área e sua divisão em dois campos, foi feito através do uso de uma ocular KPL 12,5X (Carl Zeiss West Germany) aferida com uma lâmina Mikrometer, de 2mm de comprimento com 200 divisões (E. Leitz Gm. b. H. Wetzlar). Na padronização desta contagem escolheu-se ao acaso, uma região dos cortes histológicos de duodeno. Em seguida ajustou-se a linha inferior da área determinada na ocular com a linha divisória entre o topo das criptas de Liberkuhn e a base das vilosidades. Logo após processou-se a contagem da seguinte forma: total de células caliciformes existentes no campo microscópico superior (metade superior das vilosidades), total de células caliciformes existentes no campo microscópico inferior (metade inferior das vilosidades) e total de células caliciformes existentes em toda a área estipulada (soma dos dois campos).

3.2.7. Tratamento Estatístico.

Empregou-se a distribuição randomizada ("Completely Random Design" ou CRD) para o delineamento experimental (BENDER et alii, 1982).

Os valores obtidos dos ensaios foram submetidos à análise de variância e, quando diferentes ao teste F, analisados de acordo com Duncan (1955), ao nível de 5%, para verificar diferenças entre os mesmos. Para tanto foi utilizado o programa Statistical Package for Social Sciences, para regressão simples, teste T, análise de variância e teste de comparação múltipla, em Personal Computer (PC) AT286.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Resultados obtidos do ensaio biológico.

4.1.1. Crescimento ponderal dos animais.

Os resultados do ensaio de crescimento com três diferentes tipos de tratamentos, são mostrados na Figura 3, expressa com a evolução dos pesos médios dos ratos em função do tempo.

Nos primeiros 4 dias (período de aclimação), quando os ratos foram alimentados com dieta DC, dieta não-purificada de fórmula fechada, observa-se que os animais que pesavam inicialmente $55,4 \pm 5,1g$ atingiram $83,4 \pm 4,3g$, tendo desta forma um ganho de peso de aproximadamente 30% ($24,5g$) por animal, e os animais que permaneceram nesta dieta (ratos controles) apresentaram um crescimento contínuo, chegando a atingir um peso de $241,5 \pm 18,7g$, no final de 35 dias.

O grupo que após o período de aclimação passou a ser alimentado com dieta ulcerativa (DU), apresentou no final de 9 dias uma perda de peso de aproximadamente 31% ($26,0g$), chegando desta forma a $57,4 \pm 3,3g$ de peso por animal. Esta perda de peso foi pioneiramente descrita por Osborne e Mendel, em 1919 apud Oliveira (1986), e mais recentemente comprovada por Fuztai e colaboradores (1979) e Oliveira e colaboradores (1989). Estes autores demonstraram que, após esta fase da perda de peso, os animais colocados em dieta comercial, mostraram uma recuperação no

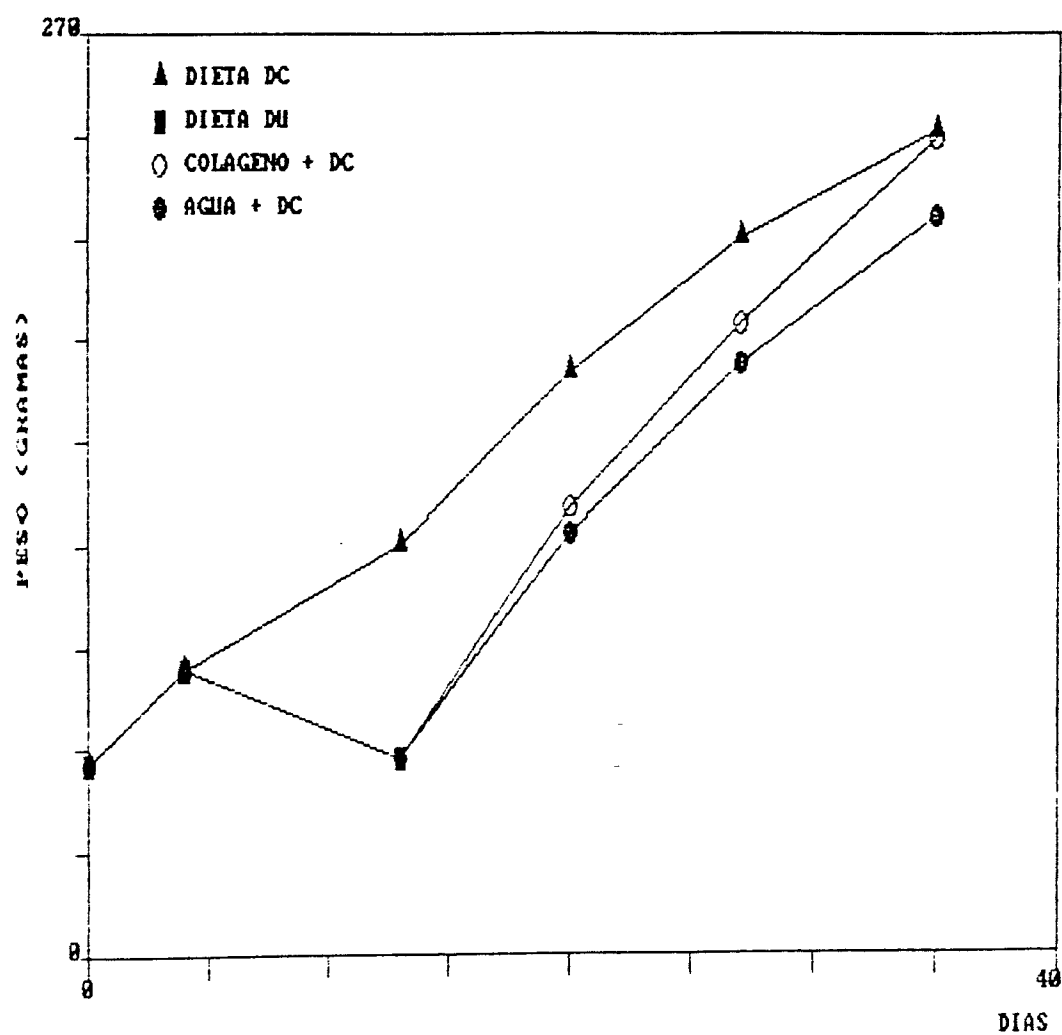


FIGURA 3. Variação do peso médio de ratos Wistar em 04 tratamentos; alimentados com dieta não-purificada de fórmula fechada (DC), alimentados com dieta de feijão cru (DU), tratados com gel de colágeno e alimentados com DC, tratados com água destilada esterilizada e alimentados com DC.

peso, demonstrando desta forma, ser reversível o efeito tóxico do feijão cru. Tais relatos foram confirmados no presente experimento e pôde ainda ser constatado que, animais tratados com gel de colágeno e alimentados com dieta DC, logo na primeira semana começaram a ter um crescimento mais acentuado do que aqueles que foram tratados com água e alimentados com dieta DC, chegando, desta maneira, ao final de 22 dias com um peso de $238,2 \pm 3,4g$, peso este não apresentando diferença estatística ($p < 0,05$) dos animais controles. Por outro lado, os animais intubados com água + DC, atingiram somente um ganho de peso de $216,2 \pm 6,1g$ ao final do mesmo período de tempo (22 dias), diferindo significativamente dos ratos controles e dos tratados com colágeno.

Esses resultados demonstram que os ratos tratados com gel de colágeno, apresentam uma melhora clínica mais satisfatória do que aqueles que foram tratados com água, pois voltam ao peso normal através de um acelerado crescimento.

4.2. Resultados obtidos na examinação histológica

Na Figura 4 observa-se um desenho esquemático da mucosa intestinal com suas características morfológicas normais (LEBLOND, 1981). Esta representação esquemática tem a função de facilitar as observações a serem feitas na análise de lesões ocasionadas pelas lectinas ativas da dieta de feijão cru, restituição do epitélio intestinal quando da aplicação do colágeno ou da água e a aderência do colágeno à mucosa intestinal.

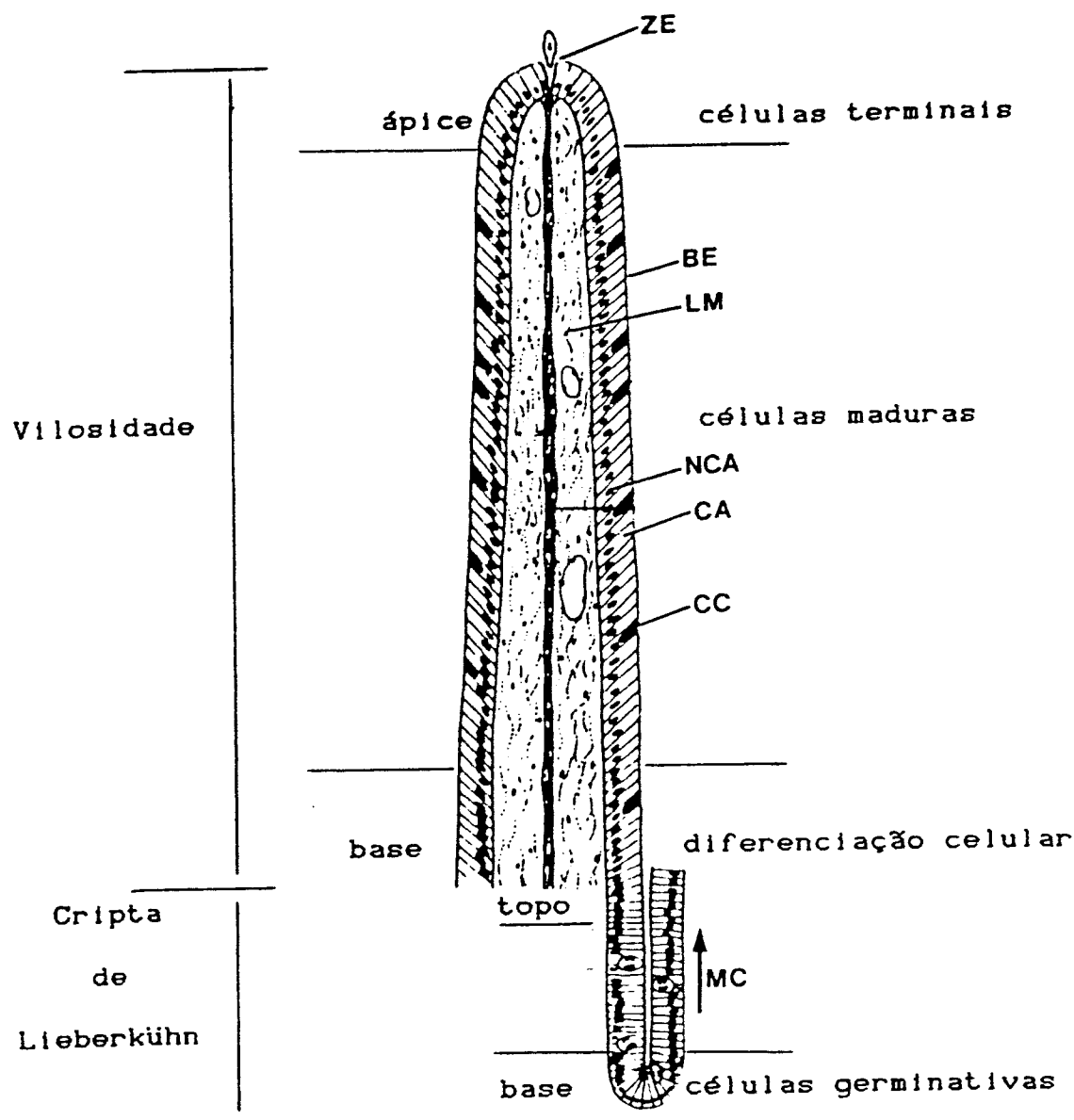


FIGURA 4. Representação diagramática de várias regiões da cripta e vilosidade e o estado das células constituintes. Componentes de maior interesse, para estudo dos efeitos das lectinas e da ação do gel de colágeno no duodeno dos ratos, segundo Leblond (1981); MC-migração celular, CC-célula caliciforme, CA-célula absorptiva, NCA-núcleo de célula absorptiva, LM-lâmina própria, BE-bordo estriado, ZE-zona de extrusão.

As Figuras 5 e 6 mostram fotomicrografias da mucosa duodenal de ratos controles, ou seja, animais que permaneceram sendo alimentados em dieta DC. Nota-se a normalidade morfológica das vilosidades, das glândulas de Lieberkuhn e da lâmina própria. Na figura 5, vê-se cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (HE), onde pode-se observar porção do duodeno com suas estruturas normais, ou seja, vilosidades com seguimento contínuo de enterócitos apresentando núcleos menos corados, grande quantidade de células caliciformes e com muco entre as mesmas (Fotomicrografia 5A). Em maior aumento, observa-se um detalhe do mesmo corte anterior na Fotomicrografia 5B, onde com melhor nitidez vê-se a integridade estrutural da lâmina própria e das células absortivas apresentando basofilia citoplasmática normal. Esta basofilia é reconhecida por um escurecimento no citoplasma das células, e nada mais é do que ribossomos livres carregados de RNAr, fenômeno comum em células de crescimento rápido (HAM & CORMACK, 1983) como as do intestino ou de regiões que encontram-se em fase de recuperação de lesões. Esta basofilia também pode ser observada em material corado com azul de toluidina (MELLO & VIDAL, 1980) conforme esta demonstrado na Fotomicrografia 6A. Ainda neste material, observa-se núcleos em evidência e a bordadura em escova (microvilosidades) sem ruptura. A Fotomicrografia 6B, mostra o mesmo material anterior porém analisado por microscopia de polarização, técnica esta usada em estudos de anisotropias ópticas. É possível perceber a perfeita continuidade da bordadura em escova que aqui aparece birrefringente por conter

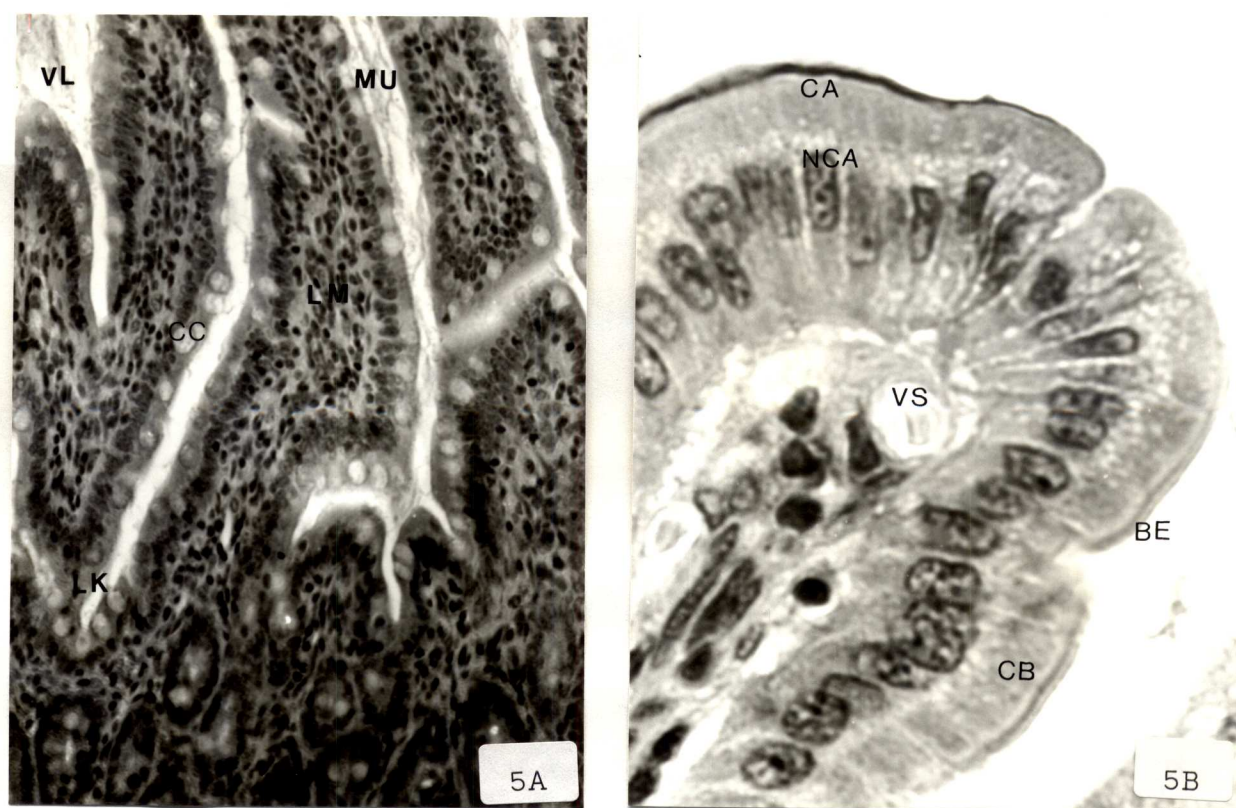


FIGURA 5. Corte histológico do duodeno de ratos controles alimentados em dieta DC; A: VL-vilosidades, CC-célula caliciforme, LK-glândula de Lieberkuhn, LM-lâmina própria, MU-muco. HE, 220X. B: CA-célula absorptiva, NCA-núcleo de célula absorptiva, BE-bordo es triado, VS-vaso sanguíneo, CB-citoplasma basófilo. HE, 560X.

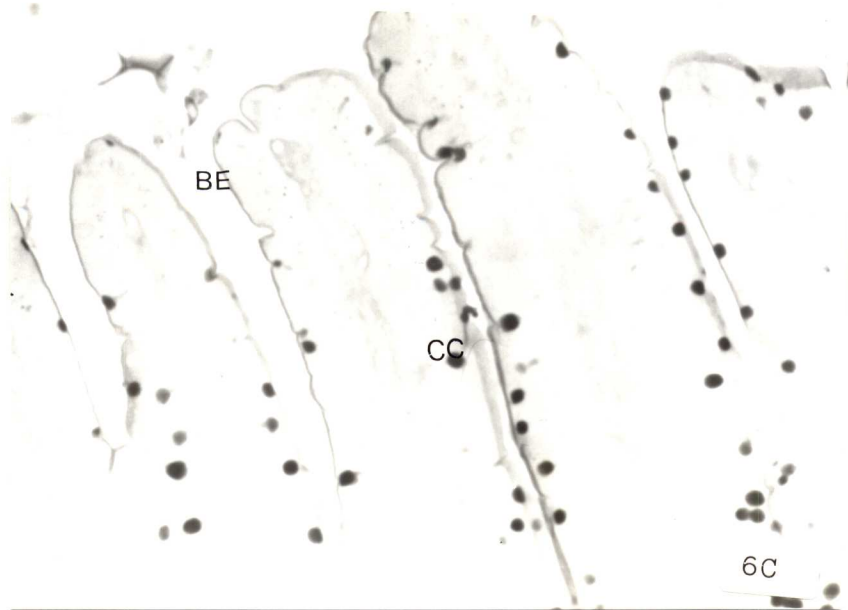
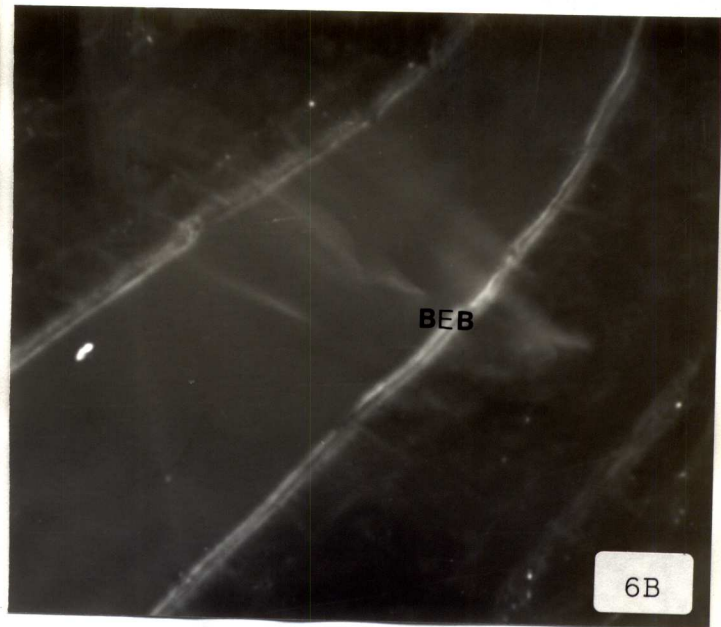
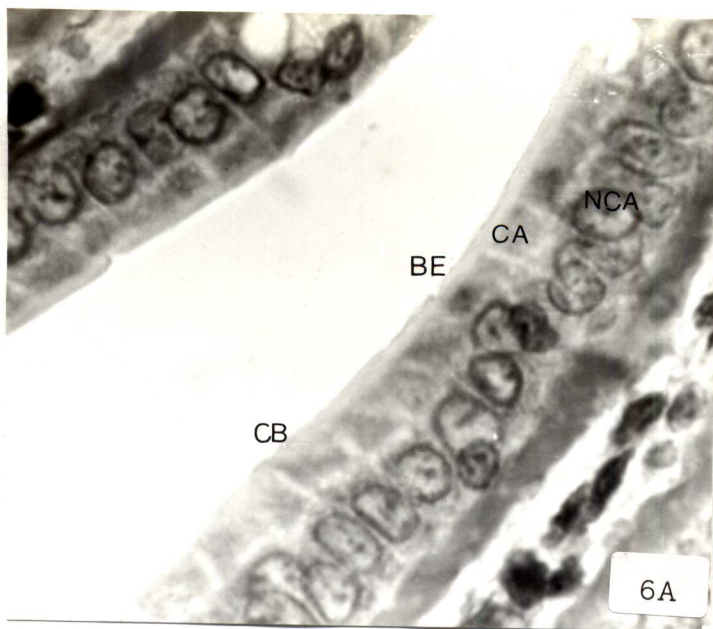


FIGURA 6. Corte histológico do duodeno de ratos controles alimentados com dieta DC; A: CA-célula absorptiva, NCA- núcleo de célula absorptiva, CB-citoplasma basófilo, BE-bordo estriado. AT, 560X. B: BEB-bordo estriado birrefringente. AT em microscopia de polarização, 560X. C: BE-bordo estriado, CC-célula caliciforme. PAS, 220X.

actina. Esta birrefringência apresenta-se como um brilho em fundo escuro conforme o exposto por Mello e Vidal (1980). Na Fotomicrografia 6C, observa-se material corado pela técnica do ácido periódico - Shiff (PAS), onde segundo Kiernan (1989) os grupos 1 e 2 glicol são oxidados pelo ácido periódico resultando na produção de aldeídos nos substratos. A seguir, tratando-se com a base de Shiff, para reagir com os aldeídos, forma-se um produto de cor vermelha ou magenta (preto em fotografia preto e branco) que comumente chama-se de material PAS-positivo. Esta técnica que evidencia glicogênio, polissacarídeos neutros e glicoproteínas, facilita a análise de células caliciformes e superfícies celulares. No material apresentado, vê-se grande quantidade de material PAS-positivo nas células caliciformes e superfície celular.

As Figuras 7 e 8 mostram fotomicrografias de corte histológico do duodeno de ratos, após permanecerem por 9 dias sendo alimentados com dieta de feijão cru (DU). Quando comparadas às Figuras 5 e 6, nota-se as lesões que foram ocasionadas pela ação tóxica das lectinas ativas, através de alterações morfológicas ocorridas na mucosa intestinal, como já relatado por Oliveira e colaboradores (1989) e Pusztai (1992). Na Figura 7 temos material corado com HE, notando-se regiões da mucosa rompidas, com consequente exposição da lâmina própria apresentando necrose; vê-se ainda soluções de continuidade nos pólos ápicos dos enterócitos, com estes apresentando núcleos mais corados e citoplasma com menor basofilia (Fotomicrografia 7A). Na Fotomicrografia 7B, observa-se detalhe de 7A, porém em maior aumento, mostrando

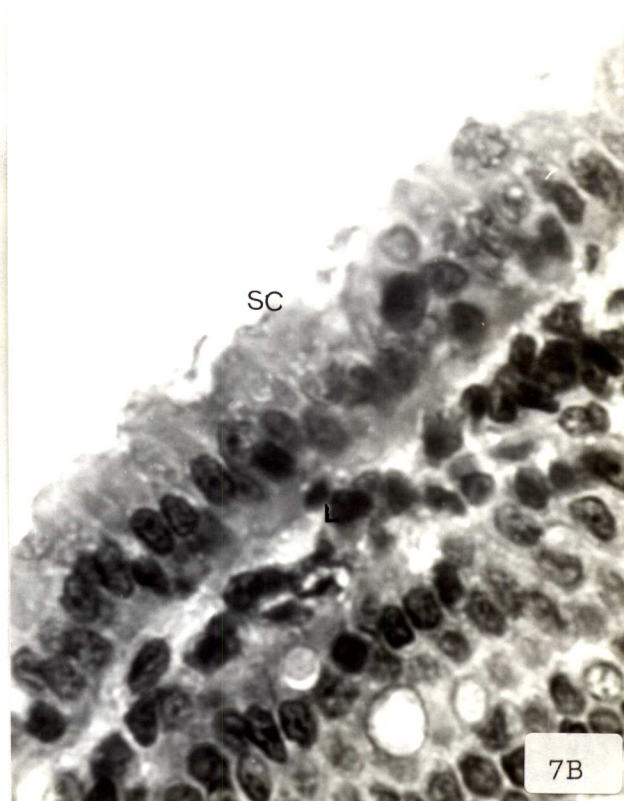


FIGURA 7. Corte histológico do duodeno de ratos, após 9 dias em dieta de feijão cru; A: SC-solução de continuidade, R-ruptura. HE, 220X. B: maior aumento de A, SC-solução de continuidade, L-linfócito. HE, 560X.

um desarranjo celular com total descontinuidade dos enterócitos e a lâmina própria apresentando sinais de inflamação, como vasos sanguíneos dilatados, hiperemia e linfócitos. A Figura 8 mostra fotomicrografias do mesmo material, porém corado com AT e analisado por microscopia ótica (8A) e de polarização (8B), e corado com PAS (8C). Em 8A, observa-se ruptura e sinais de necrose no ápice das vilosidades onde expõe-se a lâmina própria. Em 8B, são vistas soluções de continuidade na bordadura em escova através de falhas no material birrefringente. A Fotomicrografia 8C, demonstra material PAS-positivo em grande quantidade entre as vilosidades, suspeitando tratar-se de muco. Ainda em 8C, observa-se ausência deste material PAS-positivo na porção globulosa das células caliciformes. Estas observações vêm fortalecer as sugestões abordadas recentemente por Freed, em 1982 e Pusztai e Greer, em 1984 apud King e colaboradores (1986), que sugerem uma relação entre lectinas e o estímulo para um incremento de secreção intestinal do muco, bem como o proposto por Oliveira e colaboradores (1989) de que, quando da ação das lectinas, há uma diminuição de células caliciformes; as duas sugestões não tiveram o mecanismo explicado pelos autores.

As Figuras 9,10,11,12 e 13 apresentam fotomicrografias de cortes histológicos do duodeno de ratos em fase de recuperação, ou seja, animais que após serem ulcerados pelas lectinas contidas no feijão cru, foram retirados desta dieta e intubados com 1,5mL de gel de colágeno ou 1,5mL de água destilada esterilizada a cada 24 horas durante 3 dias. Todos esses animais intubados permanecem

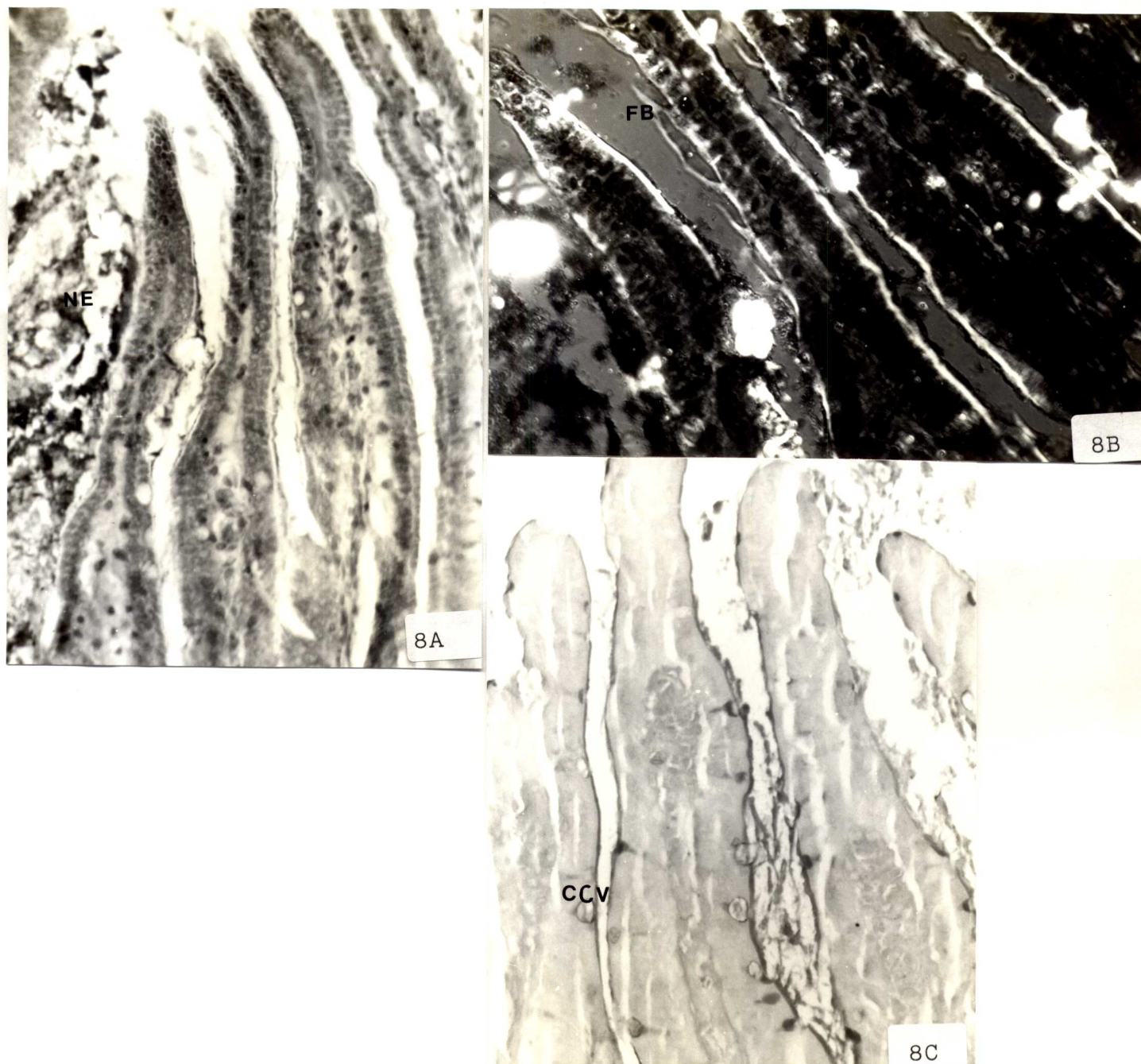


FIGURA 8. Corte histológico do duodeno de ratos alimentados em dieta DU; A: NE-necrose. AT, 220X. B: FB-falhas na birrefringência. AT em microscopia de polarização, 220X. C: CCV-células califormes sem PAS-positivo, MU-muco. PAS, 220X.

ram até o final do experimento recebendo dieta DC e água à vontade.

As Figuras 9 e 10, mostram fotomicrografias do duodeno de ratos, após 24 horas da primeira intubação com o gel de colágeno. Comparando-se às Figuras 5 e 6 (ratos controles) e/ou Figuras 7 e 8 (ratos ulcerados) observa-se a total falta de lesões, i. e., após 24 horas do tratamento com o colágeno, os aspectos morfológicos da mucosa duodenal dos ratos voltam a apresentar normalidade. Na Figura 9, onde são mostrados cortes corados com HE, nota-se vilosidades com seguimento contínuo de enterócitos e normalidade nas glândulas de Lieberkuhn, na submucosa, camada muscular e serosa (Fotomicrografia 9A). Em maior aumento temos um detalhe de 9A na Fotomicrografia 9B, observando-se basofilia citoplasmática, seguimento contínuo dos enterócitos, não mostrando desarranjo celular, ausência da solução de continuidade e de inflamação na lâmina própria. Na Figura 10, observa-se o mesmo material anterior porém corado com AT, visualizado através de microscopia de polarização (Fotomicrografia 10A), e PAS (Fotomicrografia 10B). Notam-se as microvilosidades totalmente íntegras representadas pela birrefringência sem falhas na borda dura em escova (10A), e as células caliciformes e superfície dos enterócitos evidenciadas, pela presença do material PAS-positivo nas mesmas (10B).

As Figuras 11,12,13 e 14 mostram fotomicrografias do duodeno de ratos que, ao saírem da dieta DU, foram tratados com água destilada esterilizada e mantidos em dieta DC e água. Nas

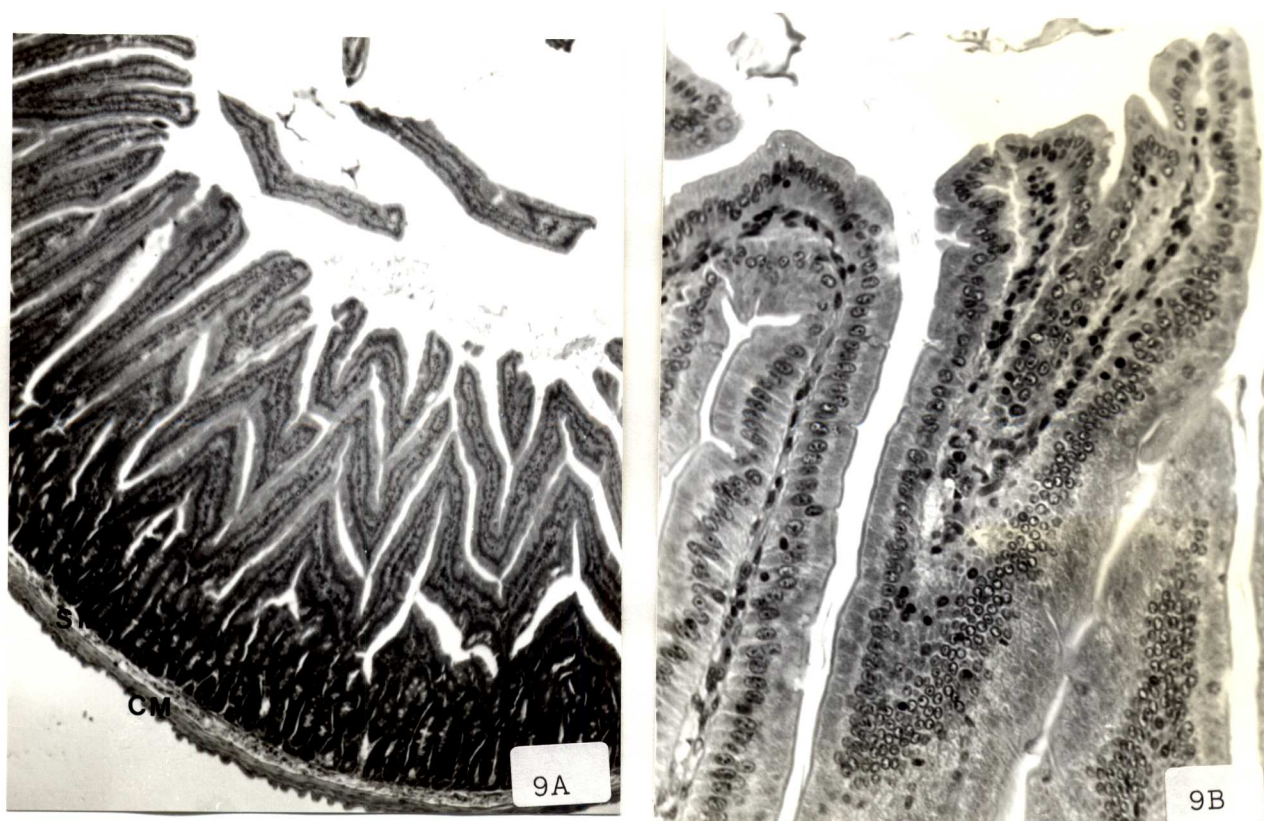


FIGURA 9. Corte histológico do duodeno de ratos, após 24 horas da primeiro tratamento com gel de colágeno; A: SM-submucosa, CM-cama da muscular. HE, 35X. B: maior aumento de A. HE, 220X.

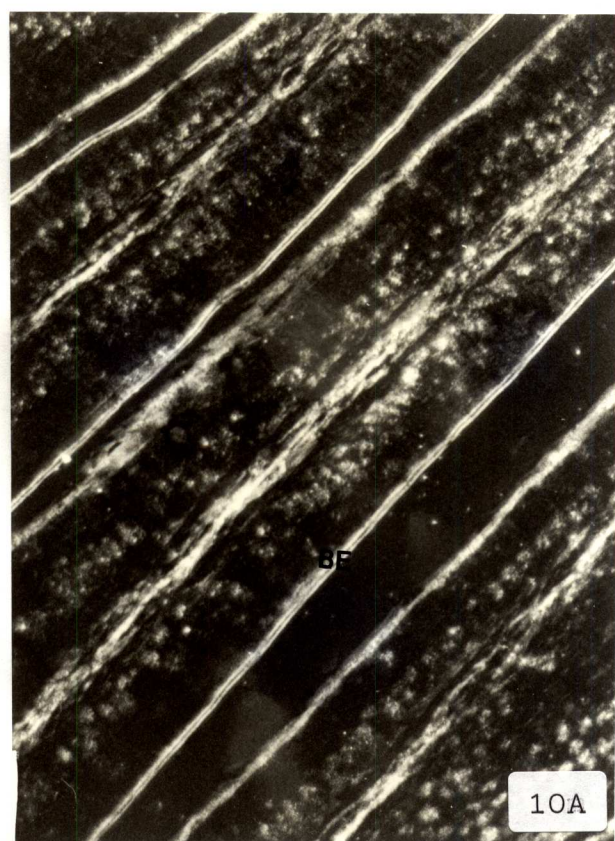


FIGURA 10. Corte histológico do duodeno de ratos, após 24 horas da primeiro tratamento com gel de colágeno; A: BE-bordo estriado. AT em microscopia de polarização, 220X. B: PAS, 220X.

Figuras 11 e 12 são mostrados animais nas 24 horas seguintes à intubação. Na Figura 11, apesar de já se notar alguma melhora nos aspectos gerais, ainda observa-se sinais claros de lesão como ruptura nas regiões superiores das vilosidades (Fotomicrografia 11A). Em maior aumento (Fotomicrografia 11B) observa-se ainda a exposição da lâmina própria com sinais de inflamação. A Figura 12, mostrando fotomicrografias do mesmo material mas corado com AT, demonstra com nitidez que ainda ocorre um desarranjo celular e exposição da lâmina própria exposta com sinais de necrose (Fotomicrografia 12A). Através da birrefringência (Fotomicrografia 12B) pode-se notar que há uma melhora na superfície dos enterócitos na metade inferior das vilosidades, mas ainda com falhas nas regiões apicais. Na Fotomicrografia 12C, já aparece material PAS-positivo salientando algumas células caliciformes.

Estes resultados das primeiras 24 horas sugerem uma ação positiva do gel de colágeno na recuperação da mucosa duodenal. Acredita-se que o colágeno, por ser uma glicoproteína possuidora de glicanas-ácidas com forma filamentar orientada semelhante às encontradas no muco (VIDAL & MELLO, 1984), seja reconhecido pela sequência tripeptídica-RGD (RUOSLAHTI & PIERSCHBACHER, 1987) e ligue-se à mucosa duodenal para dar início à ação curativa. Sugere-se ainda, que o restabelecimento da mucosa não ocorra somente pelo poder hemostático do colágeno, mas também por que este, em substituição ao muco, venha oferecer proteção a esta mucosa que irá se restabelecer por si própria, acelerando suas atividades.

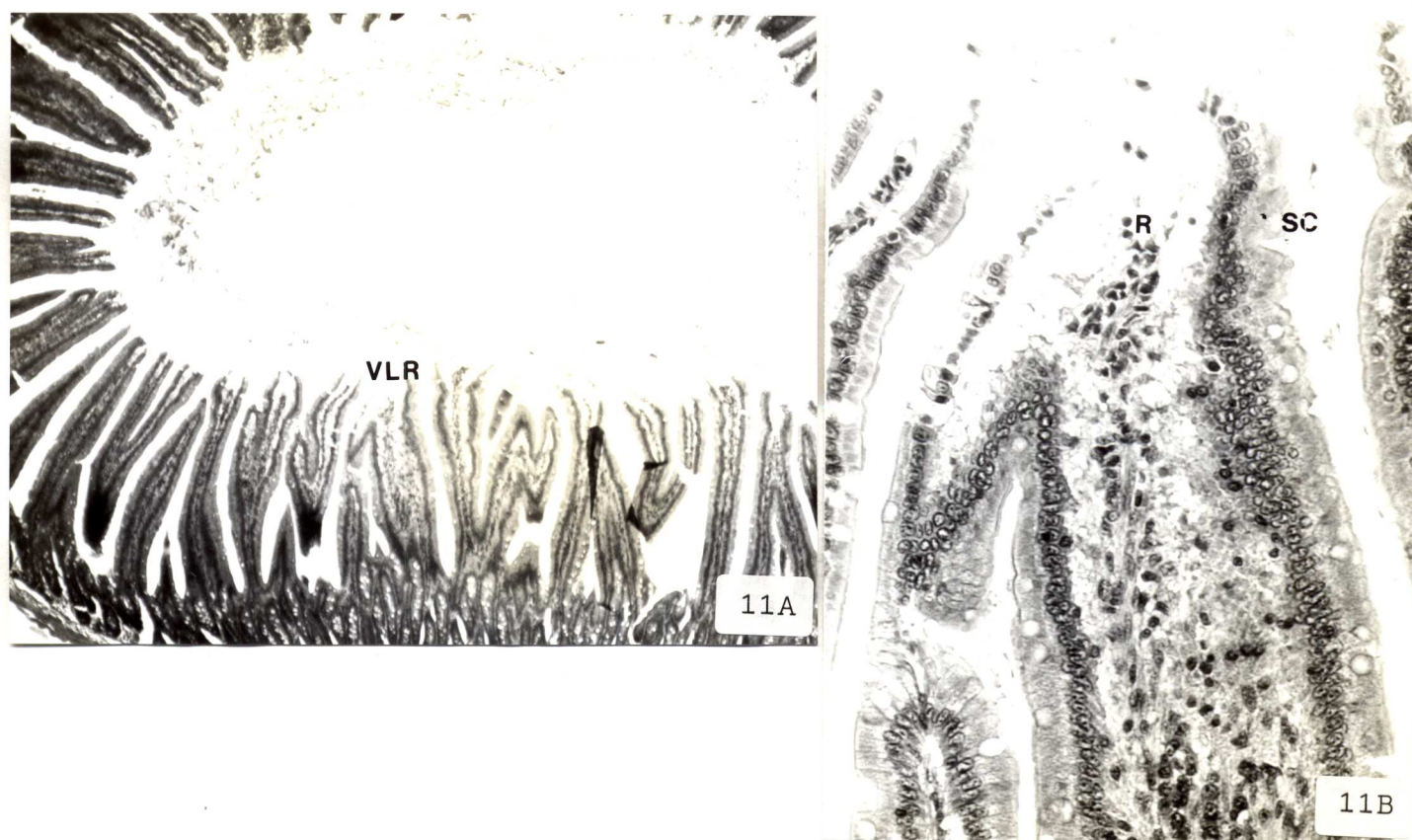


FIGURA 11. Corte histológico do duodeno de ratos, após 24 horas da primeiro+ tratamento com água destilada esterilizada; A: VLR- vi losidade rompida. HE, 35X. B: maior aumento de A, r-ruptura, SC-solução de continuidade. HE, 220X.

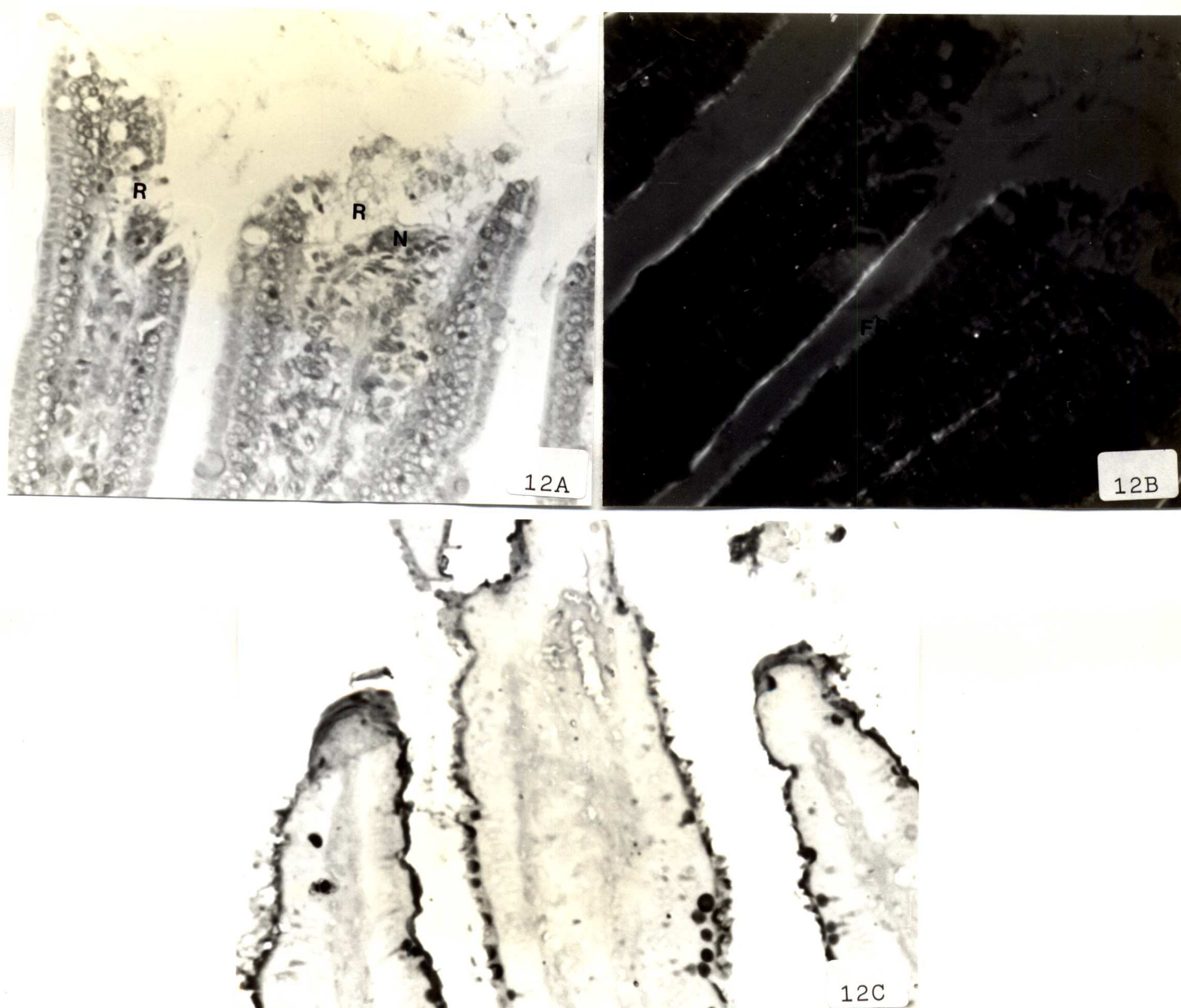


FIGURA 12. Corte histológico do duodeno de ratos, após 24 horas da primeiro tratamento com água destilada esterilizada; A: R-rugosa, N-necrose. AT, 220X. B: FB-falhas no material birrefringente. AT em microscopia de polarização, 220X. C: PAS, 220X.

des mitóticas, como relata Feil e colaboradores (1989). Desta maneira, acredita-se que o colágeno tenha uma ação biomecânica na recuperação destas lesões duodenais.

A Figura 13 mostra corte histológico do duodeno de rato após 48 horas do primeiro tratamento com água. Apesar de notar-se aspectos morfológicos teciduais mais íntegros, ainda ocorrem lesões. Na Fotomicrografia 13A, material corado com HE, nota-se melhor continuidade dos enterócitos, com estes apresentando melhor basofilia citoplasmática, mas ainda é observado ruptura na região apical das vilosidades expondo a lâmina própria, e esta ainda com sinais de inflamação. Na Fotomicrografia 13B, encontra-se trechos na superfície dos enterócitos apresentando birrefringência demonstrando perfeita continuidade, mas também observa-se trechos com falhas. Na Fotomicrografia 13C, apesar das rupturas no ápice das vilosidades, já se nota uma quantidade significativa de células caliciformes.

Finalmente, na Figura 14 são mostrados cortes com 72 horas do primeiro intubamento com água. Com lesões restringidas ao ápice das vilosidades, onde pode-se observar rupturas com exposição da lâmina própria, nota-se uma melhora acentuada da morfologia tecidual do duodeno (Fotomicrografia 14A). É mostrado na Fotomicrografia 14B, detalhe de 14A em maior aumento, que no corpo das vilosidades (da base até o ápice) não ocorrem mais sinais de lesão, vê-se continuidade dos enterócitos e estes apresentando basofilia citoplasmática. A Fotomicrografia 14C mostra birrefringência na superfície das vilosidades com algumas falhas

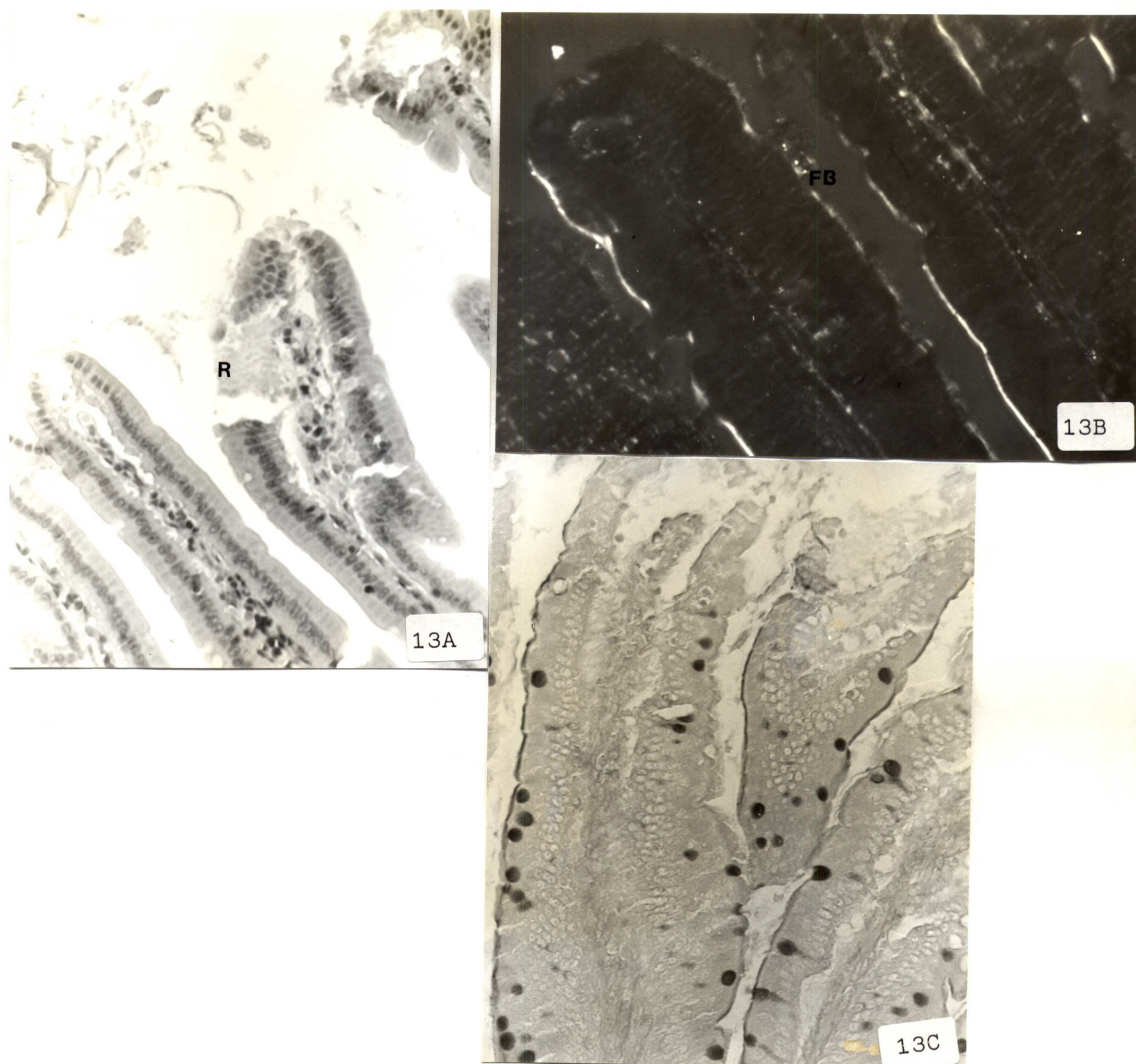


FIGURA 13. Corte histológico do duodeno de ratos, após 48 horas da primeiro tratamento com água destilada esterilizada; A: R-ruptura. HE, 220X. B: FB-falhas no material birrefringente. AT em microscopia de polarização, 220X. C: PAS, 220X.

no ápice das mesmas, demonstrando desta forma uma diminuição acentuada na destruição de microvilosidades.

Estes resultados sugerem, como já relatado por Fuzstai e colaboradores (1979), Oliveira (1986) e Weinman e colaboradores (1989) que, após a retirada dos animais da ação tóxica das lectinas, estes por si só começam a reverter o quadro recuperando-se das lesões. Apesar de neste trabalho ter sido usado animais terminais com graves lesões no duodeno, observou-se que o tempo necessário para a renovação celular, que normalmente é de 3 dias (CHENG & LEBLOND, 1974; CHENG & BJERKNES, 1982; MAYHEN & CARSON, 1989), não foi suficiente para a ocorrência da cura total do epitélio duodenal dos ratos tratados com água, fato este observado em animais tratados com o gel de colágeno em 24 horas.

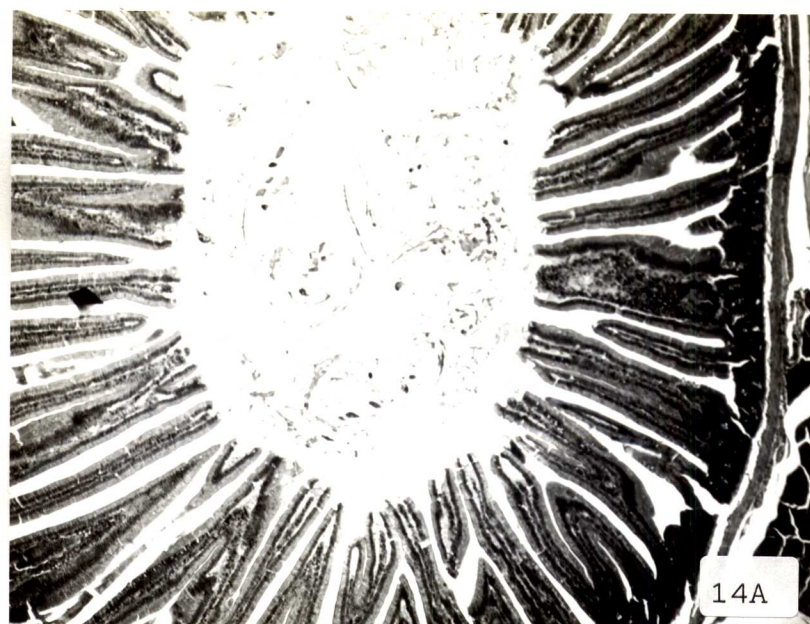


FIGURA 14. Corte histológico do duodeno de ratos, após 72 horas da primeiro tratamento com água destilada esterilizada; A: HE, 35X. B: maior aumento de A, R-ruptura, N-necrose. HE, 220X. C: FB-falhas no material birrefringente. AT em microscopia de polarização.

4.3. Resultados obtidos da contagem de células caliciformes.

Na Tabela 4, observa-se os valores médios da contagem de células caliciformes em vilosidades, por campo microscópico de corte histológico do duedeno de ratos, nos 4 diferentes tratamentos. Estes tratamentos foram: ratos controles, animais que permaneceram alimentados com dieta DC; ratos ulcerados, animais alimentados por 09 dias com dieta DU; ratos tratados com água após lesão e alimentados posteriormente com dieta DC; e finalmente ratos tratados com colágeno após lesão e alimentados posteriormente com dieta DC. Em todos os tratamentos foram computadas as células caliciformes contendo material PAS-positivo, existentes na metade inferior e metade superior das vilosidades, e foram ainda somadas as duas metades para computar o total.

Os ratos em período de desmame, dos 12 aos 30 dias, estão em amadurecimento dos intestinos, no qual ocorrem modificações, como diferenças na quantidade de células caliciformes. Segundo Cummins e colaboradores (1988), estas tendem a ter um crescimento quantitativo até o vigésimo segundo dia para depois decrescer e estabilizar por volta do trigésimo. Este fato foi fundamental na escolha da idade dos animais para ser efetuada a contagem, que ficou em torno de 35 dias.

Com relação aos ratos controles, os ulcerados apresentaram-se com 49,3% e 34,4% das células caliciformes na metade inferior e superior das vilosidades respectivamente, perfazendo desta forma, uma diminuição de 43,9% do total encontrado. Este dado vem confirmar suspeitas levantadas por Oliveira e colaboradores

TABELA 4. Valores médios* da contagem de células caliciformes nas vilosidades duodenais de ratos alimentados com: dieta não-purificada de fórmula fechada** (DC); dieta de feijão cru (DU); e ratos lesados intubados com gel de colágeno ou água destilada esterilizada, e alimentados com dieta DC.

TRATAMENTO	METADE	METADE	TOTAL
	SUPERIOR	INFERIOR	
Dieta Controle (DC)	67,7±13,5 ^{af}	119,8±10,5 ^a	187,6±22,0 ^a
Dieta Ulcerativa (DU)	23,3± 5,6 ^c	59,1± 7,1 ^c	82,3± 9,3 ^c
Tratados com colágeno + DC			
24 horas post cibum	73,6± 9,8 ^{ab}	123,9±12,3 ^a	197,4±15,8 ^{ab}
48 horas post cibum	67,1±13,5 ^{af}	132,9±14,5 ^b	200,0±24,2 ^b
72 horas post cibum	77,9± 7,3 ^b	125,4±10,4 ^b	203,3±14,8 ^b
Tratados com água + DC			
24 horas post cibum	42,6±11,5 ^d	88,7±12,5 ^d	131,9±19,4 ^d
48 horas post cibum	53,8± 8,2 ^e	93,8± 9,3 ^d	147,6±12,4 ^e
72 horas post cibum	61,4± 7,7 ^f	104,2±13,3 ^e	162,8±21,0 ^f

* Os valores representam a média e desvio-padrão para 18 campos microscópios com uma área de $3,249 \times 10^3 \text{ um}^2$, obtidos de 3 ratos;

**Nuvilab CR1, da Nuvital Nutrientes Ltda, Curitiba, PR;

a,b,c Letras diferentes na coluna vertical indicam haver diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Duncan;

(1989) de que quando ratos são submetidos à dieta de feijão cru, há diminuição das células caliciformes. Alguns fatos recentes, envolvendo lectinas e células do epitélio intestinal, podem estar ligados diretamente a este fenômeno de diminuição de células caliciformes, pois segundo Pusztai (1992), existe uma pré-disposição das lectinas internalizarem-se, por endocitose, à estas células. O autor sugere inclusive sua utilização em farmacologia para o transporte de drogas polipeptídicas. Trabalhos publicados (LIENER, 1986; PAVELKA *et alii*, 1986; POSEL *et alii*, 1988; ELLINGER & PAVELKA, 1988), sugerem uma capacidade de ligação das lectinas à resíduos de carboidratos existentes em estruturas intracelulares, como as do complexo de Golgi das células absorptivas e caliciformes, por exemplo. É sabido que no complexo de golgi ocorre a ligação dos açúcares periféricos à glicoproteínas, e estas mais tarde, irão migrar à região superior do citoplasma de suas respectivas células para depositarem-se à superfície de microvilosidades, ou para formar muco, como ocorre nas células caliciformes (NEUTRA & LEBLOND, 1966; LEBLOND, 1981).

Após os tratamentos, os animais tratados com gel de colágeno, em 24 horas não apresentaram diferença significativa na quantidade de células caliciformes quando comparados aos controles e, nas 48 horas já continham uma quantidade maior na metade inferior e total das vilosidades, apresentando diferença estatística significativa ao nível de 5% pelo teste de Duncan (1955). Com 72 horas, esta quantidade era superior nas metades inferior

res, superiores e no total ($p < 0,05$). Ao contrário do proposto por Oliveira e colaboradores (1989), de que há uma diminuição no número de células caliciformes quando da ação das lectinas, os resultados obtidos no presente trabalho, sugerem que ocorra, por mecanismo ainda desconhecido, um desaparecimento do material PAS-positivo (muco) do interior destas células, o que obviamente interfiriria nas contagens, reduzindo-as. Caso ocorresse diminuição destas células caliciformes, por morte celular, seria fisiologicamente impossível voltar à quantidade normal na vilosidade em 24 horas, sabendo-se ser necessário 2 a 3 dias para que ocorra o "turnover" celular nos intestinos dos ratos (CHENG & LEBLOND, 1974; CHENG & BJERKNES, 1982; MAYHEN & CARLSON, 1989). Os animais tratados com água, ao contrário dos tratados com colágeno, apresentam valores sempre inferiores aos animais normais. Somente na metade superior e em 72 horas, é que estes conseguem alcançar quantidade de células caliciformes semelhante ao encontrado nos controles sem diferenças significativas ($p < 0,05$). Os demais resultados apresentaram valores como: 74,0%, 62,9% e 70,3% para metade inferior, superior e total respectivamente nas 24h; 78,3%, 79,5% e 78,7% para metade inferior, superior e total respectivamente nas 48h; e 87,0% e 86,8% para metade superior e total respectivamente nas 72 horas. Estes resultados sugerem que, ratos intubados com água destilada esterilizada e alimentados com dieta DC, após terem sofrido ação de lectinas ativas do feijão (*Phaseolus vulgaris*) cru, ainda 72 horas após a primeira intubação permanecem com quantidade total

de células caliciformes (material PAS-positivo) inferior aos controles e aqueles intubados com gel de colágeno.

4.1.4. Resultado obtido no teste *in situ* de aderência do gel de colágeno à mucosa duodenal.

A Figura 15 apresenta fotomicrografia de corte histológica do duodeno de rato, após dissecação e posterior aplicação do gel de colágeno. Observa-se corte corado com AT e submetido à microscopia de polarização. O colágeno, por possuir anisotropia birrefringente apresenta-se com brilho à luz polarizada. Na Fotomicrografia observa-se a orientação das fibras colágenas com as mesmas aderidas ao ápice de uma vilosidade. Este resultado demonstra a capacidade do colágeno aderir-se à mucosa duodenal de ratos.

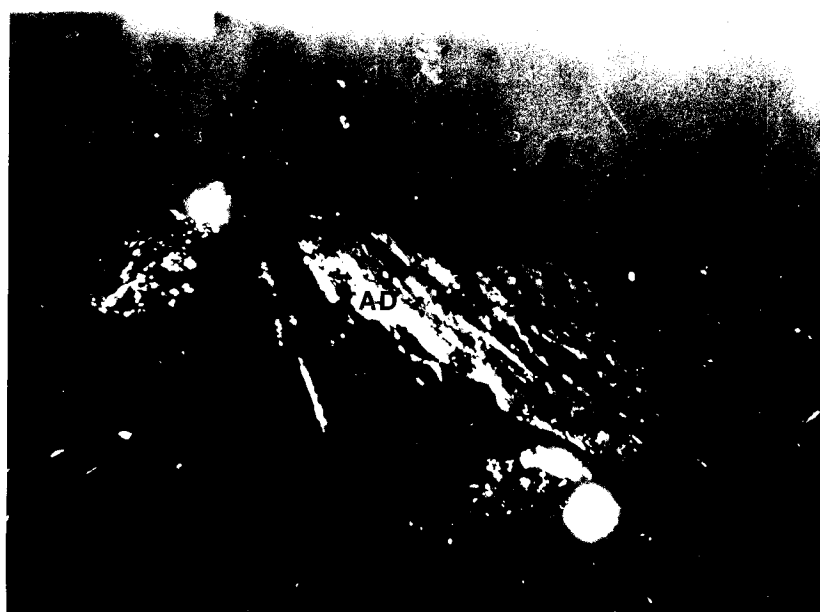


FIGURA 15. Corte histológico do duodeno de ratos, após teste *in situ* para exame da aderência do gel de colágeno à mucosa intestinal; FC-fibras colágenas, AD-aderência do colágeno, BE-bordo em escova. AT em microscopia de polarização, 220X.

5. CONCLUSÕES

Nas condições em que foi desenvolvido o trabalho, pôde-se concluir que :

5.1. Os ratos que foram tratados com gel de colágeno apresentaram uma melhora clínica superior, em termos de evolução ponderal, aos que foram tratados com água destilada esterilizada, pois atingiram o mesmo peso dos ratos controles ao final de 22 dias.

5.2. Os ratos que foram tratados com gel de colágeno tiveram suas lesões recuperadas em 24 horas após ao primeiro tratamento, pois apresentaram características morfológicas teciduais do duodeno semelhantes aos ratos controles; os ratos tratados com água, após 72 horas, ainda apresentaram lesões.

5.3. Os ratos que foram tratados com gel de colágeno, em 24 horas apresentaram uma quantidade normal de células caliciformes, sugerindo desta forma que haja um esgotamento na produção de muco quando da ação das lectinas.

5.4. De maneira geral, o colágeno tratado como subproduto da indústria animal, mostrou-se promissor como agente recuperador de lesões do trato gastrintestinal, por intubação oro-gástrica, sob forma purificada e gelificada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, N. G.; de LaBARCA A. M. C.; VALENCIA, M. E. Effect of different heat treatments on the antinutritional activity of *Phaseolus vulgaris* (variety ojo de cabra) lectin. J. Agric. Food. Chem., 39 :1627-30, 1991.
2. AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION. EXPERIMENTAL ANIMAL NUTRITION COMMITTEE. Guidelines for describing diets for experimental animals. J. Nutr., 114 :15-6, 1984.
3. ASGHAR, A. & HENRICKSON, R. L. Chemical, biochemical, functional and nutritional characteristics of collagen in food systems. Adv. Food. Res., 28: 231-372, 1982.
4. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of analysis, 12 ed. Washington DC. Horwitz W Ed. 1975. p.857
5. ----- .13. ed.1980. p. 211.
6. BALDI, G. & SALAMINI, F. Variability of essential amino acid content in seeds of 22 *Phaseolus* species. Theor. Appl. Genetics, 43 :75-8, 1973.

7. BENDER, F. E.; DOUGLAS, L. W.; KRAMER, A. Statistical methods for food and agriculture. Westport, Avi Publishing Company, 1982. p. 91-4.
8. BLIGH, E. F. & DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol., 37:911-17, 1959.
9. BRASIL. Ministério da Agricultura. Matérias primas e subprodutos de origem animal. Anuário Estatístico, 1985
10. CHENG, H & LEBLOND, C. P. Origin differentiation and renewal of the flour main epithelial cell types in de mouse small intestine. Am. J. Anat., 141:461-561, 1974.
11. CHENG, H. & BJERKNES, M. Whole population cell kinectics of mouse duodenal, jejunal, ileal and colonic epithelial as determinad by radioautography and flow cytometry. Anat. Rec., 203:251-64, 1982.
12. CHVAPIL, M. & HOLUSA, R. Experimental experiences with the collagen sponge as hemostaticum and tampon. J. Biomed. Mater. Res., 2:245-64, 1968.

13. CHVAPIL, M.; KRONENTHAL, R. L.; WINKLAE, W. V. J. Medical and surgical applications of collagen. Int. Rev. Connect. T. Res., 06 :1-61, 1973.
14. CUMMINS, A. G.; STEELE, T. W.; LABROOY, J. T.; SHEARMAN, D. J. C. Maturation of the rat small intestine at weaning: changes in epithelial cell kinetics, bacterial flora, and mucosal immune activity. Gut, 29 :1672-79, 1988.
15. DONOHUE-SHEA, T.; STEEL, L.; MAZZILLI, E. M.; DUBOIS, A. Aspirin-induced changes in gastric function: role of endogenous prostaglandins and mucosal damage. Gastroenterol., 98 :284-92, 1990.
16. DUNCAN, D. B. Multiple range and multiple F tests. Biometrics, 11 :1-42, 1955.
17. DURIGAN, J. F.; SGARBIERI, V.C., ALMEIDA, L. D. Antinutritional factors and toxicity in raw dry beans (*Phaseolus vulgaris*) of brazilian cultivars. J. Food Biochem., 11 :185-200, 1987.
18. ELLINGER, A. & PAVELKA, M. Localization of fucosyl residues in cellular compartments of rat duodenal absorptive enterocytes and goblet cells. Eur. J. Cell Biol., 47 :62-71, 1988.

19. ENGVALL, E.; BELL, M. L.; CARISSON, R. N. K.; MILLES, E. J.; RUOSAHTI, E. Nonhelical, fibronectin - binding - basement membrane collagen from endodermal cell culture. Cell, 29 :475-82, 1982.
20. FEIL, W.; LACY, E.R.; WONG, Y.M.; BURGER, D.; WENZH, E.; STARLINGER, M.; SCHIESSEL, R. Rapid epithelial restitution of human and rabbit colonic mucosa. Gastroenterol, 92 :685-701, 1987.
21. FREEMAN, H. S. ; LOTAN, R.; KIM, Y. S. Application of lectins for detection of goblet cell glycoconjugate differences in proximal and distal colon of the rat. J. Pathol, 42 :405-12, 1980.
22. FLEMSTRON, G. Gastroduodenal mucosal secretion of bicarbonate and mucus. Am. J. Med, 81 :18-22, 1986.
23. GOLDSTEIN, I. S. & PORETZ, R. D. Isolation, physiochemical characterization, and carbohydrate - binding specificity of lectins. In: LIENER, I. E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I. J., Eds. The lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine. New York, Academic press, 1986. p.33-247 (Molecular Biology).
24. GRANT, M. E.; KEFALIDES, N. A.; PROCKOP, D. J. The biosynthesis of basement membrane collagen in embryonic chick lens.

J. Biol. Chem., 247 :3545-51, 1972.

25. GREENLAW, R.; SHEAHAN, D. G.; DeLUCA, V.; MILLER, D.; MYERSON, D.; MYERSON, P. Gastroduodenitis-A broader concept of peptic ulcer disease. Digest. Dis. Sciences, 25 :660-72, 1980.
26. GUYTON, A. C. Tratado de Fisiologia Médica. 7. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1989. p.830.
27. HAIT, M. R. Microcrystalline collagen-A new hemostatic agent. Am. J. Surg., 120 :330, 1970.
28. HAM, A. W. & CORMACK, D. H. Histologia. 8. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1983. p.907
29. HAY, E. D. Cell biology of extracellular matrix. New York, Plenum Press, 1981. p. 417.
30. KIIERNAN, J. A. Histological & histochemical methods: theory & practice. 2 ed. Toronto, Pergamon Press, 1990. p.433.
31. KING, T. P.; FUSZTAI, A.; CLARKE, M. W. Kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) lectin induced lesions in rat small intestine. I. Light microscope studies. J. Comp. Path., 90 :585-95, 1980.

32. KING, T. P.; PUSZTAI, A.; GRANT, G.; SLATER, D. Immunogold localization of ingested Kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) lectins in ephitelial of the rat small intestine. Histochem J., 18 :413-20, 1986.

33. KLEINMAN, H, K; KLEBE, R, J; MARTIN, G. R. Role of collagenous matrices in adhesion and growth of cells. J. Cell Biol., 88 :473-85, 1981.

34. LEBLOND, C. P. The life history of cells in renewing systems. Am. J. Anat., 160 :114-58, 1981.

35. LIENER I. E. Nutritional significance of lectins in diet. In: LIENER I. E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I.J., Eds. The lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine. New York, Academic Press, 1986. p.527-52 (Molecular Biology).

36. ----- Lectins and protein inhibitors of proteolytic enzymes (an overview). In OLIVEIRA, B. & SGARBIERI, V. C., Eds. Proceedings of the first Brazilian congress on proteins. Campinas, Unicamp, 1991. p.639.

37. LINSCHER, W. G.; TERPSTRA, H.; TANAKA, K.; LARSSON, C.; RAHEJA, K. L. Ulcer protection against recurrent bleeding by microfibrillar collagen (AVITENE) in a dog model. Gastroenterol., **82** :1119, 1982.
38. LINSCHER, W. G.; YAMAUCHI, S.; MURTHY, UK.; CHIJIIWA, K.; CHO, C. Solid vs liquid collagen for prevention of recurrent gastric ulcer bleeding in a dog model. Gastroenterol., **94** :A266, 1988.
39. MAYHEM, T. M. & CARSON F. Mechanism of adaptation in rat small intestine during normal growth and experimental hypertrophy. J. Anat., **164** :189-200, 1989.
40. MELLO, M. L. S. & VIDAL, B. C. Práticas de biologia celular. São Paulo, Edgard Blucher, 1980. p.
41. MOORE, R.; MADRI, J.; CARLSON, S.; MADARA, J. L. Collagens facilitate epithelial migration in restitution of native guineas pig intestinal epithelium. Gastroenterol., **102** :119-30, 1992.
42. MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. Harper: Bioquímica. 6 ed. São Paulo, Atheneu, 1990. p.705.

43. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. National Research Council. Institute of Laboratory Animal Resources. Laboratory animal management. Separata do ILAR News, 20 :11-15, 1977.
44. NEUTRA, M. & LEBLOND, C. P. Synthesis of the carbohydrate of mucus in the Golgi complex as show by electron microscope radioautography of goblet cells from rats injected with glucose-H³. Cell Biol., 30 :110-36, 1966.
45. NUTRITIONAL BIOCHEMICALS CORPORATION. ICN Diet Catalog. ICN Life Sciences Group. Cleveland, NBC, 1977/1978.
46. OLIVEIRA, A. C. Fatores endógenos e exógenos com influência na digestibilidade e valor biológico das proteínas de feijão (Phaseolus vulgaris). Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1986. 134p.
47. OLIVEIRA, A. C.; VIDAL, B. C.; SGARBIERI, V. C. Lesions of intestinal epithelium by ingestion of bean lectins in rats. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 35 :315-22, 1989.
48. PAULL, A. A. & SOUTHGATE, D. A. T. McCance and Widdowson's. The composition of foods. 4 ed. Londres, Elsevier / Holand Biomedical Press, 1978.

49. PAVELKA, M. & ELLINGER, A. RCA I - binding patterns of the Golgi apparatus. Eur. J. Cell. Biol., **41** :270-78, 1986.
50. PEARSE, A. G. E. Histochemistry, theoretical and applied. 5. ed. New York, Churchill Livingstone, 1985. v. 2, p.1055.
51. PEARSON, D. Técnicas de laboratorio para el analisis de alimentos. [Laboratory techniques in food analysis]. Zaragoza, Acribia, 1976. p.10-2.
52. PIEZ, K. A. Molecular and aggregate structures of the collagens Ext. matrix. Biochem., :1-36, 1984.
53. PIKKARAINEN, J. & KULONEN, E. Comparative chemistry collagen. Nature, **223** :839-41, 1969.
54. POSEL, F.; SCHUMACHER, U.; FRICK, H.; WELSCH, U. Histochemistry of mucosubstance in Brunner's-gland cells and duodenal goblet cells of two new words monkey species , (*Saimari sciureus* and *Sanguinus fuscicollis*). Histochem., **88** :327-32, 1988.
55. PUSZTAI, A. Plant and food lectins as metabolic signals for the gut. :18-25, 1992.

56. PUSZTAI, A.; CLARK, M. W.; KING, T. P. The nutritional toxicity of *Phaseolus vulgaris* lectins. Proc. Nutr. Soc., **38** :115-58, 1979.
57. PUSZTAI, A.; GRANT, G; OLIVEIRA, J. T. A. Local (gut) and systemic responses to dietary lectins. IRCS Med. Sci., **14** :205-8, 1986.
58. RACHMILEWITZ, D.; SIMON, P. L.; SCHWARTZ, L. W.; GRISWOLD, D. E.; FONDACARO J. D.; WASSERMAN, L. W. Inflammatory mediators of experimental colitis in rat. Gastroenterol., **97** :326-37. 1989.
59. RIFIKIN, G. D. & FEKETY Jr, F. R. Antibiotic-induced enterocolitis in animals. In: PFEIFFER, C. J., Ed. Animal models for intestinal disease. Boca Raton, CRC Press, 1985. p.123-33.
60. RUBIO L. A.; BRENES, A.; CASTAÑO, M. Histological alterations to the pancreas and the intestinal tract produced by raw faba bean (*Vicia faba L. minor*) diets in growing chickens. Brit. Poult. Sci., **30** :101-14, 1989.
61. RUOSLAHTI, E. & PIERSCHBACHER, M. D. News perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. Science, **238** :491-97, 1987.

62. SANTOS, K. M. O. O desenvolvimento histórico da ciência da Nutrição em relação ao de outras ciências. Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1990. p.64-69.
63. SELLERS, L. A.; ALLEN A.; BENNETL, M. K. Formation of a fibrin based gelatinous coat over repairing rat epithelium after acute ethanol damage: interaction with adherent mucus. Gut, 28:835-43, 1987.
64. SGARBIERI, V.C. Alimentação e Nutrição: fator de saúde e desenvolvimento. Campinas, Almed, 1987. p.387.
65. TOBIN, G. & CARPENTER, K. J. The nutritional value of the dry bean (*Phaseolus vulgaris*): a literature review. Nutr. Abstr. Rev. - Ser. A. Human. Exp., 48:919-36, 1978.
66. VIDAL, B. C. Orden molecular y haces de colágeno. Trab. Inst. Quím., 25:19-27, 1984.
67. ----- Interações células-matriz extracelular: uma unidade estrutural e sistemática. R. Fac. Ciênc. Méd., Unicamp, 1:33-40, 1989.

68. ----- Colágeno, uma especial proteína: medicina e biologia In: OLIVEIRA, B. SGARBIERI, V. C., eds. Proceedings of the first brazilian congress on proteins. Campinas: Unicamp, 1991. p.448-73.

69. VIDAL, B. C. & MELLO, M. L. S. Macromolecular conformation of the colon mucus as revealed by detection of anisotropic phenomena. Ann. D-Histochim., 19 :151-56, 1974.

70. ----- Biologia Celular. Rio de Janeiro, Atheneu, 1987. p. 347.

71. VIDAL, B. C.; CARVALHO, H. F. Aggregation state molecular order of tendons as function of age. Matrix, 10 :48-57, 1990.

72. WALLACE, J. L. & MacNAUGHTON, W. K. Gastrintestinal damage induced by platelet-activating factor: role leukotrienes. Eur. J. Pharmacol., 151 :43-50, 1988.

73. WEINMEN, M. D.; ALLAN, C. H.; TRIER, J. S.; HAGEN, S. J. Repair of microvilli in rat small intestine after damage with lectins contained in the red kidney bean. Gastroenterol., 97 :1193-204, 1989.

74. WHITEHEAD, R.; TRUELOVES, S. C.; GEAR, M. W. L. The histological diagnosis of chronic gastric in fibrioptic gastroscop

pe biopsy specimens. J. Clin. Path., 25 :1-11, 1972.

75. WILLIAMS, P. C. The use of titanium dioxide as a catalyst for large - scale Kjeldahl determination of total nitrogen content of cereal grains. J. Sci. Food Agric., 24 :343-48, 1973.

76. YAMADA, K. M. Cell surface interactions with extracellular materials. Ann. Rev. Biochem., 52 :761-99, 1983.