

## AVALIAÇÃO HISTOQUÍMICA DA MUCOSA GASTROINTESTINAL DE RATOS EXPOSTOS AO ÁLCOOL<sup>1</sup>

### HISTOCHEMICAL AVALIATION OF THE GASTROINTESTINAL MUCOSA OF RATS EXPOSED TO ALCOHOL

Mario Ribeiro MELO-JUNIOR<sup>2</sup>, Marcos Cezar Feitosa de Paula MACHADO<sup>3</sup>, Jorge Luiz Silva ARAÚJO-FILHO<sup>4</sup>, Vasco José Ramos Malta PATU<sup>5</sup>, Eduardo Isidoro Carneiro BELTRÃO<sup>6</sup> e Nicodemos Teles de PONTES-FILHO<sup>7</sup>.

#### RESUMO

**Objetivo:** avaliar através da histoquímica com lectinas a expressão de glicosaminoglicanos (mucinas) nas células do trato gastrointestinal de ratos expostos ao etanol. **Método:** ratos foram expostos ao etanol (3g/kg do peso) durante 15, 30 e 45 dias. Após a perfusão, o estômago e o intestino fixados em formalina tamponada a 10% e fragmentos desses órgãos emblocados em parafina. Os cortes histológicos (4µm) foram incubados com lectinas (PNA, WGA e Con A) conjugadas à peroxidase. A marcação das lectinas se revelou com o DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, seguida pela contra-coloração com hematoxilina. Os métodos Periodic acid-shiff (PAS) e Alcian blue foram usados para avaliar a expressão de glicosaminoglicanos (mucinas). **Resultados:** verificou-se que na mucosa gástrica a expressão das mucinas aumentou progressivamente durante a exposição ao etanol, conforme o aumento do número de células PAS e Alcian blue positivas. Por outro lado, na mucosa intestinal nenhuma diferença considerável se observou no número dessas células. Todas as lectinas testadas apresentaram um aumento no padrão de marcação relacionado ao maior período de exposição ao etanol. A PNA foi a mais seletiva das lectinas, reconhecendo, exclusivamente, células do cólon e das glândulas gástricas. A Con A apresentou uma intensa marcação nas regiões apicais das glândulas do cólon e do estômago, enquanto que a WGA reagiu, intensamente, nas células caliciformes e células de Paneth nas glândulas do epitélio intestinal. **Conclusão:** esses achados demonstram que a exposição ao etanol, leva a uma alteração dos padrões de reconhecimento das lectinas nas células do tecido gastrointestinal, bem como, um aumento a expressão gástrica das mucinas.

**DESCRIPTORIOS:** Histoquímica, lectinas, etanol, glicosaminoglicanos

#### INTRODUÇÃO

Um dos principais locais de ação tóxica do etanol nas células é a membrana plasmática. Vários estudos têm demonstrado a existência de correlações entre o nível de intoxicação e a extensão de distúrbios na membrana celular resultante da ação do etanol<sup>1</sup>. A ingestão de álcool afeta as membranas plasmáticas e organelas celulares devido ao metabolismo de lipídios, carboidratos e proteínas, predispondo os tecidos às injúrias.

Alterações morfológicas e funcionais do trato gastrointestinal após a exposição ao etanol têm sido descritas em humanos<sup>2</sup> e animais experimentais<sup>3</sup>, caracterizando-se, essencialmente, pela interferência nas células epiteliais e na manutenção da flora microbiana residente prejudicando, ao mesmo tempo, a absorção e proteção imune do sistema<sup>4</sup>.

Os glicosaminoglicanos (carboidratos) das membranas são em sua maioria glicoproteínas ou

Recebido em 18.08.2006 - Aprovado em 05.10.2006

<sup>1</sup> Trabalho desenvolvido no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE.

<sup>2</sup> Professor titular de Patologia – ASCES, Doutorando em Ciências Biológicas – CCB/UFPE

<sup>3</sup> Mestrando em Patologia – CCS/UFPE.

<sup>4</sup> Mestre em Patologia – CCS/UFPE.

<sup>5</sup> Mestrando em Ciências Biológicas – CCB/UFPE.

<sup>6</sup> Professor adjunto do Departamento de Bioquímica – CCB/UFPE, Doutor em Ciências Biológicas.

<sup>7</sup> Professor adjunto do Departamento de Biologia - UFRPE, Doutor em Nutrição.

glicolípídios de elevada complexidade e variabilidade estrutural, funcionando como sinalizadores das alterações sofridas pelas células<sup>5</sup>. Somando-se a isso, lectinas apresentam alta especificidade por carboidratos e são utilizadas para detectar alterações celulares estruturais e bioquímicas em diferentes situações de injúrias<sup>6</sup>.

Diferentes modelos experimentais de interações entre lectinas e células do trato gastrointestinal têm sido empregados, tais como: a modulação e controle de infecções do ambiente gastrointestinal de ratos infectados por *Salmonella*<sup>7</sup>, aderência e reconhecimento da *Giardia lamblia* pelas células intestinais em humanos<sup>8</sup>, estudos das alterações nos receptores de superfície das células epiteliais durante a infecção por bactérias intestinais em ratos<sup>9</sup>. Devido à sua versatilidade, as lectinas são também utilizadas como vetores biológicos (bioadesinas) carreando vacinas para as mucosas intestinal e respiratória<sup>10</sup>.

Uma das mais freqüentes aplicações das lectinas é como marcador histoquímico de tecidos que sofreram transformações neoplásicas<sup>6</sup>, na identificação de tipos celulares específicos como macrófagos/histiócitos<sup>11</sup>, células M intestinais<sup>12</sup> e outras células das mucosas gástrica e intestinal em diversos modelos experimentais<sup>13</sup>.

## OBJETIVO

Avaliar através da histoquímica com lectinas a expressão de glicosaminoglicanos (mucinas) nas células do trato gastrointestinal de ratos expostos ao etanol.

## MÉTODO

### Animais em dieta

Vinte e oito (28) ratos machos Wistar recém-desmamados (25 dias) foram expostos, diariamente, ao etanol (3g/kg de peso através da cânula orogástrica, por períodos de 15 (G15, n=7), 30 (G30, n=7) e 45 (G45, n=7), e comparados a um grupo controle (35 dias). Todos os grupos receberam dieta comercial (LABINA- Purina<sup>®</sup>). O protocolo experimental desenvolvido foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em experimentação animal (CCB-UFPE – ofício 119/2003).

### Amostra de tecidos

Os animais foram anestesiados, intraperitonealmente, com uma solução contendo 0,5% de cloralose e 12% de uretana, em dose de 1,0ml/kg de peso. Após abertura do tórax e introdução de uma cânula de polietileno no ventrículo esquerdo, foram injetados 200ml de formalina 10% tamponada. Em seguida, procederam-se a retirada do intestino delgado e estômago, que foram preservados em solução de formalina até o momento da microtomia. Para os cortes histológicos, selecionaram-se fragmentos de regiões distintas do intestino (jejuno e íleo) e estômago (corpo e antro), submetidos a rotina

histológica e incluídos em parafina. Os cortes histológicos (4mm) foram obtidos em micrótomo horizontal Yamato (Japan).

## Histoquímica com Lectinas

Os fragmentos teciduais montados em lâminas histológicas albuminizadas foram tratados com solução de tripsina (0,1%) a 37°C por 2 minutos, expostos ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 20 minutos e incubados a 4°C por 2 horas com lectinas (PNA-25 mg/ml, WGA-25 mg/ml e Con A-50 mg/ml) conjugadas à peroxidase (Sigma). Posteriormente as lâminas foram mergulhadas por 10 minutos em 10 mM de tampão fosfato (PBS) pH 7.2. A reação da peroxidase foi visualizada após incubação por 5 a 8 min em PBS contendo diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio. As lâminas foram contrainformadas com hematoxilina e analisadas em microscópio óptico (Olympus BH-2, Japão). Para controle, as lectinas foram inibidas utilizando-se methyl- $\alpha$ -D-manose para Con A, D-galactose para PNA e N-acetilglicosamina para WGA (Sigma).

Para o estudo do padrão de marcação das lectinas aplicou-se uma escala semiquantitativa (DxI) calculada levando-se em consideração a intensidade da coloração (I), variando de 1 a 4, e a distribuição (D) variando entre fraca (+), moderada (++) e intensa (+++), conforme metodologia utilizada.<sup>16</sup>

## Histoquímica das mucinas

Para diferenciação da composição do muco das células do estômago e do intestino delgado foram utilizados fragmentos teciduais corados com Alcian blue a 1% em pH 2,5 para revelar mucopolissacarídeos ácidos e PAS (Periodic acid-schiff) a 0,5% para mucopolissacarídeos neutros, segundo o protocolo proposto por Felipe<sup>15</sup>.

As imagens das lâminas histológicas foram capturadas utilizando um sistema de análise de imagens Optimas<sup>™</sup> 6.1 (Optimas Corporation, USA), conectado a um microscópio óptico padrão. Os padrões de marcação dos glicosaminoglicanos foram calculados pelo número médio de células marcadas (área total 12234  $\mu$ m<sup>2</sup>), em 5 campos aleatórios por lâmina de cada animal. Os resultados obtidos foram submetidos ao estudo estatístico utilizando-se os Testes t de student e de Tukey, com p<0,05, através do software PRISMA 3.0<sup>ª</sup>.

## RESULTADOS

### Histomorfologia

A histologia da mucosa gastrointestinal nos grupos estudados não mostrou alterações importantes entre os períodos de exposição ao álcool. A mucosa do estômago, na região do corpo apresentou discreta atrofia das

glândulas no grupo G45, principalmente na região glandular apical, enquanto as células e a organização das criptas não diferiu, morfológicamente, entre os indivíduos. A membrana da mucosa do estômago, mais precisamente da camada epitelial, exibiu células descamadas, além de uma camada regular de muco recobrando o epitélio, que aumentou progressivamente nos grupos G30 e G45.

A mucosa do intestino delgado mostrou-se formada por diversos tipos celulares, com destaque para células absorptivas e caliciformes. Apesar da exposição ao etanol, a mucosa não apresentou alterações morfológicas importantes, apenas uma ligeira diminuição do número e altura das vilosidades e glândulas de Lieberkühn.

### Histoquímica das mucinas

Quanto às reservas de glicosaminoglicanos pelas células da mucosa intestinal reveladas pela reação com PAS e Alcian blue, observou-se um gradativo aumento da expressão dos mesmos pelas células produtoras de muco à medida que o período de exposição ao etanol aumentou (Tabela 1).

Foi confirmado o aumento na produção de mucopolissacarídeos neutros, evidenciado pela intensa marcação de PAS nas regiões foveolar e apical das células de reserva no corpo gástrico, à medida que a exposição ao etanol foi intensificada, principalmente aos 45 dias.

**Tabela I.** Área média\* das reservas de glicosaminoglicanos gastrointestinais de ratos durante a exposição ao etanol (15-45 dias), Recife 2003

GRUPOS	ESTÔMAGO		INTESTINO	
	GN	GA	GN	GA
G15	123,4	124,8	116,7	120,4
G30	234,8	232,1	238,3	208,4
G45	274,7	268,9	254,1	206,0
CG	120,0	118,9	108,8	111,7

GN, glicosaminoglicanos neutros; GA, glicosaminoglicanos ácidos.  
\* área média em  $\mu\text{m}^2$  (área total = 12.234  $\mu\text{m}^2$ ).

Na região antral não houve marcação para presença de mucinas ácidas ou neutras para nenhum dos períodos de exposição. No intestino delgado a análise qualitativa não evidenciou diferença na expressão de mucina neutra nem no número de células PAS-positivas nos diferentes períodos de exposição ao etanol.

### Histoquímica com Lectinas

As lectinas utilizadas mostram padrões de ligação crescentes com o aumento dos períodos de exposição ao etanol (Tabela 2).

**Tabela II.** Padrões de marcação das lectinas na mucosa gástrica e intestinal de ratos em diferentes períodos de exposição ao etanol, Recife 2003

Lectina	GRUPOS							
	CG		G15		G30		G45	
	MG	MI	MG	MI	MG	MI	MG	MI
PNA	-	+	++	++	++	++	+++	++
WGA	+	-	+	+	+	+	+++	++
Con A	+	+	-	+	+	-	+++	++

MG, Mucosa Gástrica; MI, Mucosa Intestinal

Intensidade de marcação: - sem marcação, + fraca, ++ moderada, +++ intensa.

A PNA foi a mais seletiva das lectinas testadas, marcando, exclusivamente, células do colo e ístmo das glândulas gástricas e com reação negativa para o muco, apresentando um padrão granular de marcação para os eritrócitos. A Con A revelou uma marcação mais intensa nas regiões do ístmo e criptas das glândulas fúndicas estomacais e falha na marcação do muco, mostrando o mesmo padrão de marcação obtido pela PNA em relação aos eritrócitos. Quanto à WGA, esta marcou, especificamente, as células caliciformes, bem como o muco e os grânulos das células de Paneth, contidas nas glândulas de Lieberkühn no intestino. Na mucosa do estômago, revelou um padrão de marcação bastante difuso e inespecífico.

### DISCUSSÃO

O etanol sendo uma molécula polar, pode interagir com uma região hidrofóbica de macromoléculas, ligando-se a uma variedade de proteínas e carboidratos de membranas<sup>17</sup>. Um dos efeitos tóxicos do etanol se reflete na função básica do epitélio intestinal e quando ocorre lesão, os processos de absorção são prejudicados, desencadeando “síndrome de má absorção”<sup>14</sup>. Atualmente se sabe que tanto o etanol, quanto o seu principal metabólito, o acetaldeído, são indicados como responsáveis por diversos distúrbios da mucosa intestinal, além de serem fatores carcinogênicos tanto para os ratos,<sup>18</sup> como para seres humanos<sup>19</sup>.

O aumento da síntese e distribuição de mucina ácida e neutra pelas células mucosas do estômago e intestino, observado neste estudo, pode ser explicada pela ação tóxica do etanol que, ao ser ingerido oralmente, é transportado ao intestino, onde uma parte é oxidada pelas bactérias residentes na mucosa, que produzem boa parte do acetaldeído tóxico aos eritrócitos, alterando a produção e secreção de muco<sup>20</sup>.

No epitélio gastrointestinal a mucosa é coberta por um mucoprotetor, composto principalmente de glicoproteínas-mucinas, sintetizado pelas células superficiais (goblet cells), células estas sensíveis às agressões sofridas pela mucosa<sup>21</sup>.

A observação de achados idênticos quanto às regiões positivas para Alcian blue/PAS e a marcação da lectina WGA para o muco, reafirma a possibilidade da utilização de lectinas como biomarcadores, se tornando uma das ferramentas para o estudo da mucosa gastrointestinal, devido a sua afinidade por substâncias do muco<sup>22</sup>.

Os glicoconjugados do muco são, possivelmente, relacionados a muitas doenças, apresentando diferenças na sua composição entre a mucosa gástrica normal e durante as situações de estresse como, por exemplo, a ingestão de álcool<sup>23</sup>.

As lectinas utilizadas mostram variados padrões de marcação para a mucina produzida pelas células secretoras, evidenciando a presença de tipos específicos de carboidratos, mais especificamente, N-acetilglicosamina, como um componente importante da proteção da mucosa gastrointestinal.

Os padrões de marcação das glândulas estomacais pelas lectinas PNA e Con A utilizadas neste trabalho, marcando exclusivamente, células do colo e células parietais (oxínticas) nas glândulas do corpo do estômago, mostram-se semelhantes à marcação obtida em epitélio colunar maior e neoplásico de cão<sup>24</sup>, confirmando observações anteriores que os oligossacarídeos das glicoproteínas nas células epiteliais absorptivas, evidenciados por lectinas podem servir como marcadores auxiliares no estudo das modificações funcionais nas células da mucosa, desde lesões pré-neoplásicas até tumores malignos no estômago e intestino<sup>25</sup>.

As afinidades das lectinas Con A, PNA e WGA pelas células da mucosa gástrica observadas, demonstradas pela marcação intensa e específica a determinados grupos celulares, são corroborada por outros autores, que em estudos recentes<sup>26,27</sup> observaram marcação pela PNA na superfície foveolar e células

epiteliais, enquanto com WGA essas regiões mostraram-se negativas<sup>27</sup>. Outros trabalhos afirmam, ainda, que várias lectinas ligam-se, especificamente, a mucinas estomacais e células gástricas, como as lectinas Meã I-II<sup>28</sup>, BPA e VVA<sup>29</sup>.

Em relação às variações de intensidade observadas nos padrões de ligação das lectinas, esses resultados são semelhantes a estudos anteriores que atribuíram esse fato aos efeitos tóxicos da exposição ao etanol sobre a extensão da ligação e distribuição de lectinas nos tecidos<sup>30</sup>.

A ausência de alterações estruturais mais evidentes no epitélio gastrointestinal dos ratos nesse estudo, deve-se à alta capacidade de regeneração desse epitélio que é corroborado por estudo ultraestrutural da mucosa gástrica durante a exposição ao etanol<sup>31</sup>. A ingestão crônica do álcool favorece uma resposta adaptativa das membranas, apesar desta interação álcool-membrana ocasionar mudanças significativas no funcionamento das mesmas<sup>32</sup>.

Desta, os resultados obtidos sugerem um importante papel das glicoproteínas durante alterações e reorganização do ambiente celular gastrointestinal quando exposto às situações de estresse. Podendo-se, assim, em concordância com especulações anteriores<sup>33</sup>, confirmar os efeitos do álcool no glicocálice e instituir a histoquímica com lectinas como uma possível ferramenta para detectar os graus de toxicidade alcoólica nas células.

## CONCLUSÕES

Os resultados comprovaram a existência de uma íntima relação entre a ingestão crônica de etanol, subsequente síntese/expressão de mucinas pelas células mucosas e os padrões diferenciados de marcação de lectinas, indicando também alterações na expressão de carboidratos pelas células do trato gastrointestinal, quando expostas a toxinas como o etanol.

## SUMMARY

### HISTOCHEMICAL AVALIATION OF THE GASTROINTESTINAL MUCOSA OF RATS EXPOSED TO ALCOHOL

Mario Ribeiro MELO-JUNIOR, Marcos Cezar Feitosa de Paula MACHADO, Jorge Luiz Silva ARAÚJO-FILHO, Vasco José Ramos Malta PATU, Eduardo Isidoro Carneiro BELTRÃO e Nicodemos Teles de PONTES-FILHO.

**Objectives:** in this work, lectin histochemistry was used to evaluate the expression of glycosaminoglycan (mucin) in gastrointestinal cells of rats exposed to ethanol. **Method:** Rats were exposed to ethanol (3g/kg of weight) during 15, 30 and 45 days. After perfusion, the stomach and intestine were formalin 10% fixed and the tissues were paraffin embedded. Slices (4mm) were incubated with peroxidase-conjugated lectins (PNA, WGA and Con A). Lectin staining was revealed with DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> followed by haematoxylin counterstaining. Periodic acid-Shiff (PAS)

and Alcian Blue staining methods were used to evaluate glycosaminoglycan expression. **Results:** indicated that, in gastric mucosae, acid and neutral mucin expression rose progressively during ethanol exposition while in intestinal mucosae no considerable difference was observed in the number of PAS- and Alcian Blue-positive staining cells. All lectins presented an increasing binding pattern related to the period of ethanol exposure. PNA was the most selective lectin, recognizing exclusively colon cells and gastric glands. Con A presented an intense binding to the bottom region of the colon stomach glands while WGA intensely bound to the caliceform and Paneth cells in the intestinal glands. **Conclusion:** These findings demonstrate that ethanol exposure led to a different pattern of lectin recognition of the cells of the gastrointestinal tissue.

**KEYWORDS:** Histochemistry, lectins, ethanol, glycosaminoglycans

## REFERENCIAS

1. JUAREZ J, DE TOMASI EB & VASQUEZ C Alcohol treatment during lactation produces an advance in the onset of puberty in female rats. *Alcohol*. 21(2): 181-185, 2000.
2. PERES WAF, CARMO MGT, ZUCOLOTO S, IGLESIAS AC, BRAULIO VB. Ethanol intake inhibits growth of the epithelium in the intestine of pregnant rats. *Alcohol*. 33:83-89, 2004.
3. GARIGE M, AZUINE, LAKSHMAN MR. Chronic ethanol consumption upregulates the cytosolic and plasma membrane sialidase genes, but downregulates lysosomal membrane sialidase gene in rat liver. *Metabolism Clinical and Experimental*. 55: 803- 810, 2006.
4. WATZL B, WATSON RR. Symposium: Nutrition, immunomodulation and AIDS. Role of alcohol abuse in nutritional immunosuppression. *Am Inst. Nut.*33: 773-737, 1992.
5. SHARON N & LIS H. Carboirdrates in cell recognition. *Scientific Amer*. 268: 74-81, 1993.
6. MELO-JÚNIOR M R, TELLES AMS, ALBUQUERQUE F E B, PONTES-FILHO N T, CARVALHO JRL B, BELTRÃO E I C. Altered lectin-binding sites in normal colon and ulcerative colitis. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* vol.40, no.2, p.123-125. ISSN 1676-2444, Apr 2004.
7. NAUGHTON PJ *et al.* Modulation of Salmonella infection by the lectin of *Canavalia ensiformis* (Con A) and *Galanthus nivalis* (GNA) in a rat model in vivo. *J. Appl. Microb.* 88(4): 720-727, 2000.
8. SOUSA MC, GONÇALVES CA, BAIROS VB, POIARES-DA-SILVA J. Adherence of *Giardia lamblia* trophozoites to Int-407 human intestinal cells. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 8(2): 258-265, 2001.
9. PUSZTAI A *et al.* Lectins and also bacteria modify the glycosilation of gut surface-receptors in the rat. *Glycoconj. J.* 12(1): 22-35, 1995.
10. GUPTA P N, MAHOR S, RAWAT A, KHATRI K, GOYAL A, VYAS SP. Lectin anchored stabilized biodegradable nanoparticles for oral immunization Development and in vitro evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*. 318: 163-173, 2006.
11. URDIALESVIEDMA M, DEHAROMUNOZ T, MARTOSPADILLA S, ABADORTEGA JM, VARELADURAN J, GRANDAPAEZ R JACALIN. Another marker for histocytes in paraffin-embeddee tissues. *Histol. Histopathol.* 10(3):597-602, 1995.
12. KITAGAWA H *et al.* Ultrastructural characteristics and lectin-binding properties of M-cells in the follicle associated epithelium of chicken caecal tonsils. *J. Anat.* 197(4): 607-616, 2000.
13. GEBHARD A & GEBERT A. Brush cells of the mouse intestine possess a specialized glycocalyx as revealed by quantitative lectin histochemistry: Further evidence for a sensory function. *J. Histochem. Cytochem.* 47(6): 799-808, 1999.
14. SOFFIENTINO B, GOMEZ-CHIARRI M, SPECKER J. Developmental changes in stomach, intestine, and skin glycoconjugates in summer flounder (*Paralichthys dentatus*) A lectin histochemical study. *Aquaculture*. 253: 680-687, 2006.
15. FILIPE MI. Gastrointestinal tract. In: *Histochemistry in pathologic diagnosis*. 10<sup>a</sup> Edition, Samuel S. Spicer (Ed.). New York (USA). 1041p, 1986.
16. ÖZER E, SARIOGLU S & GÜRE A. Effects of prenatal ethanol exposure on neuronal migration, neurogenesis and brain myelination in the mice brain. *Clin. Neuropathol.* 19(1): 21-25, 2000.
17. BARRY J, GWRISH K DIRECT NMR. Evidence for ethanol binding to the lipidwater interface of phospholipid bilayers. *Biochemistry*. 33: 882-888, 1994.
18. HOMANN N, TILLONEN J & SALASPURO M. Microbially produced acetaldehyde from ethanol may increase the risk of colon cancer via folate deficiency. *Int. J. Cancer*. 86(2): 169-173, 2000.
19. SEITZ HK, MATSUZAKI S, YOKOYAMA A, HOMANN N, VOKEVAINEN S, WANG XD. Alcohol and cancer. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 25(5): 137-143, 2001.
20. SALASPURO M. Microbial metabolism of ethanol and acetaldehyde and clinical consequences *Add. Biol.* 2(1): 35-46, 1997.
21. DEPLANCKE B, GASKINS HR. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nut.*73(6): 1131-1141, 2001.
22. ZEPELETA I. Preparation of Ulex europeus lectin-gliadin nanoparticle conjugates and their interation with gastrointestinal mucus. *Int. J. Pharm.* 19(1): 25-32, 1999.
23. TAYLOR C, ALLEN A, DETTMAR PW, PEARSON J P. Two rheologically different gastric mucus secretions with different putative functions. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1674: 131- 138, 2004.

24. HAINES DM. Peanut agglutinin lectin immunohistochemical staining of normal and neoplastic canine tissues. *Vet. Pathol.* 30(4): 333-342, 1993.
25. MADRID JF *et al.* Lectin-gold localization of fucose residues in human gastric mucosa. *J. Histochem. Cytochem.* 46(11): 1311-1320, 1998.
26. KHIN MM *et al.* Agglutinin of *Helicobacter pylori* coccoids by lectins. *World j Gastroenterol.* 6(2): 202-209, 2000.
27. RIOSMARTIN JJ, DIAZCANO SJ & RIVERAHUETO F Ultrastructural distribution of lectin-binding sites on gastric superficial mucus-secreting epithelial-cells. The role of golgi-apparatus in the initial glycosylation. *Histochem.* 99(2): 181-189, 1993.
28. ZETENO E *et al.* Specificity of the isolectins from the plant cactus *Machaerocereus eruca* for oligosaccharides from porcine stomach mucin. *Glycoconj. J.* 12(5): 699-706, 1995.
29. SHUE GL *et al.* Expression of glycoconjugates in pancreatic, gastric and colonic tissue by *Bauhinia purpurea*, *Vicia villosa* and Peanut lectins. *Scand J gastroenterol.* 28(7): 599-604, 1993.
30. CASEY CA. The effects of chronic ethanol administration on the rates of internalization of various ligands during hepatic endocytosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1134: 96-104, 1992.
31. ARABSKI M *et al.* Interaction of amoxicillin with DNA in human lymphocytes and *H. pylori*-infected and non-infected gastric mucosa cells. *Chemico-Biological Interactions.* 152: 13-24, 2005.
32. DIAMOND I, GORDON A. Celular and Molecular neuroscience of alcoholism. *Physiol. Rev.* 77: 1-20, 1997.
33. SINGH RS, TIWARY AK, KENNEDY JF. Lectins: sources, activities and applications. *Crit. Rev. Biotech.* 19(2): 145-178, 1999.

#### **Endereço para correspondência**

Prof. Mario Ribeiro de Melo-Junior  
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, LIKA, Universidade  
Federal de Pernambuco, UFPE. Av. Moraes Rêgo s/n, Campus  
Universitário - CEP 50670-910.  
E-mail: mariormj@gmail.com