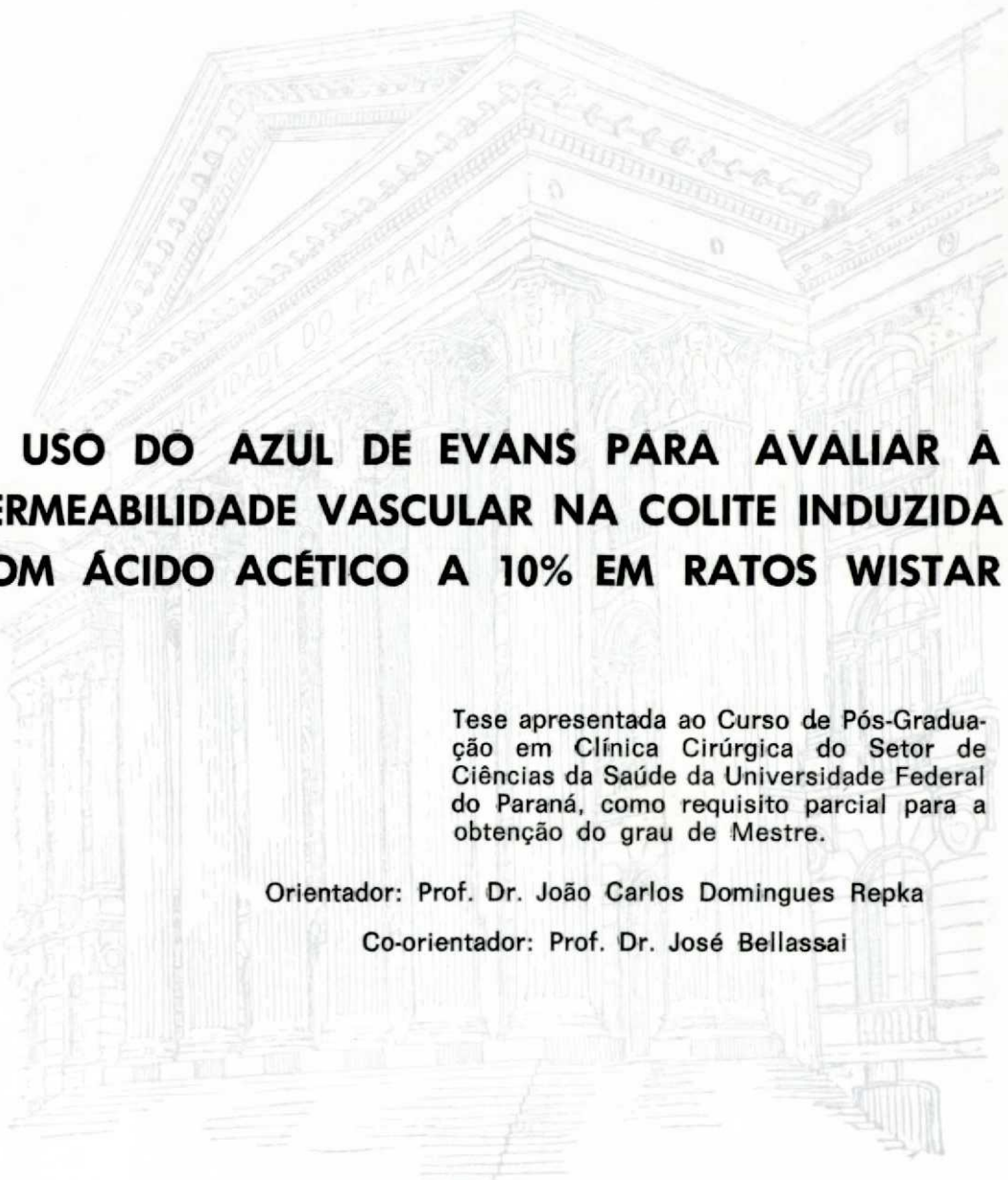


NEMER HAJAR



O USO DO AZUL DE EVANS PARA AVALIAR A PERMEABILIDADE VASCULAR NA COLITE INDUZIDA COM ÁCIDO ACÉTICO A 10% EM RATOS WISTAR

Tese 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. João Carlos Domingues Repka

Co-orientador: Prof. Dr. José Bellassai

CURITIBA

1994

NEMER HAJAR

**O USO DO AZUL DE EVANS PARA AVALIAR A
PERMEABILIDADE VASCULAR NA COLITE INDUZIDA
COM ÁCIDO ACÉTICO A 10% EM RATOS WISTAR**

Tese 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. João Carlos Domingues Repka
Co-orientador: Prof. José Belassai

CURITIBA

1994

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka

*A minha querida esposa, LAILA, exemplo de amor,
carinho, incentivo e dedicação.*

*Ao meu pai,
a quem Deus concedeu
algo maior que a inteligência de muitos
deu-lhe a Sabedoria de poucos
Meu respeito de homem
Meu orgulho de filho*

*A minha mãe, sempre presente com uma
palavra de amizade e esperança.*

Aos meus sogros, pelo apoio e incentivo.

EM NOME DE DEUS, CLEMENTE, MISERICORDIOSO

"Vosso amigo é a satisfação de vossa necessidade.

Ele é o campo que semeias com carinho e ceifais com agradecimento.

É vossa mesa e vossa lareira.

Pois ides a ele com vossa fome e o procurais em busca de paz.

Quando vosso amigo expressa seu pensamento, não temais o 'não' de vossa própria opinião, nem prendais o 'sim'.

E quando ele se cala, que vosso coração continue a ouvir o seu coração,

Porque na amizade, todos os desejos, ideais, esperanças, nascem e são partilhados sem palavras, numa alegria silenciosa.

Quando vos separais de vosso amigo, não vos aflijais.

Pois o que amais nele pode torna-se mais claro na sua ausência, como para o alpinista a montanha aparece mais clara, vista da planície.

E que não haja outra finalidade na amizade a não ser o amadurecimento do espírito.

Pois o amor que procura outra coisa a não ser a revelação de seu próprio mistério não é amor, mas uma rede armada, e somente o inaproveitável é nela apanhado.

E que o melhor de vós próprios seja para vosso amigo.

Se ele deve conhecer o fluxo de vossa maré, que conheça também o seu refluxo.

Pois, que achais seja vosso amigo para que o procureis somente a fim de matar o tempo?

Procurai-o sempre com horas para viver:

O papel do amigo é de encher vossa necessidade, não vosso vazio.

E na doçura da amizade, que haja risos e o partilhar dos prazeres.

Pois no orvalho de pequenas coisas, o coração encontra sua manhã e sente-se refrescado."

GIBRAN KHALIL GIBRAN

AGRADECIMENTOS

"Gratidão é a memória do coração"

Provérbio

Quero aqui externar os meus sinceros agradecimentos àqueles que de forma direta ou indireta participaram da realização não só deste trabalho, mas da minha formação.

Ao Prof. Dr. JOÃO CARLOS DOMINGUES REPKA, orientador deste trabalho, pelos preciosos ensinamentos, pelo tempo despendido e pelos conselhos e apoio oferecidos nas diferentes etapas desta tese.

Ao Prof. Dr. OSVALDO MALAFAIA, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, pela confiança depositada, dando-me a oportunidade de realizar esta tese.

À Dra. ANA CRISTINA BORDÓN DE CORVALÁN, pela amizade, pela determinação e elevado espírito científico, fatores que foram preponderantes para a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. JOSÉ BELLASSAI, pela valiosa colaboração na realização dos estudos histológicos.

Ao Prof. PAULO AFONSO BRACARENSE COSTA, pelos estudos estatísticos realizados.

Ao Dr. PAULO CÉSAR ANDRIGUETTO, pela sólida amizade, incentivo e sugestão durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. LUÍS ALBERTO GONÇALVES BUENO, por ser o "irmão mais velho" nos momentos de maior dificuldade.

Ao Dr. JOÃO BATISTA MARCHESINI, pela acolhida desde os tempos de acadêmico em sua equipe, indicando-me sempre o melhor caminho.

Ao Prof. DR. MICHEL BUFFARA, exemplo de pessoa e de médico e que iniciou a minha formação cirúrgica

Ao Prof. WOTHAN TAVARES DE LIMA, por me apresentar e ensinar a utilização do corante que deu início a este estudo.

Ao Prof. Dr. ROBERTO DA SILVEIRA MORAES, pelos valiosos ensinamentos oferecidos sobre o modelo experimental utilizado neste estudo.

Aos professores da Disciplina de Cirurgia do Aparelho do Hospital de Clínicas, pela participação tanto na minha formação cirúrgica como no desenvolvimento de meu espírito científico.

À Diretoria e ao Corpo Clínico do Hospital Santa Cruz, pelo incentivo e apoio oferecidos.

À TECPAR (Instituto de Tecnologia do Paraná), pelo fornecimento do animal para o experimento.

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

À Dra. CRISTIANE KIST MOUSFI, acadêmicos de medicina PABLO FABIAN AVILES CABRERA, SILVANIA LUG PIMENTEL, EDUARDO PRADI ADAM, SÉRGIO RICARDO PENTEADO e MARCEL HEIBEL e o técnico de laboratório REINALDO GONÇALVES, pelas valiosas colaborações na realização da parte experimental desta tese.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 OBJETIVO	6
2 REVISÃO DA LITERATURA	8
3 MATERIAL E MÉTODO	17
3.1 DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO.....	17
3.2 AMOSTRA.....	17
3.2.1 Preparo da amostra.....	17
3.3 ORGANIZAÇÃO DO MÉTODO	19
3.3.1 PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES	19
3.3.1.2 Solução do azul de Evans	19
3.3.1.3 Solução de hidrato de cloral a 10%.....	19
3.3.1.4 Formamida	19
3.3.1.5 Formalina	19
3.3.1.6 Ácido acético a 10%.....	20
3.3.2 Indução do processo inflamatório	20
3.3.2.1 Grupo I - colite induzida.....	20
3.3.2.2 Grupo II - controle.....	20
3.3.3 Inoculação do azul de Evans.....	21
3.3.4 Obtenção da amostra de plasma e fragmento de cólon	22
3.3.4.1 Obtenção da amostra de plasma.....	22

3.3.4.2	Obtenção do fragmento de cólon	23
3.3.5	Processamento do fragmento de cólon	23
3.3.5.1	Processo de extração do azul de Evans do fragmento de cólon	24
3.3.5.2	Processamento histológico do fragmento de cólon	25
3.4	MÉTODO DE AFERIÇÃO	25
3.4.1	Determinação da curva padrão do azul de Evans em solução fisiológica	25
3.4.2	Determinação da curva padrão do azul de Evans em plasma.....	27
3.4.3	Aferição do azul de Evans no fragmento de cólon	28
3.4.4	Aferição do azul de Evans na amostra de plasma.....	28
3.4.5	Aferição histológica do fragmento de cólon	28
3.5	AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA.....	30
3.5.1	Análise de regressão linear e correlação	30
3.5.2	Análise de variância.....	32
3.5.3	Cálculo de média e desvio padrão.....	32
4	RESULTADOS	34
4.1	CURVA PADRÃO DO AZUL DE EVANS.....	34
4.1.1	Curva padrão do azul de Evans em solução fisiológica	34
4.1.2	Curva padrão do azul de Evans em plasma	36
4.2	GRUPO I - COLITE INDUZIDA.....	38
4.2.1	Peso do animal	38
4.2.2	Dose do azul de Evans.....	38
4.2.3	Peso do fragmento de cólon.....	39
4.2.4	Volume de formamida	40
4.2.5	Concentração do azul de Evans no fragmento de cólon	40
4.2.6	Concentração do azul de Evans na amostra de plasma.....	43
4.2.7	Aferição histológica do fragmento de cólon	44

4.3 GRUPO II - CONTROLE	48
4.3.1 Peso do animal	48
4.3.2 Dose do Azul de Evans.....	49
4.3.3 Peso do fragmento de cólon.....	49
4.3.4 Volume de formamida	50
4.3.5 Concentração do azul de Evans no fragmento de cólon	50
4.3.6 Concentração do azul de Evans na amostra de plasma.....	53
4.3.7 Aferição histológica do fragmento de cólon	54
4.4 CORRELAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS HISTOLÓGICAS E DO AZUL DE EVANS COLÔNICO NO GRUPO I DO 7º AO 36º DIA.....	54
5 DISCUSSÃO.....	57
5.1 MODELO EXPERIMENTAL.....	57
5.2 ESCOLHA DO MODELO DE AFERIÇÃO.....	58
5.3 DOSAGEM DO AZUL DE EVANS E AFERIÇÃO HISTOLÓGICA.....	60
6 CONCLUSÕES	65
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

LISTA DE FIGURAS

1 Aspecto ilustrativo da inoculação do azul de Evans através da veia peniana do rato	21
2 Aspecto ilustrativo do plasma obtido após a inoculação do azul de Evans.....	22
3 Aspecto macroscópico da peça colônica ressecada, corada pelo azul de Evans	23
4 Aspectos ilustrativos do azul de Evans extraído pela formamida dos fragmentos colônicos.....	24
5 Foto do leitor de microplacas de ELISA BIO TEK BT100.....	26
6 Demonstrativo das escalas para transformação dos valores nominais das alterações histológicas, em valores numéricos	31
7 Distribuição gráfica e correlação (r) entre as concentrações do padrão do azul de Evans ($\mu\text{g/ml}$) e densidades ópticas a 620 nm Curva padrão de calibração para determinações teciduais	35
8 Distribuição gráfica da correlação (r) entre as concentrações do padrão do azul de Evans ($\mu\text{g/ml}$) e densidades ópticas a 620 nm Curva padrão de calibração para determinações plasmáticas	37
9 Distribuição gráfica das dosagens do azul de Evans ($\mu\text{g/ml}$) extraído dos fragmentos colônico Grupo I - colite induzida.....	41
10 Distribuição gráfica das dosagens do azul de Evans ($\mu\text{g/g}$) extraído dos fragmentos colônicos Grupo I - colite induzida.....	42
11 Distribuição gráfica das dosagens ($\mu\text{g/ml}$) do azul de Evans plasmático Grupo I - colite induzida	44
12 Fotomicrografia do tecido colônico no 1º dia após a indução do processo inflamatório pelo ácido acético a 10%: 1- edema de submucosa 2- necrose coagulativa da mucosa 3 - úlcera de mucosa (Hematoxilina-Eosina, aumento de 20 vezes)	47

13 Fotomicrografia do tecido colônico no 2º dia após a indução do processo inflamatório pelo ácido acético a 10%: 1- edema e infiltrado leucocitário da submucosa (Hematoxilina-Eosina, aumento 40 vezes).....	47
14 Distribuição gráfica das dosagens do azul de Evans ($\mu\text{g/ml}$) extraído dos fragmentos colônico Grupo II - controle	51
15 Distribuição gráfica das dosagens do azul de Evans ($\mu\text{g/g}$) extraído dos fragmentos colônicos Grupo II - controle.....	52
16 Distribuição gráfica das dosagens do azul de Evans ($\mu\text{g/ml}$) plasmático Grupo II - controle	53
17 Representação gráfica da evolução histológica e permeabilidade vascular do azul de Evans em cólon de ratos na vigência de reação inflamatória induzida pelo ácido acético a 10% do 7º ao 36º dia ($r= 0,7002$).....	55

LISTA DE TABELAS

I Preparação das diluições da solução padrão do azul de Evans em solução fisiológica	26
II Preparação das diluições da solução do azul de Evans em plasma de ratos	27
III Graduação histológica - Indução.....	29
IV Graduação histológica - Reparo.....	30
V Relação entre concentração do azul de Evans da solução padrão e densidade óptica a 620 nm frente a solução fisiológica como branco	34
VI Concentração do azul de Evans da solução padrão e densidade óptica frente a um filtro de 620 nm de comprimento de onda tendo como branco a solução fisiológica.....	36
VII Demonstrativo dos pesos (g) dos animais submetidos a indução de colite pelo ácido acético a 10% - Grupo I - colite induzida....	38
VIII Volumes do azul de Evans (ml) inoculados, na dose de 20 mg/kg de peso de cada animal, através da veia peniana - Grupo I - colite induzida	39
IX Peso (g) dos fragmentos colônicos, obtidos quando do sacrificio dos animais - Grupo I - colite induzida.....	39
X Volumes (ml) de formamida, utilizados na proporção de 4 ml/g de peso do fragmento colônico - Grupo I - colite induzida.....	40
XI Resultados das dosagens do azul de Evans ($\mu\text{g/ml}$) extraído dos fragmentos colônico - Grupo I - colite induzida	41
XII Resultados das dosagens do azul de Evans ($\mu\text{g/g}$) extraído dos fragmentos colônicos - Grupo I - colite induzida.....	42
XIII Resultados das dosagens do azul de Evans ($\mu\text{g/ml}$) plasmático - Grupo I - colite induzida	43
XIV Graduação histológica (indução - reparo) - Grupo I - colite induzida.....	45

XV Demonstrativo dos pesos (g) dos animais submetidos a indução de colite pelo ácido acético a 10% - Grupo II - controle	48
XVI Volumes do azul de Evans (ml) inoculados, na dose de 20 mg/kg de peso de cada animal, através da veia peniana - Grupo II - controle	49
XVII Peso (g) dos fragmentos colônicos, obtidos quando do sacrificio dos animais - Grupo II - controle	49
XVIII Volumes de formamida (ml), utilizados na proporção de 4 ml/g de peso do fragmento colônico - Grupo II - controle	50
XIX Resultados das dosagens do azul de Evans ($\mu\text{g/ml}$) extraído dos fragmentos colônico - Grupo II - controle	51
XX Resultados das dosagens do azul de Evans ($\mu\text{g/g}$) extraído dos fragmentos colônicos - Grupo II - controle	52
XXI Resultados das dosagens do azul de Evans ($\mu\text{g/ml}$) plasmático - Grupo II - controle.....	53
XXII Representação dos valores obtidos para a transformação numérica das médias histológicas nominais e valores médios determinados espectrofotometricamente do azul de Evans colônico do 7° ao 36° dia	55

LISTA DE ABREVIATURAS

μ = micra

μg = micrograma

μl = microlitro

$^{\circ}\text{C}$ = graus Celsius

cm = centímetro

g = grama

kg = quilograma

L. Inferior = Limite Inferior

L. Superior = Limite superior

mg = miligrama

ml = mililitro

n = número

NaCl = cloreto de sódio

nm = nanômetro

rpm = rotações por minuto

SDx = Desvio padrão

p/v = peso/volume

v/v = volume/volume

RESUMO

Este estudo tem por objetivo avaliar as alterações da permeabilidade vascular decorrentes das reações inflamatórias induzidas pelo ácido acético a 10%, em ratos Wistar, pela dosagem do azul de Evans, através de micrométodo espectrofotométrico, e correlacionar as alterações histológicas, durante um período de 36 dias. Foram utilizados 120 ratos Wistar, machos, com pesos compreendidos entre 146,1 a 336,0 g . Os animais foram subdivididos em 2 grupos: Grupo I (colite induzida) com 90 ratos que sofreram a instilação de 0,5 ml do ácido por via retal e acompanhados por 36 dias; Grupo II (controle) com 30 ratos que receberam a instilação de 0,5 ml de solução fisiológica e acompanhados por três dias. Os animais foram divididos em subgrupos de 10 ratos cada. Para a avaliação do modelo foram realizadas dosagens plasmáticas e teciduais do azul de Evans e ainda avaliação histológica do cólon, nos dias 1º, 2º, 3º, 5º, 7º, 9º, 16º, 21º e 36º, para Grupo I, e nos dias 1º, 2º e 3º para o Grupo II. Todos os animais foram inoculados através da veia peniana com azul de Evans a 2,5% na dose de 20 mg/kg, 8 horas antes do período pré-determinado para o sacrifício. Nos períodos pré-determinados os animais foram submetidos a coleta de amostra de sangue para determinação plasmática do azul de Evans e após o sacrifício foram obtidos fragmentos colônicos para a determinação das concentrações do azul de Evans teciduais e avaliação histológica. Utilizou-se formamida durante 24 horas à 22°C para a extração do azul de Evans do tecido colônico. As quantificações foram efetuadas frente a uma solução padrão de azul de Evans 2,5%, em leitor de ELISA com filtro de 620 nm de comprimento de onda, com coeficiente de correlação (r) de 0,99539 para as leituras plasmáticas e de 0,98424 para as leituras em extratos de fragmentos de cólon. Os resultados das dosagens do azul de Evans dos fragmentos colônicos do Grupo I no primeiro dia foram de 97,24 µg/g de tecido, que se normalizaram no nono dia (51,64 µg/g) e manteve-se até o trigésimo sexto dia, quando comparados ao Grupo controle. Não foram observadas alterações nas concentrações plasmáticas do corante na vigência do processo inflamatório colônico induzido. Os resultados obtidos permitiram concluir que foi possível avaliar as alterações da permeabilidade vascular nas reações inflamatórias induzidas no cólon de ratos e que houve correlação (r= 0,7002) entre as alterações histológicas e as dosagens colônicas do azul de Evans tecidual.

ABSTRACT

The aim of this study is to evaluate the changes in vascular permeability in Wistar rats due to inflammatory reaction induced by acetic acid 10 %, using Evans blue to measure this changes and to correlate the results with the histopathological patterns. One hundred and twenty males rats, were used, with body weight varying from 146,1 to 336,0 g. The animals were divided in two groups: Group I (induced colitis group) with 90 rats which were instilated with 0,5 ml of acetic acid through the rectum, and followed up during 36 days period. Group II (control group) with 30 animals which were instilated with 0,5 ml of normal saline solution and followed up by 3 days period. Both groups were subdivided in subgroups of 10 rats each. For the evaluation of this experiment model was determine the plasmatic and tissual concentrations of Evans blue plus the histological evaluation of the colon at day 1st, 2nd, 3rd, 5th, 7th, 9th, 16th, 21st and 36th of Group I and day 1st, 2nd and 3rd of group II. 20 mg/kg of 2,5% Evans blue solution was injected through the penis vein 8 hours before the time of sacrifice. In the predetermined days, the blood was withdrawn from the animals for the determination of plasmatic concentration of Evans blue and after the sacrifice, colonic samples were obtained for the determination of tissual concentration and also for histological evaluation. The extraction of Evans blue from the colonic tissue were obtained with formamide at 22°C during 24 hours. The quantification were done relating with a standard 2,5% Evans blue solution, in a ELISA reader, with 620 nm wave length filter. The correlation coefficient (r) was 0,99539 and 0,98424 for the plasmatic and colonic tissue respectively. The mean concentration value of Evans blue in colonic tissue at the first day was 97,24 µg/g, which got to normal at 9th day (51,64 µg/g) as compare with the control Group, thereafter it estabilized until the 36th day. There was no changes in plasmatic concentrations of Evans blue during induzed acetic acid colitis. The results obtained allowed to conclude that it was possible to evaluate vascular permeability changes with Evans blue, during the induced colonic inflammatory reaction in rats and that there was correlation ($r= 0,7002$) between the histological changes and tissue concentrations of the blue dye.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias crônicas inespecíficas intestinais apresentam na fase aguda reações inflamatórias, com características similares às aquelas encontradas nos diferentes tecidos, em resposta a uma lesão tecidual (MACPHERSON e PFEIFFER, 1976). Essa lesão pode ser causada por bactéria, trauma, agente químico ou calor (ROBBINS, COTRAN e KUMAR, 1991). A histamina juntamente com outras substâncias humorais, são liberadas do tecido lesado para os líquidos circunjacentes. Isso aumenta o fluxo sanguíneo local, aumentando também a permeabilidade dos capilares, permitindo que proteínas extravasem para os tecidos.

A primeira descrição conhecida de inflamação, data de cerca de 1550 a.C., vem do *Edwin Smith Papyrus*, que foi um dos papiros egípcios achados numa tumba nos arredores de Tebas citado por WILHELM em 1982.

A inflamação foi considerada como doença até 1794, quando Hunter convenceu a comunidade médica que estas alterações teciduais eram uma resposta inespecífica evocada por todas as formas de lesão, sendo tanto proposital como benéfica por natureza (ROBBINS, COTRAN e KUMAR, 1991).

São quatro os sinais cardeais de inflamação descritos por Cornelius Celsus: o calor, o rubor, o tumor e a dor. Virchow acrescentou um quinto sinal, a perda de função (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. 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 (VANE, 1976).

As manifestações locais da inflamação aguda mostram nitidamente os três componentes da resposta inflamatória: alterações no fluxo vascular e no calibre dos vasos, alterações da permeabilidade vascular e exsudação leucocitária.

Sob condições fisiológicas, o endotélio dos capilares e a porção proximal das vênulas formam uma membrana semipermeável que permite a livre passagem de água e pequenas moléculas de um lado para outro do endotélio, mas que, normalmente impede 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 parece ser o fator resultante de uma mediação bioquímica.

Para se avaliar a permeabilidade vascular num processo inflamatório, dispõem-se de técnicas como: quantificação do conteúdo aquoso do tecido inflamado, mensuração do escape de albumina marcada com o iodo radioativo num sítio inflamatório, 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 WILHEM, 1966; UDAKA, 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).

O azul de Evans tem sido utilizado em função de algumas características conhecidas: sua alta afinidade pela albumina (RAWSON, 1943; LEVEEN e FISHMAN, 1947; FREEDMAN e JOHNSON, 1969) e

inocuidade (LINDERKAMP, MADER, BUTENANDT e RIEGEL 1977; WOODS, SMITH e GRAHAM, 1988). Estão descritas suas aplicações para determinação do volume plasmático (GREGERSEN, 1944; CASTER, SIMON e ARMSTRONG, 1955; HUANG e BONDURANT, 1956; PARVING, KLEBE e INGOMAR, 1973; LINDERKAMP, MADER, BUTENANDT e RIEGEL, 1977) e estudo da distribuição da albumina (FREINKEL, SCHREINER, ATHENS, HIATT e BREESE, 1954).

Diversos modelos experimentais de processos inflamatórios induzidos por agentes químicos têm sido avaliados pelo azul de Evans, que se combina a albumina plasmática, formando um complexo corante-albumina que extravasa através da barreira endotelial lesada (STEELE e WILHELM, 1966).

Vários autores utilizaram diferentes agentes indutores na tentativa de reproduzir experimentalmente um processo inflamatório colônico, similar à doença humana, com aferições baseadas nos aspectos histológicos (MACPHERSON e PFEIFFER, 1978; MORAES, 1987; MORRIS, BECK, HERRIDGE, DEPEW, SZEWCZUK e WALLACE, 1989; OKAYASU, HATAKEYAMA, YAMADA, OHKUSA, INAGAKI e NAKAYA, 1990) ou nas dosagens de metabólitos do ácido araquidônico (SIMMONS, SALMON e MONCADA, 1983; SHARON e STENSON, 1985; VILLASECA, SALAS, GUARNER, RODRIGUEZ e MALAGELADA, 1990).

1.1 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi verificar a eficácia do azul de Evans pelo micrométodo espectrofotométrico na avaliação da permeabilidade vascular da colite induzida pelo ácido acético a 10%, via retal em ratos Wistar, e também verificar se as concentrações do azul de Evans colônico estariam relacionadas com as alterações histológicas nas diferentes fases da colite induzida nos animais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

Entre as técnicas disponíveis para o estudo da permeabilidade vascular, através da determinação da quantidade de proteína exsudada, destaca-se a utilização do azul de Evans. Essa técnica foi utilizada em vários modelos experimentais de processos inflamatórios, devido a sua afinidade pela albumina, que forma um complexo corante-albumina, capaz de ultrapassar a barreira endotelial.

RAWSON em 1943, utilizando os corantes azul de Evans (T-1824), azul de Tripan, azul celeste de Niagara, azul celeste de Niagara 6B homogeneizados com proteína plasmática humana e avaliados por método eletroforético, observou que o azul de Evans na concentração de 0,004% combinava-se completamente com a albumina, determinando grande afinidade deste corante por esta proteína.

NOBLE, GREGERSEN, PORTER, BUCKMAN em 1945, após estudarem as curvas de tempo e concentração do T-1824, como era então conhecido o azul de Evans, em pacientes normais e com vários tipos de lesões, observaram a saída do complexo corante-albumina da circulação. Concluíram que havia aumento da saída do corante da circulação sanguínea nos pacientes queimados e com peritonite, relacionando a exsudação plasmática com a alteração da permeabilidade vascular.

CASTER, SIMON, ARMSTRONG em 1955, compararam a concentração do azul de Evans em vários tecidos e no plasma de ratos Wistar. Injetaram 2 ml do azul de Evans a 1% pela veia caudal, e em tempos pré-determinados, recolheram amostras de diversos tecidos. Após a extração do corante, obtiveram os seguintes resultados: 16% no plasma, 30% na pele, 13% no músculo, 12% no fígado, 9% no esqueleto e 20% nos outros tecidos. Concluíram que estes resultados poderiam estimar o volume plasmático de um determinado tecido.

STEELE e WILHELM em 1966, produziram reações inflamatórias na pele de cobaias com agentes químicos como: xylol, benzeno, tetracloreto de carbono e ácido acético glacial, onde estudaram a permeabilidade vascular através da injeção endovenosa do azul de Evans na dose de 30 mg/kg de peso. Relataram que a inoculação dos agentes agressores produzia aumento da permeabilidade vascular, e que o eritema formado não era devido somente à vasodilatação local, mas também estava relacionado ao aumento da permeabilidade vascular, como demonstrou a exsudação do azul de Evans.

UDAKA, TAKEUCHI e MOVAT em 1970, elaboraram um método físico-químico para quantificar o aumento da permeabilidade vascular. Utilizaram coelhos albinos e ratos Wistar, injetando por via endovenosa 60 mg/kg do azul de Evans e também utilizaram cobaias, injetando nestas, 20 mg/kg do corante. Posteriormente, foram induzidas lesões inflamatórias na pele com diferentes mediadores destas lesões. Retiraram amostras de pele com lesão e após a extração do corante com formamida,

foram realizadas leituras em espectrofotômetro com filtro de 620 nm de comprimento de onda e obtiveram curvas de tempo de evolução e extravasamento do corante. Evidenciaram assim, as trocas durante a permeabilidade vascular ao corante. Os autores concluem que os resultados permitem demonstrar que o método pode avaliar quantitativamente o aumento da permeabilidade vascular, frente a reações imunológicas e lesões inflamatórias.

REIS, OKINO e ROCHA E SILVA em 1971, avaliaram os efeitos farmacológicos das bradicininas e outras cininas na permeabilidade vascular em parede abdominal de ratos, utilizando o azul de Evans. Os resultados demonstraram que o aumento da permeabilidade vascular estava numa relação direta com o aumento da dose das cininas.

LUNDBERG e SARIA em 1983, estudaram os efeitos da fumaça do cigarro, a irritação mecânica (intubação traqueal), a ação direta de agentes químicos (éter, formalina, histamina, bradicinina e capsaicina) e a estimulação vagal na mucosa da traquéia e árvore brônquica de ratos Sprague-Dawley, utilizando o azul de Evans. Concluíram que a ação direta dos agentes irritantes, causava edema subepitelial das vias aéreas, demonstrado pelo extravasamento do azul de Evans e quando os animais eram pré-tratados com capsaicina, por via subcutânea, a permeabilidade vascular estava reduzida ou abolida.

SARIA, LUNDBERG, SKOFITSCH e LEMBECK em 1983, estudaram o extravasamento protéico em diversos tecidos de ratos e cobaias, sob a ação de diferentes substâncias como capsaicina, bradicinina, serotonina, histamina, substância P e agressões por antígenos, utilizando o azul de Evans na dose de 20 mg/kg por via endovenosa. Os tecidos dos animais que sofreram a ação dos agentes, foram comparados com um grupo controle. Os autores concluíram que após a determinação quantitativa do azul de Evans, todos os órgãos dos animais submetidos a ação de autacoides, tiveram maiores níveis de corante, quando comparados ao grupo controle, determinados pelo aumento da permeabilidade vascular com conseqüente extravasamento protéico.

SZABO, BROWN, TRIER e SCHNOOR em 1985, estudaram a permeabilidade vascular utilizando o azul de Evans, em ratos Sprague-Dawley, após a instilação de etanol na cavidade gástrica. Demonstraram o extravasamento do corante e a presença deste no conteúdo gástrico.

FLORES, MELO e FERREIRA em 1988, utilizaram modelo experimental de infarto de miocárdio em ratos Wistar e avaliaram o extravasamento protéico com o corante azul de Evans, para quantificar a lesão miocárdica induzida. Após a produção de infarto por ligadura coronariana, o coração dos animais foi removido em diferentes intervalos de tempo. O corante foi extraído com formamida e os resultados obtidos por espectrofotometria. Os autores revelaram que as áreas de infarto apresentavam um aumento progressivo da quantidade do corante, ao que chamaram de "infarto azul".

ROGERS, BELVISI, AURSUDKIJ, EVANS e BARNES em 1988, estudaram as interações dos neuropeptídeos sobre a permeabilidade microvascular nas vias aéreas de cobaias, utilizando o azul de Evans como demarcador deste fenômeno. Verificaram então, que as taquicininas, através de estímulos sobre os receptores em células endoteliais, aumentavam a permeabilidade microvascular.

ROGERS, BOSCHETTO e BARNES em 1989, estudaram o efeito do fator de ativação plaquetário (PAF) sobre as vias aéreas superiores de cobaias, onde causam exsudação protéica e transudação luminal, com o azul de Evans e albumina marcada com radioisótopo, fazendo uma correlação dos resultados. Obtiveram uma correlação significativa entre a exsudação dos marcadores, concluindo que ambos poderiam ser usados na determinação da permeabilidade vascular à proteína. Definiram ainda que o método poderia ser usado para avaliar a ação humoral e neural no mecanismo da inflamação das vias aéreas de cobaias, sendo também válido para indicar as drogas com potencial terapêutico da asma.

ROGERS, DIJK e BARNES em 1990, estudaram a exsudação plasmática determinada pela bradicinina em vias aéreas superiores de cobaias, utilizando as propriedades do corante azul de Evans como marcador. Concluíram que a bradicinina produzia um extravasamento protéico, e que utilizando o fator ativador plaquetário ocorreria uma inibição, inicialmente na fase precoce, mas com maior intensidade na fase tardia.

HAAS, NAKANISHI, MACMILLAN, JORDAN e HU em 1992, aproveitando as propriedades do azul de Evans, estudaram num modelo orofacial experimental de inflamação aguda em ratos Sprague-Dawley, fazendo avaliação morfométrica do fluxo de neutrófilos para confirmar a lesão que foi induzida com óleo de mostarda a 20%. Os resultados foram obtidos através da análise morfométrica, com contagem de neutrófilos, e por determinação da permeabilidade vascular, com leitura espectrofotométrica do azul de Evans extravasado. Relataram que o método era facilmente reproduzível, devido aos resultados mostrarem valores significativamente mais elevados do extravasamento protéico em comparação com o grupo controle.

Vários autores utilizaram-se de diversos agentes para induzir uma colite em animais de experimentação, tais como: substâncias químicas, fatores imunológicos, bactérias e outros. Porém, todos depararam com a dificuldade de se obter lesões crônicas bem definidas, pois esses modelos apresentam freqüentemente lesões agudas superficiais e transitórias, embora possam ter algumas semelhanças com as doenças inflamatórias colônicas em humanos.

ORIOU PALOU, HALPERN, ZWEIBAUM, MORARD, VEYRE e ABADIE em 1967, produziram em ratos, previamente imunizados com muco colônico de cães, colite através de auto-anticorpos. Obtiveram lesões colônicas graves, similares a doença inflamatória colônica do homem.

ZWEIBAUM, MORARD e HALPERN em 1968, obtiveram lesões inflamatórias colônicas em ratos imunizados com diferentes cepas de *Escherichia coli*. Produziram nos animais lesões com evolução crônica e histologia compatíveis com a colite em humanos.

SOMMERS e WARREN em 1955, produziram em ratos através da irradiação, lesões similares a colite ulcerativa do homem, com presença de abscessos crípticos. A desvantagem deste método foi a ocorrência de lesões em outros órgãos.

MARCUS e WATT em 1969, produziram um modelo experimental de colite em ratos e cobaias, com a utilização do musgo da Irlanda em solução aquosa, degradado ou não, oferecida diariamente com água.

MACPHERSON e PFEIFFER em 1978, apresentaram um modelo experimental de colite difusa em ratos pela instilação de ácido acético a 10%, por via retal. Após avaliações histológicas verificaram que as lesões obtidas eram similares em alguns aspectos com a doença humana.

CHESTER em 1985, obteve lesões inflamatórias no cólon de ratos, que se caracterizavam por edema, infiltração leucocitária polimorfonuclear, ulceração e necrose, através da instilação de peptídeos quimiotáxicos por via retal e endovenosa.

MORAES em 1987, reproduzindo estudos de MACPHERSON e PFEIFFER (1978), induziu colite em ratos através da instilação de ácido acético a 10% por via retal. A avaliação histológica nos períodos de indução e reparo, demonstrou que as lesões eram compatíveis com a doença inflamatória do cólon em humanos e que o modelo era de fácil reprodução.

MORRIS, BECK, HERRIDGE, DEPEW, SZEWCZUK e WALLACE em 1989, descreveram um modelo experimental de colite em ratos pela instilação por via retal de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico dissolvido em etanol a 50%, obtendo lesões inflamatórias que persistiam por 8 semanas.

OKAYASU, HATAKEYAMA, YAMADA, OHKUSA, INAGAKI e NAKAYA em 1990, obtiveram lesões inflamatórias intestinais em ratos através do dextran sulfato de sódio oferecido aos animais na forma de solução com água na ração diária. As lesões produzidas tinham características agudas e crônicas.

3 MATERIAL E MÉTODO

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO

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

Tem por escopo a investigação da permeabilidade vascular do processo inflamatório num modelo experimental de colite difusa induzida por ácido acético a 10% em ratos Wistar, através da determinação espectrofotométrica do azul de Evans extravasado no tecido colônico. Os resultados foram relacionados com as alterações histológicas do processo inflamatório induzido.

Foram adotadas as Normas para 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 *International Council for Laboratory Animal Science* (1990).

3.2 AMOSTRA

Foram utilizados 120 ratos albinos machos, (*Rattus norvegicus*, *Rodentia, mammalia*, da linhagem Wistar-TECPAR), com peso variando entre 146,1 a 336,0 g.

3.2.1 Preparo da amostra

Os animais foram distribuídos em 2 grupos. Grupo I - colite induzida: com 90 animais nos quais procedeu-se a instilação do ácido acético

glacial a 10% por via retal; Grupo II - controle: com 30 ratos, onde se procedeu a instilação de solução fisiológica (0,9% de NaCl) por via retal. Os grupos foram divididos em subgrupos de 10 animais cada, seguindo os períodos pré-estabelecidos para o sacrifício.

O Grupo I dividido em subgrupos 1º dia, 2º dia, 3º dia, 5º dia, 7º dia, 9º dia, 16º dia, 21º dia e 36º dia, e o Grupo II em 1º dia, 2º dia, 3º dia, períodos estes nos quais foram retiradas amostras de tecido colônico e sangue para posterior aferição.

Os animais foram identificados individualmente e dispostos em caixas com 10 ratos, permanecendo durante todo o experimento albergados no laboratório em temperatura ambiente, tendo livre acesso a ração balanceada para espécie, Nuvital[®], e água até a data do sacrifício, conforme recomendam ROMERO e FUENZALIDA (1989).

Os ratos foram deixados em jejum por 24 horas antes do início do experimento e então submetidos a um preparo intestinal, pela instilação por via retal de 20 ml de solução fisiológica, estando o animal em decúbito ventral supino, imobilizado pela cauda, sem anestesia. Utilizou-se um cateter número 6 de polietileno medindo 9 cm de comprimento com múltiplos orifícios, a cada 3 mm, numa extensão de 5 cm da extremidade distal que estava fechada e conectada a sua extremidade proximal uma seringa de 20 ml.

Todos os ratos foram pesados em balança eletrônica, HELMAC HM[®] 3600, e registrados os valores antes do período pré-determinado para o sacrifício.

3.3 ORGANIZAÇÃO DO MÉTODO

3.3.1 Preparo das soluções e reagentes

3.3.1.2 Solução do azul de Evans

Foi preparada uma solução do 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.

3.3.1.3 Solução de hidrato de cloral a 10%

Foi utilizada uma solução de hidrato de cloral, REAGEN®, a 10% (p/v) em solução fisiológica e filtrada em membrana esterilizante MILLIPORE®, com porosidade de 0,22 μ .

3.3.1.4 Formamida

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

3.3.1.5 Formalina

Preparada a 10% (v/v), a partir de Formaldeído, RIEDEL®, em água destilada. Empregada para fixação das amostras colônicas com posterior processamento histológico.

3.3.1.6 Ácido acético a 10%

Elaborada a 10% (v/v), com ácido acético REAGEN[®], em solução fisiológica. Foi usada para indução da colite.

3.3.2 Indução do processo inflamatório

3.3.2.1 Grupo I - colite induzida

Após 24 horas de jejum alimentar e preparo intestinal, os animais foram pesados e anestesiados, utilizando-se hidrato de cloral a 10%, a dose de 3 ml/kg por peso, administrada intraperitonealmente no quadrante inferior esquerdo do animal. Com o animal em decúbito ventral supino, induziu-se a colite pela instilação por via retal de 0,5 ml de ácido acético glacial a 10%, segundo o método proposto por MORAES em 1987, através do mesmo cateter utilizado para o preparo intestinal, tendo em sua extremidade proximal conectada seringa de 1 ml.

3.3.2.2 Grupo II - controle

Com o animal em decúbito ventral supino, instilou-se 0,5 ml de solução fisiológica por via retal, utilizando-se para isso o mesmo cateter usado para indução da colite.

3.3.3 Inoculação do azul de Evans

Foi realizada a inoculação do azul de Evans em todos os animais dos Grupo I e II, 8 horas antes do sacrifício. O rato sob efeito anestésico do hidrato de cloral a 10%, foi colocado em decúbito dorsal. O pênis foi tracionado e a veia peneana puncionada com agulha número 13x4,5 mm. A seguir foi injetada a solução do azul de Evans na dose de 20 mg/kg de peso, segundo o método usado por BORDÓN DE CORVALÁN em 1994.



Figura 1 - Aspecto ilustrativo da inoculação do azul de Evans através da veia peneana do rato

3.3.4 Obtenção da amostra de plasma e fragmento de cólon

3.3.4.1 Obtenção da amostra de plasma

Com o animal sob efeito de anestesia inalatória, induzida através de éter sulfúrico comercial, foi realizada punção intracardíaca através da parede torácica com agulha número 25x7 mm e seringa de 10 ml previamente heparinizadas, obtendo-se em média de 8 ml de sangue por animal, que foram centrifugados a 4.000 rpm por 10 minutos. Desprezado o sedimento, foi separado o plasma e mantido a -20°C para posterior leitura espectrofotométrica.

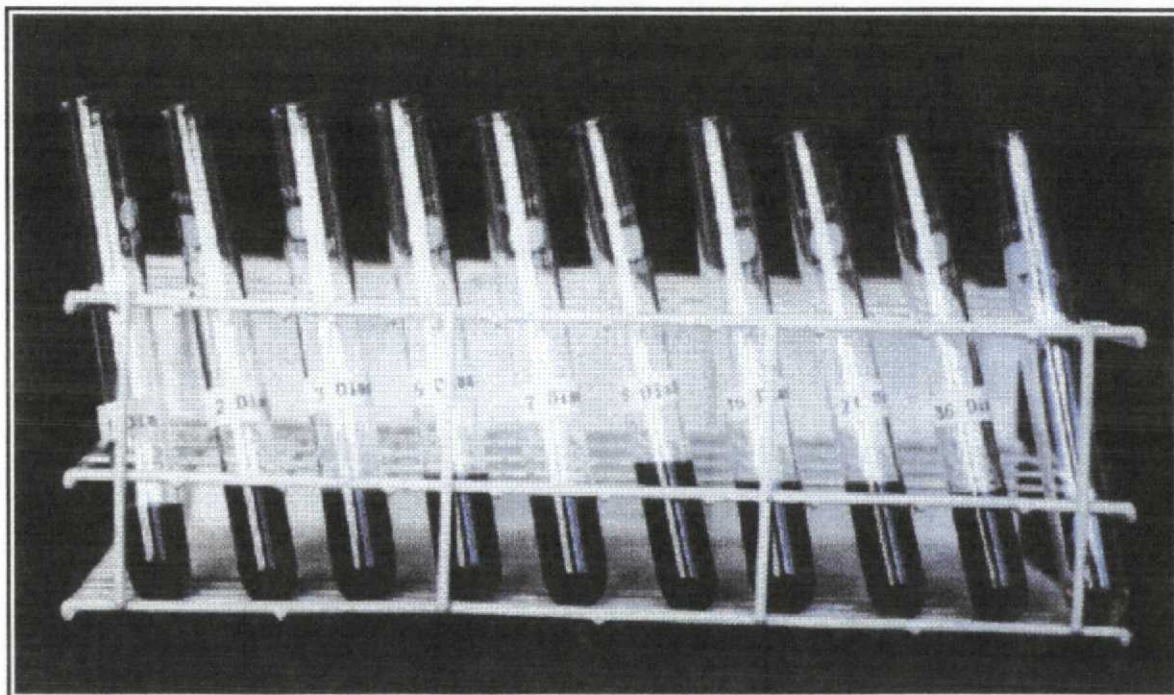


Figura 2 - Aspecto ilustrativo do plasma obtido após a inoculação do azul de Evans comparado com o plasma sem o corante.

3.3.4.2 Obtenção do fragmento de cólon

Os ratos foram sacrificados, através da inalação letal de éter sulfúrico comercial, e a seguir, com o animal em decúbito dorsal e extremidades fixadas, foi realizada incisão mediana xifopúbica, abertura da cavidade abdominal, secção da sínfise pubiana e exposição do cólon, sendo retirada amostra de 5 cm a partir do ânus.



Figura 3 - Aspecto macroscópico da peça colônica ressecada, corada mais intensamente pelo azul de Evans nos locais onde existe permeabilidade vascular.

3.3.5 Processamento do fragmento de cólon

A abertura da peça foi realizada ao longo do seu maior eixo pela borda antimesentérica. Os resíduos fecais e sangüíneos foram retirados com jatos de solução fisiológica.

3.3.5 Processamento do fragmento de cólon

A abertura da peça foi realizada ao longo do seu maior eixo pela borda antimesentérica. Os resíduos fecais e sangüíneos foram retirados com jatos de solução fisiológica.

3.3.5.1 Processo de extração do azul de Evans do fragmento de cólon

Seccionou-se 3 cm da amostra colônica, que foram pesadas em balança eletrônica e colocadas em tudo de ensaio, acrescentando-se a esta, formamida na proporção de 4 ml/g de peso da amostra. Esta solução foi deixada por 24 horas à temperatura de 22°C. Findo este período, os tubos foram agitados mecanicamente, por 15 segundos em agitador PHOENIX® modelo AT 56. O corante extraído pela formamida foi conservado a temperatura de -20°C para posterior leitura espectrofotométrica.

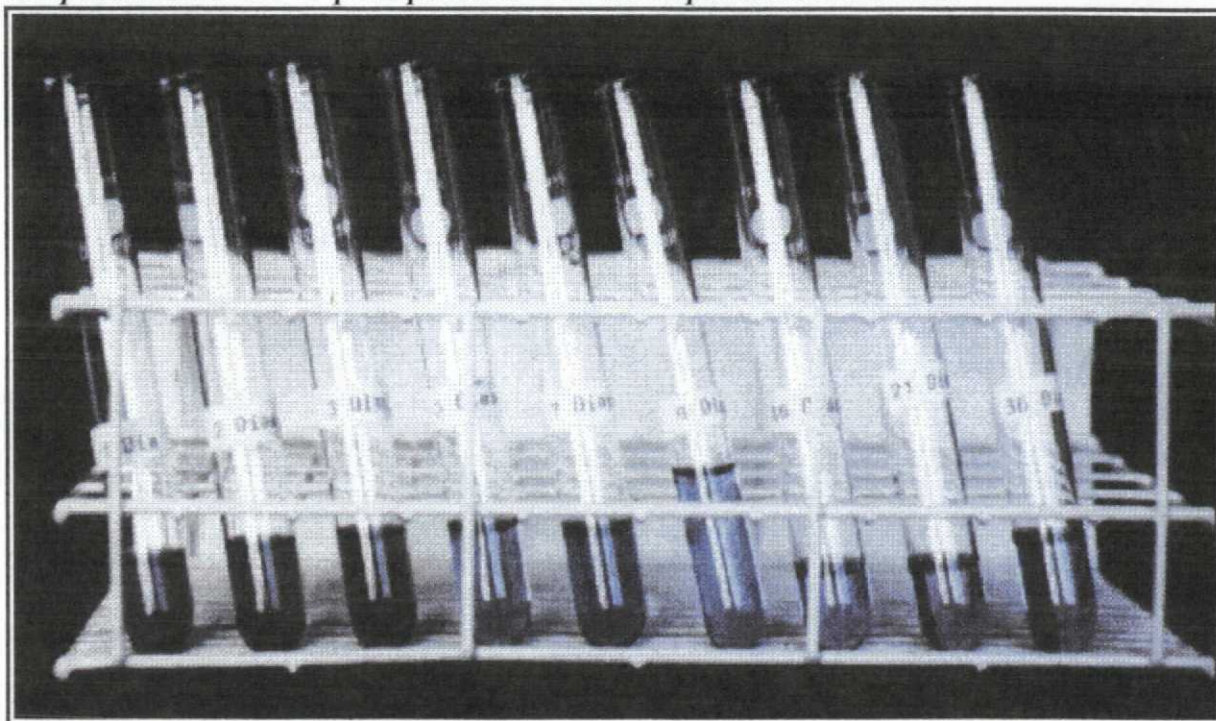


Figura 4 - Aspectos ilustrativos do azul de Evans extraído pela formamida dos fragmentos colônicos.

3.3.5.2 Processamento histológico do fragmento de cólon

Obteve-se 2 cm da amostra inicial de cólon, que foi estirada e fixada sobre superfície de papel cartão e a seguir submersas em formalina. Após decorridos 48 horas os fragmentos foram submetidos à técnica histológica de rotina que consistiu em:

- a. Desidratação;
- b. Diafanização;
- c. Infiltração em parafina e emblocamento;
- d. Microtomia;
- e. Hidratação;
- f. Coloração com método usual de hematoxilina-eosina (H.E.), recorrendo-se à solução de hematoxilina de HARRIS para a coloração nuclear e a solução aquosa de eosina amarelada a 1% para a coloração citoplasmática (MICHALANY, 1980);
- g. Montagem da lâmina.

Para leitura histológica, foi utilizado o microscópio óptico comum.

3.4 MÉTODO DE AFERIÇÃO

3.4.1 Determinação da curva padrão do azul de Evans em solução fisiológica

Tomou-se uma alíquota da solução do azul de Evans a 2,5% (item 3.3.1.2), para padronização do método de microleitura espectrofotométrica.

Nesta solução calculou-se o coeficiente de extinção à um filtro de 620 nm de comprimento de onda, frente a um branco de formamida, nas diluições compreendidas entre 1/5.000 a 1/1.500 (tabela I), utilizando leitor de micro-placas de ELISA - BIO TEK BT-100.

Tabela I - Preparação das diluições da solução padrão do azul de Evans em solução fisiológica.

DILUIÇÃO	VOLUME DE SOLUÇÃO FISIOLÓGICA (µl)	VOLUME DE SOLUÇÃO PADRÃO AZUL DE EVANS (µl)
1/ 1.500	500	1.000
1/ 2.000	1.000	1.000
1/ 2.500	1.500	1.000
1/ 3.000	2.000	1.000
1/ 3.500	2.500	1.000
1/ 4.000	3.000	1.000
1/ 4.500	3.500	1.000
1/ 5.000	4.000	1.000



Figura 5 - Foto do leitor de micro-placas de ELISA - BIO TEK BT-100.

Após obtenção das densidades ópticas, os resultados foram submetidos à análise de regressão linear para se obter a equação da reta e o coeficiente de correlação (r) entre as densidades ópticas e as concentrações do azul de Evans.

3.4.2 Determinação da curva padrão do azul de Evans em plasma

Submeteu-se a solução do azul de Evans a 2,5% a uma série de diluições em plasma de ratos não envolvidos com o experimento.

Calculou-se o coeficiente de extinção a um filtro de 620 nm de comprimento de onda, frente a um branco de plasma de ratos, nas diluições compreendidas entre 1/256 a 1/4096 (tabela II) utilizando um leitor de microplacas de ELISA.

Tabela II - Preparação das diluições da solução do azul de Evans em plasma de ratos.

DILUIÇÃO	VOLUME DE PLASMA DE RATOS (μ l)	VOLUME DE SOLUÇÃO PADRÃO DO AZUL DE EVANS (μ l)
1/ 256	1.000	1.000 μ l da diluição prévia 1/128
1/ 512	1.000	1.000 μ l da diluição prévia 1/256
1/ 1024	1.000	1.000 μ l da diluição prévia 1/512
1/ 2.048	1.000	1.000 μ l da diluição prévia 1/1024
1/ 4.096	1.000	1.000 μ l da diluição prévia 1/2048

Após a obtenção das densidades ópticas, os resultados foram submetidos à análise de regressão linear, para se obter a equação da reta e o coeficiente de correlação (r) entre as densidades ópticas e as concentrações do azul de Evans.

3.4.3 Aferição do azul de Evans no fragmento de cólon

Das amostras de formamida com o corante azul de Evans, extraído do fragmento de cólon, 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 com filtro de 620 nm de comprimento de onda. Foi utilizada solução de formamida como branco para o teste.

As leituras obtidas foram extrapoladas na curva padrão da solução do azul de Evans em solução fisiológica e as concentrações das amostras calculadas em microgramas por mililitro e microgramas por grama de fragmento de cólon.

3.4.4 Aferição do azul de Evans na amostra de plasma

As amostras plasmáticas foram descongeladas à temperatura ambiente. Utilizando pipeta automática, foram realizadas diluições com solução fisiológica e distribuiu-se 150 µl de cada amostra nos orifícios da placa de Terazaki e posteriormente determinou-se espectrofotometricamente as densidades ópticas, em leitor de ELISA com filtro de 620 nm de comprimento de onda. Foi utilizado plasma de ratos não inoculados com azul de Evans, como branco para a leitura. As leituras obtidas foram extrapoladas na curva padrão da solução do azul de Evans em plasma e calculadas as concentrações das amostras em microgramas por mililitro.

3.4.5 Aferição histológica do fragmento de cólon

As lâminas com os cortes histológicos foram aferidas seguindo-se os critérios de graduação histológica da indução e do reparo da lesão proposto por MORAES em 1987, como segue nas tabelas III e IV respectivamente.

Tabela III - Graduação histológica - Indução

GRAU	ASPECTOS HISTOLÓGICOS
0	mucosa normal
I	<p>espessamento mucoso por edema; criptas alongadas de base dilatada; degeneração celular epitelial focal; exsudato polimorfonuclear, edema, hemorragia e dilatação linfática no córion; muscular da mucosa dissociada por edema; edema, dilatação, congestão vascular, marginação leucocitária na submucosa.</p>
II	<p>mucosa adelgada; criptas encurtadas de base dilatada; degeneração celular epitelial; realce das fibras colágenas na submucosa (por edema e tumefação das fibras)</p>
III	<p>mucosa com extenso desaparecimento de criptas; criptas remanescentes isoladas; presença de pseudomembranas fibrino-leucocitárias em áreas de erosão do epitélio de superfície sem depressão; exsudato polimorfonuclear, hemorragia recente.</p>
IV	<p>mucosa com ulceração superficial (profundidade túnica mucosa); aspecto hialino homogêneo da mucosa (áreas de desaparecimento de criptas); exsudato polimorfonuclear e hemorragia acentuados na submucosa.</p>
V	<p>ulceração profunda (atinge túnica submucosa); restos celulares necróticos desprendendo-se para a luz; ilhas de mucosa inflamada; exsudato polimorfonuclear acentuado na submucosa; desaparecimento da muscular da mucosa; edema e exsudato polimorfonuclear na camada muscular própria; tecido conjuntivo proliferado na submucosa com início de organização (proliferação de vasos capilares, fibroblastos e infiltrado monomorfonuclear).</p>
VI	<p>ulceração profunda (atinge túnica muscular própria); fragmentos de tecido necrótico e exsudato fibrino-leucocitário descamados para a luz; tecido de granulação na submucosa.</p>

Tabela IV - Graduação histológica - Reparo

GRAU	ASPECTOS HISTOLÓGICOS
e	ulceração profunda (atinge túnica muscular própria); fragmentos de tecido necrótico e exsudato fibrino-leucocitário descamados para a luz; tecido de granulação na submucosa.
d	redução da profundidade da úlceras (nível submucoso); criptas regenerativas adjacentes; submucosa rica em vasos capilares neoformados; infiltrado inflamatório misto, polimorfo e monomorfonuclear; hemossiderina.
c	maior redução da profundidade do leito ulceroso e reepitelização na periferia; criptas adjacentes tortuosas, epitélio pseudo-extratificado, muco reduzido e mitoses na base das criptas; submucosa rica em vasos neoformados; infiltrado inflamatório monomorfonuclear predominante.
b	reepitelização da superfície mucosa com incorporação de áreas hialinas; infiltrado inflamatório submucoso monomorfonuclear, discreto.
a	reepitelização da superfície mucosa; criptas colônicas refeitas; submucosa com focos de fibrose residual (seqüela); ausência de infiltrado inflamatório; vasos ectasiados na submucosa (seqüela).

3.5 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

3.5.1 Análise de regressão linear e correlação

Para a validação dos resultados espectrofotométricos das amostras plasmáticas e colônicas frente às respectivas curvas padrões de calibração, empregou-se a análise de correlação para obtenção dos coeficientes de correlação (r) (BOX, HUNTER e HUNTER, 1978).

Após a obtenção das aferições histológicas e espectrofotométricas do Grupo I, a partir do 7º dia de observação, empregou-se também a análise de regressão linear e correlação (r) para comparar estes resultados.

Em uma primeira etapa de cálculos, transformou-se a escala nominal dos achados histológicos, a partir do 7º dia de observação, em escala numérica pela atribuição de fatores de correção (figura 6) (BOX, HUNTER e HUNTER, 1978).

Escala 1	<table style="margin: auto; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;">(0)</td> <td style="padding: 5px;">(1)</td> <td style="padding: 5px;">(2)</td> <td style="padding: 5px;">(3)</td> <td style="padding: 5px;">(4)</td> <td style="padding: 5px;">(5)</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">I</td> <td style="padding: 5px;">II</td> <td style="padding: 5px;">III</td> <td style="padding: 5px;">IV</td> <td style="padding: 5px;">V</td> <td style="padding: 5px;">VI</td> </tr> </table> <hr style="border: 1px solid black; margin: 5px 0;"/> <table style="margin: auto; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;">a</td> <td style="padding: 5px;">b</td> <td style="padding: 5px;">c</td> <td style="padding: 5px;">d</td> <td style="padding: 5px;">e</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">(0)</td> <td style="padding: 5px;">(1)</td> <td style="padding: 5px;">(2)</td> <td style="padding: 5px;">(3)</td> <td style="padding: 5px;">(4)</td> </tr> </table>	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	I	II	III	IV	V	VI	a	b	c	d	e	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)
(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)																		
I	II	III	IV	V	VI																		
a	b	c	d	e																			
(0)	(1)	(2)	(3)	(4)																			
Escala 2	<table style="margin: auto; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;">(0)</td> <td style="padding: 5px;">(4)</td> <td style="padding: 5px;">(8)</td> <td style="padding: 5px;">(12)</td> <td style="padding: 5px;">(16)</td> <td style="padding: 5px;">(20)</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">I</td> <td style="padding: 5px;">II</td> <td style="padding: 5px;">III</td> <td style="padding: 5px;">IV</td> <td style="padding: 5px;">V</td> <td style="padding: 5px;">VI</td> </tr> </table> <hr style="border: 1px solid black; margin: 5px 0;"/> <table style="margin: auto; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;">a</td> <td style="padding: 5px;">b</td> <td style="padding: 5px;">c</td> <td style="padding: 5px;">d</td> <td style="padding: 5px;">e</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">(0)</td> <td style="padding: 5px;">(5)</td> <td style="padding: 5px;">(10)</td> <td style="padding: 5px;">(15)</td> <td style="padding: 5px;">(20)</td> </tr> </table>	(0)	(4)	(8)	(12)	(16)	(20)	I	II	III	IV	V	VI	a	b	c	d	e	(0)	(5)	(10)	(15)	(20)
(0)	(4)	(8)	(12)	(16)	(20)																		
I	II	III	IV	V	VI																		
a	b	c	d	e																			
(0)	(5)	(10)	(15)	(20)																			

Figura 6 - Demonstrativo das escalas para transformação os valores nominais das alterações histológicas, em valores numéricos.

Para obter os valores da Escala 2, tomou-se os fatores 4 e 5 nas paralelas da Escala 1 e permutou-se o produto destes pelos valores atribuídos de 0 a 5 e 0 a 4.

A partir desses novos valores obteve-se médias histológicas numéricas, representativas das alterações microscópicas observadas nos fragmentos colônicos.

3.5.2 Análise de Variância

Com o propósito de comparar os resultados médios das aferições do azul de Evans colônico do Grupo I, no 7º, 9º, 16º, 21º e 36º dias, adotou-se os seguintes critérios:

1. Os resultados médios que se encontravam entre os valores de referência, obtidos no estudo de BORDÓN DE CORVALÁN (1994), foram considerados normais;

2. Os resultados que não se encontravam entre estes valores, foram submetidos ao *student-t test* (BOX, HUNTER e HUNTER, 1978), para avaliar se a diferença numérica entre estes era significativa.

3.5.3 Cálculo de média e desvio padrão

Executados automaticamente através de calculadora Casio® F705-PX.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 CURVA PADRÃO DO AZUL DE EVANS

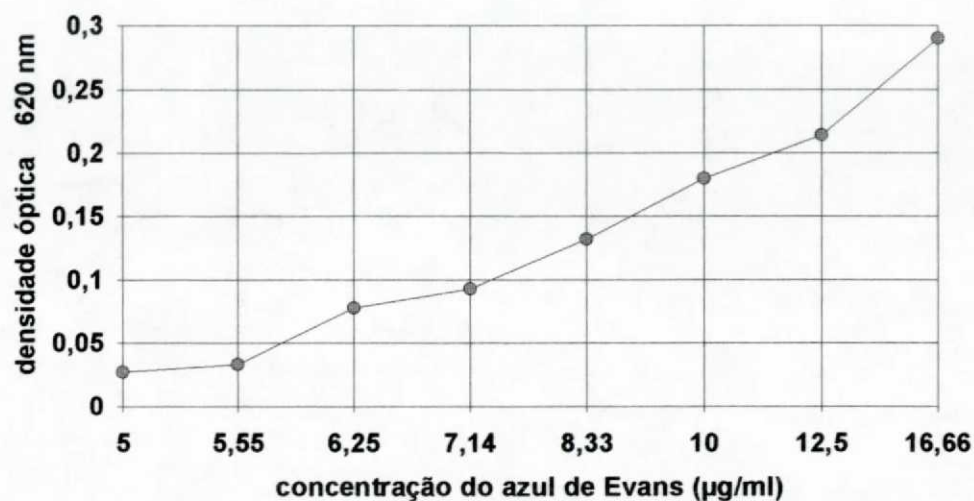
4.1.1 Curva padrão do azul de Evans em solução fisiológica

Os valores de densidade óptica obtidos nas diluições da solução padrão do azul de Evans em solução fisiológica em relação com as concentrações das mesmas foram analisadas e obteve-se índice de correlação (r) de 0,98424. Os valores apresentados na tabela V foram usados como referência.

Tabela V - Relação entre concentração do azul de Evans da solução padrão e densidade óptica a 620 nm frente a solução fisiológica como branco

Concentrações ($\mu\text{g/ml}$)	Densidade óptica
16,66	0,290
12,50	0,214
10,00	0,180
8,33	0,132
7,14	0,093
6,25	0,078
5,55	0,033
5,00	0,027

A correlação obtida entre as diversas concentrações da solução padrão em solução fisiológica e os respectivos valores de densidade óptica, estão demonstrados na figura 7.



coeficiente de correlação (r) = 0,98424
equação de regressão (y) = $a + bx$
 $a = 3,3312$
 $b = 42,70$
 $y = 3,3312 + 42,70 x$

Figura 7 - Distribuição gráfica e correlação (r) entre as concentrações do padrão do azul de Evans ($\mu\text{g/ml}$) e densidades ópticas a 620 nm - Curva padrão de calibração para determinações teciduais

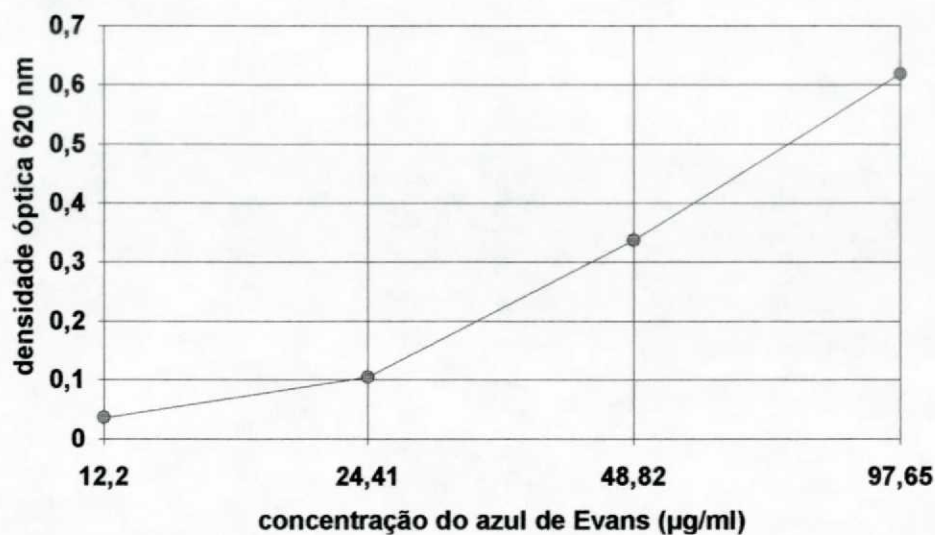
4.1.2 Curva padrão do azul de Evans em plasma

Foram analisados os valores das densidades ópticas obtidos nas diluições da solução padrão em plasma, em relação com as concentrações das mesmas para o estudo do índice de correlação (r) dos dados. Foram obtidos nas diluições da solução padrão em plasma um coeficiente de correlação (r) de 0,99539. Os valores apresentados na tabela VI foram utilizados como referência.

Tabela VI - Concentração do azul de Evans da solução padrão e densidade óptica frente a um filtro de 620 nm de comprimento de onda tendo como branco a solução fisiológica.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Densidade óptica
97,65	0,618
48,82	0,337
24,41	0,105
12,20	0,036

A curva de correlação obtida entre as concentrações do azul de Evans da solução padrão e os respectivos valores de densidade óptica estão demonstrados na figura 8.



coeficiente de correlação (r) = 0,99539
equação de regressão (y) = $a + bx$
 $a = -0,04191$
 $b = 13,9363$
 $y = -0,04191 + 13,9363x$

Figura 8 - Distribuição gráfica da correlação (r) entre as concentrações do padrão do azul de Evans ($\mu\text{g/ml}$) e densidades ópticas à 620 nm - Curva padrão de calibração para determinações plasmáticas

Neste estudo utilizou-se 120 ratos divididos em 2 grupos os quais foram analisados em subgrupos. Durante o experimento não foram observados óbitos dos animais. A seguir serão apresentados os resultados obtidos em cada grupo.

4.2 GRUPO I - COLITE INDUZIDA

4.2.1 Peso do animal

Neste grupo foi induzida a colite em 90 ratos, cujos pesos estão demonstrados na tabela VII.

TABELA VII - Demonstrativo dos pesos (g) dos animais submetidos a indução de colite pelo ácido acético a 10% - Grupo I - colite induzida

Rato	1ºDia	2ºDia	3ºDia	5ºDia	7ºDia	9ºDia	16ºDia	21ºDia	36ºDia
1	185,50	180,20	219,90	177,10	246,80	215,00	245,20	255,70	299,60
2	195,00	196,40	176,70	225,30	246,70	248,70	287,40	275,40	297,20
3	190,00	170,70	186,70	189,20	212,20	252,90	278,20	258,00	292,50
4	189,50	160,50	224,00	205,10	246,50	250,70	282,00	251,40	282,90
5	176,60	224,80	156,70	167,60	186,50	270,30	278,20	267,40	283,90
6	197,10	187,30	146,10	239,30	146,50	226,30	283,00	262,40	306,20
7	191,80	220,40	186,60	236,80	232,40	197,40	276,20	277,00	317,70
8	192,30	203,30	211,80	193,10	299,70	215,50	258,00	260,30	309,20
9	215,50	185,10	163,40	245,50	207,60	257,10	206,00	292,30	306,40
10	190,60	201,70	162,30	215,80	226,60	243,10	264,00	264,70	299,60

4.2.2 Dose do azul de Evans

Os animais foram submetidos a um preparo intestinal, e após realizada indução da colite pela instilação de 0,5 ml de ácido acético glacial a 10% por via retal e 8 horas antes de cada período pré-determinado para o sacrifício, foi administrado azul de Evans a 2,5% através da veia peniana, na proporção de 20 mg/kg de peso do animal, obtendo-se os volumes observados na tabela VIII.

TABELA VIII - Volumes do azul de Evans (ml) inoculados, na dose de 20 mg/kg de peso de cada animal, através da veia peneana - Grupo I - colite induzida

Rato	1ºDia	2ºDia	3ºDia	5ºDia	7ºDia	9ºDia	16ºDia	21ºDia	36ºDia
1	0,17	0,12	0,17	0,14	0,19	0,17	0,19	0,20	0,23
2	0,15	0,15	0,14	0,18	0,19	0,19	0,22	0,22	0,23
3	0,15	0,13	0,15	0,15	0,16	0,20	0,22	0,20	0,23
4	0,14	0,14	0,18	0,16	0,19	0,20	0,22	0,20	0,22
5	0,18	0,14	0,12	0,13	0,14	0,21	0,22	0,21	0,22
6	0,16	0,13	0,12	0,19	0,11	0,18	0,22	0,20	0,24
7	0,18	0,14	0,15	0,18	0,18	0,18	0,22	0,22	0,25
8	0,17	0,16	0,17	0,15	0,23	0,17	0,20	0,20	0,24
9	0,18	0,16	0,13	0,19	0,16	0,20	0,16	0,23	0,24
10	0,15	0,17	0,13	0,17	0,18	0,19	0,21	0,21	0,23

4.2.3 Peso do fragmento de cólon

Após decorridos 8 horas da administração do azul de Evans, os animais foram sacrificados nos períodos pré-determinados e coletados os fragmentos colônicos, obtendo-se os pesos observados na tabela IX.

TABELA IX - Peso (g) dos fragmentos colônicos, obtidos quando do sacrifício dos animais - Grupo I - colite induzida

Rato	1ºDia	2ºDia	3ºDia	5ºDia	7ºDia	9ºDia	16ºDia	21ºDia	36ºDia
1	0,44	0,65	0,78	0,41	0,45	1,03	0,81	0,29	0,58
2	0,30	0,40	0,67	0,52	0,61	0,49	0,42	0,21	0,62
3	0,47	0,63	0,71	0,56	0,47	0,63	0,43	0,35	0,28
4	0,46	0,47	0,66	0,46	0,77	0,62	0,50	0,40	0,44
5	0,23	0,58	0,68	0,99	0,45	0,58	0,45	0,19	0,38
6	0,32	0,30	0,49	0,57	0,47	0,51	0,59	0,42	0,76
7	0,61	0,36	0,75	0,69	0,92	0,45	0,50	0,46	0,65
8	0,52	0,61	0,53	0,70	0,50	0,53	1,01	0,22	0,31
9	0,47	0,54	0,56	0,61	0,61	0,87	0,49	0,19	0,46
10	0,44	0,33	0,65	0,54	0,80	0,52	0,59	0,33	0,37

4.2.4 Volume de formamida

Aos fragmentos colônicos foi acrescentado formamida, para a extração do azul de Evans, na proporção de 4 ml/g de peso do fragmento de cólon e deixados por 24 horas à temperatura de 22°C. Observamos na tabela X o volume de formamida utilizado.

TABELA X - Volumes de formamida (ml), utilizados na proporção de 4 ml/g de peso do fragmento colônico - Grupo I - colite induzida

Rato	1ºDia	2ºDia	3ºDia	5ºDia	7ºDia	9ºDia	16ºDia	21ºDia	36ºDia
1	1,76	2,60	3,12	1,64	1,80	4,12	3,24	1,16	2,32
2	1,20	1,60	2,68	2,08	2,44	1,96	1,68	0,84	2,48
3	1,88	2,52	2,84	2,24	1,88	2,52	1,72	1,40	1,12
4	1,84	1,88	2,64	1,84	3,08	2,48	2,00	1,60	1,76
5	0,92	2,32	2,72	3,96	1,80	2,32	1,80	0,76	1,52
6	1,28	1,20	1,96	2,28	1,88	2,04	2,36	1,68	3,04
7	2,44	1,44	3,00	2,76	2,70	1,80	2,00	1,84	2,60
8	2,08	2,44	2,12	2,80	2,00	2,12	4,04	0,88	1,24
9	1,88	2,16	2,24	2,44	2,44	3,48	1,96	0,76	1,84
10	1,76	1,32	2,60	2,16	3,20	2,08	2,36	1,32	1,48

4.2.5 Concentração do azul de Evans no fragmento de cólon

Após obter-se todas as amostras de formamida com o azul de Evans extraído do fragmento de cólon, realizou-se a aferição em leitor de micro-placas de ELISA com filtro de 620 nm de comprimento de onda. Os valores estão demonstrados nas tabelas XI e XII e as respectivas representações gráficas, nas figuras 9 e 10.

TABELA XI - Resultados das dosagens do azul de Evans ($\mu\text{g/ml}$) extraído dos fragmentos colônicos - Grupo I - colite induzida

Dia	Animais(n)	L. Superior	Média	L. Inferior	SDx
1	10	24,90	24,31	23,59	0,96
2	10	25,04	24,33	23,61	1,16
3	10	19,92	19,45	18,97	0,76
5	10	17,66	17,00	16,33	1,08
7	10	16,25	15,20	14,14	1,70
9	10	13,59	12,91	12,22	1,11
16	10	11,57	10,64	9,70	1,51
21	10	12,73	12,03	11,32	1,13
36	10	13,60	12,43	11,25	1,89

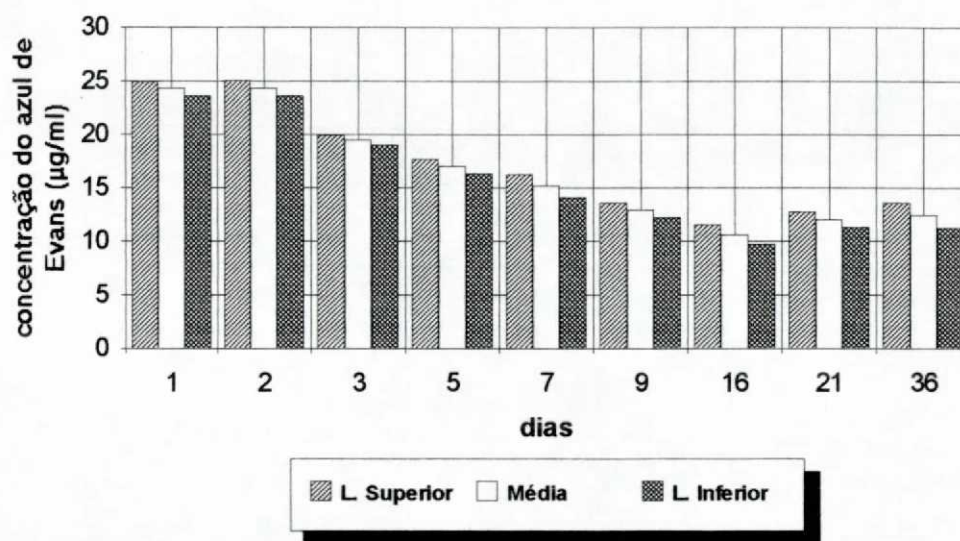


Figura 9 - Distribuição gráfica das dosagens do azul de Evans ($\mu\text{g/ml}$) extraído dos fragmentos colônicos - Grupo I - colite induzida

TABELA XII - Resultados das dosagens do azul de Evans extraído ($\mu\text{g/g}$) dos fragmentos colônicos - Grupo I - colite induzida

Dia	Animais(n)	L. Superior	Média	L. Inferior	SDx
1	10	97,83	97,24	96,54	0,96
2	10	98,03	97,32	96,60	1,16
3	10	78,27	77,80	77,32	0,76
5	10	68,66	68,00	67,33	1,08
7	10	61,85	60,80	59,74	1,70
9	10	52,32	51,64	50,95	1,11
16	10	43,49	42,56	41,62	1,51
21	10	48,82	48,12	47,41	1,13
36	10	50,89	49,72	48,54	1,89

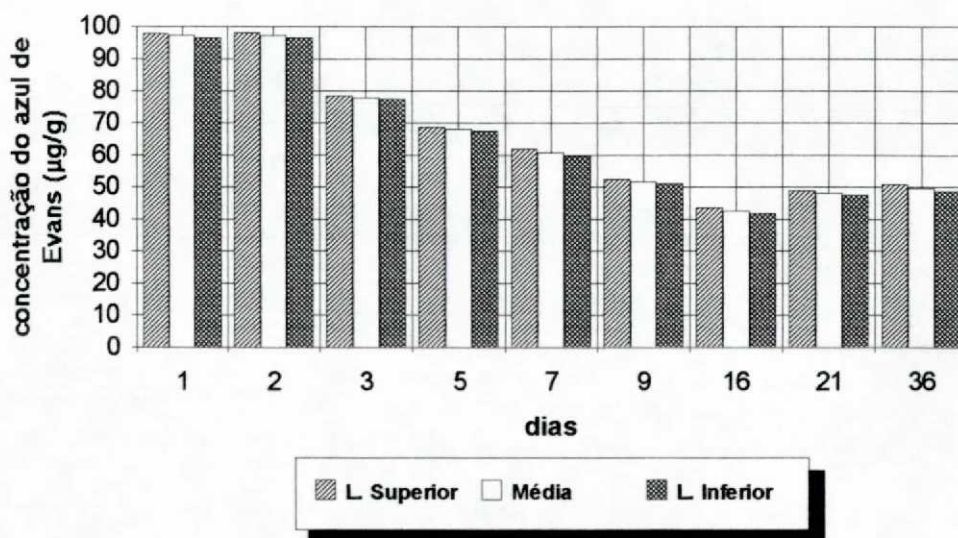


Figura 10 - Distribuição gráfica das dosagens do azul de Evans ($\mu\text{g/g}$) extraído dos fragmentos colônicos - Grupo I - colite induzida

4.2.6 Concentração do azul de Evans na amostra de plasma

Foram obtidas amostras de plasma, as quais sofreram aferição espectrofotométrica a 620 nm em leitor de ELISA, demonstrando-se estes valores na tabela XIII e representadas graficamente na figura 11.

Tabela XIII - Resultados das dosagens do azul de Evans ($\mu\text{g/ml}$) plasmático - Grupo I - colite induzida

Dia	Animais(n)	L. Superior	Média	L. Inferior	SDx
1	10	169,06	168,69	168,77	0,24
2	10	156,81	156,43	156,64	0,27
3	10	106,80	106,63	106,67	0,11
5	10	166,72	166,46	166,53	0,16
7	10	163,44	162,94	163,05	0,31
9	10	152,56	152,21	152,29	0,22
16	10	164,55	164,23	164,46	0,07
21	10	170,07	169,25	169,78	0,24
36	10	197,89	197,56	197,64	0,20

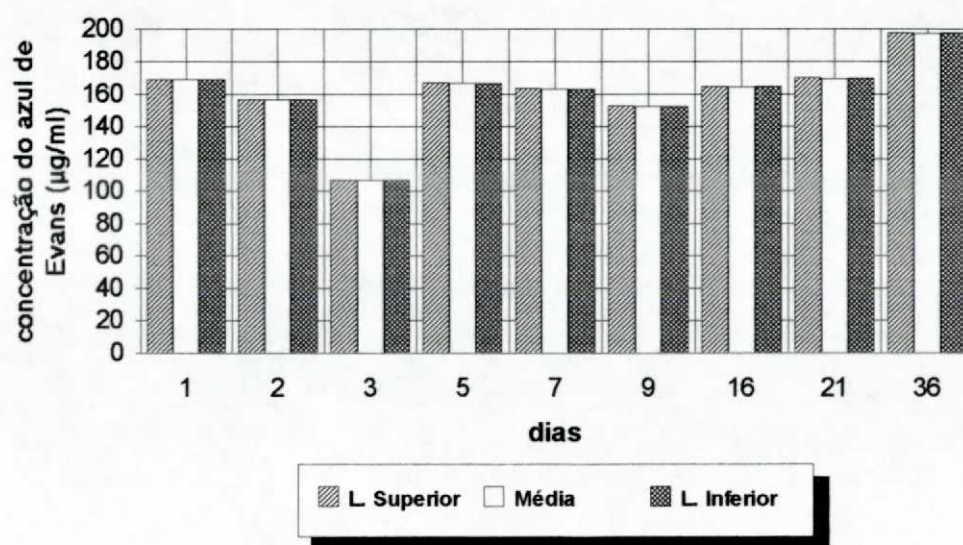


Figura 11 - Distribuição gráfica das dosagens do azul de Evans ($\mu\text{g/ml}$) plasmático - Grupo I - colite induzida

4.2.7 Avaliação histológica do fragmento de cólon

Cada um dos fragmentos colônicos obtidos, foi submetido a processamento histológico, que foi analisado obedecendo-se os critérios de graduação histológica de indução e reparo segundo as tabelas I e II respectivamente. Obteve-se os resultados apresentados na tabela XIV.

TABELA XIV - Graduação histológica (indução - reparo) - Grupo I - colite induzida

Dia	Animais (n=10)	Grau
1	2	II
	1	III
	7	IV
2	2	I
	1	III
	4	IV
	1	V
	2	VI
3	2	I
	3	V
	5	VI
5	3	I
	2	III
	1	IV
	3	VI
	1	b
7	1	I
	1	II
	1	IV
	7	VI
9	2	IV
	1	c
	4	b
	3	a
16	1	d
	2	c
	6	b
	1	a
21	1	e
	1	b
	8	a
36	10	a

Várias alterações foram observadas na submucosa, como a presença de edema, observada com maior intensidade no 1º dia , não sendo mais encontrada de maneira significativa a partir do 7º dia.

A hemorragia na submucosa, estava presente desde o 1º até o 3º dia, quando não foi mais identificada.

Foi encontrado um importante infiltrado inflamatório polimorfonuclear a partir do 1º dia que se estendeu até o 9º dia, quando se modifica para um infiltrado monomorfonuclear.

Identificou-se um caso de abscesso críptico no 16º dia e outro no 21º dia.

A partir do 9º dia, quando se iniciou o processo de reparação, observou-se a presença de estruturas que se assemelham a pólipos inflamatórios.

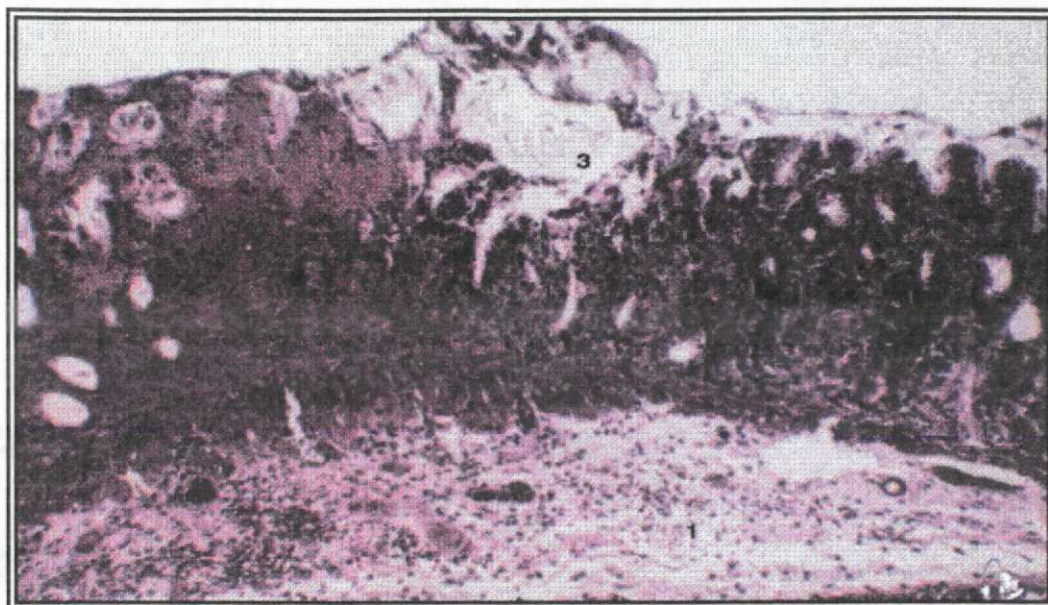


Figura 12- Fotomicrografia do tecido colônico no 1º dia após a indução do processo inflamatório pelo ácido acético a 10%: 1- edema de submucosa; 2- necrose coagulativa da mucosa; 3- úlcera de mucosa (Hematoxilina-Eosina, aumento de 20 vezes)

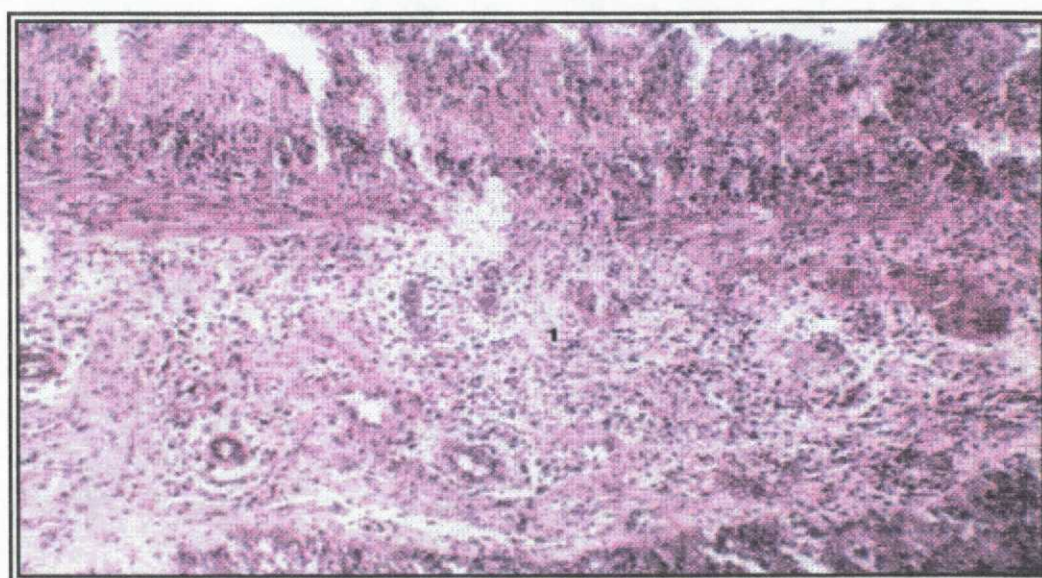


Figura 13- Fotomicrografia do tecido colônico no 2º dia após a indução do processo inflamatório pelo ácido acético a 10%: 1- edema e infiltrado leucocitário da submucosa (Hematoxilina-Eosina, aumento 40 vezes)

4.3 GRUPO II - CONTROLE

Para eliminar a variável causada pelo traumatismo do cateter na parede colônica no momento da instilação do ácido acético glacial a 10%, foi realizado o mesmo procedimento em um grupo com 30 ratos divididos em subgrupos de 1º dia, 2º dia e 3º dia, com 10 animais cada, onde instilou-se 0,5 ml de solução fisiológica por via retal.

Para este grupo foi adotada a mesma seqüência metodológica empregada para o Grupo I, onde se obteve os seguintes resultados:

4.3.1 Peso do animal

Peso dos animais no período pré-determinado para o sacrifício, tabela XV.

TABELA XV - Demonstrativo dos pesos (g) dos animais submetidos a indução de colite pelo ácido acético a 10% - Grupo II - controle

Rato	1ºDia	2ºDia	3ºDia
1	279,00	261,60	313,70
2	328,60	293,90	219,40
3	303,40	232,20	217,90
4	203,40	302,80	289,00
5	278,10	284,50	275,30
6	183,20	323,20	206,20
7	224,40	331,40	210,50
8	296,30	308,30	190,00
9	281,00	336,00	335,00
10	297,80	292,50	262,20

4.3.2 Dose do azul de Evans

Volumes do azul de Evans administrados na dose de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso do animal, estão representados em mililitros na tabela XVI.

TABELA XVI - Volumes do azul de Evans (ml) inoculados, na dose de 20 mg/kg de peso de cada animal, através da veia peneana - Grupo II - controle

Rato	1ºDia	2ºDia	3ºDia
1	0,22	0,20	0,25
2	0,26	0,23	0,18
3	0,24	0,18	0,17
4	0,16	0,24	0,17
5	0,22	0,22	0,23
6	0,14	0,25	0,22
7	0,17	0,26	0,16
8	0,23	0,25	0,16
9	0,22	0,24	0,15
10	0,23	0,26	0,21

4.3.3 Peso do fragmento de cólon

Valor dos pesos dos fragmentos colônicos em gramas, representados na tabela XVII.

TABELA XVII - Peso (g) dos fragmentos colônicos, obtidos quando do sacrifício dos animais - Grupo II - controle

Rato	1ºDia	2ºDia	3ºDia
1	0,45	0,41	0,25
2	0,39	0,33	0,25
3	0,25	0,27	0,32
4	0,32	0,41	0,37
5	0,33	0,33	0,36
6	0,20	0,27	0,48
7	0,41	0,30	0,41
8	0,28	0,25	0,59
9	0,24	0,39	0,43
10	0,33	0,33	0,33

4.3.4 Volume de formamida

Volumes de formamida em mililitros, observados na tabela XVIII.

TABELA XVIII - Volumes de formamida (ml), utilizados na proporção de 4 ml/g de peso do fragmento colônico - Grupo II - controle

Rato	1ºDia	2ºDia	3ºDia
1	1,80	1,64	1,00
2	1,56	1,32	1,00
3	1,00	1,08	1,28
4	1,28	1,64	1,48
5	1,32	1,32	1,44
6	0,80	1,08	1,92
7	1,64	1,20	1,64
8	1,12	1,00	2,36
9	0,96	1,56	1,72
10	1,32	1,32	1,32

4.3.5 Concentração do azul de Evans no fragmento de cólon

Os valores das aferições espectrofotométricas em leitor de ELISA, frente a um filtro de 620 nm de comprimento de onda, obtidos das amostras colônicas, são apresentados na tabela XIX em micrograma por mililitro de formamida e na tabela XX em micrograma por grama de peso do fragmento colônico. As figuras 14 e 15 são representações gráficas das tabelas XIX e XX respectivamente.

TABELA XIX - Resultados das dosagens do azul de Evans ($\mu\text{g/ml}$) extraído dos fragmentos colônicos - Grupo II - controle

Dia	Animais(n)	L. Superior	Média	L. Inferior	SDx
1	10	11,48	11,03	10,57	0,73
2	10	13,05	12,36	11,68	1,12
3	10	13,35	12,83	12,30	0,85

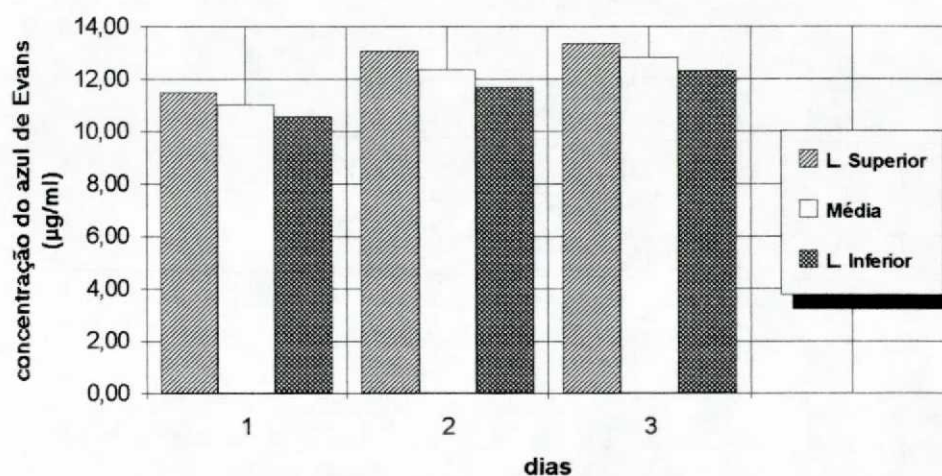


Figura 14 - Distribuição gráfica das dosagens do azul de Evans ($\mu\text{g/ml}$) extraído dos fragmentos colônicos - Grupo II - controle

TABELA XX - Resultados das dosagens do azul de Evans ($\mu\text{g/g}$) extraído dos fragmentos colônicos - Grupo II - controle

Dia	Animais(n)	L. Superior	Média	L. Inferior	SDx
1	10	45,92	44,12	42,31	2,92
2	10	52,21	49,44	46,66	4,48
3	10	53,42	51,32	49,21	3,40

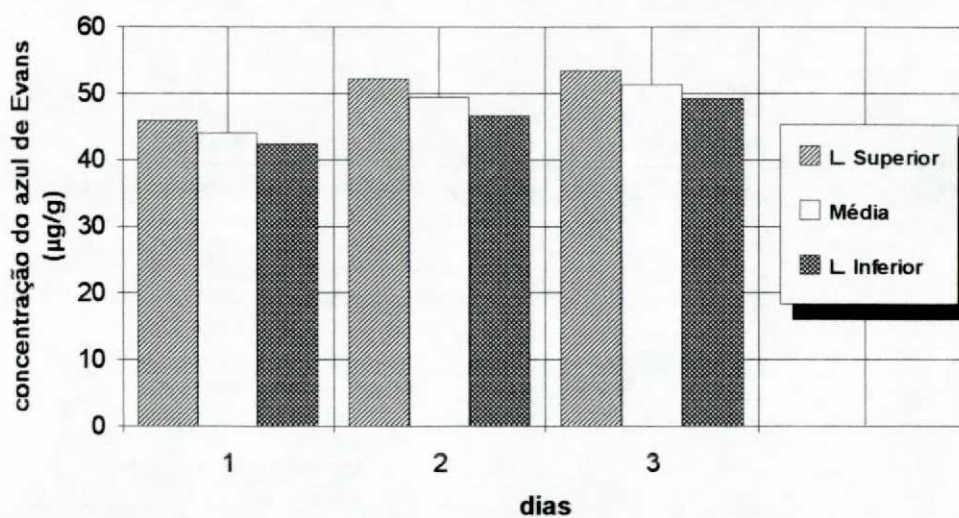


Figura 15 - Distribuição gráfica das dosagens do azul de Evans ($\mu\text{g/g}$) extraído dos fragmentos colônicos - Grupo II - controle

4.3.6 Concentração do azul de Evans na amostra de plasma

Valores das aferições espectrofotométricas obtidos das amostras plasmáticas em microgramas por mililitros, apresentados na tabela XXI e representados graficamente na figura 16.

TABELA XXI - Resultados das dosagens do azul de Evans ($\mu\text{g/ml}$) plasmático - Grupo II - controle

Dia	Animais(n)	L. Superior	Média	L. Inferior	SDx
1	10	163,87	163,50	163,12	0,60
2	10	158,94	158,20	157,45	1,20
3	10	174,36	173,50	172,63	1,40

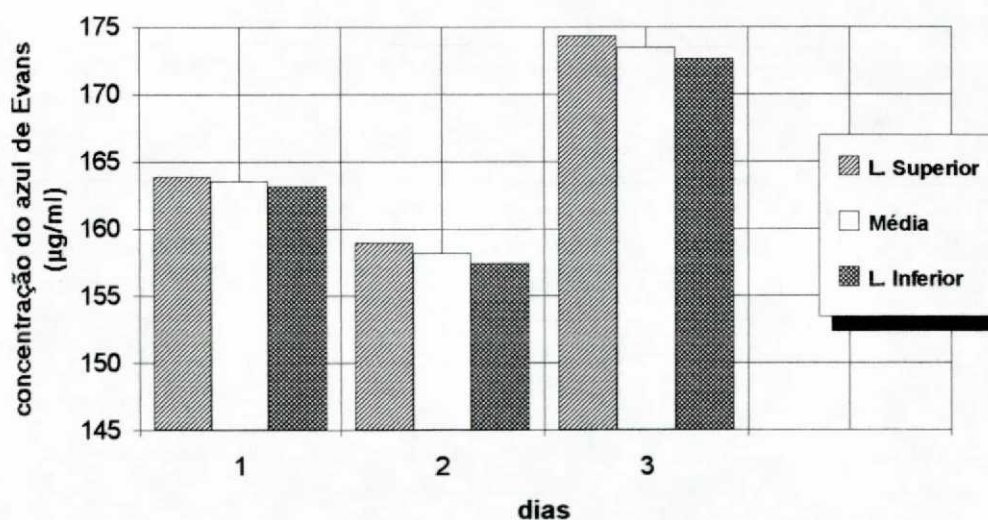


Figura 16 - Distribuição gráfica das dosagens do azul de Evans ($\mu\text{g/ml}$) plasmático - Grupo II - controle

4.3.7 Aferição histológica do fragmento de cólon

As avaliações histológicas dos fragmentos colônicos do Grupo II (Grupo controle) não apresentaram alterações.

4.4 CORRELAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS HISTOLÓGICAS E DO AZUL DE EVANS COLÔNICO NO GRUPO I DO 7º AO 36º DIA

Com as médias numéricas histológicas calculadas (tabela XXII) foi possível aplicar a análise de regressão linear e obteve-se um coeficiente (r) de 0,7002 entre a evolução histológica do processo inflamatório induzido e as determinações espectrofotométricas do azul de Evans colônico (figura 17).

Tabela XXII - Representação dos valores obtidos para a transformação numérica das médias histológicas nominais e valores médios determinados espectrofotometricamente do azul de Evans colônico do 7º ao 36º dia.

Dia	Número de animais - graduação histológica	Transformação numérica	Média histológica	Média de dosagem do azul de Evans ($\mu\text{g/g}$)
7	1 - I 1 - II 1 - IV 7 - VI	0 4 12 20	15,6	60,8
9	2 - IV 1 - c 4 - b 3 - a	12 10 15 0	5,4	51,64
16	1 - d 2 - c 6 - b 1 - a	15 10 5 0	6,5	42,56
21	1 - e 1 - b 8 - a	20 5 0	2,5	48,12
36	10 - a	0	0	49,72

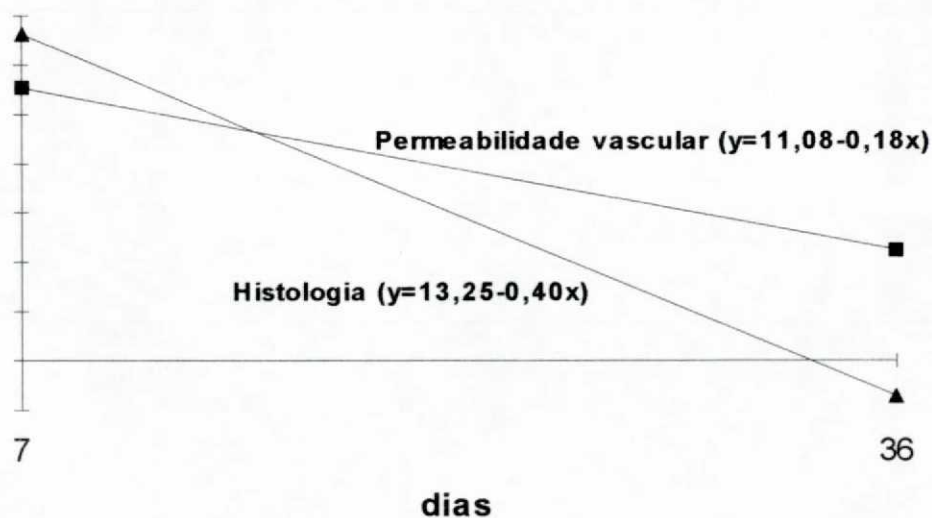


Figura 17 - Representação gráfica da evolução histológica e permeabilidade vascular do azul de Evans em cólon de ratos na vigência de reação inflamatória induzida pelo ácido acético a 10% do 7º ao 36º dia ($r = 0,7002$).

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 MODELO EXPERIMENTAL

Inúmeros pesquisadores tentam através de modelos experimentais reproduzir a doença inflamatória intestinal de humanos. Essa tentativa foi acompanhada de dificuldades técnicas e pela utilização em laboratório de animais de grande porte (KIRSNER, 1961; LEVEEN, FALK e SCHATMAN, 1961; BICKS e WALKER, 1962). Por isso, nesse experimento optou-se pela utilização do rato, por ser ele de fácil manipulação, exigir pequeno espaço para confinamento e permitindo o uso de grande número de animais. Além disso, outro fator determinante para a escolha deste animal, foi o fato de que BORDÓN DE CORVALÁN (1994) também ter utilizado o rato para a determinação das concentrações do azul de Evans colônico não lesionado e plasma.

Vários agentes foram e continuam a ser utilizados na indução de colite em ratos, como bactérias (HALPERN, ZWEIBAUM, ORIOL PALOU e MORARD, 1967; ZWEIBAUM, MORARD e HALPERN, 1968), reações imunológicas (ORIOL PALOU, HALPERN, ZWEIBAUM, MORARD, VEYRE e ABADIE, 1967;) e agentes físicos e químicos (SOMMERS e WARREN, 1955; MARCUS e WATT, 1969; MACPHERSON e PFEIFFER, 1978; MORAES, 1987; CHESTER, 1985; MORRIS, BECK, HARRIDGE, DEPEW, SZEWCZUK e WALLACE, 1989; OKAYASU, HATAKEYAMA, YAMADA, OHKUSA, INAGAKI e NAKAYA, 1990). Neste estudo optou-se pelo modelo experimental proposto por MORAES (1987), que induziu colite em ratos com ácido acético a 10% instilado pela via retal, por ser de fácil reprodução e apresentar lesões inflamatórias histologicamente similares a doença inflamatória em humanos. Outro aspecto a ser considerado é que o

modelo experimental em estudo e a colite do homem apresentam semelhanças no metabolismo do ácido araquidônico (SHARON e STENSON, 1985).

5.2 ESCOLHA DO MODELO DE AFERIÇÃO

Revisando-se a literatura não se encontrou relatos da utilização do azul de Evans na avaliação da colite em ratos. Encontrou-se métodos que por estudos histológicos e bioquímicos fazem a aferição do processo inflamatório utilizando as determinações de celularidade e mensuração das criptas da mucosa dos fragmentos colônicos no processo inflamatório (MACPHERSON e PFEIFFER, 1978; OKAYASU, HATAKEYAMA, YAMADA, OHKUSA, INAGAKI e NAKAYA, 1990; MORAES, REPKA, TELES, BRENNER e HENNING, 1992), quantificações dos produtos finais do metabolismo do ácido araquidônico (VILLASECA, SALAS, GUARNER, RODRIGUEZ e MALAGELADA, 1990; SIMMONS, SALMON e MONCADA, 1983; SHARON e STENSON, 1988). Este estudo se propõe avaliar a permeabilidade vascular decorrente da inflamação induzida pelo ácido acético a 10%, através da determinação das concentrações do azul de Evans, em cólon de ratos, relacionando-as com as alterações histológicas.

Valendo-se das propriedades do azul de Evans em se combinar à albumina plasmática e formar um complexo corante-albumina, conforme demonstraram, RAWSON (1943); LEVEEN e FISHMAN (1947); FREEDMAN e JOHNSON (1969), da capacidade deste complexo em ultrapassar a barreira endotelial durante as alterações da permeabilidade vascular no processo inflamatório como demonstraram os estudos de STEELE e WILHEM (1966); UDAKA, 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) e dos estudos da determinação das concentrações deste corante em diversos órgãos apresentados no experimento de GREEN, JOHNSON, MARCHESSAULT e GATTO (1988), desenvolveu-se um método para a avaliação do processo inflamatório da colite induzida por ácido acético a 10% instilado pela via retal, em ratos, através da determinação espectrofotométrica das concentrações do azul de Evans.

Neste estudo utilizou-se o método de aferição espectrofotométrica, através de um leitor de micro-placas de ELISA, por ser ele de fácil manipulação, não utilizar materiais radioativos, necessitar de somente 150 µl da amostra e pela rapidez com que se analisa múltiplas amostras consecutivamente. Além disso, apresenta vantagens sobre os outros métodos que avaliam o processo inflamatório pela quantificação dos derivados do ácido araquidônico e que necessitam de instrumentais como *HPLC (high performance liquid chromatography)* (VILLASECA, SALAS, GUARNER, RODRIGUEZ e MALAGELADA, 1990) e radioimunoensaio (SIMMONS, SALMON e MONCADA, 1983; VILLASECA, SALAS, GUARNER,

RODRIGUEZ e MALAGELADA, 1990; ROBINS, COTRAN e KUMAR, 1991)

Para esse estudo utilizou-se como padrão de normalidade as concentrações do azul de Evans determinadas espectrofotometricamente no estudo de BORDÓN DE CORVALÁN (1994) em cólon não lesionado e plasma de ratos. Descreveu este autor que no período de 8 horas após a inoculação do corante, os níveis em tecido colônico apresentavam concentração máxima. Sendo assim, optou-se por este horário para a inoculação do corante antes do sacrifício, por entender-se que, todas as concentrações acima daquela tida como normal, refletiriam algum tipo de alteração na permeabilidade vascular do cólon do animal em estudo.

5.3 DOSAGEM DO AZUL DE EVANS E AFERIÇÃO HISTOLÓGICA

Com o objetivo de eliminar a variável causada pelo traumatismo do cateter, usado para a instilação do ácido acético, foi realizado um grupo controle com a instilação de 0,5 ml de solução fisiológica e acompanhamento por 3 dias dos animais. Obtendo-se concentrações do corante (tabela XX) que estavam entre os valores normais (39,60 a 57,04 $\mu\text{g/g}$) do estudo de BORDÓN DE CORVALÁN (1994), demonstrando que o cateter não causou trauma na mucosa colônica suficiente para que as concentrações do azul de Evans se alterasse.

Os valores encontrados no Grupo I (colite induzida) (tabela XII) apresentaram-se elevados desde o 1º até o 7º dia de observação em relação aos valores obtidos por BORDÓN DE CORVALÁN (1994) (39,60 a 57,04 $\mu\text{g/g}$) e pelo Grupo II (controle) (tabela XX). Esses resultados demonstraram que a ação do ácido acético a 10 % determinou elevação das concentrações normais do azul de Evans, devido a um aumento da permeabilidade vascular induzida

pelo processo inflamatório colônico. Pela análise estatística efetuada do valor mínimo de determinação colônica do azul de Evans no 7º dia (59,04 µg/g), e o valor máximo de referência obtido por BORDÓN DE CORVALÁN (1994) (57,04 µg/g), apresentam $p = 0,0037$, o que denotou diferença estatisticamente significativa. A partir do 7º dia até 36º dia de observação, os valores obtidos (tabela XII) não diferem dos valores encontrados no grupo controle (tabela XX) e nos estudos de BORDÓN DE CORVALÁN (1994), o que reflete uma provável normalização do fluxo transcapilar do corante.

Para se obter um outro critério de aferição do modelo aqui proposto, realizou-se o estudo histológico dos fragmentos colônicos dos Grupos I e II, grupo da colite induzida e controle respectivamente.

Não foram observadas alterações histológicas no grupo controle, demonstrando que não houve agressão sobre o tecido colônico do animal.

Utilizaram-se os critérios de graduação de indução e reparo (tabela III e IV) do tecido colônico, propostos por MORAES (1987), para se classificar histologicamente as lesões inflamatórias encontradas. As alterações histológicas encontradas nos animais do Grupo I, relacionadas na tabela XIV, são similares àquelas encontradas por MORAES (1987) e MACPHERSON e PFEIFFER (1978). Do 1º ao 7º dia de observação verificou-se nos espécimes coletados, um incremento do processo inflamatório, caracterizado por: espessamento mucoso por edema, exsudato polimorfonuclear, hemorragia, dilatação linfática no córion muscular, congestão vascular e marginação leucocitária na submucosa. Estas alterações evoluíram até o 7º dia, onde observou-se ulceração profunda atingindo túnica muscular própria, fragmentos de tecidos necróticos, exsudato fibrino-leucocitário e tecido de granulação na submucosa.

Os achados acima descritos, nesta primeira fase, quando comparados no mesmo período aos resultados encontrados nas determinações do azul de Evans colônico do Grupo I, podemos afirmar que são inversamente proporcionais ou seja, enquanto ocorre incremento da reação inflamatória comprovada histologicamente, desenvolve concomitantemente tendência ao equilíbrio do fluxo transvascular pois, do 1º ao 7º dia os valores do azul de Evans colônico encontrados no Grupo I são decrescentes (figura 10). Este fato decorre da diminuição do processo hemorrágico que se instala desde o 1º ao 7º dia também de forma decrescente. Portanto os valores do azul de Evans desta fase refletem mais o processo hemorrágico que o processo inflamatório induzido. Estudos vindouros poderão ser aplicados no que se referem a mensuração do azul de Evans tecidual em vigência de hemorragia, como por exemplo: a utilização de soluções que degradem a hemoglobina nos sítios hemorrágicos, formando cianometahemoglobina precipitada nos tecidos. Desta forma, poder-se-ia mensurar exclusivamente o complexo corante-albumina exsudado.

Na segunda fase deste estudo que corresponde ao período entre 7º e 36º dia de observação, encontrou-se uma reorganização tecidual do processo inflamatório induzido, que se caracterizou ao seu término, por uma reepitelização da superfície mucosa e ausência de infiltrado inflamatório. É importante enfatizar que nesta fase os achados histológicos e as determinações do azul de Evans teciduais do Grupo I apresentam uma mesma tendência ou seja, a normalização do fluxo transvascular anteriormente elevado, que se traduz estatisticamente pelo coeficiente de correlação $r = 0,7002$. Isto reflete a diminuição das reações inflamatórias induzidas comprovadas histologicamente. Conforme a figura 17, observa-se que a tendência de normalização histológica é precoce em relação à normalização da permeabilidade vascular.

Com relação a dosagem do azul de Evans plasmático não foram observadas alterações que pudessem ser relacionadas ao processo inflamatório induzido neste estudo.

Os valores plasmáticos descritos por BORDÓN DE CORVALÁN (1994) na inoculação do corante 8 horas antes do sacrifício do animal, que refletia o nível máximo de exsudação do azul de Evans em nível colônico, apresentou valores de 126,6 a 189,1 $\mu\text{g/ml}$ de plasma. Os valores obtidos neste estudo estão compreendidos no intervalo acima descrito, o que denota que a permeabilidade vascular alterada, comprovada pela determinação do azul de Evans colônico no processo inflamatório induzido, não altera os níveis plasmáticos do corante. Por outro lado GREEN, JOHNSON, MARCHESSAULT e GATTO (1988) demonstraram em seus estudos, que drogas de ação sistêmica como a histamina, bradicinina e endotoxinas podem determinar alterações do fluxo transvascular capazes de serem determinadas pelos níveis plasmáticos do azul de Evans.

Podemos afirmar que este novo método proposto para a avaliação da permeabilidade vascular da colite induzida em ratos, pode ser usado para avaliar a evolução do processo inflamatório pelas determinações das concentrações teciduais do azul de Evans. Desta forma, este método pode ser útil para futuros estudos de fisiopatologia e da ação de drogas, com propostas terapêuticas sobre as doenças inflamatórias colônicas.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

As determinações das concentrações do azul de Evans teciduais pelo micrométodo espectrofotométrico, são capazes de avaliar as alterações da permeabilidade vascular causadas pelas reações inflamatórias colônicas induzidas pelo ácido acético a 10% em ratos Wistar.

As alterações histológicas encontradas no tecido colônico de ratos, após a instilação do ácido acético a 10%, apresentam correlação com as concentrações do azul de Evans teciduais a partir do 7º dia de observação.

7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- BICKS, R. O.; WALKER, R. H. *Immunologic colitis in dogs. American Journal of Digestive Diseases*, New York, v. 7, p. 574-584, 1962.
- BORDÓN DE CORVALÁN, 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.
- BOX, G.; HUNTER, W.; HUNTER, J. **Statistics for experimenter - an introduction to design data analysis and model building**, 1. ed., New York, John Wiley & Sons, 1978.
- 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.
- 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.
- CHESTER, J. F. *Acute colitis produced by chemotactic peptides in rats and mice. American Journal of Pathology*, Philadelphia, v. 121, p. 284-290, 1985.
- COTRAN, 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.

- 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.
- FLORES, C. A.; MELO, R.; FERREIRA, S. H. *The blue infarct: a simple method for the quantitation of myocardial damage in the rat.* **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 21, p. 561-563, 1988
- 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.
- FREINKEL, N.; SCHREINER, G. E., ATHENS, J. W.; HIATT, C. W.; BREESE, S. *Artifactual differences in the distribution of T-1824 and I¹³¹-labeled albumin resulting from mixing prior to administration.* **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Saint Louis, v. 43, p. 215-226, 1954.
- 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.
- GREGERSEN, M. I. *A practical method for the determination of blood volume with the dye T-1824.* **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Saint Louis, v. 29, p. 1266-1286, 1944.
- GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica**, 5. ed., Rio de Janeiro, Interamericana: 1976.
- HAAS, D. A.; NAKANISHI, O.; MACMILLAN, R. E.; JORDAN, R. C., HU, J. W. *Development of an orofacial model of acute inflammation in the rat.* **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 37, p. 417-422, 1992.

HUANG, K-C.; BONDURANT, J. H. *Simultaneous estimation of plasma volume, red cell volume and thyocyanate space in unanesthetized normal tissue and splenectomized rats.* **American Journal of Physiology**, Saint Louis, v. 185, p. 441-445, 1956.

KIRSNER, J. B. *Experimental colitis with particular reference to hypersensitivity reactions in the colon.* **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 40, p. 307-312, 1961.

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.

LEVEEN, H. H.; FALK, G.; SCHATMAN, B. *Experimental ulcerative colitis produced by anti-colon sera.* **Annals of Surgery**, Philadelphia, v. 154, p. 275-280, 1961.

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.

LOUIS, S. M.; JAMIESON, A.; RUSSELL, 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.

LUNDBERG, J.; SARIA, A. *Capsaicin-induced desensitization of airway mucosa to cigarette smoke, mechanical and chemical irritants.* **Nature**, London, v. 302, p. 251-253, 1983.

_____. *Capsaicin-sensitive vagal neurons involved in control of vascular permeability in rat trachea.* **Acta Physiologica Scandinavica**, Oxford, v. 115, p. 521-523, 1982.

MACPHERSON, B. R.; PFEIFFER, C. J. *Experimental production of diffuse colitis in rats.* **Digestion**, Basel, v. 17, p. 135-150, 1978.

_____. *Experimental colitis.* **Digestion**, Basel, v. 14, p. 424-452, 1976.

- MARCUS, R.; WATT, J. *Seaweeds and ulcerative colitis in laboratory animals*. **Lancet**, London, v. 2, p. 489-490, 1969.
- MCHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica**. São Paulo: Pedagógica e Universitária, 1980.
- MCMAHON, S. B.; LEWIN, G. R.; ANAND, P.; GHATEI, 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.
- MORAES, R. S.; REPKA, J. C. D.; TELES, J. E. Q.; BRENNER, S.; HENNING, N. A. *Aspectos morfológicos da colite difusa induzida pelo ácido acético a 10% via retal. Estudo experimental em ratos Sprague Dawley*. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, Rio de Janeiro, v. 3, p. 70-76, 1992.
- MORAES, R. S. **Indução da colite difusa pela instilação de ácido acético via retal**. Curitiba, 1987. Tese (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- MORRIS, G. P.; BECK, P. L.; HERRIDGE, M. S.; DEPEW, W. T.; SZEWCZUK, M. R.; WALLACE, J. L. *Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon*. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 96, p. 795-803, 1989.
- 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.
- 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.

- 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.
- OKAYASU, I.; HATAKEYAMA, S.; YAMADA, M.; OHKUSA, T.; INAGAKI, Y.; NAKAYA, R. *A novel method in the induction of reliable experimental acute an chronic ulcerative colitis in mice.* **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 98, p. 694-702, 1990.
- ORIOU PALOU, R.; HALPERN, B.; ZWEIBAUM, A.; MORARD, J. C.; VEYRE, C.; ABADIE, A. *Production expérimentale de colitis ulcéro-hémorragique avec auto-corps.* **Méd. Hyg.**, Geneve, v. 25, p. 62-64, 1967.
- PARVING, H. H.; KLEBE, J. G.; INGOMAR, C. J. *Simultaneous determination of plasma volume and transcapillary escape rate with I^{131} -labeled albumin and T-1824 in the new born.* **Acta Pædiatrica Scandinavica**, Stockholm, v. 62, p. 248-252, 1973.
- 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.
- 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.
- 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.
- ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Patologia estrutural e funcional**, 4. ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan: 1991.

- ROGERS, D.; DIJK, S.; BARNES, P. J. *Bradykinin-induced plasma exudation in Guinea pig airways: involvement of platelet activating factor*. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 101, p.739-745, 1990.
- 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.
- 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.
- ROMERO, S.; FUENZALIDA, L. **Manual de manejo de animales de laboratorio de medio y pequeño portes**. Instituto de Salud Pública de Chile. 1989.
- SARIA, A.; LUNDBERG, J. M.; SKOFITSCH, G.; LEMBECK, F. *Vascular protein leakage 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.
- SHARON, P.; STENSON, W. F. *Metabolism of arachidonic acid in acetic acid colitis in rats*. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 88, p. 55-63, 1985.
- SIMMONS, P. M.; SALMON, J. A.; MONCADA, S. *The release of leukotriene B₄ during experimental inflammation*. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 32, p. 1353-1359, 1983.
- SOMMERS, S. C.; WARREN, S. *Ulcerative colitis lesions in irradiated rats*. **American Journal of Digestive Diseases**, New York, v. 22, p. 109-111, 1955.

- STEELE, R. H.; WILHELM, D. L. *The inflammatory reaction in chemical injury. I. Increased vascular permeability and erythema induced by various chemicals.* **British Journal of Experimental Pathology**, London, v. 47, p. 612-623, 1966.
- 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.
- SZABO, S., BROWN, A., TRIER, J. S., SCHNOOR, J. *Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat.* **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 88, p. 228-236, 1985.
- UDAKA, 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.
- VANE, J. R. **Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research**, New York, v. 2, Raven Press, p. 791-806, 1976.
- 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.
- WILHELM, D. L. **Patologia**, 7. ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan: 1982.
- 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.
- ZWEIBAUM, A.; MORARD, J-CI; HALPERN, B. *Réalisation d'un colite ulcéro-hémorragique expérimentale par immunisation bactérienne.* **Pathologie Biologie**, Paris, v. 16, p. 813-823, 1968.