

B27701078



**MEDIDA DO AUMENTO DA PERMEABILIDADE CAPILAR NA PELE COM
AUXÍLIO DE AZUL DE EVANS MARCADO COM IODO 125 OU 131**

Suemi Sugavara e José Moura Gonçalves

**PUBLICAÇÃO IEA 424
CRB 63**

JULHO/1976

**MEDIDA DO AUMENTO DA PERMEABILIDADE CAPILAR NA PELE COM
AUXÍLIO DE AZUL DE EVANS MARCADO COM IODO 125 OU 131**

Suemi Sugavara e José Moura Gonçalves

**COORDENADORIA DE RADIOBIOLOGIA
(CRB)**

**INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA
SÃO PAULO - BRASIL**

APROVADO PARA PUBLICAÇÃO EM FEVEREIRO/1976

CONSELHO SUPERIOR

Eng^o Roberto N. Jafet -- Presidente
Prof. Dr. Emilio Mattar -- Vice-Presidente
Prof. Dr. José Augusto Matins
Dr. Ivano Humbert Marchesi
Eng^o Heício Modesto da Costa

SUPERINTENDENTE

Prof. Dr. Rômulo Ribeiro Pieroni

INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA
Caixa Postal 11.049 (Pinheiros)
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
SÃO PAULO - BRASIL

MEDIDA DO AUMENTO DA PERMEABILIDADE CAPILAR NA PELE COM AUXÍLIO DE AZUL DE EVANS MARCADO COM IODO 125 OU 131

Suemi Sugavara e José Moura Gonçalves

RESUMO

Este trabalho descreve a quantificação de droga vasoativa (bradicinina e histamina) pela medida do aumento de permeabilidade capilar na parede abdominal de rato, a partir do extravasamento de azul de Evans marcado com iodo 125 ou 131, após a administração intradérmica de 0,1 ml de solução de substância ativa. Discos de pele são cortados com perfurador circular para contagem externa.

A dose de corante radioativo utilizado foi de 0,3 mg com 1 μ Ci de atividade por 100 g de peso animal e as doses de drogas vasoativas de 0,25 a 6 μ g de bradicinina e 0,1 a 10 μ g de histamina.

O desenvolvimento dessa tecnologia trouxe maior simplificação na quantificação satisfatória dos resultados, quando comparada a outros métodos.

INTRODUÇÃO

A quantificação do aumento da permeabilidade capilar produzido pela administração de droga vasoativa na pele, quando se usa corantes como azul de Evans, baseia-se ou na medida do diâmetro da mancha de extravasamento^(1,4) ou na determinação quantitativa do corante após sua extração^(1,2,4).

O presente trabalho propõe técnica simples e mais rápida para a quantificação dos efeitos de drogas vasoativas sobre o aumento da permeabilidade capilar na pele de ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados com: a) ratos machos de raça Wistar, pesando aproximadamente 200 g cada, dos quais removiam-se previamente os pelos da pele abdominal; b) azul de Evans (Merck) marcado com iodo 125 ou 131; c) bradicinina sintética obtida na Escola Paulista de Medicina e d) histamina (Sigma). Todos os demais reagentes utilizados no decorrer da experiência, tanto para marcação do azul de Evans como para a medida do aumento da permeabilidade capilar, foram de grau de pureza p.a.

As medidas de atividade radioativa foram feitas ou no Calibrador de Dose Mediac (Mediac Dose Calibrator – model 6372, Nuclear Chicago Corporation) ou no contador gama de “poço” (series 1185 – Automatic Gamma Counting System, Nuclear Chicago Corporation).

1 – MARCAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CONTROLE DO AZUL DE EVANS

a) Método de Marcação do Azul de Evans com Iodo Radioativo (Iodo 125 ou 131)

O método de marcação de azul de Evans (6,6' – { (3,3' – dimetil – 4,4' – bifeniilo) bis (azo) } bis { 4 – amino – 5 – hidróxi – 1,3 – naftalenedisulfônico tetrasódico }) com iodo radioativo foi de

Mani e Kulkarni⁽²⁾ com algumas modificações. Em linhas gerais, o método de marcação do azul de Evans compreende duas fases: diazotação do corante e iodação do corante já diazotado.

A fase inicial de diazotação do corante foi feita em meio ácido a 0°C (banho de gelo) sob agitação constante, conforme a seguinte técnica: num tubo de marcação, tomou-se 5 ml de solução aquosa de azul de Evans a 0,6%, acidificou-se com 0,5 ml de H₂SO₄N e adicionou-se 0,5 ml de nitrito de sódio a 9,2 mg/ml, esperou-se 30 minutos. Após a reação, tomou-se uma alíquota e verificou-se o excesso de nitrito com o teste de amido iodetado. Procedeu-se, então, a destruição do nitrito acrescentando 0,5 ml de solução de sulfamato de amônio a 20 mg/ml, esperando-se 15 minutos.

A iodação do corante diazotado foi realizada adicionando-se 0,2 ml de solução de iodo radioativo, isento de carregador e redutor (20 – 30 mCi de iodo-131 ou 1 – 2 mCi de iodo 125) e 0,1 ml de solução de iodeto de potássio a 10 mg/ml. Fechou-se bem o tubo, retirou-se do banho de gelo e, ainda sob agitação constante, foi mantido por 6 horas em banho termostatzado a 55°C e depois por mais uma hora em banho-maria.

b) Purificação

Fez-se a purificação por diálise contra solução fisiológica durante 20 horas.

A atividade do produto marcado e purificado foi determinada no calibrador de dose Mediac.

c) Controle

Confirmou-se a pureza radioquímica do corante por eletroforese em papel Whatman nº 1 (30 x 2,5 cm) com carregador de iodeto de sódio, usando tampão acetato 0,1 M, pH 5,5, tempo de migração = 45 minutos e amperagem = 1,5 mA/fita.

O iodeto foi revelado com acetato de chumbo de 10% e a porcentagem de radioisótopo livre calculada pela distribuição de radioatividade ao longo da fita.

2 – ENSAIOS BIOLÓGICOS

Inicialmente, foram feitos testes preliminares para verificar a homogeneidade de distribuição da radioatividade na pele (quantidade básica de radioatividade na pele), bem como a resposta a uma mesma dose de substância vasoativa para depois realizar os ensaios quantitativos com histamina e bradicinina.

O azul de Evans isotópico foi adicionado ao azul de Evans frio, de tal modo a dar uma concentração total de corante de 0,3% contendo 10 µCi/ml.

a) Prova de Quantidade Básica de Radioatividade na Pele

Administrou-se, por via endovenosa, azul de Evans ¹³¹I a 0,3% com 10 µCi/ml de atividade, na dose de 0,1 ml por 100 g de peso animal. Decorridos 10 minutos, fez-se a sangria total do animal por decaptação e retirou-se a pele abdominal. Após inversão da pele, com auxílio do perfurador circular de 15 mm de diâmetro, foram retiradas seis amostras (três de cada lado) para determinação da atividade radioativa no contador gama de "poço".

b) Prova de Identidade de Resposta

Administrou-se a mesma dose de azul de Evans ^{131}I e decorridos 10 min. foram injetadas, subcutaneamente, 5 doses de 0,1 ml de solução de histamina (25 $\mu\text{g/ml}$) em diferentes pontos da região abdominal e uma dose (0,1 ml) de solução fisiológica.

Dez minutos após a última administração subcutânea, fez-se a sangria total e retirou-se a pele abdominal do animal. Os locais de administração da histamina e da solução fisiológica foram cortados e, em seguida, determinou-se a atividade radioativa de cada disco no contador gama de "poço"

c) Ensaio Quantitativo com Histamina e Bradicinina

Utilizaram-se soluções de 1 a 100 μg de histamina e 2,5 a 60 μg de bradicinina por ml de solução fisiológica. Procedeu-se da mesma maneira como no item anterior, injetando-se a mesma dose de azul de Evans marcado com iodo 125 ou 131, mesmo número de pontos e mesmo volume de droga vasoativa. Após a retirada da pele, além dos discos correspondentes aos seis pontos de administração subcutânea, obteve-se disco da pele para medida da atividade radioativa básica.

d) Cálculo do Índice de Aumento da Permeabilidade Capilar

Para o cálculo de índice de aumento da permeabilidade capilar utilizou-se a seguinte fórmula:

$$R = \frac{C_a - (C_{sf} - C_p)}{C_p}$$

onde:

C_a = Contagem da pele no local de administração da droga.

C_{sf} = Contagem da pele no local de administração da solução fisiológica

C_p = Contagem da pele.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto à radioatividade basal da pele, verificou-se que em todos os animais houve uma distribuição dentro de limites satisfatórios (Tabela I)

A Tabela II apresenta os resultados obtidos com injeção de mesma dose de histamina na pele.

A distribuição da radioatividade basal na pele, aliada às respostas adequadas à mesma dose de histamina, condicionaram a aplicação da técnica a apreciação quantitativa dos efeitos de drogas que aumentam a permeabilidade capilar.

Os resultados dos ensaios quantitativos de histamina e bradicinina encontram-se nas Tabelas III e IV e figura I.

Na figura I notamos que as curvas log dose-resposta em forma de S são satisfatórias.

Ao contrário dos métodos clássicos de determinação de aumento de permeabilidade capilar^(1,2,4), o emprego de azul de Evans ^{125}I ou ^{131}I a 0,3% vem simplificar sua quantificação pela medida de radioatividade. Usando-se corante de 0,3% na dose de 0,1 ml por 100 g de peso animal, permite visualizar perfeitamente as manchas de extravasamento para a localização dos discos a serem contados

Acreditamos ainda que a técnica ora apresentada torna-se mais fisiológica no sentido de se medir o extravasamento do corante ligado a albumina, pois os ratos não se apresentam com coloração azul forte uma vez que a quantidade de azul de Evans injetada é consideravelmente reduzida.

Tabela I
Distribuição da Radioatividade na Pele*

ratos	c p m x 10			
	1	2	3	4
amostras				
1	12 610	8 706	14 810	10 420
2	13 661	8 878	16 199	10 880
3	11 373	9 796	13 940	10 491
4	13 461	8 303	13 269	9 305
5	11 965	8 393	16 244	10 220
6		8 545	14 443	10 225
\bar{M}	12 614	8 770	14 817	10 259
$\pm s$	971	554	1 204	525

* A Tabela mostra a distribuição da radioatividade em 6 regiões da pele abdominal de ratos 10 min após a administração endovenosa de 1 μ Ci de azul de Evans 131 I/100 g de peso animal.

Tabela II
Identidade de Resposta*

ratos	valores de R			
	1	2	3	4
amostras				
1	4,4	4,6	5,6	3,6
2	4,1	4,0	5,8	4,5
3	3,6	4,4	5,2	3,9
4	4,6	4,7	4,0	4,5
5	4,5	4,1	5,5	4,3
\bar{M}	4,2	4,4	5,2	4,2
$\pm s$	0,4	0,3	0,7	0,4

* A Tabela mostra os índices de aumento da permeabilidade capilar (R), 10 min após a administração subcutânea de 2,5 μ g de histamina em diferentes pontos da pele abdominal de ratos usando azul de Evans 131 I como traçador.

Tabela III
Atividade de Histamina na Permeabilidade Capilar*

doses rato n ^o s	Valores de R								
	0,1 µg	0,2 µg	0,3 µg	0,4 µg	0,5 µg	1,0 µg	2,5 µg	5,0 µg	10,0 µg
1	—	1,9	—	1,9	2,3	—	—	—	—
2	—	1,4	—	2,2	1,5	—	—	—	—
3	2,2	1,9	3,0	2,6	3,0	—	—	—	—
4	1,5	1,8	2,1	1,5	1,3	—	—	—	—
5	1,2	1,5	—	1,5	—	—	—	—	—
6	—	1,0	1,2	1,6	—	—	—	—	—
7	1,2	1,8	1,5	—	—	—	—	—	—
8	—	—	—	—	—	2,1	4,6	6,1	—
9	—	—	—	—	—	—	4,9	6,3	5,8
10	—	—	—	—	—	2,2	4,4	6,5	3,6
11	—	—	—	—	—	2,5	4,9	6,1	4,8
12	—	—	—	—	—	3,5	5,5	8,3	7,3
M	1,5	1,6	2,0	1,9	2,0	2,6	4,9	6,7	5,4
± s	0,5	0,3	0,8	0,4	0,8	0,6	0,4	0,9	1,6

* A Tabela mostra os índices de aumento da permeabilidade capilar (R), 10 min após a administração subcutânea de diferentes doses de histamina, utilizando-se azul de Evans ¹³¹I como traçador.

Tabela IV
Atividade da Bradicicina na Permeabilidade Capilar*

doses ratos n ^o s	Valores de R					
	0,25 µg	0,5 µg	1,0 µg	2,0 µg	4,0 µg	6,0 µg
1	—	—	9,0	9,4	26,1	—
2	—	—	5,3	9,1	15,0	—
3	—	—	7,2	10,4	27,0	—
4	—	4,4	7,5	13,6	—	—
5	—	4,0	7,9	9,9	—	—
6	—	3,4	4,5	7,3	—	—
7	—	3,6	6,1	7,7	—	—
8	—	1,8	3,2	5,6	—	—
9	—	6,1	6,4	9,8	—	—
10	2,7	3,2	—	—	16,3	27,2
	—	—	—	—	—	27,1
11	3,3	3,1	—	—	17,1	22,9
	—	—	—	—	—	20,9
12	2,8	3,6	—	—	18,2	21,1
	3,4	—	—	—	—	—
13	3,6	3,7	—	—	19,7	23,3
	3,4	—	—	—	—	—
14	1,8	3,7	—	—	14,5	15,6
15	3,9	3,7	—	—	11,7	18,9
	—	—	—	—	13,6	—
M	3,1	3,7	6,3	9,2	17,9	22,1
± s	0,6	1,0	1,8	2,2	5,1	4,0

* A Tabela mostra os índices de aumento da permeabilidade capilar (R), 10 min após a administração subcutânea de diferentes doses de bradicicina, utilizando o azul de Evans ¹²⁵I como traçador.

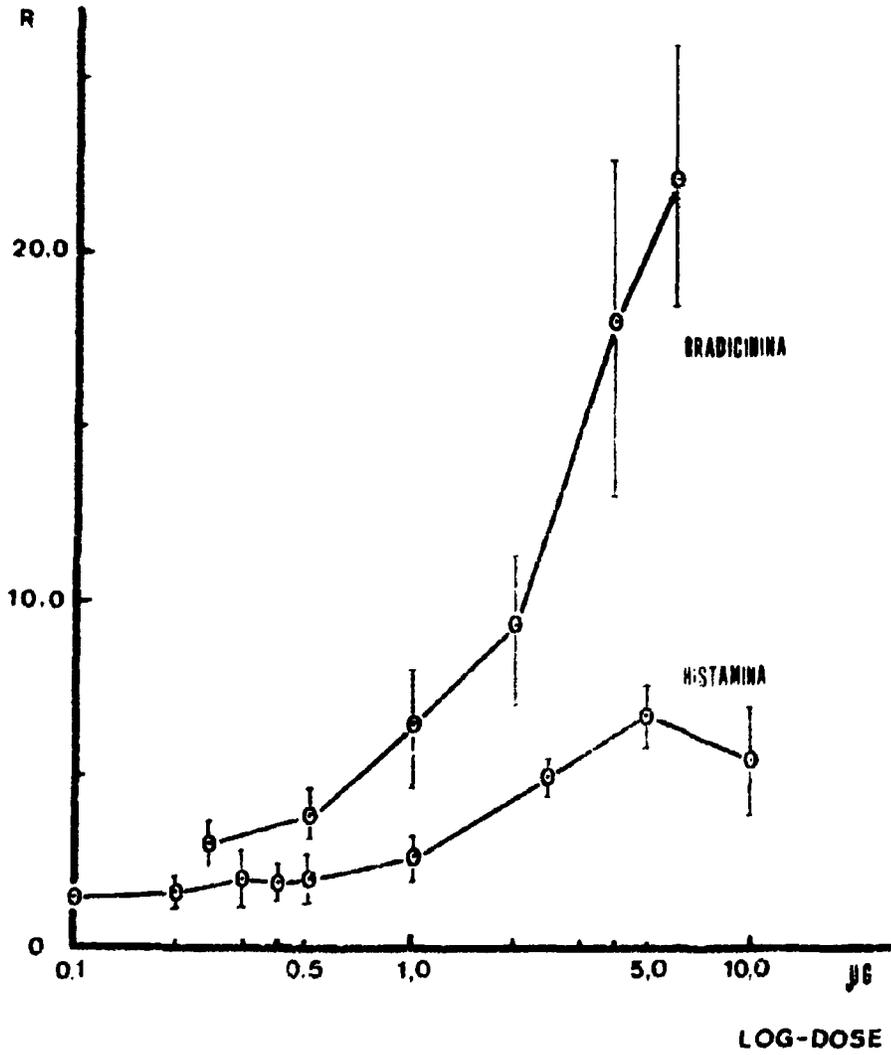


Figura 1 — Curva log-dose resposta da bradicinina e histamina. A figura mostra a curva log-dose resposta da bradicinina e histamina obtida pelo teste da permeabilidade em pele de rato, usando como traçador azul de Evans marcado com iodo radiativo.

ABSTRACT

This communication describes the quantitative evaluation of bradykinin and histamine with Evans blue labelled with iodine 125 or 131.

The activity upon vascular permeability was performed in the abdominal wall of rats injecting intravenously solution of labelled Evans blue and 0.1 ml of vasoactive drugs solution intradermally. Skin discs were cut with circular punch for external counting, quantitative results being compared with control discs.

By using this method, satisfactory log dose response curves were obtained for bradykinin and histamine that followed the general trend of S - shaped curves.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos Profs. J. L. Prado e A. C. M. Paiva, da Escola Paulista de Medicina pela doação de bradicinina e ao Prof. J. C. Barbério pelas facilidades oferecidas nos laboratórios da Coordenadoria de Radiofarmácia do Instituto de Energia Atômica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FRIMMER, M. & MÜLLER, S. W. Brauchbarkeit und Grenzen der Farbstoffmethoden zur Bestimmung vermehrter Durchlässigkeit der Haut-Capilaren. *Med. exp.*, Basel, 6:327-30, 1962.
2. JUDAH, J. D. & WILLOUGHBY, D. A. A quantitative method for the study of capillary permeability: extraction and determination of trypan blue in tissues. *J. Path. Bact.*, London, 83:567-72, 1962.
3. MANI, R. S. & KULKARNI, P. V. Preparation of radioiodinated Evans blue for medical use. *Indian J. Chem.*, New Delhi, 4:498-9, 1966.
4. REIS, M. L.; OKINO, L. & ROCHA e SILVA, M. Comparative pharmacological actions of bradykinin and related kinins of larger molecular weights. *Biochem. Pharmac.*, London, 20:2935-46, 1971.

