

## DIETAS CON *CANAVALIA ENSIFORMIS* ALTERAN EL PATRÓN DE SECRECIÓN DE MUCINAS EN EL INTESTINO DELGADO DE POLLOS DE ENGORDE

### Diets with Raw Jack Beans (*Canavalia ensiformis*) Alter Small Intestine Mucin Secretion Pattern in Broiler Chickens

Adriana Méndez<sup>\*1</sup>, Gisela García<sup>\*\*</sup>, Coromoto Michelangeli<sup>\*</sup> y Lilliam Sívoli<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, Centro de Bioquímica Nutricional. <sup>\*\*</sup>Laboratorio de Histoquímica. Universidad Central de Venezuela. Apartado 4563, Maracay 2101A, Estado Aragua, Venezuela.

**Correo-E: [raliuga@cantv.net](mailto:raliuga@cantv.net)**

Recibido: 28/04/04 - Aprobado: 28/06/04

#### RESUMEN

Se condujo un experimento de 6 semanas de duración, empleando pollos de engorde, para evaluar los efectos de dietas con harina de granos crudos de *Canavalia ensiformis* (CC), sobre el patrón de secreción de mucinas del intestino delgado. Se preparó una dieta a base de maíz y soya (B) a la cual se le incorporó 2,5; 5,0 ó 10,0 % de CC. Todas las dietas tenían la composición de nutrientes similar. Se asignaron al azar cuatro grupos de 5 pollos Arbor Acres de un día de edad a cada dieta. Al final de cada semana, tres pollos de cada dieta fueron seleccionados y sacrificados por dislocación cervical. Se tomaron muestras de intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) y se fijaron rápidamente en formol neutro bufferado al 10%, para su posterior procesamiento histológico. Cada muestra de intestino delgado fue incluida en parafina, se cortaron secciones de 5-6  $\mu\text{m}$  y se colorearon con hematoxilina-eosina. Las mucinas neutras

#### ABSTRACT

A six-week experiment was conducted employing broiler chickens to evaluate the effects of diets containing Raw Jack Beans (RJB; *Canavalia ensiformis*) on the mucin secretion pattern of the small intestine. A basal corn-soy diet (B) was prepared to which 2.5; 5.0 or 10.0% of ground RJB were added. All diets had similar nutrient composition. Four groups of 5 one-day old Arbor Acres chicks were randomly assigned to each diet. Three chickens were selected weekly on a body weight basis and killed by cervical dislocation. Samples of small intestine (duodenum, jejunum e ileum) were quickly removed and fixed in buffered neutral formalin (10%) for later histological examination. Each small intestine sample was embedded in paraffin, sliced into 5-6  $\mu\text{m}$  sections and stained with hematoxylin-eosin. Neutral mucins were colored following the schiffs periodic acid (PAS) technique whereas the sialomucins and sulfomucins were

<sup>1</sup> A quien debe dirigirse la correspondencia (Corresponding Author).

se evidenciaron a través de la reacción histoquímica con ácido periódico de schiff (PAS) y las sialomucinas y sulfamucinas fueron visualizadas con la reacción de PAS + Alcian Blue (pH 2.5) y PAS + Alcian Blue (pH 1.0), respectivamente. Los datos histológicos revelaron una reducción en la secreción de todos los tipos de mucinas hasta la cuarta semana. Sin embargo, durante las semanas 5 y 6 se evidenció un aumento en la secreción de mucinas neutras. Considerando que estas últimas mucinas tienen un alto contenido de manosa en su estructura, se sugiere que los consumos crecientes de Con A dietética durante 4 semanas, induce una mayor secreción de mucinas neutras en un esfuerzo por neutralizar los efectos muy conocidos de la lectina sobre la mucosa intestinal.

**(Palabras clave:** *Canavalia ensiformis*, mucina, intestinos, pollos de engorde, dieta)

## INTRODUCCIÓN

El valor nutritivo de los granos de *Canavalia ensiformis* indican que éstos podrían ser utilizados en la elaboración de dietas para aves. Se han reportado valores de 24,2 % de proteína (Michelangeli y Vargas, 1994) y de 2247 kcal/kg de EMVn de materia seca para granos crudos. Sin embargo su incorporación en la dieta animal, así como otros granos leguminosos, han resultado en variados efectos sobre el tracto gastrointestinal y más específicamente en el intestino delgado. Estos efectos incluyen inhibición de la actividad de enzimas digestivas (Nakata y Kimura, 1985; Kik *et al.*, 1989) y alteraciones en la estructura morfológica y funcional del intestino, observándose daños en el borde en cepillo, erosión y atrofia de

visualized by PAS + Alcian Blue (pH 2,5) and PAS + Alcian Blue (pH 1,0), respectively. The histological data revealed a reduction in the secretion of all types of mucins up to four weeks following the intake of the RJB diets. However, during weeks 5 and 6 an increased production of neutral mucins was observed. Considering that these latter mucins have a higher content on mannose in its structure, this response is interpreted to mean that broiler chicks exposed during 4 weeks to increasing levels of dietary RJB, and therefore to increasing intakes on the lectin Con A, respond by secreting more neutral mucins in an attempt to counteract the well-known effects of the lectin on the intestinal mucosa.

**(Key words:** Jack beans (*Canavalia ensiformis*), mucin, intestine, broiler chicks, diet)

vellosidades, lo cual se traduce en reducción de la superficie de absorción (King *et al.*, 1980; Lorenzson y Olsen, 1982; Pusztai *et al.*, 1990), resultando en disturbios de los procesos de digestión y absorción de los nutrientes. Ha sido señalado que la presencia de la lectina Concanavalina A (Con A) en la *Canavalia* es uno de los principales factores responsable por sus efectos tóxicos, como resultado de la unión de la Con A a carbohidratos específicos del epitelio del intestino delgado (Pusztai *et al.*, 1991). Estos azúcares con los cuales la Con A presenta afinidad son la  $\alpha$ -D manosa y la  $\alpha$ -D-glucosa (Sharon y Lys, 1972) y forman parte de la estructura de las mucinas secretadas por las células caliciformes del epitelio intestinal (Spicer, 1965). Las mucinas del intestino de pollos de engor-

de cumplen funciones, de protección de la mucosa, (Smith y Butler, 1974; Felipe y Branfoot, 1976) lubricación, proveen las condiciones favorables para el crecimiento de la flora intestinal (Sakata y Engelhardt, 1981) y forman parte de los sitios de reconocimiento y adherencia para numerosos microorganismos (Mirelman y Ofek, 1986). Estas funciones son cumplidas cuando el tracto digestivo se encuentra en un estado normal, sin embargo, cuando se ve afectado por patógenos o componentes de la dieta, se pudiera comprometer la estructura normal del epitelio (Dibner *et al.*, 1996; Sharman *et al.*, 1997). Estudios previos han revelado cambios en la secreción de mucinas, asociados a mecanismos de protección o resistencia a la presencia de lectinas en la dieta (Lorenzson y Olsen, 1982). En el caso de pollos de engorde se han caracterizado el tipo de mucinas que están presentes en los diferentes segmentos del intestino delgado (Bryk *et al.*, 1999; Méndez y García, 2001), sin embargo, se desconocen los cambios en la secreción de mucinas, que pudieran ocurrir por la presencia de la Con A, cuando harinas de Canavalia son incluidas en la dieta.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Animales y Dietas**

Se emplearon 80 pollos de engorde, machos del cruce comercial Arbor Acres, de un día de edad, alojados en jaulas metálicas de dimensiones 1.0 x 0.5 x 0.5 m durante 6 semanas. Los pollos fueron pesados individualmente al inicio del experimento descartándose aquellos con pesos extremos. El agua y alimento fueron provistos *ad libitum*. Se preparó una dieta basal (B) con 3100 kcal/kg y 22% PC, siguiendo los requerimientos nutritivos recomendados por la National Research

Council (1994) y utilizando las harinas de maíz y soya como ingredientes principales (Tabla 1). A partir de esta dieta B, se formularon tres dietas adicionales (tratamientos) que contenían 2,5; 5,0 y 10% de harina de granos crudos de *Canavalia ensiformis*. La harina de canavalia cruda fue incluida en sustitución parcial de maíz y soya. Los granos crudos de canavalia contenían 2,4% de Con A. Detalles adicionales sobre las dietas experimentales han sido publicados previamente por Méndez *et al.* (1998).

### **Preparación del Tejido y Método Histoquímico**

Al final de cada semana se seleccionaron tres pollos por dieta y se sacrificaron mediante dislocación cervical, sin previo ayuno. El intestino delgado fue inmediatamente removido, cortado longitudinalmente, lavado con solución salina y fijado en formol neutro bufferado al 10% (v/v). Posteriormente, las muestras se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones de 5-6  $\mu\text{m}$ . Los cortes obtenidos se tiñeron con Hematoxilina – Eosina (Luna, 1968) y se examinaron en un microscopio de luz (Carl-Zeiss, Oberkochen, Germany).

Las mucinas neutras, se visualizaron mediante la reacción histoquímica del ácido periódico de schiff (PAS) (Mc Manus, 1946; Luna, 1968). Para la detección de sialomucinas se empleó PAS+ Alcian Blue, pH 2,5 (PAS + AB 2,5) de acuerdo con la metodología propuesta por Pearse (1985) y las sulfomucinas se colorearon con PAS + Alcian Blue, pH 1,0 (PAS + AB 1,0) (Pearse, 1985).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Numerosas investigaciones sobre el desarrollo del tracto gastrointestinal han

**Tabla 1.** Composición de las dietas experimentales utilizadas en el experimento

Ingredientes	Canavalia cruda			
	Control	2,5	5,0	10,0
	%			
Maíz, molido	58,27	57,60	55,96	53,55
Harina de soya	32,27	30,42	29,50	26,90
Canavalia cruda	0,00	2,50	5,00	10,00
Harina de Pescado	2,00	2,00	2,00	2,00
Aceite de maíz	2,85	2,90	3,00	3,10
Fosfato dicálcico	2,05	1,95	1,90	1,70
Carbonato de calcio	1,12	1,20	1,20	1,30
DL-metionina (99%)	0,24	0,23	0,24	0,25
Cloruro de sodio iodado	0,20	0,20	0,20	0,20
Premezcla de vitaminas <sup>1</sup>	0,50	0,50	0,50	0,50
Premezcla de minerales <sup>2</sup>	0,50	0,50	0,50	0,50
Análisis calculado <sup>3</sup>				
Proteína cruda (%)	22	22	22	22
EM (Kcal/Kg)	3.100	3.100	3.100	3.100
Metionina + Cisteína	0,95	0,93	0,93	0,93
Lisina	1,17	1,17	1,17	1,17
Calcio	1,00	1,01	1,00	1,00
Fósforo disponible	0,45	0,45	0,45	0,45

<sup>1</sup> Premezcla de vitaminas contiene (kg/dieta): retinol acetato, 2,27 mg; colecalciferol, 0,04 mg; a-tocoferol acetato, 5,5 mg; menadiona sodio bisulfio, 1,45mg; riboflavina, 6,6 mg; ac. pantotenico, 1,1 mg; cianocobalamina, 0,01 mg; colina, 550 mg; ac. folico, 0,7 mg; tiamina monohidratada, 1,1 mg; piridoxina, 1,1 mg; niacina, 33 mg.

<sup>2</sup> Premezcla de minerales (kg/dieta): manganeso (Mn), 65 mg; zinc (Zn), 40 mg; cobre (Cu), 5 mg; yodo (I), 0,5 mg.

<sup>3</sup> El calculo de los valores para cada ingridente (NRC 1994) excepto para Canavalia cruda, se tomaron los reportados por León *et al.* (1989; 1990).

demostrado los cambios morfológicos que ocurren desde la etapa embrionaria del animal (Lim y Low, 1977; Uni *et al.*, 1998; Geyra *et al.*, 2001). Tales cambios pueden estar asociados con la composición de la dieta, el tipo de flora bacteriana del intestino y el régimen alimenticio (Cook y Bird, 1973; Dibner *et al.*, 1996).

Las Tablas 2, 3 y 4 muestran la composición y el patrón de distribución de las mucinas del intestino delgado de pollos de engorde alimentados con las dietas experimentales, durante las 6 semanas que duró el experimento. En coincidencia con las observaciones previas de Méndez y García (2001), el intestino delgado de los animales alimentados con la dieta control B, mostró la presencia de tres tipos de

mucinas: ácidas, neutras y sulfatadas. Estos autores también observaron que la secreción de mucinas disminuye con la edad. En el presente trabajo, la adición de 2,5; 5,0 ó 10% de harina de granos crudos de Canavalia, modificó la secreción de mucinas en el intestino delgado, en relación con la dieta control. En particular, la incorporación de 5 y 10% de Canavalia cruda a las dietas de los pollos, redujo la secreción de los tres tipos de mucinas (neutras, ácidas y sulfatadas) desde la primera hasta la cuarta semana de haber estado los pollos consumiendo estas dietas, en relación con la dieta control. Este efecto pareciera ser más marcado con las dietas que contenían 10% de Canavalia cruda. Ha sido demostrado que las lectinas, tienen la

**Tabla 2.** Efecto de dietas con harina de granos crudos de *Canavalia ensiformis* (CC) sobre la secreción de mucinas neutras en el intestino delgado de pollos de engorde<sup>1/</sup>.

Dieta	Semanas de edad					
	1 <sup>era</sup>	2 <sup>da</sup>	3 <sup>era</sup>	4 <sup>ta</sup>	5 <sup>ta</sup>	6 <sup>ta</sup>
Basal (B)	+++	+++	++	++	+	+/*
B + 2,5% CC	+++	+++	++	++/+	++	++/+
B + 5,0% CC	++	++	++/+	++/+	++	+++/>++
B + 10,0% CC	++	++/+	+	+	++/+	++/+

**Tabla 3.** Efecto de dietas con harina de granos crudos de *Canavalia ensiformis* (CC) sobre la secreción de sialomucinas en el intestino delgado de pollos de engorde<sup>1/</sup>.

Dieta	Semanas de edad					
	1 <sup>era</sup>	2 <sup>da</sup>	3 <sup>era</sup>	4 <sup>ta</sup>	5 <sup>ta</sup>	6 <sup>ta</sup>
Basal (B)	+++	+++	++	++	++/+	++/+
B + 2,5% CC	+++	+++	++	++	++	++/+
B + 5,0% CC	++	++	++	++	++	+++/>++
B + 10,0% CC	++	++/+	++/+	+++/>++	++/+	++/+

**Tabla 4.** Efecto de dietas con harina de granos crudos de *Canavalia ensiformis* (CC) sobre la secreción de mucinas sulfatadas en el intestino delgado de pollos de engorde<sup>1/</sup>.

Dieta	Semanas de edad					
	1 <sup>era</sup>	2 <sup>da</sup>	3 <sup>era</sup>	4 <sup>ta</sup>	5 <sup>ta</sup>	6 <sup>ta</sup>
Basal (B)	+++	+++	++	++	+	++/+
B + 2,5% CC	+++	++	++	++	++	++/+
B + 5,0% CC	++	++	++	++/+	++	++
B + 10,0% CC	++	++/+	++/+	+++/>++	+++/>++	++/+

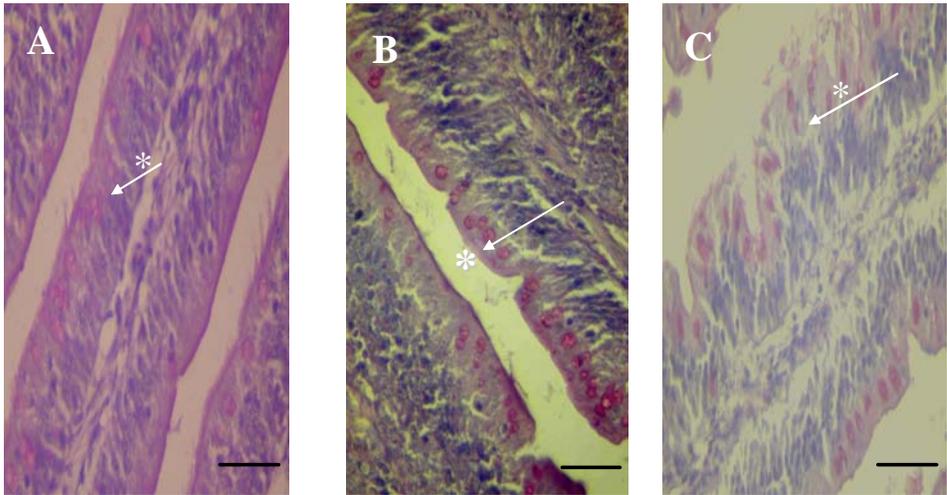
Cantidad de secreción: Trazas: (\*); Débil: (+); Moderada: (++) ; Fuerte: (+++) <sup>1/</sup>Cada resultado de la valoración histoquímica en estas tablas representa un promedio de las observaciones correspondientes a los 3 segmentos del intestino delgado estudiados, ya que no se observaron cambios aparentes entre cada segmento.

capacidad de unirse a algunos residuos específicos de oligosacáridos unidos a las proteínas (glicoconjugados) que conforman las mucinas del intestino delgado (Eshdat *et al.*, 1978; Ovtsharoff y Ichev, 1984; Méndez *et al.*, 1998), ocasionando cambios en su secreción. La lectina Con A, presente en la Canavalia cruda, exhibe afinidad por la  $\alpha$ -D-glucosa y alta afinidad por la  $\alpha$ -D-manosa (Sharon y Lys, 1972; Pusztai, 1991), azúcares que forman parte de las mucinas secretadas por el epitelio intestinal.

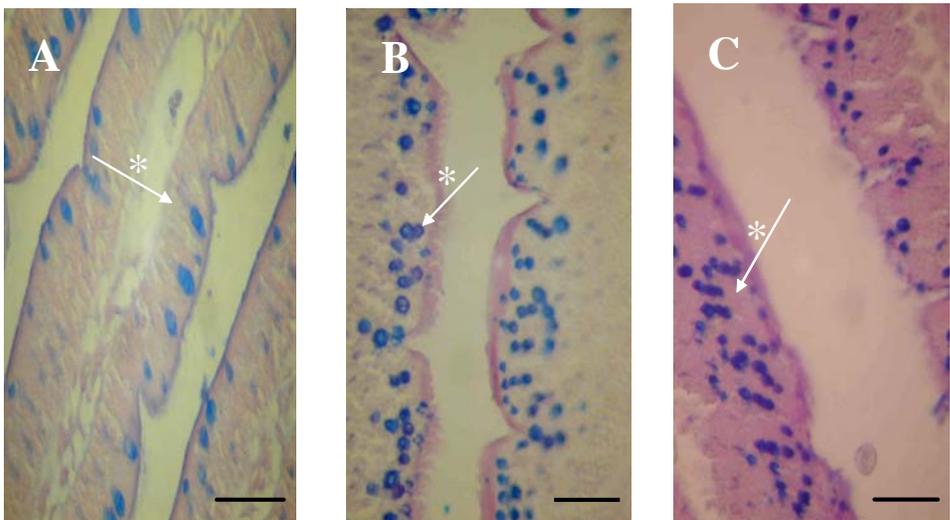
Una posible explicación de los efectos adversos asociados con el consumo de CC, reportados por varios investigadores (D'Mello y Walker, 1991; Melcion *et al.*, 1993), pudiera ser el resultado de los cambios adaptativos que han sido observados en las aves y que incluyen pérdidas de la membrana del borde en cepillo causadas por la Con A ingerida, (Lorenzson y Olsen, 1982) y como se aprecia en el presente trabajo, de la reducción en la concentración de mucinas secretadas en el intestino delgado observado hasta la 4<sup>ta</sup> semana del ensayo. Sin embargo, esta respuesta parece modificarse durante la quinta y sexta semanas, al observarse un aumento de la secreción de mucinas de los pollos que consumieron CC, en relación con los pollos que consumieron la dieta control (Microfotografía 1 y 2). La mayor secreción parece ser más evidente en el caso de las mucinas neutras con niveles de 10% de CC (Tabla 2). De acuerdo a la clasificación de las mucinas propuesta por Spicer (1965), la manosa constituye el principal carbohidrato presente en la estructura de las mucinas neutras y como se ha señalado, este azúcar muestra mayor afinidad con la Con A (Sharon y Lis, 1972). De esta manera, el intestino delgado estaría respondiendo a la presencia de la Con A, aumentando la secreción de mucinas con mayor contenido de manosa.

Coincidentalmente, el efecto sobre el consumo de alimento de los pollos (datos no mostrados) que consumieron las dietas con CC se hicieron proporcionalmente menos marcados, luego de la 4<sup>ta</sup> semana, en relación con el basal (Méndez *et al.*, 1998). Esta hipótesis es coincidente con lo planteado por otros autores, en el sentido de que el aumento en la secreción de mucinas en el lumen intestinal, es uno de los mecanismos que le permiten al animal, al menos parcialmente, contrarrestar los efectos asociados a la ingestión de lectinas con la dieta (Freed y Buckley, 1979; Greer *et al.*, 1985). Este aumento pareciera depender de la cantidad de lectina ingerida y del tiempo de exposición a la misma (Sharma *et al.*, 1997; Iji *et al.*, 2001). Así, en el presente trabajo, los pollos de engorde parecieran tener un umbral de concentración de Con A en la dieta, a partir del cual, la secreción de mucinas en el intestino aumenta. Como se ha señalado los resultados (Tablas 2, 3, y 4) indican que las dietas con 5 y 10% de CC, asociadas a un mayor consumo de Con A, indujeron un aumento en la secreción de mucinas en el intestino delgado de los pollos luego de la 4<sup>ta</sup> semana de edad.

En resumen, los resultados demuestran que la lectina Con A, al ser ingerida como un componente de la CC en la dieta, puede reducir la secreción de mucinas, desde la 1<sup>ra</sup> hasta la 4<sup>ta</sup> semana de edad de los pollos, seguida de un aumento de tales secreciones, en particular las mucinas neutras, en la 5<sup>ta</sup> y 6<sup>ta</sup> semanas de edad (microfotografía 1 y 2). Posteriores estudios sobre los cambios en la composición y secreción de mucinas pudieran ayudar a entender la interacción entre la secreción de mucinas y los componentes de la dieta, así como su relación con las respuestas fisiológicas de las aves ante la presencia de lectinas en la dieta.



**Microfotografía 1.** Reacción histoquímica de ácido periódico de Schiff (PAS). Duodeno de pollos de engorde de 5 semanas de edad, alimentados con dieta basal (A), el cual presenta una secreción débil para mucinas neutras (\*). Dieta basal + 5 % de CC (B) presenta una secreción moderada y dieta basal + 10 % de CC (C) evidencia moderada a débil secreción de mucinas neutras. 40X. Escala de la barra: 5mm



**Microfotografía 2.** Reacción histoquímica PAS + Alcian Blue, pH 1,0. Duodeno de pollos de engorde de 5 semanas de edad, alimentados con dieta basal (A), el cual presenta una secreción débil para mucinas sulfatadas (\*). Dieta basal + 5 % de CC (B) presenta una secreción moderada y dieta basal + 10 % de CC (C) evidencia moderada a débil secreción de mucinas sulfatadas. 40 X. Escala de la barra: 5 mm

## AGRADECIMIENTO

La ejecución de este trabajo fue posible, gracias a los aportes del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (CDCH), mediante Ayudas Institucionales al Centro de Bioquímica Nutricional.

## REFERENCIAS

- Bryk, S. G.; Sgambati, E. and Gheri Bryk, G. 1999. Lectin histochemistry of goblet cell sugar residues in the gut of the chick embryo and the newborn. *Tissue Cell*. 31:170-175.
- Cook, R. H. and Bird, F.H. 1973. Duodenal villus area and epithelial cellular migration in conventional and germ-free chicks. *Poult. Sci.* 52:2276-2280.
- D'Mello, J. P. and Walker, A. G. 1991. Detoxification jack beans (*Canavalia ensiformis*): Studies with young chicks *Anim. Feed. Sci. Technol.* 33:117-127.
- Dibner, J. J.; Kitchell, M.; Atwell, C.A. and Ivey, F.J. 1996. The effect of dietary ingredients and age on the microscopic structure of the gastrointestinal tract in poultry. *Applied. Poult. Sci.* 5:70-77.
- Eshdat, Y.; Ofek, I.; Yashouv-Gan, Y., Sharon, N. and Mirelman, D. 1978. Isolation of a mannose – specific lectin from *Escherichia coli* and its role in the adherence of the bacteria to epithelial cells. *Biochem. and Biophys. Research Communication.* 85:1551-1559.
- Felipe, M.I. and Branfoot, A.C. 1976. Mucin histochemistry of the colon. *Curr. Top. Pathol.* 63:143-178.
- Freed, D.L.J. and Buckley, C. H. 1979. Mucottractive effect of lectin. *Lancet.* 585-586.
- Geyra, A.; Uni, Z. and Sklan, D. 2001. Enterocyte dynamic and mucosal development in the posthatch chick. *Poult. Sci.* 80:776-782.
- Greer, F.; Brewer, A.C. and Pusztai, A. 1985. Effect of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) Toxin on tissue weight and composition and some metabolic functions of rats. *Br. J. Nutr.* 54:95-103.
- Igi, P. A.; Saki, A. y Tivey, D.R. 2001. Body and intestinal growth of broiler chicks on a commercial starter diet. 1. Intestinal weight and mucosal development. *Br. Poult. Sci.* 42: 505-513.
- Kik, M.J.L.; Rojer, J.M.; Mouwen, M.V.M.; Koninkx, J.F.J.; Van Dijk, J.E. and Van der Hage, M.H. 1989. The interaction between plant lectin and the small intestinal epithelium: a primary cause of intestinal disturbance. *Vet. Quart.* 11:108-115.
- King, T.P.; Pusztai, A. and Clarke, E.M.N. 1980. *Kidney bean* (*Phaseolus vulgaris*) lectins induced lesions in rat small intestine: 1. Light microscope studies. *J. Comp. Pathol.* 90:585-595.
- Lim, S., and Low, F.N. 1977. Scanning electron microscopy of the developing alimentary canal in the chick. *Am. J. Anat.* 150:149-174.
- Lorenzson, V. and Olsen, W.A. 1982. In vivo responses of rat intestinal epithelium to intraluminal dietary lectins. *Gastroenterol.* 82:838-848.
- Luna, L. 1968. Manual of Histological staining methods of the armed forces institute of pathology, 3ra edición. *McGraw – Hillbook Company.*
- Mcmanus, J.F.A. 1964. Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature (Lond.)* 158, 202.
- Melción, J.; Michelangeli, C. and Picard, M. 1993. Evaluation of the effect of extrusion cooking of Jacbean (*Canavalia ensiformis* L.) seed on short-term feed intake in chicks. *Anim. Feed Sci. Technol.* 46:197-213.

- Méndez, A. y García, G. 2001. Patrón de secreción de mucosustancias en el tracto intestinal de pollos de engorde durante su ciclo productivo. *Rev. Fac. Cs. Vets. UCV*. 42:101-108.
- Méndez, A. Vargas, R. E. and Michelangeli, C. 1998. Effects of Concanavalin A, fed as constituent of Jack bean (*Canavalia ensiformis* L.) seeds, on the humoral immune reponse and performance of broiler chickens. *Poult. Sci.* 77:282-289.
- Michelangeli, C. and Vargas R. E. 1994. L-canavanine influences feed intake, Basic plasma amino acids and kidney arginase activity in chicks. *J. Nutr.* 124:1081-1087.
- Mirelman, D. and Ofek, I. 1986. Introduction of microbial lectins and agglutinin. In *Microbial Lectin and Agglutinin: Properties and Biological Activity* (edited by Mirelman, D.), pp. 1-19. New York: Jhn Wiley and Sons.
- Nakata, S. and Kimura, T. 1985. Effects of ingested toxic bean lectins on the gastrointestinal tract in the rat. *J. Nutr.* 115:1621-1629.
- National Research Council, 1994. *Nutrient Requirements of Poultry*, 9<sup>th</sup> rev. ed. National Academy Press, Washington, DC.
- Ovtscharoff, W. and Ichev, K. 1984. Localization of lectin binding sites on the rat intestinal microvillous membrane. *Acta Histochem.* 74:21-24.
- Pearse, A.G.E. 1985. *Histochemistry. Theoretical and applied.* vol 2. 4<sup>th</sup> ed Churchill Livingstone, London.
- Pusztai, A.; Ewen, S.W.B.; Grant, G.; Peumans, W.J.; Van Damme, E.J.M.; Rubio, L.A. and Bardocz, S. 1990. The relationship between survival and binding of plant lectins during small intestinal passage and their effectiveness as growth factors. *Digest.* 46:308-316.
- Pusztai, A.; Ewen, S.W.B.; Grant, G.; Peumans, W.J.; Van Damme, E.J.M.; Rubio, L.A. and Bardocz, S. 1991. Plant (Food) lectins as signal molecules: Effects on the morphology and bacterial ecology of the small intestine. In: *lectin Reviews*, Vol. 1. (Kil Rattray, E.A.S., R. Palmer, and Pusztai, A. 1974 . Toxicity of Kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to conventional and gnotobiotic rats. *J. Sci. Food. Agric.* 25:1035-1040.
- Sakata, T. and Engelhardt, W.V. 1981. Luminal mucin in the large intestine of mice, rats and guinea pigs. *Cell Tissue Res.* 219:629-635.
- Sharman, R.; Fernandez, F.; Hinton, M. and Schumacher, V. 1997. The influence of diet on the mucin carbohydrates in chick intestinal tract. *Cell. Mol. Life Sci.* 53:935-942.
- Sharon, N. and Lys, H. (1972). Lectins: cell agglutinating and sugar specific proteins. *Sci.* 177: 449-459.
- Smith, B. and Butler, M. 1974. The autonomic control of colonic mucin secretion in the mouse. *Br. J. Exp. Pathol.* 55:615-621.
- Spicer, S.S 1965. Diamine methods for differentiating mucosubstances histochemically. *J. Histochem. Cytochem.* 13:211-234.
- Uni, Z.; Ganot, S. and Sklan, D. 1998. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. *Poult. Sci.* 77:75-82.