

MARCELO LUIZ GEHLEN

**AVALIAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE REAÇÃO INFLAMATÓRIA
CORNEANA: ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Moreira

Co-orientador: Prof. Dr. João Carlos
Domingues Repka

CURITIBA
2001

Gehlen, Marcelo Luiz

Avaliação espectrofotométrica do azul de Evans em reação inflamatória corneana: Estudo experimental em coelhos – Curitiba, 2001.

f.51.

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Moreira.

Dissertação (Mestrado)/ Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

1. Avaliação Espectrofotométrica. 2. Reação Inflamatória Corneana.
3. Estudo Experimental. 4. Azul de Evans.

I. Título

***Ao eterno amor, minha esposa Simone;
exemplo de compreensão, carinho e fidelidade.***

*Aquela que acendeu meu coração
Que sempre esteve ao meu lado
Encantou minha vida
Ilimitou minha felicidade*

*Superou as expectativas
Uniu nossas aspirações
Soube amar, engrandecer-me
Sem dúvida, foi um presente de Deus.*

*Aos meus pais,
pelo eterno afeto,
pelo senso de responsabilidade,
pela proposta de vida a mim apresentada,
agradeço de todo meu coração.*

*Às almas dos animais:
Àqueles que serviram, sem saber para quê
Lutaram bravamente pela sua existência
Algumas vezes agoniados, pareciam confiantes
Num futuro que não lhes pertenceu.*

*Superaram a dor, o medo e a intimidação
Foram verdadeiros heróis, dignos de suas almas
Almas que Deus certamente lhes confiou
Num sobressalto retumbante...
...no testemunho da subservência à ciência*

*Ao meu irmão,
pela esperança nas dificuldades,
pela sua persistência e ajuda,
reconheço um verdadeiro amigo.*

*Ao Superior,
Deus, tu és o Superior
Não há religiões que te separe
Não há ser que te ignore
Não há o que façamos sem tua força*

*Desde o sol que nasce todo dia
Desde a energia que nos faz agir
Deus protege a nossa existência
Por ele devemos sempre agradecer*

*Aos meus sogros,
pela perseverança e estímulo
pelo carinho e compreensão
obrigado*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, participaram deste trabalho e que me engrandeceram com seus conhecimentos e experiências de vida.

Ao Prof. Dr. HAMILTON MOREIRA, orientador deste trabalho, pelos valiosos conselhos, pela sua sabedoria e determinação no intercurso desta tese.

Ao Prof. Dr. ANTÔNIO CARLOS L. CAMPOS, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de demonstrar meu estudo.

Ao Prof. Dr. JOÃO CARLOS DOMINGUES REPKA, exemplo de dedicação, pelas horas difíceis na confecção experimental deste trabalho, pela nossa amizade, pelo inesgotável apoio, pela paciência nos momentos críticos e principalmente pelo incentivo científico o qual pude usufruir.

Ao Prof. Dr. CARLOS AUGUSTO MOREIRA, pelos ensinamentos, pela acolhida desde os tempos de acadêmico, indicando sempre o melhor caminho.

À Dra. LUCIANE MOREIRA, pela amizade, espírito científico e companheirismo em toda a elaboração e confecção desta tese.

Ao Dr. FÁBIO PRADO SABBAG, exemplo de amizade, honestidade e sinceridade, pelos árduos dias de trabalho experimental.

À FACULDADE EVANGÉLICA DO PARANÁ, por ceder as dependências de seus laboratórios de Imunologia e Microbiologia para a realização experimental desta tese.

Ao CNPq, pela bolsa de estudo oferecida e pelo incentivo científico-cultural, muito importante na realização deste trabalho.

Aos médicos: MACCLEITON GEHLEN, PEDRO JOÃO NETO e MANUELLA BASSETTI pelas valiosas colaborações na parte prática do estudo e à Prof. FERNANDA ROSA WILLRICH, pelas correções lingüísticas desta dissertação

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 OBJETIVOS.....	4
2 REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1 ANATOMIA DA CÓRNEA HUMANA.....	6
2.2 HISTOLOGIA DA CÓRNEA HUMANA.....	6
2.3 ANATOMIA E HISTOLOGIA LIMBO HUMANO.....	8
2.4 ANATOMIA E HISTOLOGIA DA CÓRNEA DO COELHO.....	9
2.5 QUEIMADURAS QUÍMICAS.....	9
2.6 PERMEABILIDADE VASCULAR E INFLAMAÇÃO.....	11
2.7 AZUL DE EVANS.....	12
3 MATERIAL E MÉTODO	19
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	19
3.2 AMOSTRA.....	19
3.2.1 Preparo da Amostra.....	19
3.2.1.1 Procedimento Anestésico.....	19
3.2.1.2 Grupo I.....	20
3.2.1.3 Grupo II.....	20
3.2.1.4 Grupo III.....	21
3.3 ORGANIZAÇÃO DO MÉTODO.....	23
3.3.1 Preparo das Soluções e Reagentes.....	23
3.3.1.1 Solução de Azul de Evans.....	23

3.3.1.2	Formamida.....	23
3.3.2	Injeção do Azul de Evans.....	23
3.3.3	Sacrifício	24
3.3.4	Coleta das Amostras.....	24
3.3.5	Extração do Corante.....	25
3.3.6	Determinação Espectrofotométrica do Azul de Evans.....	26
3.4	AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA.....	26
3.4.1	Análise de Regressão Linear e Correlação.....	26
3.4.2	Análise de Variância.....	27
3.4.3	Cálculo de Média e Desvio Padrão.....	27
4	RESULTADOS.....	29
5	DISCUSSÃO.....	36
5.1	GRUPO I.....	36
5.2	GRUPO II.....	38
5.3	GRUPO III.....	39
6	CONCLUSÕES.....	44
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 DEMONSTRATIVO DE NÚMEROS DE ANIMAIS,

	PERÍODO DE COLETA DE AMOSTRAS E NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS NO GRUPO I.....	20
TABELA 2	RELAÇÃO ENTRE A TREPANAÇÃO CENTRAL DA CÓRNEA, NÚMERO DE ANIMAIS ESTUDADOS E NÚMERO DE AMOSTRAS DO TECIDO COLETADAS NO GRUPO II.....	21
TABELA 3	DEMONSTRATIVO DO NÚMERO DE ANIMAIS E DO NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS EM RELAÇÃO AO OLHO ANALISADO NO GRUPO III.....	22
TABELA 4	CURVA PADRÃO DO AZUL DE EVANS.....	26
TABELA 5	VALORES DAS CONCENTRAÇÕES DE AZUL DE EVANS EM $\mu\text{g}/\text{mg}$ DE TECIDO CORNEANO NOS PERÍODOS DE TEMPO (GRUPO I)	30
TABELA 6	CONCENTRAÇÃO DO AZUL DE EVANS ($\mu\text{g}/\text{mg}$) EM FRAGMENTOS CORNEANOS (GRUPO II).....	32
TABELA 7	CONCENTRAÇÕES DO AZUL DE EVANS ($\mu\text{g}/\text{mg}$) NAS AMOSTRAS CORNEANAS DO GRUPO III.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

Coeficiente de correlação	r
desvio padrão	DP
grama	g
graus Celsius	°C
hidróxido de sódio	NaOH
kilograma	kg
limites de variação	L
marca registrada	r
média	M
micrograma	ug
microlitro	ul
miligrama	mg
mililitro	ml
milímetro	mm
nanômetro	nm
normal	N
número	n
olho direito	OD
olho esquerdo	OE
rotações por minuto	rpm

RESUMO

Introdução: o azul de Evans constitui-se num corante inócuo que tem alta afinidade pela albumina e pode ser mensurado espectrofotometricamente como demonstram vários estudos. **Objetivos:** a) Constatar a presença do azul de Evans na córnea normal estipulando o período de tempo de concentração máxima do corante após inoculação endovenosa; b) Verificar o mecanismo de difusão do corante no tecido; c) Mensurar a exsudação do azul de Evans em processo inflamatório após indução de queimadura química corneana com NaOH. **Material e métodos:** Utilizou-se 50 coelhos albinos machos que foram divididos em 3 grupos: Grupo I: composto de 25 animais e que inoculou-se via endovenosa 20 mg/Kg de azul de Evans e sacrificou-se os animais em 8, 10, 12, 14 e 16 horas após injeção do corante. A partir de então extraiu-se o tecido corneano margeado por 1 mm de esclera e quantificou-se o corante através do micrométodo espectrofotométrico. Grupo II: Em 15 animais inoculou-se o corante via endovenosa e posteriormente fragmentou-se centralmente o tecido com trépanos de 6, 8 e 10 mm e procedeu-se a extração do azul de Evans da mesma forma que no grupo I. Grupo III: induziu-se queimadura na córnea do olho direito de 10 animais com NaOH a 1 N. Cinco dias após o procedimento, os animais foram sacrificados, sendo que, 10 horas antes do sacrifício, foi inoculado o azul de Evans para que posteriormente se pudesse quantificá-lo. A córnea esquerda serviu como controle. **Resultados:** no grupo I, as médias das concentrações do azul de Evans foram: 8 h.: 14,68 µg/mg; 10 h.: 15,30 µg/mg; 12 h.: 15,02 µg/mg; 14 h.: 14,09 µg/mg; 16 h.: 14,85 µg/mg. No grupo II, as médias das concentrações do corante foram: 6 mm.: 0,93 µg/g; 8 mm.: 1,19 µg/mg; 10 mm.: 1,35 µg/mg. No grupo III, as médias das concentrações do azul de Evans foram: olho direito (queimadura): 23,74 µg/mg e olho esquerdo (controle): 16,71 µg/mg. **Discussão e Conclusão:** O azul de Evans tem sido motivo de estudo em diversos órgãos e em diferentes animais. Foi possível quantificar pela primeira vez o corante na córnea de coelhos e constatar que, após 10 horas de inoculação endovenosa, o azul de Evans atingiu seu pico de concentração no tecido. As concentrações do corante decresceram a medida que se atingia porções mais centrais da córnea como foi demonstrado no grupo II, revelando um padrão de distribuição centrípeta do corante no tecido estudado. Comprovou-se que o aumento da permeabilidade vascular, induzida pela queimadura química na córnea, está diretamente ligada ao extravazamento do corante ao tecido, aumentando significativamente ($p < 0,001$) sua concentração em relação à córnea normal. Portanto, o azul de Evans serve como um bom método de quantificação da permeabilidade vascular alterada na córnea, especialmente na vigência de processo inflamatório.

ABSTRACT

Introduction: The Evans blue is an innocuous colouring which has high affinity for albumin and it has been measured as many studies have shown. The aims of this study is to find the Evans blue in normal cornea, showing how the coloring diffuse in cornea and determine the concentrations of Evans blue in an inflammatory reaction in cornea after alkali burns with NaOH. **Material and Methods:** Fifty albino male rabbits were divided in three groups. Group I: the Evans blue solution was injected in the left ear vein of 25 animals which were sacrificed after 8, 10, 12, 14 and 16 hours (5 animals in each subgroup) after inoculation. Then, the corneas samples were extracted with 1 mm. of esclera and the concentration of Evans blue were determined. Group II: after 10 hours of Evans blue inoculation in 15 animals, the corneas samples were centrally fragmented in 6, 8 and 10 mm. and the Evans blue was quantified. Group III: after 5 days of alkali burns in right corneas of 10 animals, they were sacrificed. 10 hours before this fact, the Evans blue had been inoculated. As the same as other groups, the Evans blue was measured. **Results:** In group I, the Evans blue average concentrations are: 8 h.: 14,68 µg/mg; 10 h.: 15,30 µg/mg; 12 h.: 15,02 µg/mg; 14 h.: 14,09 µg/mg; 16 h.: 14,85 µg/mg. In group II, the Evans blue average concentrations are: 6 mm.: 0,93 µg/mg; 8 mm.: 1,19 µg/mg; 10 mm.: 1,35 µg/mg. In group III, the Evans blue average concentrations are: right eyes (alkali burns): 23,74 µg/mg and left eyes (control): 16,71 µg/mg. **Discussion and Conclusion:** The Evans blue has been demonstrated in many tissues and in different animals. It was possible to observe, at the first time, the Evans blue present in rabbit's cornea. The higher concentration of Evans blue in cornea was found after 10 hours of inoculation. The Evans blue concentrations were decreasing in central cornea fragments comparing to limb. The rates of Evans blue were significantly higher in alkali burns corneas ($p < 0,001$) comparing to normal corneas of the same animal. This results obtained allowed to conclude that it was possible to evaluate the vascular permeability changes with Evans blue, during the induced inflammatory reaction in the rabbits' corneas.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Desde 1943, com os primeiros estudos de RAWSON, o azul de Evans foi amplamente utilizado em diversos trabalhos experimentais. Este corante apresenta algumas características como inocuidade (LINDERKAMP, MADER, BUTENANDT e RIEGEL, 1977; WOODS, SMITH e GRAHAM, 1988), alta solubilidade em água e afinidade pela albumina (RAWSON, 1943; LEVEEN e FISHMAN, 1947; FREEDMAN e JOHNSON, 1969).

O azul de Evans, quando inoculado via endovenosa, combina-se com a albumina de maneira reversível e dependente de pH (LEVEEN e FISHMAN, 1947). Estudos demonstraram que, após 40 horas da administração endovenosa do azul de Evans, 90% do corante já havia deixado a circulação, atingindo diversos tecidos do organismo. Depois de 24 horas de inoculação endovenosa, 30% do corante pôde ser encontrado na pele, 13% nos músculos, 12% no fígado e 9% nos ossos, constatando-se que o azul de Evans poderia ser quantificado em diversos tecidos (CASTER, SIMON e ARMSTRONG, 1955; CLAUSEN e LIFSON, 1956).

A inflamação aguda provoca alterações no fluxo vascular, no calibre dos vasos e na permeabilidade vascular. O exsudato desta alteração da permeabilidade vascular contém mais proteínas plasmáticas do que em situação normal (GUYTON, 1976). O azul de Evans se combina à albumina plasmática formando um complexo corante-albumina que extravasa através da barreira endotelial lesada (STEELE e WILHELM, 1966).

Autores revelaram que, ao promover-se uma reação inflamatória, o aumento do exsudato plasmático para um tecido lesado eleva as taxas de azul de Evans neste tecido (BACCARO, MARIANO e MALUCELLI, 1990; BERNAUER, 1980; BORDÓN DE CORBANLÁN, 1994; HAJAR, 1994;

OBATA, KOBAYASHI, OKADA, NAKAGAWA, TERAWAKI e AISHITA, 1992; UKADA, TAKEUCHI e MOVAT, 1970; WOODS, SMITH e GRAHAM, 1988).

Existem técnicas de mensuração da permeabilidade vascular em tecidos como dosagem de catabólitos do ácido araquidônico (SIMONS, SALMON e MONCADA, 1983; SHARON e STENSON, 1985; VILLASECA, SALAS, GUARNER, RODRIGUEZ e MALAGELADA, 1990), quantificação do conteúdo aquoso, mensuração do escape de albumina marcado com iodo radioativo e marcação vascular com carbono coloidal (ROBBINS, COTRAN e KUMAR, 1991; COTRAN, SUTER e MAJNO, 1967). Há outros corantes, além do azul de Evans, que se ligam à albumina, como o azul Celeste de Niágara, o azul Celeste de Pontamina 6BX e o azul de Tripan (STEELE e WILHELM, 1966; UKADA, TAKEUCHI e MOVAT, 1970; REIS, OKINO, ROCHA e SILVA, 1971; LUNDBERG e SARIA, 1982 e 1983; SARIA, LUNDBERG, SKOFITSH e LEMBECK, 1983; RINKEMA, BEMIS e FLEISH, 1984; SZABO, BROWN, TRIER e SCHNOOR, 1985; SZABO, PIHAN e TRIER, 1986; WOODS, SMITH e GRAHAM, 1988; ROGERS, BELVISI, AURSUDKIJ, EVANS e BARNES, 1988; ROGERS, BOSCHETTO e BARNES, 1989; MCMAHON, LEWIN, ANAND, GHATEI e BLOOM, 1989; LOUIS, JAMIESON, RUSSELL e DOCKRAY, 1989; FINCK, MASHBURN, KOTTKE e ORSZULAK, 1989; BACCARO, MARIANO e MALUCELLI, 1990; NISHIKAWA, IKEDA, FUKUDA, SUZUKI e OKUBO, 1990; HAAS, NAKANISHI, MACMILLAN, JORDAN e HU, 1992; OBATA, KOBAYASHI, OKADA, NAKAGAWA, TERAWAKI e AISHITA, 1992; BROKAW e WHITE, 1992; BORDÓN DE CORBALÁN, 1994; HAJAR, 1994). O azul de Evans consiste no corante capaz de ser mensurável através de espectrofotometria (BORDÓN DE CORBALÁN, 1994 e HAJAR, 1994).

Há vários modelos experimentais de inflamação aguda induzida na córnea. A queimadura química por álcali produz dano severo ao olho com edema importante, desepitelização e neovascularização (BROWN, 1969; GEGGEL, THOFT e FRIEND, 1984; JOHNSON-WINT, 1987; MC CULLEY, 1987; PATTERSON, PFISTER e

LEVINSON, 1975; SHAPIRO, FRIEND e THOFT, 1981; WAGONER, 1997).

Reações inflamatórias induzidas pelo ácido acético a 10% em intestino correlacionam-se com incremento da permeabilidade vascular quantificado pelo azul de Evans. As determinações das concentrações do corante foram realizadas pelo micrométodo espectrofotométrico (HAJAR, 1994).

Revisando-se a literatura, encontrou-se relatos de avaliação do fluxo transcapilar evidenciado através do azul de Evans em diversos tecidos, tais como pele, coração e cólon (GREEN, JOHNSON, MARCHESSAUT e GATTO, 1988; BORDÓN DE CORBALÁN, 1994; HAJAR; 1994). Não há relatos desta metodologia no tecido corneano.

1.1 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo são:

- Verificar o padrão de normalidade das concentrações do azul de Evans na córnea de coelhos.
- Determinar o mecanismo de difusão do corante nos tecidos corneanos.
- Estudar a permeabilidade vascular em modelo animal induzido por queimadura química corneana.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ANATOMIA DA CÓRNEA HUMANA

SPENCER em 1996 relata que a córnea forma o sexto anterior da circunferência da camada externa do olho. No seu bordo há uma zona transicional conhecida como limbo onde o estroma da córnea une-se à esclera. Seu epitélio encontra progressivamente o epitélio conjuntival e seu endotélio é contínuo com o endotélio trabecular. As lamelas estromais da córnea transparente e da esclera opaca juntam-se posteriormente no estroma médio, formando uma junção difícil de separar, pois está obscurecida pelo tecido episcleral e conjuntiva. Removendo-se os tecidos, a junção é visível como uma zona semi-opaca e azulada. Esta zona é mais larga inferior e superiormente do que nos meridianos horizontais, fato que confere à córnea um aparente aspecto elíptico.

Segundo estudos de YANOFF & FINE em 1996, a córnea de uma pessoa adulta tem um diâmetro médio de 10,5 mm. no sentido vertical e 11,5 mm. horizontalmente. As superfícies anterior e posterior são paralelas uma à outra nos 4 mm. centrais, chamada zona óptica, onde a córnea apresenta uma espessura média de 0,52 mm. Existe um aplanamento da curvatura corneana perifericamente aumentando a espessura do tecido para uma média de 0,65 mm.

2.2 HISTOLOGIA DA CÓRNEA HUMANA

Em seus estudos anátomo-histológicos, MCLEAN, BURNIER, ZIMMERMAN, et al., no ano de 1994, descreveram que o epitélio é composto de cinco a seis camadas de células de epitélio escamoso estratificado. Na periferia, o número de camadas pode aumentar para oito a dez. A junção entre as células epiteliais e sua

membrana basal, assim como a adesão desta à camada de Bowman dependem de interações bioquímicas e estruturais. A membrana basal é composta de colágeno tipo IV, proteoglicans

(heparan sulfato), fibronectina, fibrinogênio, laminina (glicoproteína que liga a membrana basal às células epiteliais) e superfícies celulares.

Hemidesmossomos e filamentos finos podem ser observados na união da membrana basal às células basais. Segundo SPENCER em 1996, estas células tem o maior poder mitótico entre todas as camadas da córnea. Acima da camada basal existe aproximadamente três camadas de células poliédricas que estão firmemente aderidas entre si. A camada mais externa é composta de células largas e achatadas que possuem microvilosidades e microplicas.

MCLEAN, BURNIER, ZIMMERMAN, et al, em 1994 também estudaram a camada de Bowman que consiste em uma estrutura de aproximadamente 10 nm, avascular, situada abaixo da membrana basal do epitélio. Ela representa uma modificação do estroma anterior e compõe-se de fibras colágenas e uma base de substância muco-proteica. Há poros nesta camada que dão passagem a ramos terminais da inervação corneana.

Formado por fibras colágenas e células (ceratócitos), o estroma representa 90% da espessura da córnea. As lamelas das fibras colágenas dispõem-se paralelamente entre si e são entremeadas pelos ceratócitos. Também encontram-se fibroblastos entre o colágeno conforme escrevem YANOFF & FINE, em 1998. O mesmo autor descreveu a membrana de Descemet como sendo composta de filamentos semelhantes ao colágeno entremeados com substância básica interfilamentar. A membrana de Descemet consiste em uma membrana basal secretada pelas células endoteliais.

Originário da crista neural, o endotélio é composto de uma única camada de células situadas internamente à membrana de Descemet. Raramente as células sofrem mitose conforme relatado por SPENCER, em 1996.

2.3 ANATOMIA E FISIOLOGIA DO LIMBO HUMANO

A região de transição entre córnea e esclera chama-se de limbo.

Apresenta algumas características próprias como a ausência de células caliciformes e as elevações fibrovasculares radiais (paliçadas de Vogt). O epitélio contém 10 a 12 camadas de células além de melanócitos e células de Langherans. Vasos sanguíneos são observados nesta região e nas paliçadas de Vogt há uma densidade elevada de células basais precursoras de epitélio corneano segundo DAVANGER & EVANSON, em 1971 e DUA, GOMES e SINGH, em 1994.

As células epiteliais corneanas renovam-se rapidamente e continuamente para manter a estrutura estratificada do epitélio. THOFT & FRIEND (1983) propuseram a teoria XYZ, que seria um equilíbrio entre o movimento centrípeto das células epiteliais, o movimento das células basais em direção às células superficiais e a taxa de descamação da superfície corneana.

ZIESKE, no ano de 1994 descreve haver uma considerável diferença entre o limbo e a área central. A mais importante delas é a presença de vasos sanguíneos no limbo. Esses vasos ajudam a formar a paliçada de Vogt, permitindo uma estreita aproximação dos vasos ao epitélio limbar. Os numerosos canais arteriais do limbo são provenientes dos vasos conjuntivais e das artérias ciliares anteriores, bem como canais venosos da região do corpo ciliar (veias ciliares anteriores). A função principal é nutrir a conjuntiva, episclera e a esclera na região do canal de Schlemm. Estes vasos, conforme descrito por YANOFF & FINE, em 1998, também nutrem o estroma corneano periférico. Em estados patológicos, servem como fonte de neovascularização subepitelial e estromal.

2.4 ANATOMIA E HISTOLOGIA DA CÓRNEA DO COELHO

PRINCE, DIESEN, EGLITIS, et al. (1960) e YANOFF & FINE (1998) descrevem que o olho do coelho tem 16 a 19 mm de comprimento e que a córnea e a esclera têm praticamente a mesma curvatura, o que faz com que o sulco córneo-escleral seja pouco marcante. O epitélio apresenta uma camada de células basais e três a cinco camadas de células poliédricas e escamosas superficiais. Segundo HIRST, KENYON, FOGLE et al (1981) não há camada de Bowman compacta na córnea do coelho.

2.5 QUEIMADURAS QUÍMICAS

BROWN em 1969 demonstrou que há inflamação e vascularização (com emergência de novos vasos) severa na córnea após queimadura por álcali.

PATERSON, PFISTER e LEVINSON (1975) revelam haver sinais de penetração na câmara anterior após o acidente com hidróxido de sódio e que estes podem ser percebidos 3 a 5 minutos depois da queimadura.

A queimadura da córnea implica em graves complicações como defeitos epiteliais persistentes, úlceras tróficas,

SHAPIRO, FRIEND e THOFT, em 1981, e HUANG & TSENG, em 1991, afirmam, que, em queimaduras extensas, o epitélio conjuntival representa a única fonte de regeneração epitelial, causando processo de "conjuntivalização" da superfície corneana.

JOHNSON-WINT (1987) revelou que o epitélio em regeneração pode estimular a atividade de colagenases. Após a reepitelização, o epitélio recupera sua função inibitória comum.

WAGONER (1997) relata que as queimaduras químicas podem produzir severo dano ao olho e conseqüentemente à visão. Pode ocorrer lesão da superfície epitelial corneana, do estroma, do endotélio da córnea e do próprio segmento anterior como íris, cristalino e corpo ciliar. Os agentes químicos que mais causam queimadura ocular são: amônia, cal, soda cáustica e hidróxido de potássio. Todos estes álcalis penetram imediatamente no olho, podendo produzir sérios danos ao segmento anterior.

Segundo MC CULLEY, em 1987, a severidade da lesão depende da superfície da área afetada e do grau de penetração no globo ocular. O ânion hidróxido (OH) \angle saponifica os ácidos gordurosos das membranas celulares, com resultante rotura e morte celular e o cátion é responsável pela penetração do álcali específico. Cátions reagem com os grupos carboxílicos (COOH) do colágeno estromal e dos glicosaminoglicans e a hidratação destes resulta em perda da transparência do estroma. WAGONER (1997) ainda relata que a hidratação das fibrilas colágenas provoca espessamento e encurtamento destas, o que distorce o trabeculado escleral, predispondo a liberação de prostaglandinas que acabam por aumentar a pressão intra-ocular imediatamente após a queimadura química.

Clinicamente está bem estabelecido que, após uma queimadura química, o crescimento de epitélio conjuntival na superfície corneana está associado com retardo de epitelização, neovascularização superficial e profunda, persistência de células calciformes e erosões epiteliais recorrentes devido a uma adesão epitelial anormal da membrana basal conforme WAGONER estudou em 1997.

2.6 PERMEABILIDADE VASCULAR E INFLAMAÇÃO

ROBBINS, CONTRAN e KUMAR, em 1991, descrevem que a inflamação foi considerada como doença até 1794, quando estudou-se que as alterações teciduais eram uma resposta inespecífica causada por todas as formas de lesão, sendo tanto proposital como benéfica por natureza.

São quatro os sinais de inflamação descritos por Cornelius Celsus: o calor, o rubor, o tumor e a dor. Virchow acrescentou um quinto sinal, a perda de função, conforme citado por WILHELM (1982). O calor local e o rubor resultam do aumento da microcirculação em torno da área lesada. O tumor é caracterizado pelo edema produzido pelo escape de líquido, proteína e células do plasma, dos vasos sanguíneos para os tecidos perivasculares. VANE (1976) estudou que a dor pode ser induzida por prostaglandinas quando há liberação simultânea de bradicinina ou serotonina, ou quando há aumento da tensão tissular devido ao edema.

As manifestações locais da inflamação aguda mostram três componentes da resposta inflamatória: alterações no fluxo vascular e no calibre dos vasos, alterações da permeabilidade vascular e exsudação leucocitária, conforme citado por GUYTON em HAJAR (1994).

O endotélio dos capilares e a porção proximal das vênulas formam uma membrana semipermeável que permite a livre passagem de pequenas moléculas e água, mas que não permite normalmente a passagem de proteínas plasmáticas. De acordo com a teoria de STARLING, citado por GUYTON em 1977, o equilíbrio dos fluídos através de uma barreira endotelial é mantido pela pressão oncótica das proteínas plasmáticas. Ocorre na inflamação, nítido movimento dos fluídos para dentro dos tecidos, que tem sido estimado como sendo cinco a sete vezes maior do que num vaso normal. O exsudato fluído de inflamação contém caracteristicamente 1 a 6 g de proteínas plasmáticas por 100 ml.

Os fatores que podem estar envolvidos na formação do exsudato são: aumento na pressão hidrostática, aumento do fluxo sanguíneo através da rede local e alterações na permeabilidade da parede vascular. Este último fator parece ser resultante de uma mediação bioquímica, conforme citado por GUYTON em HAJAR (1994).

2.7 AZUL DE EVANS

RAWSON, em 1943; LEVEEN e FISHMAN, em 1947 e FREEDMAN e JOHNSON, em 1969, estudaram o corante azul de Evans. O corante, conhecido também como T-1824, é um sal orgânico, diazo-tetrassódico, com peso molecular de 960,8, utilizado em numerosas investigações clínicas, devido a sua inocuidade e alta afinidade pela albumina plasmática.

Desde os estudos de RAWSON em 1943 que a combinação corante-albumina foi demonstrada. O T-1824, o azul celeste Niágara, o azul celeste 6B e o azul de Tripan ligam-se à albumina quando presentes em baixas concentrações. Quando há saturação, o autor evidenciou que o corante ligava-se às globulinas.

Inicialmente, o azul de Evans, após inoculação endovenosa, distribui-se de forma correspondente ao volume plasmático. O declínio nas primeiras horas é o resultado da difusão para os tecidos através do fluxo transcáпилar, conforme citado por NOBLE, GREGERSEN, PORTER e BUCKMAN, em 1946 e GREEN, JOHNSON, MARCHESSAUT e GATTO, em 1988.

LEVEEN e FISHMAN em 1947 realizaram estudo das taxas de desaparecimento do corante na circulação em humanos, durante o período de 24 horas. Os resultados revelaram que a média de saída do corante da circulação era de 46%. O autor então demonstrou que a quantidade do corante em que a albumina se liga varia com o pH numa reação reversível. Nas condições de estudo com pH de 2,5 a quantidade de moléculas de corante por molécula de albumina era de 70:1. Em outra

fase do experimento demonstrou que uma solução contendo albumina e corante na proporção de 7:29 e passando por uma resina que aceita somente íons livres, foi removido 50% do corante, concluindo-se que ocorreu dissociação do complexo albumina-corante e transferência deste para a resina. Esta seria a explicação do aparecimento do corante nos tecidos e secreções, além de explicar o mecanismo de desaparecimento do corante da circulação sem estar acompanhado da albumina.

O azul de Evans forma um complexo estável com as proteínas plasmáticas. Quando é injetado na circulação sanguínea em baixas concentrações, combina-se preferencialmente com a albumina, e quando esta concentração se eleva, a albumina plasmática é saturada e o corante passa também a ligar-se às globulinas plasmáticas, selecionando primeiramente as alfa globulinas. Após injetados 20 mg do azul de Evans intravenosamente em ratos de 200 g., não são encontradas quantidades mensuráveis do corante livre no sangue circulante como constataram SELLERS, GRIGGS, MARMORSTON e GOODMAN, em 1954. O seu deslocamento da circulação é influenciado pela quantidade que as proteínas tissulares são capazes de fixar.

CASTER, SIMON E ARMSTRONG, em 1955, determinaram o volume plasmático nos tecidos de ratos albinos que dependia da quantificação simultânea do azul de Evans em plasma e tecidos aos 5 minutos de inoculação endovenosa do corante. Elaboraram-se curvas de tempo-concentração do corante para diversos tecidos, observando que existiam diferenças entre as curvas. A interpretação da forma da curva plasmática que seria a soma de todos os eventos em cada tecido pode ser separada em três fases: uma fase de rápido desaparecimento necessário para a distribuição de todo o corante no sistema vascular, com aproximadamente 11 ml de plasma. Outra fase de mistura, necessária para a distribuição do corante no leito capilar tecidual e por último a fase de transferência do corante que continua por várias horas e até dias, que diferem em ritmo para os diferentes tecidos. Após injeção endovenosa de 20 mg de azul de Evans, em 24 horas, 16% pode ser encontrado no plasma, 30% na

pele, 13% no músculo, 12% no fígado e 9% nos ossos. Pouca quantidade foi encontrada nas fezes e nada encontrou-se na urina.

CLAUSEN E LIFSON em 1956, propuseram a determinação do azul de Evans no sangue e nos tecidos. Homogeneizaram o tecido em solução concentrada de uréia, desligaram o corante da albumina, precipitaram parcialmente com acetona e depois completamente com adição de reagentes Somogy. O método foi utilizado para seguir a direção do corante após a injeção intravenosa de 12,5 mg de azul de Evans em ratos. Após 40 horas desta administração, observaram que 90% do corante injetado deixou a circulação, mas somente 15% não pôde ser recuperado do organismo. 67% do corante poderia ser recuperado do organismo, depois de 140 horas do estudo. Os autores concluíram que o método servia para quantificar o azul de Evans nos tecidos.

UKADA, TAKEUCHI e MOVAT, em 1970, quantificaram o aumento da permeabilidade capilar, em coelhos, ratos e cobaias albinas, que receberam azul de Evans por via intravenosa. Posteriormente foram induzidas várias lesões inflamatórias na pele. Os fragmentos do tecido foram removidos, cortados e colocados em formamida. A quantidade do corante extravasado dos tecidos pôde ser extraído com formamida e calculado quantitativamente por colorimetria. O trabalho constatou que lesões inflamatórias têm sua permeabilidade vascular aumentada evidenciada pelo azul de Evans.

BERNAUER (1980) avaliou fatores que incrementam os níveis de acumulação do complexo corante-albumina nos tecidos. Mediadores químicos da inflamação e injúrias com lesão vascular direta são exemplos que aumentam o fluxo transcapilar. Portanto a avaliação desses fenômenos torna-se útil para análise dos intercâmbios transcapilares em circunstâncias de permeabilidade microvascular alterada. A quantidade de albumina que flui normalmente para os tecidos não é significativa, mas o extravasamento é importante em vigência de alteração da permeabilidade capilar.

Em 1982, LUNDBERG e SARIA estudaram o envolvimento dos neurônios sensoriais vagais no controle da permeabilidade vascular da mucosa da traquéia de ratos. 20 mg/kg de azul de Evans foram injetados endovenosamente 5 minutos antes do estímulo vagal. Após injeção, o animal era irrigado com solução fisiológica e então sacrificado. Retirava-se 1 cm de segmento da traquéia, pesava-se e colocava-se em formamida. O azul de Evans extraído com a formamida era lido espectrofotometricamente. Animais controle foram estudados com igual metodologia, porém sem receber estímulo vagal. Nos animais estimulados, o conteúdo do corante era maior indicando um aumento da permeabilidade vascular. A estimulação elétrica do nervo vago alterou a cor da traquéia de branco para azul intenso. Em 1983, os mesmos autores estudaram o efeito da fumaça do cigarro, irritação mecânica, irritação química e o estímulo vagal sobre a mucosa da traquéia e brônquios de ratos Sprague-Dawley, concluindo que esses estímulos induziram edema subepitelial indicado pelo extravasamento do azul de Evans.

WOODS, SMITH e GRAHAM, em 1988, estudaram o aumento da mensuração do azul de Evans como indicador de lesão aguda da mucosa gástrica produzida pela aspirina. Os níveis de azul de Evans no conteúdo gástrico e no plasma foram medidos espectrofotometricamente. Os autores concluíram que a mensuração do azul de Evans no conteúdo gástrico ofereceria índice precoce qualitativo e possivelmente quantitativo da injúria da mucosa gástrica.

GREEN, JOHNSON, MARCHESSAULT e GATTO, em 1988, estudaram, em cobaias normais e cobaias submetidas a doses sistêmicas de histamina e endotoxina, a permeabilidade microvascular e a distribuição histológica do azul de Evans. O corante foi injetado por via endovenosa e as amostras foram coletadas em diferentes períodos de tempo. Os animais submetidos a ação da histamina e endotoxina receberam a administração destas substâncias 1 hora antes da inoculação do azul de Evans. O corante foi extraído dos tecidos e o extlidoespectrofotometricamente. Foi demonstrado que o declínio das concentrações plasmáticas era o resultado da

acumulação do corante nos compartimentos teciduais. Observaram aumento deste declínio depois da utilização da endotoxina e histamina, devido ao incremento da permeabilidade vascular provocado por estas substâncias.

Em 1990, BACCARO, MARIANO e MALUCELLI, realizaram experimentos em ratos Wistar produzindo lesões com nistatina e BCG injetando após, plasma não ativado e inibindo os fenômenos com antiinflamatório não esteróide. As alterações na permeabilidade vascular foram mensuradas pelos níveis de azul de Evans teciduais.

O extravasamento microvascular é uma característica primária da inflamação induzida com antígenos que levam à exsudação plasmática nas vias aéreas. OBATA, KOBAYASHI, OKADA, NAKAGAWA, TERAWAKI e AISHITA, em 1992, destacaram a ação dos leucotrienos no estreitamento brônquico e nos vasos endoteliais. Quando inibiram os leucotrienos, houve diminuição do extravasamento protéico produzido pela ação agressora do antígeno sobre os vasos. A concentração do azul de Evans aumentou quando havia lesão vascular no tecido pulmonar estudado.

Segundo BORDÓN DE CORBALÁN, em 1994, vários estudos clínicos e experimentais, evidenciaram sua utilidade na determinação do volume plasmático, ressaltando a vantagem sobre outros marcadores protéicos por não ser radioativo, ter alta solubilidade em água e ser mensurável através de espectrofotometria. A autora estandarizou um micrométodo espectrofotométrico para quantificar o azul de Evans em micrograma por miligrama de tecido. A autora evidenciou o fluxo transcapilar do corante ao tecido colônico de ratos Wistar.

Em HAJAR (1994) foi citado que na avaliação da permeabilidade vascular dos tecidos, podem ser utilizadas algumas técnicas como: quantificação do conteúdo aquoso, mensuração do escape de albumina marcada com iodo radioativo, marcação vascular com carbono coloidal (MAJNO e PALADE, 1961 citados por ROBBINS, COTRAN e KUMAR, 1991; COTRAN, SUTER e MAJNO, 1967) e avaliação do extravasamento de corantes injetados por via endovenosa, como o azul de Evans (T-1824), azul Celeste de Pontamina 6BX e azul de Tripán (STEELE e WILHELM, 1966; UKADA, TAKEUCHI e MOVAT, 1970; REIS, OKINO, ROCHA e SILVA, 1971; LUNDBERG e SARIA, 1982 e 1983; SARIA,

LUNDBERG, SKOFITSH e LEMBECK, 1983; RINKEMA, BEMIS e FLEISH, 1984; SZABO, BROWN, TRIER e SCHNOOR, 1985; SZABO, PIHAN e TRIER, 1986; WOODS, SMITH e GRAHAM, 1988; ROGERS, BELVISI, AURSUDKIJ, EVANS e BARNES, 1988; ROGERS, BOSCHETTO e BARNES, 1989; MCMAHON, LEWIN, ANAND, GHATEI e BLOOM, 1989; LOUIS, JAMIESON, RUSSELL e DOCKRAY, 1989; FINCK, MASHBURN, KOTTKE e ORSZULAK, 1989; BACCARO, MARIANO e MALUCELLI, 1990; NISHIKAWA, IKEDA, FUKUDA, SUZUKI e OKUBO, 1990; HAAS, NAKANISHI, MACMILLAN, JORDAN e HU, 1992; OBATA, KOBAYASHI, OKADA, NAKAGAWA, TERAWAKI e AISHITA, 1992; BROKAW e WHITE, 1992; BORDÓN DE CORBALÁN, 1994). O autor utilizou o azul de Evans para avaliar a permeabilidade vascular em ratos Wistar que foram submetidos à colite induzida por ácido acético a 10%.

3 MATERIAL E MÉTODO

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente estudo foi realizado no laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade Evangélica do Paraná.

Adotaram-se as Normas de Apresentação de Trabalhos da Universidade Federal do Paraná (1992), normas para referências bibliográficas de títulos e periódicos da Associação Brasileira de Normas Técnicas (NBR-6023) (1989), Nomina Anatômica Veterinária (1983) bem como os Princípios Éticos na Experimentação Animal propostas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (1994).

3.2 AMOSTRA

Foram utilizados 50 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) albinos machos de aproximadamente 1500 g provenientes do Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR.

Os animais foram colocados em alojamentos apropriados e divididos em três grupos que receberam água e ração específica para a espécie.

3.2.1 Preparo da Amostra

3.2.1.1 Procedimento anestésico

O procedimento anestésico foi realizado para inoculação do corante e para o sacrifício de todos os animais do experimento. Utilizou-se um funil de plástico com algodão embebido em éter sulfúrico. O funil era então colocado no coelho até o relaxamento muscular e anestesia do mesmo. Somente no grupo III foi utilizado anestesia tópica previamente à queimadura com Cloridrato de proximetacaína 0,5%.

3.2.1.2 Grupo I

Primeiramente 25 animais foram utilizados para a determinação do período de tempo ideal no qual houvesse concentração máxima do corante na córnea. Nesta etapa inicial, sacrificaram-se cinco animais a partir das primeiras oito horas após inoculação do azul de Evans para coleta de dez córneas. Dez amostras corneanas foram obtidas após 10 horas da inoculação. Da mesma forma, conduziu-se à coleta dos tecidos após 12, 14 e 16 horas pós-injeção do corante. Para coleta das amostras, retirou-se a córnea com 1 mm. de margem escleral.

TABELA I – DEMONSTRATIVO DO NÚMERO DE ANIMAIS, PERÍODO DE COLETA DE AMOSTRAS E NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS DO GRUPO I

PERÍODO	NÚMEROS DE ANIMAIS (COELHOS)	NÚMEROS DE AMOSTRAS COLETADAS
08 horas	05	10
10 horas	05	10
12 horas	05	10
14 horas	05	10
16 horas	05	10
TOTAL	25	50

3.2.1.3 Grupo II

Na segunda etapa do trabalho, 15 animais foram subdivididos em três subgrupos de 5 animais (10 amostras de tecido corneano) para verificação do mecanismo de difusão do corante na córnea normal. Dez horas após inoculação do corante azul de Evans houve o sacrifício dos animais e coleta dos tecidos corneanos com 1 mm de margem escleral. Posteriormente estes foram submetidos a uma trepanação. No primeiro subgrupo a trepanação atingiu somente os 6 mm centrais da córnea. No segundo subgrupo procedeu-se a trepanação de 8 mm do diâmetro da córnea. No terceiro subgrupo atingiu-se os 10 mm de trepanação do tecido ocular.

Os trépanos usados foram os mesmos para todos os animais, manuseados por um mesmo cirurgião e tendo-se o cuidado de trepanar-se a porção central da córnea.

TABELA 2 - RELAÇÃO ENTRE TREPANAÇÃO CENTRAL DA CÓRNEA, NÚMERO DE ANIMAIS ESTUDADOS E NÚMERO DE AMOSTRAS DO TECIDO COLETADAS NO GRUPO II

MILÍMETROS CENTRAIS DA CÓRNEA TREPANADA	NÚMEROS DE ANIMAIS ESTUDADOS	NÚMEROS DE AMOSTRAS COLETADAS
06mm	05	10
08mm	05	10
10mm	05	10
TOTAL	15	30

3.2.1.4 Grupo III

Na última etapa da pesquisa, submeteu-se 10 animais à queimadura corneana do olho direito com hidróxido de sódio a 1 N (NaOH). O olho esquerdo manteve-se como controle. O material absorvente (papel filtro) de 15 mm de diâmetro foi embebido por 20 segundos em solução de hidróxido de sódio a 1 N e aplicado sobre a córnea direita durante 45 segundos. Os animais ficaram num alojamento apropriado por 5 dias para que então houvesse o sacrifício. Dez horas antes deste procedimento foi inoculado o azul de Evans. Obteve-se então vinte amostras dos dez animais componentes deste grupo.

TABELA 3 - DEMOSTRATIVO DO NÚMERO DE ANIMAIS E DO NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS EM RELAÇÃO AO OLHO ANALISADO NO GRUPO III

OLHO DO ANIMAL ESTUDADO	NÚMERO DE ANIMAIS ESTUDADOS	NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS
Olho direito (queimadura)	10	10
Olho esquerdo (controle)	10	10
TOTAL	20	20

FIGURA 1 – CÔNEA APÓS 5 DIAS DE QUEIMADURA POR NaOH



3.3 ORGANIZAÇÃO DO MÉTODO

3.3.1 Preparo das Soluções e Reagentes

3.3.1.1 Solução do azul de Evans

Foi preparada uma solução de azul de Evans a 2,5% (p/v), MERCK® artigo 3169, em solução fisiológica, num volume suficiente para todo o experimento. A solução resultante apresentava 20 mg/ml., sendo filtrada em membrana esterilizante de 0,22 µ., MILLIPORE®, e conservada em temperatura de 4°C.

3.3.1.2 Formamida

Utilizou-se Formamida, MERCK® artigo 9684.1000 para extração do azul de Evans das amostras corneanas.

3.3.2 Injeção do Azul de Evans

Inoculou-se o azul de Evans em todos os animais dos grupos I, II e III. Os coelhos, sob ação anestésica do éter inalatório, foram submetidos à injeção de azul de Evans na dose de 20 mg/Kg de peso, segundo o método usado por BORDÓN DE CORBALÁN em 1994. A inoculação foi realizada com agulha 13x4,5 mm. na veia marginal da orelha esquerda.

FIGURA 2 - DEMOSTRAÇÃO DA INJEÇÃO ENDOVENOSA DO AZUL DE EVANS EM VEIA MARGINAL DA ORELHA DIREITA



3.3.3 Sacrifício

Nos animais do grupo I, o sacrifício ocorreu 8, 10, 12, 14 e 16 horas após injeção do corante. Nos demais grupos, o sacrifício e coleta das amostras respeitou as 10 horas pós-inoculação.

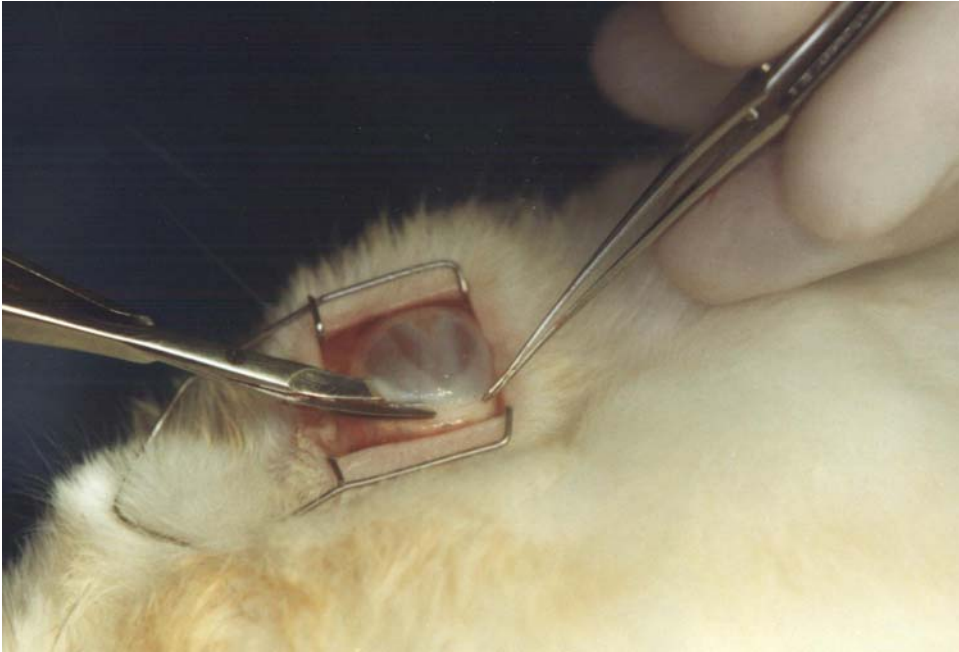
Após anestesia inalatória com éter sulfúrico, todos os animais foram sacrificados com injeção letal endovenosa de 20 ml. de ar, inoculado via veia marginal da orelha direita.

3.3.4 Coleta das Amostras

Após colocação de um blefarostato, procedeu-se a peritomia 360° da conjuntiva. A seguir, as córneas foram retiradas, tendo-se o cuidado de retirar 1 mm de margem escleral em todos os animais. No grupo II, após retirada das córneas, as mesmas foram fragmentadas centralmente com trépanos de 6, 8 e 10 mm.

FIGURA 3 – RETIRADA DA CÓRNEA COM 1 mm DE MARGEM ESCLERAL

PARA POSTERIOR QUANTIFICAÇÃO DO AZUL DE EVANS



3.3.5 Extração do Corante

Após a retirada da córnea margeada por 1 mm de esclera, a amostra foi pesada em balança eletrônica HELMAC® e imersa em Formamida Merck art 9684.1000 na proporção de 4 ml/g. Esta solução foi deixada por 24 horas a 22 °C. Após os tubos foram agitados mecanicamente, por 15 segundos em agitador PHOENIX® modelo AT 56. Finalmente, o corante extraído pela formamida foi conservado à temperatura constante de -20 C° para posterior leitura espectrofotométrica.

Este procedimento foi realizado igualmente nos três grupos.

3.3.6 Determinação Espectrofotométrica do Azul de Evans nos Extratos Corneanos

Das amostras de formamida com o corante azul de Evans, extraído do tecido corneano, colocou-se 150 µl. de cada amostra, com auxílio de uma pipeta automática GILSON®, em cada orifício da placa de Terazaki CORNING® e realizou-se aferição espectrofotométrica em leitor de ELISA (BIOTEK) com filtro de 650 nm. de comprimento de onda. Foi utilizada solução de formamida como branco para o teste.

As leituras foram interpoladas por regressão linear em uma curva padrão do corante (tabela II). As concentrações das amostras foram calculadas em microgramas por mililitro e microgramas por miligrama de tecido corneano. Da mesma forma, esta determinação foi realizada igualmente em todos os grupos.

TABELA 4- CURVA PADRÃO DO AZUL DE EVANS

DENSIDADE ÓPTICA	CONCENTRAÇÃO (ug/ml)
0,290	16,66
0,214	12,50
0,180	10,00
0,132	8,33
0,093	7,14
0,078	6,25
0,033	5,55
0,027	5,00
r=0,098435	

3.4 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

3.4.1 Análise de Regressão Linear e Correlação

Para a validação dos resultados espectrofotométricos das amostras corneanas frente às respectivas curvas padrões de calibração, empregou-se

análise de correlação para obtenção dos coeficientes de correlação (r) (BOX, HUNTER e HUNTER, 1978).

.4.2 Análise de Variância

Os resultados das aferições do azul de Evans corneano foram submetidos ao *Tukey-kramer Multiple Comparisons Test* onde o valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

3.4.3 Cálculo de Média e Desvio Padrão

Realizados através de calculadora Casio® F705-PX.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

A concentração do azul de Evans na córnea dos animais do grupo I foi maior às 10 horas pós-inoculação do corante com média de 15,28 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido. Neste período de tempo o limite superior de concentração do azul de Evans foi de 15,48 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido enquanto o limite inferior foi de 15,12 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido, como demonstrado na tabela V.

A média da concentração do azul de Evans às 8 horas foi de 15,28 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido, seu limite superior foi de 15,48 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido e o inferior de 13,52 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido.

A concentração média às 12 horas pós-inoculação foi de 14,92 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido. Às 14 e 16 horas depois da injeção endovenosa a média encontrada correspondeu a 13,36 $\mu\text{g}/\text{mg}$ e 14,76 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido respectivamente.

Os resultados estão expostos nos gráficos a seguir mencionados:

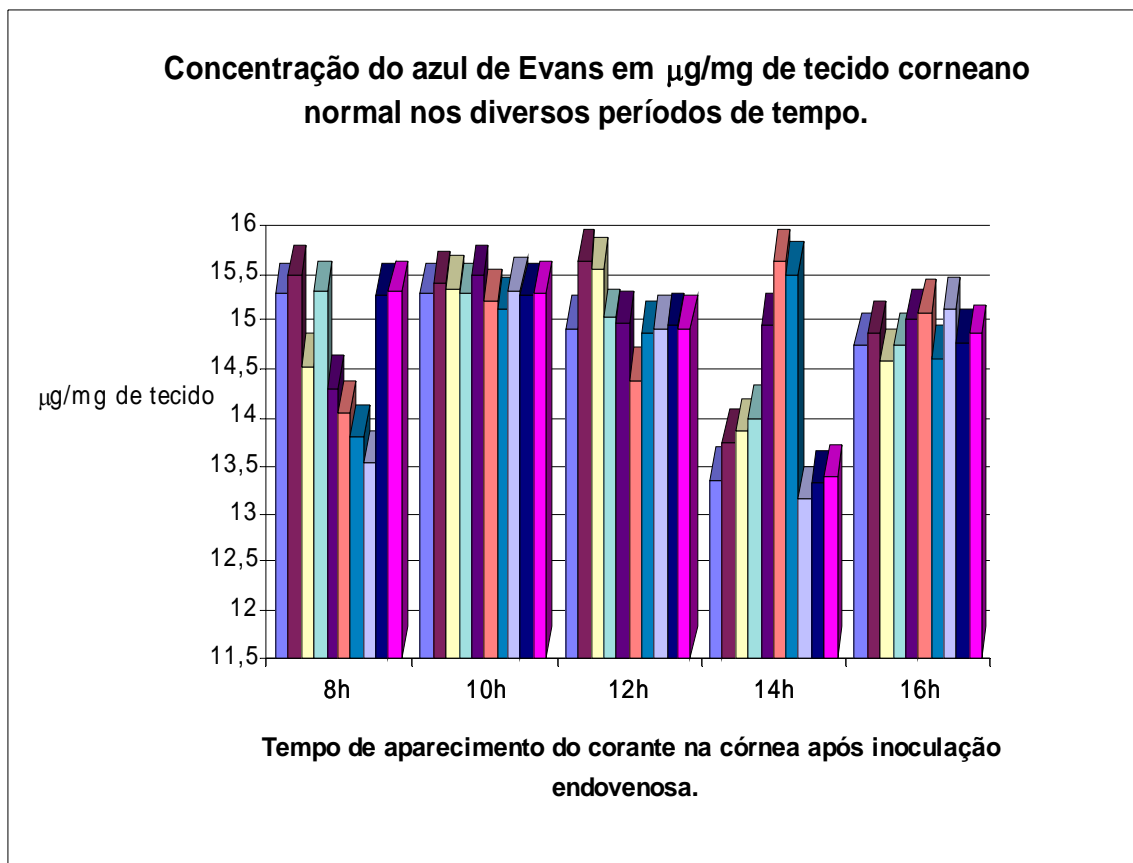


Gráfico I demonstrando as concentrações do corante em todas as córneas dos animais do grupo I após 8, 10, 12, 14 e 16 horas.

TABELA 5 - VALORES DAS CONCENTRAÇÕES DE AZUL DE EVANS EM $\mu\text{g}/\text{mg}$ DE
TECIDO CORNEANO NOS PERÍODOS DE TEMPO (GRUPO I)

Amostras	8h	10h	12h	14h	16h
1	15,28	15,28	14,92	13,36	14,76
2	22,12	15,04	15,64	13,76	14,88
3	14,54	15,36	15,55	13,87	14,06
4	15,31	15,28	15,03	14,00	14,77
5	14,32	15,48	14,98	14,96	15,01
6	14,05	15,21	14,04	15,64	15,01
7	13,08	15,12	14,87	15,49	14,63
8	13,52	15,33	14,92	13,16	15,12
9	15,27	15,26	14,97	13,33	14,78
10	15,31	15,03	14,93	13,39	14,86
M	15,28	15,28	14,92	13,36	14,76
+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -
DP	0,73	0,09	0,35	0,92	0,18

$L = M \pm (1,96 \times DP/\sqrt{n})$ onde:

L= Limites da variação, M= Média aritmética dos valores individuais, DP= desvio padrão, n= número de amostras

$p > 0,05$

Nos animais do grupo II, encontrou-se maior concentração do corante nos 10 mm. centrais da córnea com média de $1,32 \mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido. Nos 6 mm e 8 mm centrais da córnea a concentração média do azul de Evans correspondeu a $0,93 \mu\text{g}/\text{mg}$ e $1,20 \mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido respectivamente (tabela VI).

O gráfico 2 e a tabela 6 a seguir mostram os resultados do grupo II

GRÁFICO 2 – RESULTADO DAS CONCENTRAÇÕES MÉDIAS COM DESVIO PADRÃO DE AZUL DE EVNAS (EM ug / mg) NAS CÓRNEAS DOS ANIMAIS DO GRUPO II

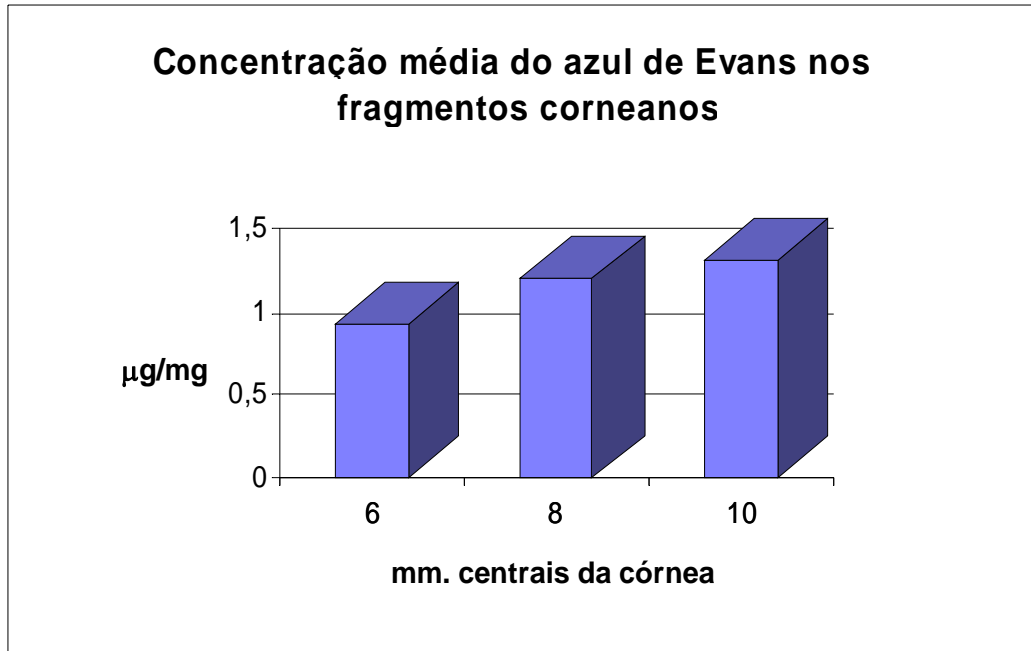


Tabela VI: Valores obtidos nas quantificações de azul de Evans ($\mu\text{g}/\text{mg}$) em fragmentos corneanos no grupo II.

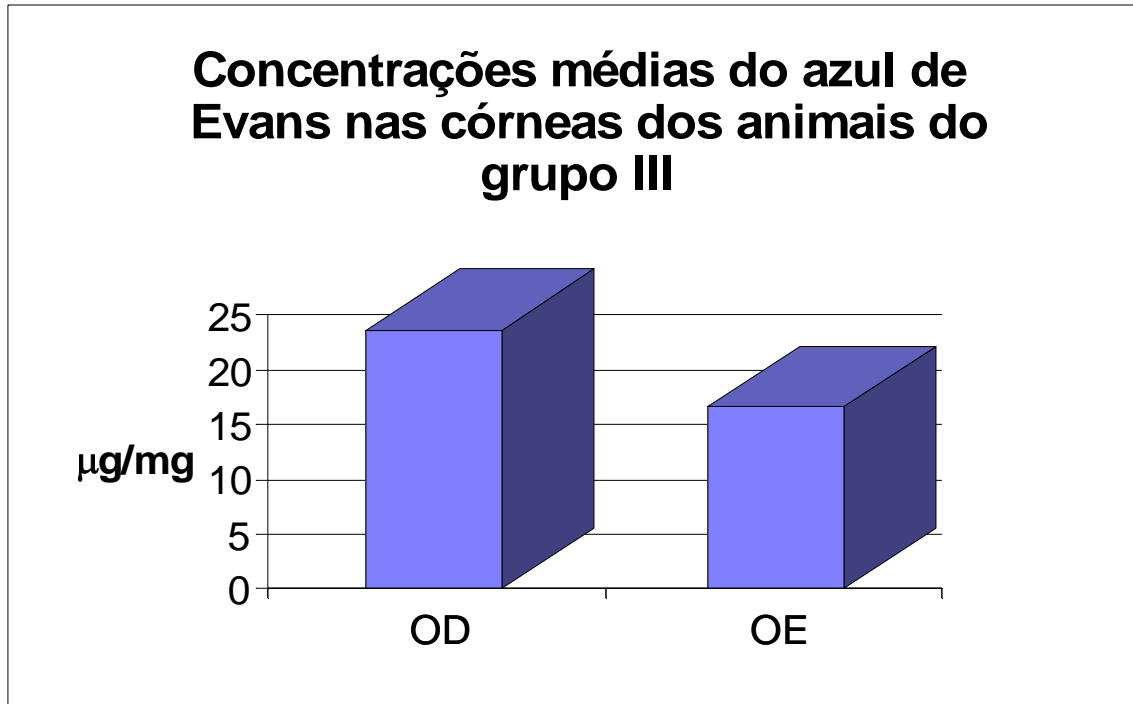
Concentração em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de azul de Evans nos respectivos milímetros centrais da córnea trepanada			
Amostras	6mm.	8mm.	10mm.
1	0,95	1,25	1,29
2	0,93	1,22	1,38
3	0,92	1,1	1,34
4	0,95	1,27	1,24
5	0,92	1,16	1,41
6	0,93	1,11	1,4
7	0,92	1,15	1,39
8	0,92	1,26	1,35
9	0,95	1,18	1,41
10	0,93	1,21	1,29

DP = Desvio Padrão M= Média

$p > 0,05$

Nas córneas dos olhos do lado direito dos animais do grupo III, as quais foram submetidas à queimadura química, houve elevada concentração do azul de Evans com média de $23,74 \mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido. Nas córneas dos olhos contralaterais dos mesmos animais (olho controle) a concentração do corante atingiu a média de $16,71 \mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido (tabela VII).

DESVIO PADRÃO DE AZUL DE EVANS (EM $\mu\text{g}/\text{mg}$) NAS
CÓRNEAS DO GRUPO III



OD = Olho direito / queimadura

OE = Olho esquerdo / controle

5 DISCUSSÃO

5.1 GRUPO I

Existem técnicas de avaliação da permeabilidade vascular nos tecidos. Pode-se citar, por exemplo, a quantificação do conteúdo aquoso, a mensuração do escape de albumina marcado com iodo radioativo, a marcação vascular com carbono coloidal e a inoculação de corantes via endovenosa que se ligam à albumina (10, 39).

Estudos de avaliação da permeabilidade vascular utilizando-se a combinação corante – albumina tem sido relatados desde RAWSON em 1943. O azul celeste de Pontamina 6 BX, ao azul de Tripán 1824 são exemplos desta combinação (BACCARO etc al... 1990, BORDON DE CORVALAN, 1994, BROKAW E WHITE 1992, FINK 1989, HAAS 1994, LOUIS 1989 LUNNDBERG E SARIA 1983, MCMAHON 1989, NISCHIKAVA 1990, OBATA 1992, REIS 1971, RINKEMA 1984, ROGERS 1988, ROGERS 1989, SARIA 1983, STEELE E WILHELM 1966, SZABO 1985, UKADA 1970, WOODS 1988. O azul de Evans tem sido útil na determinação do volume plasmático, sendo demonstrado em inúmeros trabalhos clínicos e experimentais (BORDON DE CORVALAN 1994)

O corante apresenta vantagens sobre outros marcadores protéicos, principalmente por não ser radioativo, ter alta solubilidade em água e ser mensurável através de espectrofotometria (BORDON DE CORVALAN, 1994, FREEDMAN E JOHNSON 1969, LEVEEN E FISHMAN, 1947, RAWSON 1943. Estes aspectos, além do baixo custo e fácil aplicabilidade, foram importantes na escolha do azul de Evans para ser utilizado na avaliação da permeabilidade vascular deste experimento. Existem pesquisas na Faculdade Evangélica do Paraná e na

Universidade Federal do Paraná sobre a utilização deste corante em outros órgãos (3, 19)

Em 1994 foi estandardizado um micrométodo espectrofotométrico para quantificar o azul de Evans em $\mu\text{g/g}$ de tecido (3, 19). Este micrométodo foi igualmente realizado para mensuração do corante neste trabalho.

O azul de Evans constitui-se num corante que se liga a albumina e distribui-se de forma correspondente ao volume plasmático quando injetado diretamente na veia (16, 32). Quando há elevada concentração do azul de Evans no sangue, o corante pode-se ligar às globulinas, especialmente as alfa globulinas (43).

Ao ser inoculado via endovenosa, o corante primeiramente distribui-se no sistema vascular. Posteriormente, o azul de Evans passa para o leito capilar tecidual para finalmente atingir a fase de transferência que pode durar de horas a dias e difere nos vários tecidos. A fase de transferência é o resultado da passagem do corante do leito capilar aos diversos tecidos do organismo. Assim, após 24 horas de inoculação endovenosa de 20 mg de azul de Evans, o corante ainda pode ser encontrado em 16% no plasma, 30% na pele, 13% no músculo, 12% no fígado e 9% nos ossos (8). Em 1994 estipulou-se em 8 horas como sendo o período de tempo, após inoculação endovenosa de azul de Evans em ratos, de concentração máxima do corante em cólon (3). Na córnea, a concentração não havia sido quantificada.

O estudo propôs, através dos animais do grupo I, mensurar espectrofotometricamente o azul de Evans na córnea e encontrar o período de tempo de maior concentração deste corante no tecido. Quantificou-se o azul de Evans a partir das primeiras 8 horas após inoculação endovenosa do corante. Repetiu-se o procedimento a cada 2 horas até as 16 horas pós-inoculação. Constatou-se que, em todos estes horários estudados (8h., 10h., 12h., 14h., 16h.), pode-se encontrar e mensurar o corante no tecido. Após 10 horas de injeção do corante relatou-se uma concentração mínima de $15,12 \mu\text{g/mg}$ e máxima de $15,48 \mu\text{g/mg}$ de tConcluiu-se que neste período de tempo houve uma maior concentração do corante (média de $15,30 \mu\text{g/mg}$) no tecido corneano. A média de concentração após o horas de inoculação do corante foi semelhante a média de 10 horas, porém o desvio padrão foi maior no primeiro período de tempo. Portanto, considerou-se o período de 10 horas após inoculação endovenosa como sendo o período de tempo de maior tingimento do azul de Evans na córnea

As diferenças das médias das concentrações do corante no grupo I não foram estatisticamente significativas entre os horários estudados ($p > 0,05$)

5.2 GRUPO II

A córnea consiste num tecido avascular que tem sua nutrição baseada principalmente nos vasos sanguíneos do limbo, humor aquoso e lágrimas (61). Há uma considerável diferença entre a córnea periférica, próxima ao limbo, e a área central. A mais importante é a presença de vasos no limbo nutrindo o estroma corneano periférico (60). As paliçadas de Vogt (elevações fibrovasculares radiais) permitem o aporte sanguíneo bem próximo ao estroma corneano periférico (11). No grupo II desta pesquisa, comprovou-se a distribuição centrípeta do azul de Evans na córnea. Os valores encontrados nos fragmentos trepanados contendo os 6 mm centrais da córnea foram menores que aqueles encontrados nos fragmentos corneanos com 8 mm de diâmetro da córnea central. Da mesma forma, as concentrações em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de azul de Evans mensuradas nos 8 mm centrais da córnea foram menores do que aquelas encontradas nos 10 mm centrais do tecido. A diferença entre os subgrupos deste grupo II não demonstrou ser estatisticamente significativa ($p > 0,05$). No entanto, quando compara-se a concentração do azul de Evans nos animais controle do grupo III, onde houve retirada da córnea margeada de 1 mm. de esclera, com qualquer um dos subgrupos do grupo II (córneas trepanadas) observa-se diferença estatística ($p < 0,001$). Isto demonstra que a proximidade do estroma corneano com os vasos do limbo está diretamente ligada a maior concentração do corante e provável acúmulo de proteínas plasmáticas no local. Quanto mais longe dos vasos limbares, ou seja, quanto mais próximo ao eixo central da córnea, menor a concentração do corante no tecido.

Portanto, a maior concentração do corante situa-se em extrema periferia corneana, junto aos vasos limbares. Esse fato confirma a importância dos vasos limbares e que estes estão diretamente relacionados com a concentração do azul de Evans.

5.3 GRUPO III

A queimadura corneana por álcali produz sérias lesões na estrutura ocular. Além do epitélio corneano, o álcali penetra no estroma, atinge o endotélio e chega a estruturas do segmento anterior do olho como íris, cristalino e corpo ciliar. Os agentes alcalinos que mais promovem dano ocular são: amônia, cal, soda cáustica e hidróxido de potássio (57).

Optou-se pela queimadura corneana com soda cáustica a 1 N devido ao fato deste modelo de trauma apresentar-se como causador de dano severo às estruturas oculares principalmente incitando uma rápida resposta inflamatória na córnea e limbo (57).

O hidróxido de sódio (NaOH) promove defeito epitelial persistente, úlcera trófica, neovascularização, necrose e até perfuração corneana (52). Inicialmente o ânion hidróxido (OH) saponifica os ácidos gordurosos das membranas celulares resultando na morte da célula. Os cátions reagem com os grupos carboxílicos (COOH) do colágeno estromal e dos glicosaminoglicanos e a hidratação destes leva a perda da transparência da córnea (27). Três a cinco minutos após a queimadura, o NaOH pode penetrar na câmara anterior do olho (34).

Imediatamente após a queimadura com hidróxido de sódio, observou-se edema importante e perda da transparência do tecido corneano. A córnea persistiu desepitelizada e o edema constante até o quinto dia após o procedimento da queimadura.

O epitélio conjuntival representa a fonte de células para a regeneração epitelial formando um processo de “conjuntivalização” da superfície corneana (44). Com a perda grande de células germinativas ocorre o *pannus* superficial para suprir a isquemia tecidual (14).

Ao quinto dia pós-queimadura, antes do sacrifício dos animais, as córneas dos olhos direitos já apresentavam processo de neovascularização superficial periférica com delgados vasos sanguíneos provenientes da região limbar.

A inflamação possui sinais característicos de calor, rubor, tumor, dor e perda da função. O calor e o rubor são resultado do aumento da microcirculação em torno da área lesada. Proteínas, células do plasma e líquido extravasado dos vasos sanguíneos ao tecido extravascular identificam o edema no processo inflamatório (58).

Quando há queimadura corneana imediatamente instala-se o edema e a hiperemia conjuntival pericorneana, como o observado no experimento.

A injúria tissular aguda causa alterações no fluxo vascular, no calibre dos vasos, na permeabilidade vascular e na exsudação leucocitária (17). A queimadura induzida neste estudo teve por objetivo causar o processo inflamatório agudo para que as alterações da permeabilidade vascular pudessem ser melhor avaliadas.

Em condições fisiológicas, não há passagem de proteínas plasmáticas dos capilares ao espaço intersticial. No entanto, na inflamação, ocorre esta passagem estimando-se como sendo de cinco a sete vezes maior do que num vaso normal (17). Esta exsudação das proteínas causou, após injúria provocada nas córneas dos animais do grupo III, o edema persistente do tecido. Provavelmente, este edema foi mantido pelo aumento da permeabilidade vascular dos vasos perilímbicos. Neste trabalho optou-se pela retirada de tecido corneano margeado por um milímetro de tecido escleral em função da presença de capilares limbares que estão envolvidos nas alterações exsudativas relacionadas a traumas, infecções e reações inflamatórias.

Portanto, a formação do exsudato é causada pelo aumento da pressão hidrostática, pelo aumento do fluxo sanguíneo e pelas alterações na permeabilidade da parede vascular (17). O incremento desta mudança no padrão vascular pôde ser mensurada nesta pesquisa devido ao complexo que formou-se entre o azul de Evans e a albumina.

A quantificação do fluxo transcapilar tecidual tem valor na avaliação da exsudação plasmática em vigência de reações inflamatórias, traumas ou infecções,

pois são estas, causas incontestáveis de aumento da permeabilidade capilar.

A revisão da literatura não oferece um método quantitativo para aferir alterações da permeabilidade capilar senão, quando em reações inflamatórias, com a dosagem de catabólitos do ácido araquidônico (45, 46, 56) sendo que para esta finalidade requer-se considerável implementação laboratorial. Este método estandarizado nos animais do grupo I determina os valores de referência e o momento máximo do fluxo transcapilar do corante azul de Evans nas córneas. Poderá ser utilizado em outros modelos experimentais correlacionados, aos moldes de outros autores (3, 19).

O azul de Evans foi quantificado em diversos estudos para avaliação da permeabilidade vascular alterada. Após lesões inflamatórias de pele em coelhos, pelo método de colorimetria, autores constataram aumento da concentração do corante nestas lesões devido ao aumento da exsudação de proteínas plasmáticas (54). Mediadores químicos da inflamação e injúrias com lesão vascular direta são exemplos que aumentam o fluxo transcapilar. A quantidade de albumina que extravasa aos tecidos não é significativa em situações fisiológicas, mas o extravasamento é importante devido a alteração da permeabilidade capilar (2, 3, 17, 19). Devido a este fato, o azul de Evans, combinado com a albumina, sofre deslocamento do espaço intravascular em direção ao extravascular e deposita-se no interstício do tecido, como constatou-se nesta pesquisa.

Autores revelam que a alteração da permeabilidade capilar pode ser de origem neurogênica, por exemplo, após estímulo vagal (25). Também pode ocorrer após doses sistêmicas de histamina e endotoxina demonstrando a origem hormonal da alteração vascular (13). Além destas experiências, a literatura ainda relata pesquisas com nistatina, BCG e leucotrienos (1, 33).

Em todas, utilizou-se o azul de Evans para avaliar o processo de aumento da permeabilidade vascular.

Neste estudo, as córneas queimadas dos animais do grupo III demonstraram uma média de 23,74 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de azul de Evans no tecido enquanto as córneas controle do mesmo grupo apresentaram média de 16,71 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Este dado revela uma concentração do corante nas córneas que sofreram injúria tissular significativamente maior do que as córneas controle do olho contralateral ($p < 0,001$). Comparando-se os valores quantificados nas córneas controle do grupo III com os valores do grupo I (10 horas) observa-se que não há diferença significativa entre as mesmas ($p > 0,05$).

Observou-se, através da mensuração quantitativa do corante azul de Evans, que a córnea, ao ser submetida a processo inflamatório, sofre exsudação importante dos vasos perilímbicos.

Ressalta-se a importância de novos estudos com o azul de Evans na córnea principalmente para avaliação de processo inflamatório e quantificação do mesmo.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Verificou-se que o padrão de normalidade da concentração do azul de Evans na córnea foi de dez horas após inoculação endovenosa em coelhos.

Determinou-se que as concentrações do azul de Evans são maiores em região limbar do que no centro da córnea de coelhos, resultando em distribuição centrípeta do corante.

As concentrações do azul de Evans teciduais, quantificadas pelo micrométodo espectrofotométrico, avaliaram o aumento da permeabilidade vascular causadas pelas queimaduras químicas nas córneas de coelhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) BACCARO, M. R.; MARIANO, M.; MALUCELLI, B. E. *Chronically inflamed tissue activates plasma mediators of vascular permeability. Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, São Paulo, v. 23, p. 179-185, 1990.

- 2) BERNAUER, W. *Effects of glucocorticosteroids in rats with acute myocardial infarction. Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, Ghent, v. 244, p. 86-99, 1980.

- 3) BORDÓN DE CORBALÁN, A. C. **Aplicação do micrométodo espectrofotométrico para a determinação de azul de Evans em plasma e tecido colônico de ratos Wistar.** Curitiba, 1994. Tese (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

- 4) BROKAW, J. J.; WHITE, G. W. *Calcitonin gene-related peptide potentiates substance P-induced plasma extravasation in the rat trachea. Lung*, New York, v. 170, p.85-95, 1992.

- 5) BROWN, S. I. et al. *Alkali burns of the cornea. Arch. Ophthalmol.*, Chicago, v.82, p.91-94, 1969.

- 6) BURNS, F. R. et al. *Inhibition of purified collagenase from alkali-burned rabbit corneas. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, Brookline, v. 30/7, p. 1569-1575, 1989.

- 7) CARVALHO, J. C.; *Transplante autógeno de conjuntiva no tratamento de queimaduras oculares graves. Arq. Bras. Oftal.*, São Paulo, v. 53, p. 167-170, 1994.

- 8) CASTER, W. O.; SIMON, A. B.; ARMSTRONG, W.D. *Evans blue in tissues of the rat. American Journal of Physiology*, Bethesda, v. 183, p. 317-321, 1955.

- 9) CLAUSEN, D. F.; LIFSON, N. *Determinations of Evans blue dye in blood and tissues. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, Baltimore, v. 91, p.11-14, 1956.

- 10) CONTRAN, R. S.; SUTER, E. R.; MAJNO, G. *The use of colloidal carbon as a tracer for vascular injury. Vascular Diseases*, Baltimore, v. 4, p.107-110, 1967.
- 11) DUA, H. S.; GOMES, J. A. P.; SINGH, A. *Corneal epithelial wound healing. Br. J. Ophthalmol.*, London, v. 78, p. 401-408, 1994.

- 12) FINK, S. J.; MASHBURN, J. P.; KOTTKE, B. A.; ORSZULAK, T. A. *Evaluation of arterialized vein graft permeability with Evans blue dye and iodine 125-labeled albumin. Annals of Thoracic Surgery*, New York, v. 48, p.646-650, 1989.
- 13) FREEDMAN, F. B.; JOHNSON, J. *Equilibrium and kinetic properties of the Evans blue-albumin system. American Journal of Physiology*, Bethesda, v. 16, p.675-681, 1969.
- 14) GEGGEL, H. S.; THOFT, R. A.; FRIEND, J. *Histology of human conjunctival transplantation. Cornea*, New York, v. 3, p. 11-15, 1984.
- 15) GRAYSON, M. **Enfermidades de la Cornea**, 2. ed., Bogotá, Editora Médica Panamericana: 1985.
- 16) GREEN, T. P.; JOHNSON, D. E.; MARCHESSAULT, R. P.; GATTO, C. W. *Transvascular flux and tissue accrual of Evans blue: effects of endotoxin and histamine. Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, Saint Louis, v. 111, p.173-183, 1988.
- 17) GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica**, 5. ed., Rio de Janeiro, Interamericana: 1976.
- 18) HAAS, D. A.; NAKANISHI, O.; MACMILLAN, R. E.; JORDAN, R. C., HU, J. W. *Development of na orofacial model of acute inflammation in the rat. Archives of Oral Biology*, Oxford, v. 37, p. 417-422, 1992.
- 19) HAJAR, N. **O uso do azul de Evans para avaliar a permeabilidade vascular na colite induzida com ácido acético a 10% em ratos Wistar**. Curitiba, 1994. Tese (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- 20) HIRST, I. W.; KENYON, K. R.; FOGLE, J. A. et al. *Comparative studies of corneal surface injury in the monkey and rabbit. Arch. Ophthalmol.*, Chicago, v. 99, p. 1066-1073, 1981.
- 21) JOHNSON-WINT, B. *Autocrine regulation of collagenase production by passaged corneal stromal cells in vivo. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, Brookline, v. 28 (Suppl), p. 230, 1987.
- 22) LEVEEN, H. H.; FISHMAN, W. H. *Combination of Evans blue with plasma protein: its significance in capillary permeability studies, blood dye disappearance curves, and its use as a protein tag. American Journal of Physiology*, Bethesda, v. 26, p.26-33, 1947.

- 23) LINDERKAMP, O.; MADER, T.; BUTENANDT, O.; RIEGEL, K. P. *Plasma volume estimation in severely ill infants and children using a simplified Evans blue method. European Journal of Pediatrics*, Berlin, v. 125, p.135-141, 1977.
- 24) LOUIS, S. M.; JAMIESON, A.; RUSSEL, N. J. W.; DOCKRAY, G. J. *The role of substance P and calcitonin gene-related peptide in neurogenic plasma extravasation and vasodilatation in the rat. Neuroscience*, Oxford, v. 32, p.581-586, 1989.
- 25) LUNDBERG, J. M.; SARIA, A. *Capsaicin-sensitive vagal neurons involved in control of vascular permeability in rat trachea. Acta Physiologica Scandinavica*, Oxford, v. 115, p. 521-523, 1982.
- 26) LUNDBERG, J. M.; SARIA A. *Capsaicin-induced desensitization of airway mucosa to cigarette smoke, mechanical and chemical irritants. Nature*, London, v. 302, p.251-253, 1983.
- 27) MC CULLEY, J. P. **The Cornea: Scientific Foundation and Clinical Practise**, 2. ed., Boston, Little, Brown and Co.: 1987.
- 28) MCLEAN, I. W. BURNIER, M. N.; ZIMMERMAN, L. E.; JAKOBIEC, F. A. **Tumors of the eye and ocular adnexa**, 3. ed., Washington, D.C., Armed Forces Institute of Pathology, Inc.: 1994.
- 29) MCMAHON, S. B.; LEWIN, G. R.; ANAND, P.; GHATEL, M. A.; BLOOM, S. R. *Quantitative analysis of peptide levels and neurogenic extravasation following regeneration of afferents to appropriate and inappropriate targets. Neuroscience*, Oxford, v. 33, p. 67-73, 1989.
- 30) MOREIRA, H. *Treatment of experimental Pseudomonas keratitis with cicloxygenase and lipooxygenase inhibitors. Ophthalmol.*, Philadelphia, v. 98, p.1693-1697, 1991.
- 31) NISHIKAWA, M. IKEDA, H.; FUKUDA, T.; SUZUKI, S.; OKUBO, T. *Acute exposure to cigarette smoke induces airway hyperresponsiveness without airway inflammation in Guinea pigs. Respiratory Disease*, Golnik, v. 142, p. 177-183, 1990.
- 32) NOBLE, R. P.; GREGERSEN, M. I.; PORTER, P. M.; BUCKMAN, A. *Blood volume in clinical shock. I. Mixing time and disappearance rate of T-1824 in normal subjects and in patients in shock; determination of plasma volume in man from 10 minute sample. Journal of Clinical Investigation*, New York, v. 25, p. 158-171, 1946.
- 33) OBATA, T.; KOBAYASHI, T.; OKADA, Y.; NAKAGAWA, N.; TERAWAKI, T.; AISHITA, H. *Effect of a peptide leukotriene antagonist Ono-1078 on antigen-induced airway microvascular leakage in actively sensitized Guinea pigs. Life Sciences*, Oxford, v. 51, p. 1577-1583, 1992.

- 34) PATTERSON, C. A.; PFISTER, R. R.; LEVINSON, R. A. *Aqueous humor pH changes after alkali burns*. **Am. J. Ophthalmol.**, Chicago, v. 79, p. 414-419, 1975.
- 35) PRINCE, J. H.; DIESEN, C. D.; EGLITIS, I. **Anatomy and Histology of the eye and Orbit in Domestic Animals**, 1. ed., Springfield, Charles Thomas Publisher: 1960.
- 36) RAWSON, R. A. *The binding of T-1824 and structurally related diazo dyes by the plasma proteins*. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v.138, p. 708-717, 1943.
- 37) REIS, M. L.; OKINO, L.; ROCHA E SILVA, M. *Comparative pharmacological actions of bradikinin and related kinins of larger molecular weights*. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 20, p. 2935-2946, 1971.
- 38) RINKEMA, L. E.; BEMIS, K. G.; FLEISCH, J. H. *Production and antagonism of cutaneous vascular permeability in the Guinea pig in response to histamine, leukotrienes and A23187*. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 230, p.550-557, 1984.
- 39) ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Patologia estrutural e funcional**, 4. Ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan: 1991.
- 40) ROGERS, D. F.; BELVISI, M. G.; AURSUDKIJ, B.; EVANS, T. W.; BARNES, P. J. *Effects and interactions of sensory neuropeptides on airway microvascular leakage in Guinea pigs*. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 95, p. 1109-1116, 1988.
- 41) ROGERS, D. F.; BOSCHETTO, P.; BARNES, P. J. *Plasma exudation. Correlation between Evans blue dye and radiolabeled albumin in Guinea pigs airway in vivo*. **Journal of Pharmacological Methods**, New York, v. 21, p. 309-315, 1989.
- 42) SARIA, A.; LUNDEBERG, J. M.; SKOFITSCH, G.; LEMBECK, F. *Vascular protein linkage in various tissues induced by substance P, capsaicin, bradykinin, serotonin, histamine and by antigen challenge*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, Berlin, v. 324, p. 212-218, 1983.
- 43) SELLERS, A. L.; GRIGGS, N.; MARMORSTON, J.; GOODMAN, H. A. *Filtration and reabsorption of protein by the kidney*. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 100, p. 1-9, 1954.
- 44) SHAPIRO, M. S.; FRIEND, J.; THOFT, R. A. *Corneal re-epithelization from the conjunctiva*. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, Brookline, v. 21, p.135-142, 1981.
- 45) SHARON, P.; STENSON, W. F.; *Metabolism of arachidonic acid in acetic acid colitis in rats*. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 88, p.55-63, 1985.

- 46) SIMONS, P. M.; SALMON, J. A.; MONCADA, S. *The release of leukotriene B4 during experimental inflammation*. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 32, p. 1353-1359, 1983.
- 47) SPENCER, W. H. **Ophthalmic Pathology: An Atlas and Textbook**, 4. ed., Philadelphia, W.B. Saunders: 1996.
- 48) STEELE, R. H.; WILHELM, D. L. *The inflammatory reaction in chemical injury. Increased vascular permeability and erythema induced by various chemicals*. **British Journal of Experimental Pathology**, London, v. 47, p. 612-623, 1966.
- 49) SZABO, S.; BROWN, A.; TRIER, J. S.; SCHNOOR, J. *Early vascular injury and increase vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat*. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 88, p. 228-236, 1985.
- 50) SZABO, S.; PIHAN, G.; TRIER, J. S. *Alterations in blood vessels during gastric injury and protection*. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, Oslo, v. 21, (suppl 125), p.92-99, 1986.
- 51) THOFT, R. A. *Conjunctival transplantation*. **Arch. Ophthalmol.**, Chicago, v. 95, p. 1425-1427, 1977
- 52) THOFT, R. A.; FRIEND, J. *The X, Y, Z, hypothesis of corneal epithelial maintenance*. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, Brookline, v. 24, p. 1442-1443, 1983.
- 53) TSENG, S. C. *Concept and application of limbal stem cells*. **Eye**, London, v. 3, p. 141-157, 1989.
- 54) UKADA, K.; TAKEUCHI, Y.; MOVAT, H. Z. *Simple method for quantitation of enhanced vascular permeability*. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Baltimore, v. 133, p. 1384-1387, 1970.
- 55) VANE, J. R. **Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research**, New York, v. 2, Raven Press, p. 791-806, 1976.
- 56) VILASECA, J.; SALAS, A. ; GUARNER, F.; RODRIGUEZ, R.; MALAGELADA, J. R. *Participation of thromboxane and other eicosanoid synthesis in the course of experimental inflammatory colitis*. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 98, p.269-277, 1990.
- 57) WAGONER, M. D. *Chemical injuries of the eye: Current concepts in pathophysiology and therapy*. **Surv. Ophthalmol.**, Amsterdam, v. 41, p. 275-313, 1997.
- 58) WILHELM, D. L. **Patologia**, 7. Ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan: 1982.

- 59) WOODS, K. L.; SMITH, L. J.; GRAHAM, D. Y. *Intragastric accumulation of Evans blue dye as a method for assessing aspirin-induced acute gastric mucosal injury in humans. Digestive Diseases and Sciences*, New York, v. 33, p. 769-773, 1988.
- 60) YANOFF, M.; FINE, B. S. **Atlas of Ocular Pathology**, 1. Ed., Saint Louis, C.V. Mosby: 1996.
- 61) ZIESKE, J. D. *Perpetuation of stem cells in the eye. Eye*, London, v. 8, p. 163-169, 1994.