

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA**

**TESE DE DOUTORADO**

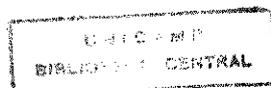
**“BIODISPONIBILIDADE E ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DE UM NOVO  
MODIFICADOR DA RESPOSTA BIOLÓGICA”**

**CANDIDATA: GISELLE ZENKER JUSTO**

**ORIENTADOR: PROF. Dr. NELSON EDUARDO DURÁN CABALLERO**

**CAMPINAS, SÃO PAULO**

**- 1996 -**



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA  
UNICAMP

Justo, Giselle Zenker  
J985b Biodisponibilidade e atividade antineoplásica de um  
novo modificador da resposta biológica / Giselle Zenker  
Justo. -- Campinas, [SP : s.n.], 1996.

Orientador: Nelson Eduardo Durán Caballero.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Química.

1. Magnésio. 2. Biodisponibilidade. I. Durán  
Caballero, Nelson Eduardo. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Instituto de Química. III. Título.

UNIDADE	8C
N.º CHAMADA:	T/Unicamp
V.	J985b
TIPO BC	29028
PRG.	667/96
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	05/11/96
N.º CFD	

CM.00094735-9

**“Todas as substâncias são venenos; não existe uma que não seja um veneno. A dose certa diferencia um veneno de um remédio”**

**Paracelsus**  
**(1493 - 1541)**

*Aos meus pais pelo amor, incentivo e apoio  
que me acompanharam ao longo de todos estes anos*

*Ao Ramón pela compreensão*

*Ao Prof. Dr. Nelson Durán pela orientação e pela oportunidade que me foi dada uma vez mais de ampliar o horizonte científico de aplicação do conhecimento químico. A realização desta tese, que abrange temas tão amplos e diversificados, é fruto de muitas críticas, sugestões, mas principalmente de sua dedicação, compreensão e confiança durante todos estes anos. Espero que tudo o que me foi ensinado possa abrir novas portas, criando novas oportunidades de participar de suas valiosas discussões acadêmicas.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Iseu Nunes pela colaboração sem a qual esta tese não seria possível, além do interesse no decorrer deste trabalho.

À Dra. Alba R. Monteiro Souza-Brito pela co-orientação nos estudos de biodisponibilidade e pela possibilidade de realizá-los em seus laboratórios, além do incentivo e amizade.

Ao Dr. Ovídio Rettori pela co-orientação nos experimentos com tumor de Walker-256 e pela valiosa oportunidade de poder aprender com ele.

À Dra. Tereza Cristina Cavalcanti por ter colocado à disposição as dependências e materiais de seu laboratório, além do interesse e incentivo que proporcionaram a realização de um projeto paralelamente ao proposto nesta tese. Agradeço ainda pela sua atenção e sugestões na correção de parte desta tese.

À Dra. Ana Neuza Vieira-Matos pela atenção, auxílio e proveitosas discussões.

Ao Fernando pela amizade, colaboração e valiosas sugestões, além da dedicação e paciência dispensadas ao esclarecimento de tantas questões que surgiram durante e no término desta tese.

Ao Ramón por facilitar a redação desta tese.

À Elisa pela amizade e apoio dispensados em todos os momentos e à Gabi pelas alegrias proporcionadas em momentos muito especiais.

Ao Dr. Ivan Saavedra pela colaboração na análise de parte dos resultados desta tese.

Ao Dr. Walter Martins por ter permitido o uso de seu laboratório e materiais necessários ao desenvolvimento de parte deste trabalho.

Ao Dr. Rogério Custódio pela pronta colaboração na confecção dos desenhos contidos nesta tese.

Aos colegas do laboratório pela agradável convivência e pelas discussões acadêmicas transcorridas ao longo deste período.

À Maria Aparecida de Souza e ao Francisco Adão de Camargo pela atenção e pronta colaboração em todas as horas.

Ao Paulo pela ajuda na utilização do aparelho de absorção atômica.

À Izabel e Amilton, funcionários do Laboratório de Pesquisas Bioquímicas do CAISM.

À Wanda, Iraídes e Bili, e a todos os funcionários do Instituto de Química pela colaboração sem a qual não seria possível a realização de parte desta tese.

À Wanda, Iraídes e Bili, e a todos os funcionários do Instituto de Química pela colaboração sem a qual não seria possível a realização de parte desta tese.

Ao pessoal do CPQBA pela atenção e em especial à Márcia, Mirtes e à Susana pelo auxílio e amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Hematologia do HEMOCENTRO da UNICAMP, pelo processamento das amostras de sangue.

Aos funcionários responsáveis pelo biotério do Departamento de Fisiologia, IB.

Aos funcionários do Centro de Bioterismo da UNICAMP.

Ao Centro de Desenvolvimento de Compostos com Atividades Biológicas.

Ao CNPq, FAPESP, FINEP e CAPES pelo apoio financeiro.

## ABREVIações E NOMES USUAIS

Ag	antígeno
Aminoácidos:	
Ala	alanina
Arg	arginina
Asn	asparagina
Asp	ácido aspártico
Cys	cisteína
Gln	glutamina
Glu	ácido glutâmico
Gly	glicina
His	histidina
Ile	isoleucina
Leu	leucina
Lys	lisina
Met	metionina
Phe	fenilalanina
Pro	prolina
Ser	serina
Tyr	tirosina
Thr	treonina
Trp	triptofano
Val	valina
Células B	linfócitos timo-independentes
Células T	linfócitos timo dependentes
ID <sub>50</sub>	dose única de uma substância que causa inibição de 50% da sobrevivência celular
Ig	imunoglobulina
IgA	imunoglobulina A
IgE	imunoglobulina E
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
IP	intraperitoneal
LD <sub>50</sub>	dose única de uma substância que causa morte em 50% dos animais

MAPA	agregado polimérico extracelular de magnésio e fosfato de amônio associado à uma proteína básica e ácidos linolêico e palmitolêico (principais componentes lipídicos)
PBS-A	“phosphate buffered saline” (solução salina tamponada sem $\text{Ca}^{2+}$ e $\text{Mg}^{2+}$ )
SC	subcutâneo
$T_h$	linfócito T helper (T auxiliar)
$T_c$	linfócito T citotóxico
$T_{th}$	linfócito T hipersensibilidade tardia
$T_s$	linfócito T supressor
W256	Walker -256

## SOLUÇÕES

PBS-A = 0,1369 M NaCl  
0,00268 M KCl  
0,008 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,015 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Solução de Ringer com lactato de sódio = cada 100 mL contém:

lactato de sódio	300 mg
cloreto de sódio	600 mg
cloreto de potássio	30 mg
cloreto de cálcio 2H <sub>2</sub> O	20 mg
água para injetáveis q.s.p.	100 mL
osmolaridade	271 mOsm/L

concentração (mEq/L): cloreto	109,0
sódio	129,0
potássio	4,0
cálcio	2,7
lactato	26,8

# ÍNDICE

SUMÁRIO	1
SUMMARY	3
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	4
1.1 DESCRIÇÃO E BIOSÍNTESE DO MAPA	9
1.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO MAPA	11
1.2.1 Toxicidade	11
1.2.2 Ações Farmacológicas	14
1.2.3 Estudos Clínicos	18
1.3 O MAGNÉSIO E O SISTEMA BIOLÓGICO	19
1.3.1 "A História do Magnésio"	20
1.3.2 Farmacocinética do Magnésio	21
1.3.3 Determinação dos Níveis de Magnésio	25
1.3.4 O Magnésio e o Sistema Imune	28
OBJETIVOS	42
CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL	44
2.1 SUBSTÂNCIA TESTE MAPA	45
2.2 ANIMAIS	45
2.3 LINHAGEM TUMORAL DE WALKER-256	46
2.4 BIODISPONIBILIDADE DO MAPA	47
2.4.1 Princípio Metodológico	47
2.4.2 Tratamento Analítico do Plasma	49
2.4.3 Tratamento Analítico dos Órgãos	49
2.4.4 Avaliação da Interferência de Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> e Ca <sup>2+</sup> na Determinação do Mg <sup>2+</sup> no Plasma	50
2.4.5 Preparação das Soluções Estoques de Mg <sup>2+</sup> , Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> e Ca <sup>2+</sup>	51
2.5 EFEITOS DA DROGA MAPA EM ANIMAIS INOCULADOS COM CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER-256	51
2.5.1 Diferentes Doses de MAPA x Inoculações Multifocais de Células Tumerais de Walker-256 linhagem A	51
2.5.2 Diferentes Doses de MAPA x 1 Sítio de Inoculação de Células Tumerais de Walker-256 linhagem A	53
2.5.3 Tratamento com MAPA x 1 Sítio de Inoculação de Células Tumerais de Walker-256 sublinhagem Ar	55

2.6 ESTUDO DA VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CÉLULAS DO SANGUE	56
2.6.1 Tratamento com MAPA x Tratamento com $Mg_3(PO_4)_2$ na Variação dos Níveis das Células do Sangue	56
2.6.2 Tratamento com MAPA x Tratamento com $NH_4MgPO_4$ na Variação dos Níveis das Células do Sangue	57
2.6.3 Variação dos Níveis das Células do Sangue (35 dias) x Diferentes Doses de MAPA	58
2.7 MÉTODOS ESTATÍSTICOS	59
CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
3.1 INTERFERÊNCIA DE $Na^+$ , $K^+$ e $Ca^{2+}$ NA DETERMINAÇÃO DO MAGNÉSIO NO PLASMA	61
3.2 BIODISPONIBILIDADE DO MAPA	63
3.3 EFEITOS DA DROGA MAPA EM RATAS INOCULADAS COM CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER-256	82
3.4 ESTUDO DA VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CÉLULAS DO SANGUE DE RATAS TRATADAS COM MAPA, $Mg_3(PO_4)_2$ e $NH_4MgPO_4$	111
3.5 ESTUDO DA VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CÉLULAS DO SANGUE DE RATAS TRATADAS COM DIFERENTES DOSES DE MAPA DURANTE 35 DIAS	122
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	133
BIBLIOGRAFIA	137
APÊNDICE 1	152
APÊNDICE 2	156
APÊNDICE 3	160
APÊNDICE 4	169
APÊNDICE 5	171
ATIVIDADES ACADÊMICAS DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORADO	176

## SUMÁRIO

Os efeitos do composto MAPA, um agregado protêico de fosfolinoleato-palmitoleato de amônio e magnésio foram estudados, *in vivo*, com o objetivo de investigar parte do seu mecanismo de ação. O estudo foi dividido em duas etapas, ambas consideradas pré-clínicas como convém à descrição de novos fármacos sob investigação. Numa primeira etapa foi estudada a biodisponibilidade do composto em ratos Wistar tratados com dose única de 750 mg/Kg de MAPA intraperitoneal (IP), através da variação do teor de  $Mg^{2+}$ , no plasma e em diferentes órgãos. Uma meia-vida ( $t_{1/2}$ ) de aproximadamente 5,3 h e área sob a curva (AUC) de 255,9  $\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}^{-1}$  foram calculados. A avaliação do comportamento da cinética do  $Mg^{2+}$  plasmático quando foram utilizadas diferentes doses de MAPA IP, confirmou uma eliminação não exponencial para o composto. Outros parâmetros observados foram os diferentes  $t_{1/2}$  calculados para cada dose e a AUC não proporcional à dose, confirmando a hipótese de que o MAPA não segue uma cinética monocompartimental. Uma segunda etapa compreendeu o estudo dos efeitos do MAPA em ratas Wistar saudáveis e inoculadas com células de Walker-256, linhagem A e sublinhagem Ar. O efeito de diferentes doses de MAPA na evolução do tumor de Walker-256 foi examinado em ratas inoculadas com células tumorais em um ou mais sítios simultâneos subcutâneos (SC) na região lombar dorso-torácica. Regressões tumorais significativas foram obtidas quando doses menores de MAPA foram administradas em animais inoculados em 1 sítio SC. A possível relevância dos mecanismos do hospedeiro na atividade do MAPA foi estudada em animais imunodeprimidos que receberam inoculação unifocal de células de Walker-256. Os resultados sugeriram a participação dos mecanismos de defesa na atividade antitumoral do MAPA. As análises das populações celulares do sangue de ratas saudáveis tratadas com diferentes doses IP de MAPA,  $Mg_3(PO_4)_2$  e  $NH_4MgPO_4$  sugeriram que o mecanismo de ação do

MAPA esteja particularmente relacionado à presença do íon  $Mg^{2+}$  como um dos principais componentes do composto.

## SUMMARY

The *in vivo* effects of the protein magnesium ammonium phospholinate-palmitoleate anhydride polymer, MAPA were investigated to understand some of its mechanistic aspects. Preliminary evaluation of the bioavailability of MAPA was carried out. A single dose of 750 mg/Kg was intraperitoneally (IP) administered to male Wistar rats. After preselected time periods magnesium ions ( $Mg^{2+}$ ) analysis were carried out in digested samples of plasma and target organs, by atomic absorption technique. The  $Mg^{2+}$  was rapidly absorbed, the mean  $t_{1/2}$  was 5,3 h over this dose and the area under the curve (AUC) value was  $255,9 \mu\text{g/mL}\cdot\text{h}^{-1}$ . The same profile for the  $Mg^{2+}$  plasma concentration *versus* time was observed when different doses of MAPA were selected. However, different half-lives were obtained for each dose and the AUC was not proportional to the dose. These results indicate that the drug does not follow an one-compartment kinetic model. The effect of different doses of MAPA on the Walker-256 tumor was examined. Female Wistar rats were inoculated with the tumor cells, line A or subline Ar, in the subcutaneous (SC) dorso-lumbar region, at one or more simultaneous sites. Rats receiving one single SC inoculation of the tumor cells presented significant regressions only when low doses of MAPA were administered. No effects were observed in rats immunodepressed, suggesting that the protective mechanisms could be involved in the *in vivo* antitumoral activity of MAPA. It was also investigated the effect of different magnesium salts,  $Mg_3(PO_4)_2$  and  $NH_4MgPO_4$ , as models of MAPA over blood cell populations counts. The results suggested a possible role played by  $Mg^{2+}$  in the activity of MAPA, as one of its major components.

## **CAPÍTULO 1 : INTRODUÇÃO**

O objetivo principal da pesquisa quimioterápica visa, principalmente, a descoberta de novos agentes capazes de inibir especificamente a multiplicação viral e de células neoplásicas, sem afetar a divisão celular normal. O estudo de novas drogas contra inúmeras infecções virais sistêmicas tem recebido especial atenção nos últimos anos devido, principalmente, à descoberta do vírus da AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida). Em parte, devido à efetividade comprometida de certos antivirais, muito pouco foi feito para desenvolver novos agentes terapêuticos. O tratamento de infecções virais oportunistas relacionadas à AIDS e ARC ("AIDS related complex", ou seja, doenças relacionadas com AIDS) com os presentes antivirais, iodoxouridina e azidotimidina (AZT, zidovudina) é bastante complicado devido à toxicidade hematológica, estando associados ao desenvolvimento de aplasias medulares e inibição do sistema imune.<sup>1, 2, 3</sup> 5-Iodo-2'-desoxiuridina (iodoxouridina) e 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT) têm sido associados com toxicidade medular, embora, 9-[(2-hidroxi)etil]guanina (aciclovir) não apresente toxicidade às células progenitoras de granulócitos *in vitro*.<sup>3</sup> AZT é um potente inibidor da hematopoiese *in vitro* e as células progenitoras de eritrócitos são particularmente sensíveis à sua ação, possivelmente explicando a hipoplasia medular que ocorre durante a administração de AZT *in vivo*.<sup>4-17</sup>

Iodoxouridina foi a primeira droga usada para o tratamento de herpes keratitis, uma infecção ocular que ameaça a visão. Aciclovir é um nucleosídeo purínico com atividade contra ambos os tipos de herpes, animal e humana.<sup>4-10</sup>

Devido à ineficiência relativa das drogas antivirais, novas propostas para a terapia da AIDS e ARC têm recebido especial atenção nos últimos anos, por exemplo, o uso combinado de antivirais e modificadores da resposta biológica. Um modificador da resposta biológica é um agente terapêutico que influencia os mecanismos de defesa próprios do hospedeiro para agirem contra células infectadas ou cancerosas. Os modificadores

biológicos compreendem uma ampla variedade de drogas incluindo interferons, interleucina-2, fatores de crescimento hematopoiéticos, hormônios tímicos, antioxidantes, fator de necrose tumoral- $\alpha$ , isoprinosina, ciclosporina A, corticosteróides e vacinas.<sup>3</sup>

Infelizmente, este insucesso não está limitado ao tratamento de doenças infecciosas, cuja repercussão mundial dentro a comunidade científica parece estar, atualmente, sendo mérito de interesse da população em geral. Vê-se, por exemplo, a atenção dedicada, recentemente, ao assunto pelo Jornal Folha de São Paulo. Repercussão esta, sem dúvida, promovida pela descoberta do HIV e pela facilidade com que ocorrem mutações em vírus e bactérias, devido a manipulação gênica e ao uso indiscriminado de muitos antibióticos. O descaso com que, em muitos países, são tratadas as entidades especializadas no estudo de novos agentes infecciosos, faz com que haja riscos imediatos aos próprios profissionais dispostos a se dedicarem ao assunto. A população, na maioria das vezes pouco informada, despreparada e desamparada pelos órgãos governamentais, é ainda mais vulnerável.

Durante as últimas décadas, foram observados grandes avanços, não menos importante, no controle de várias neoplasias humanas, antes consideradas fatais. Entretanto, tais avanços não podem ser estendidos à muitos tumores que ocorrem frequentemente em humanos. Portanto, também é fundamental que novas drogas anticâncer sejam identificadas.

Desde a descoberta, em 1940, de que o agente químico, mustarda nitrogenada, era capaz de induzir regressão em seres humanos, o arsenal de agentes citotóxicos anticâncer expandiu-se rapidamente.<sup>18-22</sup>

A descoberta e o desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos envolve várias fases. Este processo tem início com a aquisição de compostos com potencial antineoplásico, os quais sofrem uma triagem inicial através de modelos de seleção *in vitro* e/ou *in vivo*. Juntamente com reconhecidas instituições de pesquisa do câncer, tais como, o Instituto

Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI), a Organização Européia para Pesquisa e Tratamento do Câncer (EORTC) e a Companhia Inglesa de Pesquisa em Câncer (CRC), além de companhias farmacêuticas, a Fundação Central Sul-Americana para o Desenvolvimento de Novas Drogas Anticâncer (SOAD) e grupos isolados de pesquisa estão comprometidos com o desenvolvimento de novas drogas anticâncer.

Os compostos escolhidos nem sempre foram testados quanto às suas atividades citotóxica ou citostática em diferentes linhagens neoplásicas celulares como parte do estágio pré-clínico de descoberta da droga. Muitas vezes, um novo agente anticâncer emerge a partir de uma descoberta não intencional, como o caso da cisplatina, um dos principais componentes quimioterápicos capaz de curar o câncer testicular e produzir ampla resposta aos carcinomas de pulmão, ovário e bexiga.<sup>19</sup> Este agente foi descoberto graças à observação de que o crescimento da bactéria *E. coli* era inibido por complexos de platina gerados em um campo elétrico entre eletrodos de platina.<sup>23</sup>

A mostarda nitrogenada teve seu potencial antileucêmico descoberto após a Segunda Guerra Mundial, depois de uma explosão em circunstâncias de estocagem de gases de guerra, em Bari Harbor. Marujos expostos à mostarda nitrogenada desenvolveram hipoplasia da medula óssea.<sup>19</sup>

Antracenos também têm uma história de atividade ao acaso. Originariamente sintetizadas como corantes estáveis, reconheceu-se serem estes agentes - similares às antraciclinas - contendo uma estrutura de anel planar e grupos laterais básicos, críticos para a intercalação efetiva com DNA. Isto levaria ao rápido desenvolvimento da mitoxantrona que apresenta importante atividade contra o câncer de mama avançado e malignidade hematológica, mesmo apresentando menor toxicidade aos tecidos normais quando comparada às antraciclinas.<sup>19, 24</sup>

Uma recente descoberta foi a observação de que carboxamida-aminoimidazol (CAI) interfere em várias etapas da cascata metastática, sendo primariamente sintetizada para o tratamento contra parasitas de galinhas.<sup>25</sup>

Estes exemplos demonstram que caminhos não convencionais continuam sendo importantes na descoberta de novas drogas no processo de aquisição e seleção de compostos. Em geral, o processo de descoberta de uma nova droga pode ser sumarizado em 2 estágios: uma etapa pré-clínica consistindo da descoberta e estágio atual de desenvolvimento, e um estágio de triagem clínica. No estágio pré-clínico os agentes com potencial citotóxico ou citostático são identificados, envolvendo muitas vezes o isolamento do princípio ativo, produção em maiores quantidades, formulação da droga para uso em seres humanos e determinação do seu perfil toxicológico em animais, com a aquisição de dados farmacológicos. Uma vez determinada a dose inicial para estudos em seres humanos, o composto é estudado em pacientes com neoplasias avançadas, resistentes aos tratamentos convencionais, visando aferir o seu perfil de toxicidade e doses a serem testadas em estudos subsequentes (fase clínica-I). Em estudos fase clínica-II, o espectro de atividade antitumoral do composto é determinado. Uma vez identificados os tipos de tumores nos quais se obteve atividade considerada de interesse, o composto é avaliado em estudos comparativos ao acaso (fase clínica-III), com intenção de estimar possíveis vantagens da nova droga quanto a toxicidade e efeitos terapêuticos.<sup>19</sup>

Atualmente, as duas classes mais excitantes de novos agentes anticâncer que integram a fase clínica são os taxanos, taxol e taxotreno, além das camptotecinas semi-sintéticas análogas ao topotecano, CPT-11 e 9-amino-camptotecina, cujo alvo é a DNAase nuclear topoisomerase I. Ambas as classes de compostos preenchem os principais critérios para novas drogas anticâncer: novidade estrutural, mecanismo diferenciado e atividade anti-tumores sólidos.<sup>19</sup>

## 1.1 DESCRIÇÃO E BIOSÍNTESE DO MAPA

O agregado protêico MAPA (Figura 1) é um agregado polimérico extracelular de magnésio e fosfato de amônio associado à uma proteína básica e ácidos linolêico e palmitolêico (principais componentes lipídicos).<sup>1,26</sup>

Sua estrutura foi denominada como um agregado de fosfolinoleato-palmitoleato de amônio e magnésio protêico.<sup>26</sup> Ele foi desenvolvido pelo Centro de Desenvolvimento de Compostos com Atividades Biológicas de São Paulo como um novo modificador da resposta biológica, tendo inicialmente recebido o nome abreviado de SB-73.<sup>27</sup>

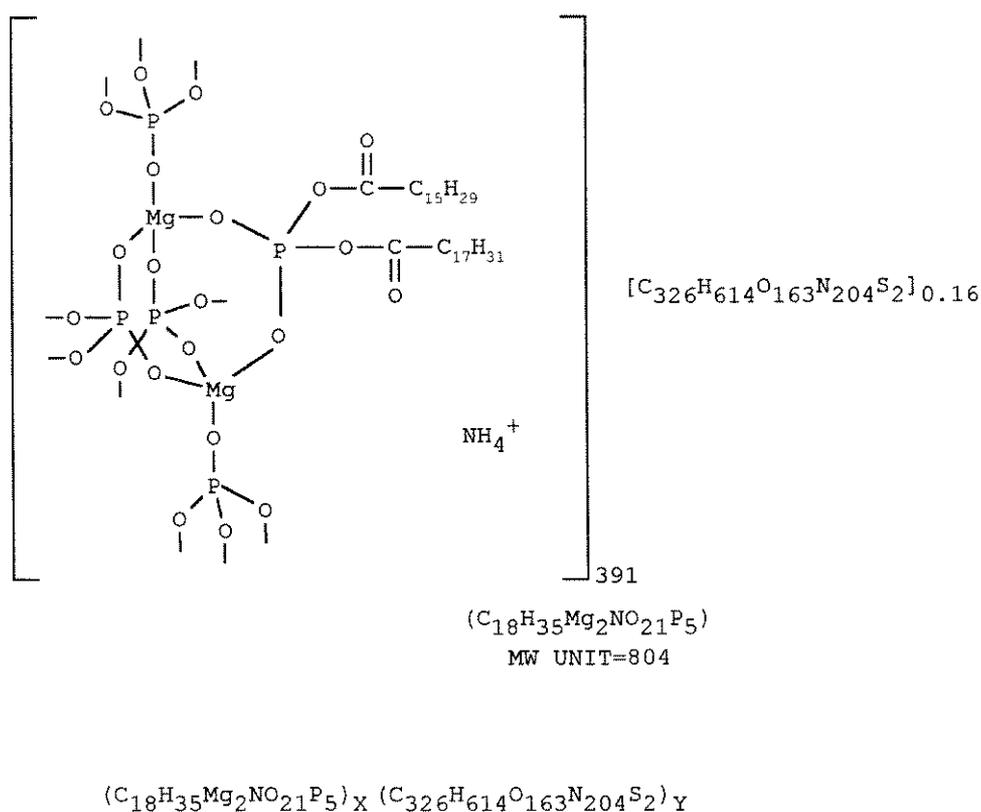


Figura 1

A droga, antes conhecida como SB-73, foi inicialmente obtida de *Penicillium sp.* ( linhagem PB-73 ) ou de *Aspergillus sp.* ( linhagem SB-73).<sup>1, 27-29</sup> Em ambos os casos os processos de purificação e

descontaminação eram longos e caros, inviabilizando a industrialização do produto.

Atualmente, a droga MAPA pode ser isolada de *Aspergillus oryzae* (linhagem AO-93) com alto rendimento e praticamente sem contaminação por bactérias ou leveduras.<sup>26</sup> A biossíntese do MAPA é obtida através de fermentação fungal em bioreatores esterilizados utilizando-se casca de arroz como fonte de carbono e extrato de "bacto-beef" (DIFCO).<sup>26-30</sup>

A droga MAPA é um sólido branco obtido como microcristais finos na forma de um agregado polimérico como demonstrado por microscopia eletrônica. É insolúvel em água e solventes orgânicos, sendo parcialmente solúvel em dimetilsulfóxido e solúvel em HCl 0,1 N (entretanto, sofrendo rápida degradação espontânea).<sup>27</sup>

A análise química quantitativa indicou os principais componentes do MAPA como sendo: magnésio ( $Mg^{2+}$ ), amônio ( $NH_4^+$ ), fosfato, ácidos linolêico e palmitolêico e proteína distribuídos como se segue:

- a) proteína:  $0,49 \pm 0,07$  % (PM 10 KDa). A análise elementar forneceu a fórmula  $C_{326}H_{614}N_{204}O_{163}S_2$ . A composição de aminoácidos, determinada após hidrólise, foi (w/w): Asp, 7,19%; Thr, 3,56%; Ser, 7,56%; Glu, 8,53%; Pro, 0,5%; Gly, 9,69%; Ala, 7,46%; Cys, 0,0%; Val, 1,0%; Met, 4,38%; Ile, 2,54%; Leu, 3,03%; Tyr, 0,5%; Phe, 1,0%; His, 2,83%; Lys, 3,56%; Trp, 1,3%; Arg, 35,2%.
- b) fosfato:  $45,2 \pm 2,7$ %.
- c) magnésio:  $20,1 \pm 0,9$ %.
- d) lipídios:  $11,6 \pm 4,3$ % dos quais  $22,7 \pm 5,0$ % ácido palmitolêico;  $42,9 \pm 2,0$ % ácido linolêico e  $32,0 \pm 3,0$ % ácido linolêico oxidado.
- e) amônio:  $10,0 \pm 3,3$ %.

Considerando-se todas as análises, a fórmula empírica do MAPA pode ser escrita como  $(C_{18}H_{35}Mg_2NO_{21}P_5)_x(C_{326}H_{614}N_{204}O_{163}S_2)_y$ , na qual a primeira parte da molécula corresponde ao fosfato de amônio magnésio polimérico e ácido linolêico-palmitolêico, como principais componentes

lipídicos, e a segunda parte à proteína. Segundo Durán e colaboradores<sup>27</sup>, os espectros de infra-vermelho e ressonância magnética nuclear revelaram que os ácidos linolêico e palmitolêico encontram-se como um anidrido orgânico do ácido fosfórico, a razão fosfato/magnésio determinada foi de  $2,34 \pm 0,14$ .

Peso unidade molecular = 804 Da

Número de unidades = 391

PM proteína = 10 KDa

PM total (médio) = 316 KDa.<sup>26-30</sup>

As amostras de MAPA são analisadas periodicamente por métodos químicos tradicionais, e controles microbiológicos são feitos rotineiramente.<sup>26-30</sup>

Amostras sólidas são estáveis por um período de 2 anos à temperatura ambiente e expostas à luz. Amostras solúveis não são estáveis senão por um período de uma semana quando armazenadas a 4°C.<sup>26-30</sup>

## 1.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO MAPA

### 1.2.1 Toxicidade

Em estudos preliminares de toxicidade em membranas celulares, fosforilação oxidativa e transporte de cálcio em mitocôndrias de fígado de rato não foi observada nenhuma disfunção a uma concentração de 100 µg/mL.<sup>2</sup>

Experimentos de citotoxicidade *in vitro* utilizando-se células fibroblásticas de râmster chinês linhagem V-79 não mostraram toxicidade até uma concentração de 120 µg/mL. Nesta concentração o valor ID<sub>50</sub> não foi alcançado.<sup>2</sup>

Alterações citogênicas em linfócitos induzidas por agentes mutagênicos, carcinogênicos ou poluentes ambientais tóxicos são usualmente monitoradas pela frequência numérica e estrutural de trocas de

cromátides irmãs, aberrações cromossômicas, índice mitótico e progressão do ciclo celular. Todas estas análises não mostraram diferenças entre culturas controle e tratadas com a droga, estando dentro dos valores normais, em concentrações de 100 µg/mL.<sup>2</sup>

A droga também não interferiu na viabilidade de células infectadas com o vírus HIV-IIIb, não mostrando efeito sobre a replicação viral.<sup>31</sup>

Em estudos pré-clínicos, doses orais de 30 g/Kg de peso corporal foram administradas, por gavagem, em um grupo de 10 camundongos albinos. Nenhum óbito foi registrado após um período de 14 dias de observação. Um valor de  $2,71 \pm 1,55$  g/Kg de peso corporal foi obtido para a LD<sub>50</sub> após administração intraperitoneal. Todas as mortes ocorreram 48 h após a administração do composto por colapso respiratório. Exames microscópicos revelaram uma larga congestão dos vasos sanguíneos na cavidade peritoneal. Doses subcutâneas de 30 g/Kg de peso corporal não mostraram nenhum efeito em camundongos em um período de 14 dias de observação.<sup>2</sup>

Também foi feito um estudo de toxicidade subcrônica (30 dias) em macacos prego (*Cebus apella*). Foram utilizados três grupos de animais: animais testemunha, animais controle, usados como padrão para o procedimento anestésico e administração de solução salina segundo o tratamento dos animais com a droga ativa, e animais tratados por via intramuscular com três diferentes doses definidas como dose baixa (5 mg/Kg), dose média (10 mg/Kg) e dose alta (30 mg/Kg). Os seguintes órgãos e estruturas foram dissecados dos animais e embebidos em parafina para estudos microscópicos: medula óssea, rins, glândulas adrenais, estômago, esôfago, bexiga urinária, intestino, placas de Peyer, fígado, baço, linfonodos e pulmão. Um aumento principalmente no número de linfócitos foi observado em todos os animais tratados. Nenhuma alteração morfológica ou degenerativa foi detectada em células do sangue. Redução nos níveis de colesterol e triglicérides dos animais tratados foi observado sem alteração

nos níveis plasmáticos de glicose, proteínas totais, albumina e transaminase glutamo-pirúvica (GPT). Ademais, um aumento nos níveis de transaminase glutamo-oxaloacética (GOT) e gama-glutamil-transpeptidase ( $\gamma$ -GT) foi observado, além de não menos importante, nos níveis de desidrogenase láctica (LDH). Não houve alterações morfológicas nos órgãos estudados. Macacos submetidos à dose média mostraram ganho de peso, enquanto que o oposto ocorreu em macacos tratados com dose alta. Como conclusão, nenhum efeito tóxico pôde ser atribuído às pequenas alterações dos parâmetros bioquímicos normalizados após 30 dias da administração da droga.<sup>1, 32</sup>

Os estudos de toxicidade subcrônica (90 dias) também foram efetuados em ratos Wistar de ambos os sexos utilizando-se doses de 1 (dose baixa), 10 (dose média) e 100 mg/Kg/dia (dose alta). Nenhuma alteração macroscópica na pele, pelos ou mucosas foi observada. Globulinas aumentaram proporcionalmente à dose, sem quaisquer disfunções hepáticas. O exame histopatológico dos órgãos e estruturas mostrou resultados normais, embora as células linfóides (B e T) estivessem aumentadas em torno das artérias peniciliares e centros germinativos. Mesmo as doses média e alta não exibiram efeitos tóxicos após 90 dias de tratamento.<sup>1, 33</sup>

Estudos de toxicidade reprodutiva e pós-natal foram conduzidos, utilizando-se o mesmo protocolo dos estudos de toxicidade subcrônica (90 dias), em ratos Wistar. Os resultados reforçaram aqueles obtidos nos estudos anteriores. A administração do composto induziu um aumento dose-dependente principalmente dos linfócitos e sem alterações morfológicas. Uma avaliação comparativa entre os espermatozóides dos animais matrizes, tratados e controle, não mostrou alterações morfofuncionais. Exame histopatológico dos órgãos e estruturas revelou estarem dentro do padrão normal, embora em alguns casos fosse observada uma densa população celular, principalmente de células reticulares e linfóides. No estudo da descendência nenhuma diferença estatística significativa foi observada entre

o número individual de filhotes das matrizes tratadas e controle. A análise dos resultados do desenvolvimento interno e externo revelou que nenhuma das alterações observadas estavam relacionadas à administração da droga antes ou durante os períodos de gestação e lactação.<sup>1</sup>

O possível efeito teratogênico da droga no desenvolvimento intraocular de enxertos de germe dental de fetos de camundongos foi investigado. Os germes foram dissecados e mantidos em meio de cultura até serem enxertados na câmara anterior de animais adultos da mesma linhagem. Os animais tratados receberam 30 mg/Kg de peso corporal (IP) por 7-9 dias e então foram sacrificados para análise histopatológica dos olhos. Apesar da alta dose do composto utilizada, nenhuma mudança no desenvolvimento dos germes foi observada nos olhos dos animais, exceto uma pequena presença de tecido mineralizado em relação aos controles. Um discreto efeito anabolizante da droga foi observado, sem se tratar, no entanto, de um efeito citotóxico ou citostático no sistema celular.<sup>34</sup>

O potencial teratogênico no desenvolvimento de estruturas também foi estudado durante a vida fetal do camundongo. Camundongos fêmeas foram injetados IP com 30 mg/Kg da droga durante o 13º e o 16º dias de gestação. Após o sacrifício, as cabeças dos fetos foram descalcificadas por 7 dias e preparadas para análise histopatológica. Embora uma alta dose de droga tenha sido utilizada, não houve interferência com o desenvolvimento intra-uterino das estruturas analisadas ou na proliferação celular.<sup>35</sup>

## **1.2.2 Ações Farmacológicas**

### **Atividade antiviral *in vitro***

Células diplóides foram submetidas a diferentes concentrações da droga utilizando-se dois procedimentos diferentes: 1) inibição da adsorção viral no sistema do hospedeiro; e 2) capacidade inibitória da droga sobre a

adsorção viral em células previamente infectadas. Em ambos os experimentos, vírus de RNA envelopados e não-envelopados (vírus da stomatitis vesicular e poliovírus respectivamente) e vírus de DNA envelopados e não-envelopados (herpes simples tipo 1 e adenovírus tipo 5 respectivamente) foram utilizados. Os resultados indicaram que a droga protege apenas contra adsorção viral dos vírus envelopados (vírus da stomatitis vesicular e herpes simples tipo 1). Com respeito à atividade terapêutica da droga *in vitro*, efeito citopatogênico (inibição total do efeito microscópico), foi encontrado: herpes simples tipo 1 (inibição total a 50 µg/mL), adenovírus tipo 5 (inibição total a 100 µg/mL), vírus da stomatitis vesicular (inibição total a 100 µg/mL) e poliovírus 3 (não houve inibição acima de 200 µg/mL). Nesta faixa de concentração não houve efeito citotóxico sobre as células.<sup>2</sup>

As propriedades anti-HIV do composto também foram estudadas. O composto dissolvido em dimetilsulfóxido foi adicionado à culturas de linfócitos T4 (linhagem CEM-IW) e então expostas ao HIV-1. Células não-infectadas e, células infectadas e tratadas foram usadas como controle básico. Essencialmente, as células T4 morreram com a infecção viral. Os resultados do experimento *in vitro* mostraram que o composto é inativo contra o vírus HIV tipo 1.<sup>1</sup>

### **Atividade antiviral *in vivo***

Testes realizados em aproximadamente 250 cachorros infectados com parvovírus mostraram que o tratamento com 20 mg/10-15 Kg de peso corporal por três dias resultou na recuperação de mais de 95% dos animais. Resultados similares foram obtidos em cachorros portadores do vírus da cinomose, mas apenas durante o primeiro estágio da doença, ou seja, antes de atingir o sistema nervoso central. Estes resultados mostraram que a droga

tem ação antiviral *in vivo* contra parvovírus e vírus da cinomose em cachorros.<sup>2</sup>

### **Atividades imunoestimulantes preliminares**

Foi estudado o efeito da droga na linfoproliferação de células esplênicas provenientes de camundongos Balb/c. Os resultados mostraram claramente que 0,1 µg do composto produzia um efeito linfoproliferativo 3,3 vezes maior em relação ao controle, o qual corresponde a 63% da capacidade de 1 µg de concanavalina A, usada como representante de efeito mitogênico positivo.<sup>1, 36</sup>

A indução na formação de colônias de células esplênicas pelo composto foi testada em camundongos divididos em grupos para o sacrifício após diferentes tempos da inoculação da droga. Nos camundongos tratados com 1,7 µg (80 µg/Kg) a formação de colônias foi gradualmente observada nas células esplênicas. Nos animais controles valores de  $216 \pm 8$  para IgM e  $1105 \pm 60$  para IgG foram obtidos após 96 h. Por outro lado, valores de  $230 \pm 15$  e  $2032 \pm 95$  para as mesmas imunoglobulinas foram obtidos após o tratamento com a droga.<sup>1, 36</sup>

### **Atividades antitumorais**

A citotoxicidade do composto foi estudada contra 53 linhagens de células tumorais, representando 8 tipos diferentes de tumores. O composto não demonstrou nenhuma citotoxicidade significativa nas células tumorais.<sup>37</sup>

Entretanto, efeitos antitumorais *in vivo* contra o linfossarcoma-180 (tumor sólido) foram observados em camundongos tratados com doses diárias de 80 µg/mL aplicadas na parte superior do pescoço, durante 8 dias a partir do quarto dia após o transplante dos tumores. A queda dos tumores da superfície ocorreu durante os 10 dias seguintes e dentro de algumas

semanas houve completa cicatrização. Nenhum dos animais controle sobreviveu e os animais que não foram submetidos ao transplante tumoral, mas que foram tratados segundo o mesmo procedimento, sobreviveram sem quaisquer sinais de toxicidade.<sup>1</sup>

O efeito antitumoral da droga *in vivo*, também foi investigado em camundongos que receberam diferentes concentrações de células tumorais de Ehrlich. Dentre o grupo que recebeu 7 milhões de células tumorais, todos os animais não-tratados morreram após 27-30 dias, enquanto que todos os animais tratados com 80 µg/Kg sobreviveram. Quando 12 milhões de células foram inoculadas, os animais não-tratados morreram após 20-22 dias. Dos animais tratados com a mesma concentração de droga, 80% se recuperaram completamente.<sup>1</sup>

Um caso particular de um cachorro portador de um carcinoma spinocelular com 3 cm de diâmetro, na região anal, foi tratado durante 90 dias consecutivos com 80 µg/Kg, com total regressão tumoral.<sup>2</sup>

Em outro estudo, ratos congênicos WAB/Not e camundongos Balb/c foram transplantados com o carcinoma mamário (SP-1) e o plasmacitoma (SP-2/O/Ag14). Após o tratamento com 80 µg/Kg observou-se que um grupo de ratos e camundongos tiveram um aumento na sobrevida até a 21<sup>a</sup> e 23<sup>a</sup> semanas respectivamente, em relação aos animais não-tratados que morreram entre a 10<sup>a</sup> e a 11<sup>a</sup> semanas. Também observou-se nestes experimentos que os tumores nos animais controle cresceram progressivamente, havendo estabilização nos animais tratados entre a 8<sup>a</sup> e a 14<sup>a</sup> semanas após o transplante, mesmo sem haver regressão tumoral. Neste último caso, a não regressão foi atribuída ao curto período de tratamento (7 semanas, a contar da 4<sup>a</sup> à 10<sup>a</sup>). Embora não houvesse regressão tumoral, estes resultados são importantes já que o crescimento tumoral foi inibido entre a 10<sup>a</sup> e 15<sup>a</sup> semanas sem qualquer administração extra da droga.<sup>1</sup>

### 1.2.3 Estudos Clínicos

Uma relação dose-resposta foi calculada dos experimentos de citotoxicidade e células esplênicas formadoras de colônias. Então, duas doses de 5 mg/mL foram administradas intramuscularmente, em dias alternados, à dois voluntários. Um aumento de 2,3 vezes no número de linfócitos totais foi observado 15 dias após a última dose e um aumento de 3,7 vezes na linfoproliferação induzida por fitohemaglutinina em cultura. Os parâmetros hematológicos não se alteraram antes e depois do tratamento, bem como as taxas de bilirrubina, transaminases, fosfatase-alcalina e  $\gamma$ -globulina. Nenhum efeito colateral foi observado. O aumento na contagem de linfócitos foi observado sem diferenças significativas para ambos os sexos. Aumento na incorporação de timidina em culturas de linfócitos provenientes de indivíduos controle após a adição do sobrenadante de culturas de linfócitos dos voluntários tratados foi observada. A incorporação isotópica aumentou de um valor controle de  $44.193 \pm 370$  para  $74.153 \pm 1101$  cpm. Tal resultado, bastante interessante, é aparentemente devido à produção de interleucinas após o tratamento *in vivo*.<sup>38</sup> Triagens preliminares controladas em pacientes aidéticos vêm sendo conduzidas visando estabelecer um protocolo específico para a terapia da AIDS. Da mesma forma que a evolução de diferentes tipos de câncer em pacientes voluntários vem sendo acompanhada com resultados promissores.<sup>1, 39</sup>

Os importantes resultados preliminares obtidos quanto à atividade terapêutica da droga MAPA podem ser considerados causa dos esforços inferidos pela comunidade científica, nos últimos anos. Segundo Durán e colaboradores<sup>1</sup>, as alterações da resposta biológica provocadas pela droga MAPA quando administrada em animais experimentais, sugerem estar relacionadas ao sistema imune. A análise química quantitativa do MAPA impulsionou a especulação acerca da relação entre os principais componentes da macromolécula e a ação farmacológica observada.

A importância do magnésio para uma grande variedade de processos bioquímicos e fisiológicos relacionados à saúde e principalmente, o conhecimento do papel exercido por este íon na função imune, sugerem uma possibilidade de que a atividade do MAPA esteja relacionada à presença do magnésio, como um dos principais componentes da macromolécula.<sup>40-47</sup> Portanto, uma revisão das particularidades deste íon, potencial terapêutico e seu crítico papel na função imune é bastante oportuna.

### 1.3 O MAGNÉSIO E O SISTEMA BIOLÓGICO

Existe uma evidência indireta para a existência de compostos de fósforo inorgânico lábil em certas algas e fungos.<sup>48</sup> Alguns autores têm demonstrado a habilidade das mitocôndrias do cérebro, pulmão e fígado de rato em acumular uma quantidade respeitável de íons magnésio ( $Mg^{2+}$ ) e de ortofosfato.<sup>49</sup> Da mesma forma, foi demonstrado que em células de levedura, os íons  $Mg^{2+}$  acumulam-se principalmente nos vacúolos.<sup>50, 51</sup> O magnésio é o quarto cátion mais abundante do organismo e tem sido objeto de muitas investigações. Existe aproximadamente 20 mM de  $Mg^{2+}$ /Kg de tecido sem gordura, no organismo de um adulto normal. Em um indivíduo mediano contendo 20% de gordura e pesando 70 Kg, esta quantidade equivaleria a 1200 mM; o que corresponde à aproximadamente 20 - 28 g de  $Mg^{2+}$ . Cerca de 50% do  $Mg^{2+}$  existente se encontra localizado nos ossos, sendo que 30% deste é intercambiável. No entanto, a movimentação desta fração é muito baixa em contraste com o que ocorre em crianças. Usualmente, em torno de 30% da ingestão de  $Mg^{2+}$  diária será absorvida, podendo ser aumentada para 50% nos casos de carência deste cátion. O fato de que aproximadamente 45% do Mg se encontra intracelularmente pode desacreditar a noção de se considerar o cátion Mg como um elemento traço.<sup>49, 52</sup> Como o  $Mg^{2+}$  é o segundo principal cátion intracelular, sua importância é óbvia. De fato, o  $Mg^{2+}$  é essencial para a ativação de mais de 300 enzimas no organismo. Foi

demonstrado que o magnésio elementar é essencial para o armazenamento e a utilização da energia.<sup>49</sup> Com efeito, a clorofila, pigmento verde das plantas, não poderia ser sintetizada sem a presença do  $Mg^{2+}$ .<sup>49</sup> O  $Mg^{2+}$  tem um papel significativo no processo de acoplamento excitação-contração da musculatura lisa e esquelética; é crucial para a integridade mitocondrial, fosforilação oxidativa, síntese protéica, estabilidade dos ácidos nucléicos e permeabilidade das membranas.<sup>49, 52</sup>

Por não ser rotineiramente medido, ainda existem dificuldades acerca da avaliação da importância biológica e farmacológica deste cátion. O problema real acerca do papel desempenhado pelo  $Mg^{2+}$  não é “como” mas “onde” ele estaria envolvido!

### **1.3.1 “A História do Magnésio”**

Aproximadamente 60 anos atrás, observou-se arritmia cardíaca em ratos submetidos à uma dieta deficiente em  $Mg^{2+}$ , embora alterações morfológicas não tenham sido documentadas.<sup>52</sup> Este resultado fez emergir um interesse renovado pela importância cardiovascular do  $Mg^{2+}$  e intensa pesquisa experimental se seguiu em humanos. Foram encontrados níveis mais baixos de  $Mg^{2+}$  no soro de pacientes infartados do que em indivíduos saudáveis. Além disso, registrou-se uma diminuição de 30% no conteúdo de  $Mg^{2+}$  no miocárdio infartado de pacientes devido ao infarto do coração.<sup>52, 53</sup> Embora, tanto os dados experimentais em animais e humanos pareçam ser convincentes, o uso clínico do  $Mg^{2+}$  permanece limitado. Foi a descoberta dos antagonistas do cálcio e a introdução bem sucedida na terapia cardiovascular que proporcionou um segundo renascimento do  $Mg^{2+}$  nos anos setenta. Com relação a este possível benefício terapêutico, a administração do  $Mg^{2+}$  foi sendo recomendada em espasmos de artérias coronarianas, outras doenças vasculares acompanhadas por vasoconstrição,

hipertensão, cardiomiopatias, infarto do miocárdio, arritmias, trabalho de parto prematuro e eclâmpsia.<sup>53, 54</sup>

### 1.3.2 Farmacocinética do Magnésio

Aproximadamente 300 mg (25 mEq) de  $Mg^{2+}$  são ingeridos por dia em uma dieta normal. Um terço do  $Mg^{2+}$  total ingerido é absorvido pelo trato gastrointestinal (jejuno e íleo).<sup>55</sup> Segundo Hardwick e colaboradores<sup>55</sup>, a maioria dos estudos em humanos e animais, onde diferentes métodos experimentais foram utilizados, bem como a dieta, idade e as condições em que o  $Mg^{2+}$  foi encontrado, sugerem que uma significativa proporção de  $Mg^{2+}$ , senão o total, sejam absorvidas no intestino distal, ou seja, pelo íleo e cólon.

O  $Mg^{2+}$  pode cruzar o epitélio do intestino através de três mecanismos: difusão passiva, transporte ativo e arraste por solvente. A principal força direcional para difusão passiva é o gradiente químico através do epitélio. No intestino delgado as evidências, reforçando o transporte ativo, derivam principalmente de observações indiretas de que a velocidade de absorção do  $Mg^{2+}$  não permanece constante (ou linear), com o aumento da concentração de  $Mg^{2+}$ . Tais observações sugerem, mas não estabelecem, a existência de um mecanismo de transporte saturado, mediado celularmente, para o  $Mg^{2+}$  no intestino delgado. Por exemplo, é possível que altas concentrações de  $Mg^{2+}$  possam reduzir a permeabilidade de "tight junctions", que em um todo podem levar à uma redução na velocidade de absorção difusional do  $Mg^{2+}$ , resultando na participação de um mecanismo saturável. Ademais, o mecanismo absorptivo ativo que existe no cólon descendente, provavelmente, é importante apenas sob condições anormais de baixa ingestão de  $Mg^{2+}$  ou rápido crescimento. Sob as condições usuais de ingestão de  $Mg^{2+}$ , se esperaria que o mecanismo ativo fosse saturado e, portanto, a absorção do  $Mg^{2+}$  passaria a ser mediada através de mecanismos difusionais e arraste por solvente.<sup>55</sup>

Os 20% do  $Mg^{2+}$  sérico total são filtrados pelos rins. Sob condições normais, 3500 mg de  $Mg^{2+}$  são filtrados a cada 24 h e 100 a 150 nEq/L são excretados na urina. Uma vez filtrado, 20 a 30% do  $Mg^{2+}$  são reabsorvidos na parte proximal, 50 a 60% a nível da alça de Henle (ramo ascendente), e de 1 a 5% a nível da parte distal.<sup>55</sup>

A absorção de  $Mg^{2+}$  depende de uma série de fatores: o mais importante é a concentração de  $Mg^{2+}$  plasmático presente no organismo. Com um nível de  $Mg^{2+}$  endógeno alto o organismo não aceitará mais  $Mg^{2+}$  da dieta. Existem evidências para um componente saturável de absorção do Mg no intestino delgado e cólon descendente que é importante em dietas restritas em Mg.<sup>55</sup> Existem outros fatores que podem afetar os níveis plasmáticos de Mg, reunidos na tabela 1.

O volume de fluido extracelular (ECF) através de um fenômeno de diluição pode influenciar nas concentrações séricas de Mg. A medida que o ECF aumenta, a concentração sérica de Mg diminui.<sup>55</sup>

Doses farmacológicas de vitamina D (1,25-dihidroxicolecalciferol) aumentam a absorção de  $Mg^{2+}$  em animais deficientes ou não em vitamina D. Os dados disponíveis sugerem que uma significativa parcela da absorção do  $Mg^{2+}$  seja independente de vitamina D, por persistir em condições de deficiência de vitamina D. Entretanto, a saturação de vitamina D está associada com aumentos na absorção de  $Mg^{2+}$ . Em animais e humanos saturados com vitamina D submetidos a doses farmacológicas de vitamina D, observou-se aumento na absorção de  $Mg^{2+}$ , enquanto que, flutuações espontâneas nos níveis circulantes de 1,25-dihidroxicolecalciferol tiveram pouco efeito no transporte de  $Mg^{2+}$ . A importância da absorção de  $Mg^{2+}$  estimulada pela vitamina D na homeostase total do  $Mg^{2+}$  permanece incerta, particularmente à luz de um drástico aumento na excreção urinária de  $Mg^{2+}$ , que tem sido associado à administração de vitamina D.<sup>55, 56</sup>

Baixas concentrações séricas de cálcio podem criar uma situação de  $Mg^{2+}$  sérico elevado, o que não é uma surpresa já que o  $Mg^{2+}$  foi identificado

como um bloqueador natural do cálcio no organismo.<sup>52</sup> Resultados de estudos preliminares não excluem um efeito adaptativo do cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) sobre o transporte de  $\text{Mg}^{2+}$  no intestino. O  $\text{Ca}^{2+}$  pode afetar indiretamente a absorção do  $\text{Mg}^{2+}$  através de mudanças nas concentrações séricas dos hormônios reguladores do  $\text{Ca}^{2+}$ . Alterações na concentração sérica de  $\text{Ca}^{2+}$  são conhecidas por afetarem não só o 1,25-dihidroxicolecalciferol, mas também o hormônio paratireóideo (PTH). Embora o efeito do 1,25 dihidroxicolecalciferol sobre a absorção de  $\text{Mg}^{2+}$  não tenha sido prontamente elucidado, PTH aumenta a absorção de  $\text{Mg}^{2+}$  em ambos, humanos e animais. A maneira precisa pela qual PTH afeta a absorção de  $\text{Mg}^{2+}$ , entretanto, é incerta. Embora o envolvimento de 1,25-dihidroxicolecalciferol e PTH em mediar as interações entre  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  no intestino não esteja ainda totalmente esclarecido, estes hormônios são provavelmente mais importantes na adaptação a longo prazo aos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  da dieta, do que mediarão flutuações de curto prazo. Em adição, evidências *in vitro* sugerem que existe uma relação entre  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  no intestino independente destes hormônios.<sup>56</sup>

Também foi observado que o  $\text{Ca}^{2+}$  pode indiretamente afetar a absorção do  $\text{Mg}^{2+}$  através de mudanças na permeabilidade de membrana. A permeabilidade da membrana intestinal é sensível às alterações nas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . Pesquisadores encontraram que uma diminuição, tanto de  $\text{Ca}^{2+}$ , quanto de  $\text{Mg}^{2+}$ , aumenta a permeabilidade da “tight junction” e então, aumenta a difusão através do caminho paracelular. Uma vez que a diminuição de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  no lúmen é um estado extremo, poder-se-ia propor que alterações fisiológicas nas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$  no lúmen também influenciariam a difusão através do caminho paracelular, podendo ser importante na regulação do transporte de cátions através deste caminho.<sup>55</sup> Futuras investigações, entretanto, são necessárias para confirmar tal hipótese e para determinar sua importância na regulação do transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  de curto e longo prazos.

Tabela 1: Fatores que podem afetar o nível de magnésio sérico <sup>(a)</sup>

Hipermagnesemia	Hipomagnesemia
aumento da concentração de fosfatos	acidose aguda
	pancreatites aguda
	álcool (inibição direta da reabsorção)
diminuição da concentração de Mg <sup>2+</sup>	ressecção do intestino
	induzida por drogas
altos níveis de PTH	aldosterona
	anfotericina
	calcitonina
	carbenicilina
	digoxina
	diuréticos
	gentamicina
	hormônio do crescimento
	ticarcilina
	tobramicina
	tiroxina
	excessiva ingestão de sódio
	hipercalcemia
	aumento de ECF
	má absorção
	diurese osmótica
	má nutrição protéica
	má nutrição calórica
	enfermidade tireoideana

(a) Modificada da referência 44.

As concentrações séricas de fosfato estão diretamente relacionadas às concentrações séricas de Mg<sup>2+</sup>. A medida que os níveis séricos de fosfatos diminuem, os níveis de Mg<sup>2+</sup> também caem. Estudos entre interação de fosfato e absorção de Mg<sup>2+</sup> são tão importantes quanto aqueles da interação entre Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>. Entretanto, os dados sugerem que a interação entre

fosfato e  $Mg^{2+}$  no intestino é complexa e dependente de muitas variáveis, tais como idade e ingestão diária de  $Mg^{2+}$  e fosfato.<sup>55</sup>

As interações intestinais entre  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  ou fosfato vêm sendo demonstradas em animais e humanos; entretanto, a natureza destas interações não podem ser prontamente explicadas através dos dados disponíveis na literatura.

### **1.3.3 Determinação dos Níveis Séricos de Magnésio**

O nível normal de  $Mg^{2+}$  no soro e plasma está entre 1,6 e 2,1% nEq/L. Exceto no período neonatal, os níveis séricos ou plasmáticos em crianças e lactentes correspondem aproximadamente aqueles encontrados em adultos. Ao redor de 50 e 55% do magnésio sérico está ionizado, podendo afetar a excitabilidade neuromuscular. As concentrações intracelulares e extracelulares de  $Mg^{2+}$  podem variar independentemente, e um déficit em um compartimento pode não ser acompanhado por uma troca significativa em outro compartimento.<sup>52</sup>

Já que o  $Mg^{2+}$  se encontra predominantemente dentro da célula é provável que trocas no conteúdo intracelular reflitam em possíveis anormalidades mais do que variações séricas de  $Mg^{2+}$ . Assim sendo, onde poderia ser medido o  $Mg^{2+}$  tecidual? O sangue como tecido, ao qual se tem fácil acesso, oferece tais possibilidades. Do ponto de vista metodológico, a determinação de  $Mg^{2+}$  no sangue inteiro ou nos eritrócitos é totalmente possível.<sup>57</sup> No entanto, o conteúdo de  $Mg^{2+}$  dos eritrócitos depende do suprimento de  $Mg^{2+}$  durante a eritropoiese e da idade do corpúsculo vermelho. Como consequência, a determinação de  $Mg^{2+}$  no sangue total ou nos eritrócitos leva a falsos resultados. Além disso, observa-se que a medida do conteúdo de  $Mg^{2+}$  no sangue total está obsoleta e não tem nenhuma importância diagnóstica. Daí a especulação acerca de outros corpúsculos sanguíneos, como por exemplo os linfócitos, que poderiam adequar-se para

detectar trocas intracelulares no conteúdo de  $Mg^{2+}$ .<sup>58</sup> Foi demonstrado, por exemplo, que em pacientes que sofreram um infarto cardíaco agudo, as concentrações de  $Mg^{2+}$  nos linfócitos podem ser um modelo da concentração intersticial do miocárdio. Entretanto, em estudos mais recentes, correlações válidas não foram encontradas, como consequência de lesões celulares ou subcelulares que provocariam a liberação de  $Mg^{2+}$  de seu compartimento celular ou subcelular podendo precipitar na presença de sais de fosfato. Esta parte precipitada foi então repassada às determinações como se fosse atual, não se levando em conta o fato de que não é funcional, senão "morta", do ponto de vista do metabolismo celular. Assim, concluiu-se que as concentrações de  $Mg^{2+}$  no soro, em células nucleares circulantes e no músculo esquelético teriam pouco valor prognóstico para assegurar os níveis de  $Mg^{2+}$  no miocárdio de humanos com falência cardíaca. Entretanto, poder-se-ia estabelecer que o conteúdo normal de  $Mg^{2+}$  tecidual não significa obrigatoriamente níveis de  $Mg^{2+}$  funcional existentes intracelularmente. Por outro lado, uma redução nas concentrações de  $Mg^{2+}$  tecidual (não sanguíneas) é um índice incondicional de uma diminuição do conteúdo no tecido.<sup>52-54</sup>

Em geral, se pode concluir que obter informações acerca da deficiência de  $Mg^{2+}$  no organismo é extremamente complicado, particularmente em um órgão ou tecido determinado.

Entretanto, os níveis de  $Mg^{2+}$  sérico oferecem possibilidades úteis quando se quer detectar trocas extremas no equilíbrio do  $Mg^{2+}$ . Este parâmetro pode ser usado no caso de não se ter mais informações acerca de qualquer outro órgão que sofra deficiência deste cátion, já que a determinação e o monitoramento das concentrações teciduais reais é praticamente impossível.<sup>52, 58</sup>

Apesar de todos os avanços conquistados pela comunidade científica, a importância da deficiência de magnésio não foi ainda reconhecida universalmente. Além das dificuldades técnicas mencionadas, a principal

razão para esta atitude se baseia, principalmente, nos sintomas mal definidos e não específicos pelos quais a deficiência de  $Mg^{2+}$ , embora absolutamente diferente da carência de vitaminas, se manifesta. Entretanto, uma diminuição nos níveis de  $Mg^{2+}$  é considerada uma consequência de origem patogênica. Isto não surpreende já que o  $Mg^{2+}$  é indispensável em numerosas atividades enzimáticas e, provavelmente, atuando como um antagonista natural do  $Ca^{2+}$ . Já a hipermagnesemia se produz mais raramente, estando principalmente associada à doenças renais.<sup>49, 52</sup>

Os sintomas da deficiência ou do excesso de  $Mg^{2+}$ , em geral, não ocorrem em humanos apenas como resultado de fatores nutricionais: as desordens gastrointestinais e endócrinas, incluindo diabetes, as doenças renais e do coração, o alcoolismo, a malnutrição protéico-calórica e a desnutrição advinda de tratamentos para a obesidade, podem causar um desbalanço de  $Mg^{2+}$  resultando em problemas fisiológicos.<sup>40-47</sup>

Existem evidências acumuladas sobre o papel do  $Mg^{2+}$  no controle do ciclo celular, de bactérias a células humanas. Em microorganismos, a sequência de eventos coordenados, culminando na duplicação da biomassa e divisão celular, pode ser modulada através da expressão de efeitos diferenciais de  $Mg^{2+}$  durante o ciclo celular. Por exemplo, tem sido sugerido que o crescimento e a divisão celular em bactérias possuem diferentes afinidades por  $Mg^{2+}$ ; em leveduras, o ciclo celular dependente do fluxo de  $Mg^{2+}$  intracelular é responsável por regular a proliferação celular.<sup>59</sup> O conteúdo de  $Mg^{2+}$  nos tecidos e no sangue parece ser regulado geneticamente.<sup>40, 60, 61</sup> Como as concentrações de  $Mg^{2+}$  no plasma e nas células vermelhas do sangue são controladas geneticamente, muitos investigadores têm sugerido que este fator genético magnésio-controlador teria um importante papel no processo imune e nas reações de estresse. Isto não surpreende, considerando-se que a participação do  $Mg^{2+}$  no processo imune está consideravelmente esclarecida.<sup>40-42, 57, 60, 62-69</sup>

Nas células de mamíferos, o magnésio é importante por governar os passos chaves limitantes da velocidade no ciclo celular, particularmente durante a síntese de DNA e na mitose. Ademais, foi demonstrado que a transformação celular pode causar perda seletiva da função reguladora do  $Mg^{2+}$ , evidenciando sua importância em oncogênese e na expressão da malignidade.<sup>46, 58, 59, 65, 69, 70</sup>

#### 1.3.4 O Magnésio e o Sistema Imune

O papel do  $Mg^{2+}$  na função imune vem sendo considerado devido à grande variedade de enzimas dependentes de  $Mg^{2+}$  e sua participação crítica na barreira das vias iônicas. O  $Mg^{2+}$  participa na resposta imune de várias maneiras, tendo um papel crucial em reações que afetam a imunocompetência.

Enquanto estudos dos efeitos *in vitro* do Mg na função imune são abundantes, existem ainda poucos estudos das consequências da deficiência do  $Mg^{2+}$  *in vivo*; além disso, a maioria dos estudos *in vivo* foram executados em camundongos e ratos.

A deficiência de  $Mg^{2+}$  em roedores prejudica a síntese de imunoglobulina G (IgG) e a imunidade celular. As complicações advindas incluem atrofia tímica, níveis elevados de imunoglobulina E (IgE), hipereosinofilia, histaminoses e deficiência na produção de interleucinas. Sequelas imunológicas da deficiência de  $Mg^{2+}$  em humanos podem ser afetadas por controle genético da concentração de  $Mg^{2+}$  nas células do sangue. Ativação anormal do complemento, excesso na produção de anticorpos e maior suscetibilidade a alergias e infecções viral e fúngica crônicas também ocorrem. O  $Mg^{2+}$  parece ter uma função protetora em reações alérgicas agudas. Os efeitos da diminuição de  $Mg^{2+}$  em pequenos animais são específicos para a espécie e a linhagem. Muitos dos efeitos foram observados em ratos jovens. Dentre eles, destacam-se atrofia tímica e

diminuição na produção de timosina, diminuição da produção de anticorpos, seguida da sensibilização por eritrócitos de carneiro, diminuição da produção de  $\gamma$ -globulina (IgG) e diminuição no número de colônias de células formadoras de anticorpos no baço.<sup>40-43, 60, 63, 65, 67, 71, 72</sup>

## **Imunoglobulinas**

A síntese de imunoglobulinas a partir de amino-ácidos segue o modelo geral de síntese de proteínas. O magnésio é reconhecido como um fator essencial em muitos mecanismos envolvidos na síntese protéica: a) ativação de enzimas catalisadoras da formação do RNAm (ácido ribonucléico mensageiro), síntese protéica propriamente dita e também reações de fosforilação oxidativa que fornecem a energia necessária para a formação das ligações peptídicas; b) manutenção das estruturas do DNA (ácido desoxirribonucléico), dos ribossomas, dos RNAs de transferência e ribossomal; c) estabilização da interação entre RNA e ribossomas para que a síntese de polipeptídeos no complexo ribossomal possa proceder.<sup>44</sup> As gama-globulinas compõem aproximadamente 1% das proteínas plasmáticas e são responsáveis por grande parte da capacidade de resistência do organismo, sob a forma de diferentes classes de imunoglobulinas (Ig) distintas antigenicamente. Muitos investigadores têm relatado uma depressão nas  $\gamma$ -globulinas em ratos com deficiência de Mg.<sup>42, 44, 45, 65, 67, 73</sup>

### **Formas circulantes**

A IgG é a classe de imunoglobulinas predominante no soro humano, totalizando cerca de 70%. Ela é formada depois das IgM, na resposta imune à um desafio antigênico. A redução desta fração é a principal responsável pela redução na concentração de  $\gamma$ -globulinas em ratos e camundongos.<sup>42, 44,</sup>

65

A IgM é a maior das moléculas de Ig e compreende 6% do total delas. Ela é a primeira a ser formada em resposta a um estímulo antigênico e tende a permanecer na circulação sanguínea.<sup>42, 44</sup>

A classe das IgA é intermediária em tamanho entre as IgG e IgM. Ela compõe cerca de 24% do total das Ig e predomina em secreções dos sistemas respiratório e gastrointestinal. Entretanto, o efeito da deficiência de  $Mg^{2+}$  nas IgA ainda não é definitivo como nas IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> e IgM.<sup>42</sup>

Normalmente presente em pequenas quantidades, a IgE é produzida em elevadas quantidades em situações alérgicas. Estímulo antigênico de células progenitoras cobertas por IgE causa a liberação de mediadores, como a histamina, que são responsáveis pelos sintomas da alergia. Em contraste ao efeito geral depressivo devido a deficiência de  $Mg^{2+}$  apresentado em outras classes de Ig, observa-se um aumento da resposta específica de IgE em tal situação.<sup>74</sup> Funcionalmente, a deficiência de  $Mg^{2+}$  em roedores mostrou prejudicar a imunidade celular. O prejuízo na imunidade celular e a diminuição nos níveis de IgG podem produzir hipereosinofilia elevando o título de IgE.<sup>40</sup> Bioquimicamente, a deficiência de  $Mg^{2+}$  em roedores implicou em níveis elevados de  $\beta$ -glucuronidase em linfócitos e eritrócitos, e níveis baixos na mucosa gástrica. A  $\beta$ -glucuronidase afeta as características das membranas celulares e sua concentração influencia a maturação dos linfócitos T.<sup>40, 74</sup>

### **Células formadoras de anticorpos**

A quantificação do número de células formadoras de anticorpos (AFC) fornece a habilidade do sistema imune humoral esplênico em responder a um estímulo antigênico. A presença de AFC no baço poderia explicar as baixas concentrações de IgM encontradas em animais Mg-deprimidos, já que a IgM é a Ig produzida em maior quantidade na resposta primária a um estímulo antigênico. A resposta imune secundária a um estímulo é

primariamente a produção de IgG. A idéia de que AFC está reduzida também em uma resposta secundária é consistente com a idéia de que a capacidade de síntese de IgG está similarmente reduzida na deficiência de  $Mg^{2+}$ .<sup>42</sup>

### **Atividade de anticorpos específicos**

Segundo McCoy e Kenney<sup>42</sup>, os baixos níveis de anticorpos encontrados em ratos deficientes de  $Mg^{2+}$  deve ocorrer devido a falta de  $Mg^{2+}$  para o metabolismo celular e síntese de anticorpos. Foi igualmente relatado que a deficiência materna de  $Mg^{2+}$  influencia a imunocompetência humoral das ninhadas.<sup>66</sup> Entretanto, na maioria dos estudos os animais foram submetidos a dietas que produzem deficiências severas de  $Mg^{2+}$ , em lugar de apenas alguns níveis subótimos de  $Mg^{2+}$  serem induzidos. Deficiências marginais de  $Mg^{2+}$  vêm se tornando cada vez mais reconhecidas na clínica. Os efeitos deste tipo de deficiência em imunocompetência são de grande interesse.

Em um trabalho de Windhauser e colaboradores<sup>41</sup> os animais foram submetidos a dietas para induzir vários níveis de deficiência de  $Mg^{2+}$ . Neste trabalho, deficiências marginais de  $Mg^{2+}$  ainda fornecem quantidades suficientes do cátion para a síntese de albumina e de  $\gamma$ -globulinas. Tais autores confirmaram que a redução nos níveis de proteínas plasmáticas em ratos submetidos a dietas severas estava associada à deficiência em  $Mg^{2+}$  e não a uma malnutrição generalizada.<sup>41</sup> A capacidade de aglutinação e lise dos anticorpos para um determinado antígeno demonstra a atividade específica de um anticorpo. Neste caso, em comparação com o anticorpo IgG, o anticorpo IgM seria mais eficiente em promover a lise de um antígeno na presença do complemento.<sup>42, 44</sup> No estudo de Windhauser e colaboradores<sup>41</sup> os animais foram imunizados com uma suspensão celular de células vermelhas de carneiro, iniciando uma resposta imune primária. Os

níveis de anticorpos encontrados aparentemente corresponderam aos níveis de IgM em deficiências marginais e severas.

Elin<sup>73</sup> encontrou que esplenócitos de camundongos deficientes em  $Mg^{2+}$  tinham uma habilidade reduzida de responder a um estímulo antigênico e sintetizar IgM. Os níveis mais baixos de anticorpos encontrados, em ratos severamente deficientes, poderia ser devido a uma falha na síntese de interleucinas, as quais estão envolvidas na diferenciação de células B e na secreção de imunoglobulinas.<sup>75</sup> Windhauser e colaboradores<sup>41</sup> observaram uma alta demanda fisiológica de  $Mg^{2+}$  durante a fase de crescimento dos ratos, diminuindo quando os animais atingiram uma fase estacionária de crescimento. Acredita-se que nesta fase a concentração de  $Mg^{2+}$  plasmática tenha atingido o estado estacionário, mantendo sua homeostase. Tal fato poderia, em parte, justificar porque a imunocompetência não foi afetada por níveis subótimos de  $Mg^{2+}$  nutricional, tendo pouca influência sobre as concentrações de imunoglobulinas.<sup>41</sup>

Com as mudanças que ocorrem nos órgãos linfóides na deficiência de  $Mg^{2+}$ , e devido à necessidade de  $Mg^{2+}$  para a síntese protéica, os efeitos da deficiência de  $Mg^{2+}$  na síntese de imunoglobulinas e consequentemente na atividade específica de anticorpos são de especial interesse.<sup>40-42</sup>

## **Linfócitos**

Dois tipos de linfócitos, os linfócitos timo-dependentes (células T) e os linfócitos B (células B) têm um importante papel na resposta imune de humanos e outros organismos multicelulares. Ambos se originam na medula óssea, mas os linfócitos T chegam ao timo através da corrente sanguínea onde atingem a maturidade antes de circular através do corpo. A resposta imune envolvida com a resistência adaptativa do hospedeiro representa uma série de eventos complexos que ocorrem após a exposição a um antígeno. Os principais tipos de resposta imune são: 1) Imunidade celular, que é uma

resposta mediada por agentes sensibilizantes específicos e linfócitos T (timo-dependentes). Ela resulta do efeito exercido pelos linfócitos T, mais especificamente por uma subclasse de células T efetoras, diretamente nos antígenos ou nos macrófagos através das linfocinas. A imunidade celular estaria associada, principalmente, aos processos de hipersensibilidade tardia, rejeição de enxertos e resistência aos agentes infecciosos persistentes, além de participar do reconhecimento e destruição de células tumorais; 2) Imunidade humoral, que envolve a produção de anticorpos específicos, após a sensibilização contra um antígeno específico. Duas outras subclasses de células T ajudam a regular a resposta imune humoral. As células T auxiliares ( $T_h$  - linfócitos T helper) interagem com as células B (colaboração de células T e B) para amplificar a produção de anticorpos. Células T supressoras suprimem as atividades de células B e T efetoras. Neste caso, os níveis de  $Mg^{2+}$  modulam a síntese de imunoglobulinas, principalmente IgG, a ligação de IgM aos linfócitos, além da aderência entre células B e linfócitos T auxiliares.<sup>43, 76</sup>

As atividades de células B e de todas as subclasses de células T podem ser influenciadas por alguns tipos de macrófagos instruídos por antígenos. Outros macrófagos podem ser ativados (para provocar fagocitose) por linfocinas liberadas por células T efetoras.<sup>43</sup>

Além disso, o crescimento normal de linfoblastos de camundongos e humanos depende da presença de íons  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  no meio de crescimento.<sup>77</sup> Flynn e Yen<sup>77</sup> observaram menores quantidades de células blásticas do baço em meio de cultura deficiente de  $Mg^{2+}$ , em relação ao meio controle. A mitogênese de linfócitos do baço e do timo de ratos deficientes em  $Mg^{2+}$  foi menor do que aquela nos controles, mesmo quando foram utilizados meios de cultura contendo quantidades normais de Mg.

A baixa resposta à lecitinas dos linfócitos de ratos Mg-deficientes e a redução no número de células formadoras de anticorpos foram comparadas após a imunização dos animais privados de  $Mg^{2+}$  com células vermelhas de

carneiro. Os linfócitos de ratos deficientes em  $Mg^{2+}$  seriam menos estimulados por lecitinas (fitohemaglutinina = PHA, concanavalina A = ConA, e lipopolissacarídeos = LPS) em comparação com linfócitos de animais controle. Isto explicaria a síntese de anticorpos reduzida na deficiência de  $Mg^{2+}$ .<sup>44, 63</sup> Outros autores também encontraram que elevadas concentrações de  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  promoviam mitogênese em culturas de linfócitos de timo de ratos, independentemente do aumento de concentrações de adenosina monofosfato cíclico (cAMP). Em contraste aos efeitos de elevadas concentrações de  $Na^+$ ,  $K^+$  e  $Ca^{2+}$ , elevadas concentrações de  $Mg^{2+}$  não inibiam a estimulação por PHA ou diminuíam a viabilidade de linfócitos humanos.<sup>43, 62, 63</sup>

## Granulócitos

Muitos são os estudos que indicam a participação do  $Mg^{2+}$  na aderência das células imunes às células alvo. Tal aderência corresponderia à primeira etapa da citólise; a lise celular usualmente requer íons  $Ca^{2+}$ .<sup>40, 78</sup> A dependência de  $Mg^{2+}$  na aderência das células imunes foi demonstrada em humanos e em camundongos, não ser dependente do complemento, sendo mais comum para lise de células tumorais por células T e aloenxertos. A geração de linhagens citotóxicas de células T é prejudicada em meio deficiente de  $Mg^{2+}$ , em parte devido à diminuição na produção do fator de reposição de células T para células  $T_h$ .<sup>40, 77, 79-81</sup>

A citólise dependente de anticorpos é também dependente de  $Mg^{2+}$  e ocorre quando células citotóxicas naturais ou células NK ("natural killer cells"), granulócitos ou macrófagos destroem células-alvo revestidas por anticorpos. A dependência de  $Mg^{2+}$  foi estabelecida para a lise de eritrócitos de carneiro por células NK de várias espécies, para a lise de células tumorais e parasitas (*Trichinella spiralis*) por granulócitos, e para a lise de células

tumorais e eritrócitos de carneiro por macrófagos. A aderência pré-lítica de leucócitos às células-alvo é o sítio principal de atividade do  $Mg^{2+}$ .<sup>81-87</sup>

A deficiência de magnésio também pode inibir a desgranulação de neutrófilos, a qual procede através da liberação de substâncias lisossomais que são quimiotáticas e podem agir sobre o material antigênico preparando-o para a ingestão. A desgranulação também está associada ao ataque e destruição de organismos através da interação intracelular do fagossomo e do lisossomo.<sup>43</sup> O íon  $Ca^{2+}$  parece estar envolvido primariamente no controle da desgranulação. Embora o  $Mg^{2+}$  extracelular pareça não estar envolvido diretamente, ele tem um importante papel regulatório, já que o processo de desgranulação é aumentado pelo cAMP e o  $Mg^{2+}$  é requerido em sua síntese. A deficiência de  $Mg^{2+}$  pode inibir a desgranulação devido ao aumento do influxo celular de  $Ca^{2+}$  e  $Na^+$  e ao efluxo de  $K^+$  e, possivelmente,  $Mg^{2+}$ . Em adição ao aumento do  $Ca^{2+}$  celular, alterações nos níveis de  $Na^+$  e  $K^+$  podem aumentar o  $Ca^{2+}$  no citosol induzindo sua liberação da mitocôndria. O influxo de  $Ca^{2+}$  agiria como um ativador do processo secretório, em lugar de participar durante a secreção.<sup>43</sup>

Outros autores também demonstraram, *in vitro*, funções das células imunes dependentes de  $Mg^{2+}$ . São elas: a) ligação de IgM à membrana celular de linfócitos, b) agregação de macrófagos por linfocinas, c) aderência entre células  $T_h$  e células B induzida por antígenos e d) ligação de antígeno ao RNA de macrófagos.<sup>88-91</sup> As quatro funções são importantes na regulação imune e as duas últimas são particularmente importantes no processamento da informação imunológica.

### **Magnésio e a ativação do complemento**

O passo mais importante na cascata do complemento é a clivagem de C3 por enzimas chamadas C3-convertases. Esta reação gera o fragmento maior, C3b, o qual se liga aos complexos imunes, permitindo a ligação aos

receptores de C3b nos neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos B. A ligação de C3b à membrana, ativa a via alternativa do complemento (APC) neste sítio. C3b também transforma C3-convertases em C5-convertases, as quais ativam os componentes efetores C5 a C9, gerando princípios de complemento vasoativo, quimiotático e citolítico. As vias clássica e alternativa formam ambas C3-convertases, porém em resposta a estímulos diferentes. Na via clássica da C3-convertase, C4b2a é gerada quando C1 se liga a um complexo imune, IgM ou IgG. A ligação de C1 ativa a enzima dependente de  $Mg^{2+}$ , C1s-convertase, a qual catalisa a conversão de C4 e C2 a C4b2a. A função imune normal em indivíduos que são deficientes em C1s-convertase sugere que a atividade deste componente, dependente de  $Mg^{2+}$ , não é crítica para a atividade da via clássica.<sup>40, 92, 93</sup>

Em contraste, a atividade da APC é completamente dependente de  $Mg^{2+}$  *in vitro*. A lenta interação de C3 com fatores B, D e properdina produz C3bBb, uma C3-convertase preliminar que continuamente gera pequenas quantidades de C3b no sangue, independente da presença de substâncias ativadoras. O fator B se liga a C3b que, na presença de  $Mg^{2+}$ , é clivado pelo fator D e libera o fragmento Ba, revelando o sítio de ligação de C3 em Bb. O produto, C3bBb, é a amplificação da C3-convertase da via alternativa, assim chamada porque sua geração é parte de uma retroalimentação positiva que amplifica a clivagem de C3 e é responsável pela ativação, biologicamente efetiva, da APC. A via alternativa é engatilhada por numerosas substâncias solúveis tais como endotoxinas bacterianas e glúten e por certos componentes das membranas de micróbios e células de mamíferos. Sua atividade tem importância conhecida, por gerar complexos solúveis de antígeno-anticorpo, na citotoxicidade de células tumorais, em células infectadas (por vírus, parasitas e fungos), e na atividade bactericida do soro humano.<sup>40, 93-96</sup>

A atividade da APC em humanos é sensível à concentração sanguínea de  $Mg^{2+}$ . A atividade do complemento na deficiência de  $Mg^{2+}$  em humanos e em camundongos tem sido também estudada.<sup>40</sup>

Também, a transcrição do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) está sob o controle de proteínas celulares que se ligam às longas porções terminais repetidas do vírus (LTR). Dentre as regiões ligantes de proteínas do HIV-1 LTR está a região de transcrição. Foi demonstrado que pelo menos uma proteína indutora, C1, e uma constitutiva, C2, se combinavam ao HIV nas células de Jurkat. As duas proteínas diferem quanto às suas superfícies de clivagem, já que elas podem ser separadas por cromatografia de troca aniônica. Cátions bivalentes, tais como  $Mg^{2+}$  e  $Zn^{2+}$ , afetam diferentemente suas ligações à oligonucleotídeos que contêm o respectivo domínio no HIV. Tanto C1 como C2 também se ligam à uma sequência similar encontrada na subunidade  $\alpha$  dos receptores de interleucina-2.<sup>97</sup>

## **Interação do magnésio com substâncias químicas reguladoras da resposta imune**

### **Histamina**

A deficiência de  $Mg^{2+}$  em roedores causa um aumento na atividade de histidina-descarboxilase e aumenta os níveis circulantes de histamina e, conseqüentemente, de eosinófilos. O  $Mg^{2+}$  também participa na reposição da histamina por basófilos. Durante a sensibilização em coelhos, a administração de  $Mg^{2+}$  reduz a concentração de anticorpos à antígenos específicos, produzindo uma diminuição no número de reações de Arthus. A massa celular agranulada vista em roedores deficientes em  $Mg^{2+}$  pode ser devida a um aumento de  $Ca^{2+}$  ou a uma diminuição na síntese de AMPc, que inibiria a liberação de histamina.<sup>40, 70</sup>

A histamina é primariamente conhecida como um mediador da resposta anafilática e inflamatória, mas sabe-se também que ela é um importante supressor da resposta imune, estimulando os receptores  $H_2$  de linfócitos, os quais ativam a população de células T supressoras; bloqueadores dos receptores  $H_2$ , como por exemplo, a cimetidina, aumentam a resposta imune *in vivo*.<sup>98</sup>

### **Substância P**

A substância P é um neurotransmissor que se liga aos linfócitos T humanos estimulando a incorporação de timidina e leucina por linfoblastos, a qual é dependente de  $Mg^{2+}$ .<sup>40</sup>

### **Adenosina trifosfato**

Os macrófagos humanos têm receptores celulares de superfície para ATP (adenosina trifosfato). A ligação de ATP aos receptores do macrófago aumenta a permeabilidade de membrana e diminui a fagocitose. O sítio de ligação envolve uma  $Mg^{2+}$ -ATPase.<sup>40</sup>

### **Cálcio**

O controle do crescimento e multiplicação celulares bem como da modulação da atividade celular através de ambientes iônicos são questões intrigantes da biologia celular, sendo a relação entre os cátions divalentes  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  de particular interesse.<sup>99</sup> A concentração citosólica, movimento e distribuição de  $Ca^{2+}$  intracelular está inerentemente ligada à regulação de uma variedade de funções e características celulares. De fato, a concentração de  $Mg^{2+}$  intracelular regula muitas reações de transfosforilação das vias glicolíticas, bem como o transporte e a utilização de glicose. Por exemplo, Cittadini e Scarpa<sup>64</sup> obtiveram resultados que indicam que a membrana plasmática de células tumorais ascíticas é altamente impermeável ao  $Mg^{2+}$  e que, dependendo das condições metabólicas, diferentes concentrações intracelulares de  $Mg^{2+}$  livre podem ser obtidas em função do tempo. Esta variação nos níveis intracelulares de  $Mg^{2+}$  livre é responsável pela regulação da entrada de  $Ca^{2+}$  na célula. A concentração de

$Mg^{2+}$  livre é dependente do conteúdo celular de adenosina trifosfato (ATP), e a inibição metabólica que leva à exaustão de ATP resulta em um aumento de duas a três vezes do nível de  $Mg^{2+}$  livre. Estas alterações no  $Mg^{2+}$  livre intracelular, as quais podem ser reguladas por mudanças metabólicas, podem ser a principal chave das vias metabólicas e a principal força direcional para a troca iônica nestas células.<sup>64, 99</sup> Segundo Cittadini e Scarpa<sup>64</sup> a adição de  $Mg^{2+}$  para o suprimento de células deficientes deste cátion, mas ricas em cálcio, provocou uma marcada perda de  $Ca^{2+}$  e ganho de  $Mg^{2+}$ . Estes dados mostram que a troca  $Mg^{2+}$ - $Ca^{2+}$  através da membrana plasmática de células ascíticas, e a direção e/ou magnitude dos fluxos, são controlados pelos gradientes intra-extracelulares de  $Mg^{2+}$ .

Quando o conteúdo celular de ATP e ADP (adenosina difosfato) diminui, os quais são conhecidos por se ligarem ao  $Mg^{2+}$ , um aumento na concentração de  $Mg^{2+}$  citosólico é observado. A entrada de  $Ca^{2+}$  em células ascíticas é dependente da magnitude dos gradientes de  $Mg^{2+}$  livre através da membrana plasmática. A entrada de  $Ca^{2+}$  estaria ligada a uma perda estequiométrica de 1:1 de  $Mg^{2+}$ . Sob condições metabólicas ativas, entretanto, células ascíticas perderam magnésio a uma baixa concentração extracelular de  $Mg^{2+}$  sem que houvesse aumento no cálcio celular. Em contraste, elas ganharam  $Mg^{2+}$  quando foram suspensas na presença de alta concentração externa de  $Mg^{2+}$ , sem aparente alteração no conteúdo de  $Ca^{2+}$ .<sup>64</sup>

Embora as alterações metabólicas, experimentalmente produzidas nos estudos de Cittadini e Scarpa<sup>64</sup>, fossem dramáticas, o fato de eventos metabólicos rotineiros em células tumorais ascíticas, tais como diminuição na produção de ATP, aumento na sua utilização, acidificação celular devido à glicólise e modulação das atividades da adenilato quinase e/ou desaminase, poderiam levar à alterações nos níveis de ATP citosólico, e conseqüentemente nos de  $Mg^{2+}$  citosólico livre. Esta modulação de  $Mg^{2+}$  livre poderia ser suficientemente ampla para modular as vias metabólicas e

fornecer uma força direcional para o movimento de íons e metabólitos através da membrana plasmática e de organelas intracelulares.<sup>64</sup>

O  $Mg^{2+}$  antagoniza a ligação de  $Ca^{2+}$  à calmodulina e pode ser um inibidor da via de  $Ca^{2+}$ . Ataques agudos de asma em humanos estão associados à uma queda brusca no  $Mg^{2+}$  sérico e de eritrócitos. A administração intravenosa de  $Mg^{2+}$  aumenta a função pulmonar em asmáticos durante e entre os ataques de asma, não sendo acompanhada por qualquer alteração nos níveis circulantes de histamina e cAMP, podendo representar um efeito bloqueador na via de  $Ca^{2+}$ .<sup>40, 100</sup>

### **Potássio**

Os linfócitos T possuem uma via de  $K^+$ , a qual é similar àquela encontrada nas células nervosas e musculares; o  $Mg^{2+}$  tem efeito clínico demonstrado na atividade desta via. Animais e humanos deficientes em  $Mg^{2+}$  mostraram sensibilidade aumentada desta via às alterações de voltagem. Efeitos similares ocorrem nos linfócitos T e podem modificar a regulação imune. Por exemplo, a formação de rosetas por linfócitos T é influenciada pela ação da bomba de  $Na^+-K^+$  na membrana.<sup>40</sup> Uma população especial de linfócitos T humanos formam rosetas ativas na presença de eritrócitos de carneiro. Esta população é aumentada em algumas doenças autoimunes. Inibição da bomba  $Na^+-K^+$  por ouabaína ou devido à deficiência em  $Mg^{2+}$  causou um aumento na formação destas rosetas pelos linfócitos humanos *in vitro*. O mecanismo é uma diminuição no potencial transmembrana produzindo aumento na afinidade celular devido à perda da repulsão de cargas negativas.<sup>40</sup>

### **Sódio**

O aumento da concentração de  $Mg^{2+}$  extracelular também seria responsável por reduzir a atividade do íon sódio intracelular.<sup>52</sup> A deficiência de  $Mg^{2+}$  está associada à uma alta frequência de arritmias cardíacas, hipertensão e morte súbita por isquemia do miocárdio.<sup>47, 52, 53, 101</sup> O magnésio ativa um grande número de enzimas, tanto diretamente como através da

formação de complexos e modificação de substratos, incluindo a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, cuja importância na manutenção da integridade intracelular é bem conhecida.<sup>63</sup>

Recentemente observou-se que mudanças de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase poderiam ser previstas variando-se o  $\text{Mg}^{2+}$  extracelular em linfócitos humanos. Através de um estímulo artificial, o aumento da concentração do  $\text{Na}^+$  citosólico livre, pôde-se testar a atividade de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Utilizando-se um inibidor endoplasmático seletivo de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, houve um aumento no  $\text{Na}^+$  intracelular, o qual não estaria relacionado à inibição de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, mas sim à uma estimulação da troca  $\text{Na}^+-\text{K}^+$ . Entretanto, não se pode excluir que um aumento da concentração de  $\text{Na}^+$  citosólico livre seja devido ao influxo de sódio através dos canais de cálcio. O aumento na concentração de  $\text{Na}^+$  citosólico livre deveria estimular a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase afim de manter a homeostase do  $\text{Na}^+$  celular. Observou-se que o aumento na concentração do  $\text{Na}^+$  citosólico livre, induzido por um inibidor seletivo, era significativamente menor na presença de  $\text{Mg}^{2+}$  externo do que na sua ausência, indicando que a potência contrarregulatória da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em diminuir o sódio citosólico livre é significativamente menor na ausência de  $\text{Mg}^{2+}$ . A importância clínica destas descobertas estaria relacionada ao papel da deficiência de  $\text{Mg}^{2+}$  na absorção de  $\text{Na}^+$ , e, conseqüentemente, na perda de  $\text{K}^+$ . A concentração de  $\text{Na}^+$  citosólico livre é criticamente influenciada pelo  $\text{Mg}^{2+}$ , isto é, as mudanças na atividade de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase não são efetivamente contrabalanceadas por outros sistemas de transporte de  $\text{Na}^+$ , tal como a troca  $\text{Na}^+-\text{H}^+$ . Assim o  $\text{Mg}^{2+}$  é necessário para manter normais as concentrações de  $\text{Na}^+$  citosólico livre nos linfócitos humanos. O  $\text{Mg}^{2+}$  externo parece ser um pré-requisito para manter uma atividade apropriada de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase bem como sua estimulação quando ocorre rápido aumento de  $\text{Na}^+$  citosólico livre.<sup>101</sup>

## OBJETIVOS

O objetivo desta tese foi investigar alguns aspectos mecanísticos da ação do composto MAPA, um agregado de fosfolinoleato-palmitoleato de amônio e magnésio protêico, e suas possibilidades terapêuticas através de efeitos dose-resposta em modelos experimentais *in vivo*. O tema foi abordado em diferentes etapas:

1. Estudo da biodisponibilidade do composto em ratos Wistar através da variação do teor de magnésio, medido no plasma e principais órgãos. As concentrações de  $Mg^{2+}$  foram determinadas por absorção atômica, tendo decorridos diferentes tempos de exposição à droga. O método foi previamente testado quanto a possíveis interferências, devido a presença de íons  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  e  $K^+$  nos fluídos biológicos.

Três doses foram pré-estabelecidas segundo estudos de toxicidade preliminares: 1500 mg/Kg, 750 mg/Kg e 375 mg/Kg, administradas em doses únicas intraperitoneais (IP).

2. Estudo dos efeitos do MAPA em ratas Wistar inoculadas SC com células tumorais de Walker-256 linhagem A e sublinhagem Ar. Dois protocolos foram alvo de investigação:

- a) efeito de inoculações multifocais de células de Walker-256 linhagem A x diferentes doses de MAPA, em gaiolas metabólicas individuais.
- b) efeito de 1 sítio de inoculação de células de Walker-256 linhagem A e sublinhagem Ar x diferentes doses de MAPA, em gaiolas coletivas.

3. Estudo dos efeitos de diferentes doses de MAPA,  $Mg_3(PO_4)_2$  ou  $NH_4MgPO_4$ , administradas IP, nas populações de células do sangue periférico de ratas Wistar saudáveis. Os diferentes sais de magnésio foram escolhidos afim de investigar a importância da porção que contém o magnésio na atividade observada do MAPA.

4. Estudo dos efeitos de diferentes doses de MAPA, administradas SC por um período de 35 dias, nas populações de células do sangue periférico de ratas Wistar saudáveis.

## **CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL**

## 2.1 SUBSTÂNCIA TESTE MAPA

A droga MAPA foi gentilmente cedida pelo Centro de Desenvolvimento de Compostos com Atividades Biológicas de São Paulo, sendo obtida a partir de culturas selecionadas de *Aspergillus oryzae*. A droga MAPA é um sólido branco obtido como micro cristais finos, na forma de um agregado polimérico após 120 h de cultura em meio apropriado. A purificação é feita posteriormente em coluna cromatográfica, como previamente descrito por Durán e colaboradores.<sup>1, 2, 26-29</sup>

## 2.2 ANIMAIS

Embora várias espécies de mamíferos possam ser utilizadas, os roedores são geralmente os animais escolhidos. Dentre eles os ratos foram os mais indicados devido ao porte e a menor quantidade de substância teste a ser utilizada. Tanto para a realização dos experimentos como para a manutenção das células tumorais de Walker-256 A e subAr foram utilizados ratos da linhagem Wistar fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP, com idade aproximada de 8 semanas. Os animais apresentaram uma variação de peso médio estatisticamente não significativa nos diferentes grupos utilizados nos experimentos. As diferenças foram testadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) a um nível de significância de 5%. Conforme o tipo de experimento os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas ou agrupados ao acaso em gaiolas plásticas, em ciclos claro-escuro de 12 h, exaustão forçada de ar e temperatura entre 21-23°C. Os animais foram aclimatados às condições do laboratório durante um período de pelo menos 5 dias. O regime alimentar foi o clássico com ração comercial padrão (Labina, proveniente da Purina) e água *ad libitum*. As gaiolas foram trocadas 3 vezes por semana com maravalha de Pinus.

## 2.3 LINHAGEM TUMORAL DE WALKER-256

A linhagem tumoral de Walker-256 foi gentilmente cedida pelo Dr. Ovídio Rettori, CAISM (UNICAMP), sendo originalmente obtida de uma linhagem do "Christ Hospital", "National Cancer Institute Bank", Cambridge, Massachussets, USA. Ela é mantida nas dependências do laboratório através de passagens sucessivas, subcutâneas (SC) ou intraperitoneais (IP), entre animais.

As células tumorais de Walker-256 crescem como células ascíticas na cavidade peritoneal de ratos, facilitando sua manutenção através das passagens consecutivas. Dessa forma, frascos contendo células tumorais de Walker-256, tanto da linhagem A (agressiva) como da sublinhagem Ar (regressiva), mantidas em nitrogênio líquido, foram descongeladas e as células foram reativadas pela reinoculação na cavidade peritoneal de uma rata. Para os grupos experimentais inoculados com células da linhagem A e da sublinhagem Ar, foram utilizadas células após 5 a 6 passagens sucessivas pela cavidade peritoneal das ratas doadoras.

Após retirada do líquido ascítico do peritônio, as suspensões de células tumorais foram diluídas aproximadamente 3 vezes com solução Ringer-lactato estéril gelada e em seguida, o número e a viabilidade de células tumorais, em cada uma das suspensões, foram determinados. A viabilidade das células tumorais foi sempre maior do que 95%, sendo determinada nas suspensões da linhagem A e da sublinhagem Ar através da exclusão do corante azul-tripan, em câmara Neubauer.

## 2.4 BIODISPONIBILIDADE DO MAPA

### 2.4.1 Princípio Metodológico

**Experimento 1:** A substância teste MAPA foi administrada intraperitonealmente aos animais em dose única de 750 mg/Kg. O veículo de administração utilizado foi tampão PBS-A, pH 7,2, tendo-se preparado a suspensão imediatamente antes da administração.

A substância teste foi administrada logo após a pesagem dos animais em dose volume de 10 mL/Kg de peso corporal e foram utilizados grupos separados de 6 ratos por tempo de exposição à droga, com peso médio de  $258 \pm 22$  g (n=78). Os animais controle receberam tampão PBS-A, pH 7,2, IP, na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados. Os animais foram alojados em gaiolas coletivas e agrupados ao acaso em número de 4 por gaiola.

Decorrido o tempo de exposição à substância, os animais foram anestesiados com éter etílico e o sangue coletado, utilizando-se capilares heparinizados para hematócrito, diretamente do plexo ocular. Os tempos de exposição selecionados foram 30 min; 1 h; 1,5 h; 2 h; 2,5 h; 3 h; 4 h; 8 h; 12 h; 24 h; 48 h e 96 h. A seguir os animais foram sacrificados e o sangue coletado foi centrifugado a 2500 rpm por 30 min, à temperatura ambiente, para separação do plasma. Todos os animais foram submetidos a uma autópsia geral, comportando um exame da superfície corporal externa, das cavidades torácica e abdominal e de seus respectivos conteúdos. As principais estruturas foram retiradas e imediatamente pesadas para evitar problemas de ressecamento sendo elas: os rins, o fígado, o baço, o pâncreas, o coração, os pulmões, a vesícula seminal e o estômago, cujo conteúdo foi descartado e o órgão lavado previamente à pesagem. O peso médio destas estruturas e a razão por 100 g de peso dos animais encontram-se na tabela 2. Tanto os órgãos como o plasma foram imediatamente

congelados e armazenados em “freezer” até a utilização. O descongelamento foi gradual a 4°C. O perfil de distribuição da droga no plasma e nos órgãos em função do tempo de exposição foi avaliado segundo o teor de Mg<sup>2+</sup> presente, medido por absorção atômica.

Tabela 2: Peso médio dos órgãos (g) e razão média peso órgão (g)/100 g peso do animal

ÓRGÃO	peso médio órgãos (g)	peso órgão (g)/100 g peso animal
FÍGADO	9,05 ± 1,07	3,55 ± 0,39
RINS	1,67 ± 0,16	0,65 ± 0,06
VESÍCULA SEMINAL	0,74 ± 0,26	0,28 ± 0,08
BAÇO	0,64 ± 0,14	0,25 ± 0,04
PÂNCREAS	1,63 ± 0,51	0,63 ± 0,19
ESTÔMAGO	1,56 ± 0,24	0,61 ± 0,08
CORAÇÃO	0,95 ± 0,18	0,36 ± 0,08
PULMÕES	1,10 ± 0,14	0,43 ± 0,06

Os valores correspondem à média ± desvio padrão da média dos órgãos coletados de todos os animais utilizados no experimento (n=78).

**Experimento 2:** A substância teste MAPA foi administrada diretamente no peritônio dos animais em doses únicas de 375 mg/Kg, 750 mg/Kg e 1500 mg/Kg para grupos separados de 2 ratos por tempo de exposição à droga. O veículo de administração utilizado foi tampão PBS-A, pH 7,2. A suspensão da droga a ser testada foi administrada logo após a pesagem dos animais em dose volume de 10 mL/Kg de peso corporal e foi preparada imediatamente antes da administração aos animais. Os animais controle receberam dose única de tampão PBS-A, pH 7,2, IP, na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados. Ratos com peso médio de 207 ± 23 g (n=72) foram utilizados no experimento. Os animais foram alojados em gaiolas coletivas e agrupados em número de 4 por gaiola.

Após decorrido o tempo de exposição à substância, os animais foram anestesiados com éter etílico e o sangue coletado, utilizando-se capilares heparinizados para hematócrito, diretamente do plexo ocular. Os tempos de

exposição selecionados foram 30 min; 1 h; 2 h; 4 h; 8 h; 12 h; 24 h; 36 h; 48 h e 72 h. A seguir os animais foram sacrificados e o sangue coletado foi centrifugado a 2500 rpm por 30 min para a separação do plasma. As amostras de plasma obtidas foram apropriadamente conservadas sob congelamento até a realização do ensaio subsequente. O descongelamento foi efetuado gradualmente a 4°C conforme o número de amostras a serem examinadas. O perfil de distribuição da droga no plasma em função dos tempos de exposição foi avaliado medindo-se o teor de  $Mg^{2+}$  no plasma pela técnica de absorção atômica.

#### **2.4.2 Tratamento Analítico do Plasma**

Em um béquer de 50 mL contendo 1,0 mL de plasma adicionou-se 2,0 mL de ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ ), tendo-se o cuidado de recobrir toda a amostra. Aqueceu-se em chapa quente adicionando-se 3,0 mL de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) 30%, gota a gota. A solução foi mantida no aquecimento até completa evaporação do peróxido de hidrogênio. Após o resfriamento adicionou-se 20 a 30 mL de água deionizada verificando-se a turbidez da solução. A solução límpida foi quantitativamente transferida para um balão de 50 mL, elevando-se o volume da solução com água deionizada. Algumas amostras foram submetidas a subseqüentes diluições quando necessário.

Uma curva padrão foi preparada para cada determinação, utilizando-se concentrações de  $Mg^{2+}$  que variaram de 0,2 a 1,0 ppm.

A leitura no espectrômetro de absorção atômica Zeiss FMD 3 foi feita segundo as especificações do aparelho e a 570,4 nm.

### **2.4.3 Tratamento Analítico dos Órgãos**

Foram preparados homogenatos dos órgãos em 5,0 mL de água deionizada, utilizando-se o politron Brinckmann Homogenizer.

A 1,0 mL de homogenato adicionou-se 3,0 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado e aqueceu-se em chapa quente. Gotejou-se 2,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, mantendo-se o aquecimento até a evaporação completa do peróxido de hidrogênio. Adicionou-se aproximadamente 30 mL de água deionizada, verificando-se a turbidez da solução, e elevou-se o volume para 50 mL em balão volumétrico. Diluições subsequentes foram feitas quando necessárias.

A leitura da concentração de Mg<sup>2+</sup> foi feita em espectrômetro de absorção atômica Zeiss FMD 3 seguindo-se as especificações do aparelho e a 570,4 nm.

Preparou-se uma curva padrão de Mg<sup>2+</sup> para cada determinação, utilizando-se concentrações que variaram de 0,2 a 1,0 ppm.

### **2.4.4 Avaliação da Interferência de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> na Determinação do Mg<sup>2+</sup> no Plasma**

Foi feita a determinação de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> nas amostras de plasma por fotometria de chama. Foram preparadas curvas padrões para tais íons nos seguintes intervalos de concentração: 10 - 100 ppm para Ca<sup>2+</sup> e 2 - 20 ppm para Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>. As leituras foram feitas em fotômetro de chama Micronal B 262.

Foram selecionadas amostras provenientes de animais submetidos a diferentes doses da droga e a diferentes tempos de exposição, os quais estão indicados no texto. A seguir, foi feito um estudo da possibilidade de interferência de íons Na<sup>+</sup> nas amostras utilizando-se soluções padrões de Mg<sup>2+</sup> dopadas com 35 e 400 ppm de Na<sup>+</sup>.

## **2.4.5 Preparação das Soluções Estoques de $Mg^{2+}$ , $Na^+$ , $K^+$ e $Ca^{2+}$**

**Solução estoque de  $Mg^{2+}$ :** Dissolveu-se 1000 g de magnésio metálico em aproximadamente 10 mL de ácido clorídrico concentrado (HCl) e elevou-se o volume da solução para 1,0 L com água deionizada em balão volumétrico.

**Solução estoque de  $Na^+$ :** Dissolveu-se 2,541 g de NaCl em 1,0 L de água deionizada em balão volumétrico.

**Solução estoque de  $Ca^{2+}$ :** Adicionou-se HCl 1:1 a 2,500 g de  $CaCO_3$  até a destruição completa do carbonato. Elevou-se o volume da solução para 1,0 L com água deionizada em balão volumétrico.

**Solução estoque de  $K^+$ :** Dissolveu-se 1,907 g de KCl em 1,0 L de água deionizada em balão volumétrico.

## **2.5 EFEITOS DA DROGA MAPA EM ANIMAIS INOCULADOS COM CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER-256**

### **2.5.1 Diferentes Doses de MAPA x Inoculações Multifocais de Células Tumorais de Walker-256 linhagem A**

Ratas Wistar procedentes do Centro de Bioterismo da UNICAMP foram distribuídas ao acaso em gaiolas metabólicas individuais e aclimatadas às condições do laboratório. Alterações no peso corporal, consumo de alimento e água, volume de urina (concentrações de sódio e potássio e osmolalidade, a qual foi monitorada através de alterações no ponto crioscópico da urina) foram seguidas diariamente, incluindo finais de semana e feriados.

Os eletrólitos foram analisados por fotometria de chama.

Células tumorais de Walker-256 linhagem A, obtidas após 5 a 6 passagens sucessivas pela cavidade peritoneal das ratas doadoras, foram

diluídas com solução Ringer-lactato estéril gelada a uma concentração final de  $16 \times 10^6$  células viáveis/mL. Um volume de 0,25 mL/sítio da suspensão celular foi administrada, através de inoculações bilaterais subcutâneas (SC), com uma distância de pelo menos 1 cm entre elas, a cada um dos diferentes sítios da região dorsal tóraco-lombar de cada rata, nos respectivos grupos experimentais.

As suspensões da droga MAPA foram preparadas em solução Ringer-lactato estéril e mantidas a uma temperatura de 4°C por um período de, no máximo, 4 dias. A administração da droga teve início 4 dias antes da inoculação das células tumorais. Aos grupos placebo foi administrado somente solução Ringer-lactato na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados. Os tratamentos empregados foram diários até o óbito ou sacrifício dos animais. O protocolo usado para o sacrifício submeteu os animais à anestesia prévia com éter etílico sem que sinais de dor ou estresse fossem detectados.

O diâmetro médio percutâneo dos tumores (mm) foi medido com o auxílio de um paquímetro e com um intervalo de um dia (média entre os dois diâmetros transversais maiores). Após o óbito ou sacrifício, os animais foram submetidos à autópsia e tiveram os tumores e, eventualmente, baço, timo e glândulas adrenais dissecados e pesados. Metástases em linfonodos regionais e distantes, invasão tecidual ou quaisquer outras anormalidades macroscópicas foram registradas.

## **Experimento I**

**Grupo 1:** 4 ratas placebo inoculadas em 2 sítios SC.

**Grupo 2:** 4 ratas inoculadas em 2 sítios SC e tratadas com MAPA em doses de 1,0 mg/Kg diárias, administradas SC.

**Grupo 3:** 4 ratas placebo inoculadas em 4 sítios SC.

**Grupo 4:** 4 ratas inoculadas em 4 sítios SC e tratadas com MAPA em doses de 1,0 mg/Kg diárias, administradas SC.

## **Experimento II**

**Grupo 1:** 6 ratas placebo inoculadas em 8 sítios SC.

**Grupo 2:** 6 ratas inoculadas em 8 sítios SC e tratadas com MAPA em doses de 10 mg/Kg diárias, administradas SC duas vezes ao dia em doses de 5 mg/Kg cada.

**Grupo 3:** 6 ratas inoculadas em 8 sítios SC e tratadas com MAPA em doses de 100 mg/Kg diárias, administradas SC duas vezes ao dia em doses de 50 mg/Kg cada.

### **2.5.2 Diferentes Doses de MAPA x 1 Sítio de Inoculação de Células Tumorais de Walker-256 linhagem A**

Ratas Wistar procedentes do Centro de Bioterismo da UNICAMP foram aclimatadas em gaiolas plásticas às condições do laboratório. Os animais foram agrupados ao acaso em número de 4 por gaiola. Alterações no peso corporal foram monitoradas a cada 2 dias.

Células tumorais de Walker-256 linhagem A, obtidas após 5-6 passagens sucessivas pela cavidade peritoneal das ratas doadoras, foram diluídas com solução Ringer-lactato estéril gelada a uma concentração final de  $16 \times 10^6$  células viáveis/mL. Um volume de 0,25 mL/sítio da suspensão celular foi administrado SC a apenas um sítio de inoculação na região dorsal tóraco-lombar de cada rata, nos respectivos grupos experimentais.

As suspensões da droga MAPA foram preparadas em solução Ringer-lactato estéril e mantidas a uma temperatura de 4°C por um período de, no máximo, 4 dias. A administração da droga teve início 4 dias antes da inoculação das células tumorais. Aos grupos placebo foi administrado solução Ringer-lactato na mesma razão dose-volume por peso corporal utilizada nos animais tratados. Os animais foram tratados diariamente até o óbito ou sacrifício, incluindo finais de semana e feriados. O protocolo usado

para o sacrifício submeteu os animais à anestesia prévia com éter etílico sem que sinais de dor ou estresse fossem detectados.

O diâmetro médio percutâneo dos tumores (mm) foi medido com o auxílio de um paquímetro e com um intervalo de um dia (média entre os dois diâmetros transversais maiores). Após o óbito ou sacrifício os animais foram submetidos à autópsia e tiveram os tumores dissecados e pesados. Metástases em linfonodos regionais foram identificadas e eventualmente pesadas. Metástases distantes, invasão tecidual ou quaisquer outras anormalidades macroscópicas foram registradas.

### **Experimento I**

**Grupo 1:** 8 ratas placebo inoculadas em 1 sítio SC.

**Grupo 2:** 8 ratas inoculadas em 1 sítio SC e tratadas com MAPA em doses de 0,5 mg/Kg diárias, administradas SC.

**Grupo 3:** 8 ratas inoculadas em 1 sítio SC e tratadas com MAPA em doses de 1,0 mg/Kg diárias, administradas SC.

### **Experimento II**

**Grupo 1:** 8 ratas placebo inoculadas em 1 sítio SC.

**Grupo 2:** 8 ratas inoculadas em 1 sítio SC e tratadas com MAPA em doses de 1,5 mg/Kg diárias, administradas SC.

### **Experimento III**

**Grupo 1:** 4 ratas placebo pré-irradiadas ( $\gamma = 400$  rads), inoculadas em 1 sítio SC.

**Grupo 2:** 4 ratas pré-irradiadas ( $\gamma = 400$  rads), inoculadas em 1 sítio SC e tratadas com MAPA em doses de 0,5 mg/Kg diárias, administradas SC.

No experimento III os animais receberam 400 rads de radiação ionizante gama (bomba de cobalto) nas dependências do CAISM -

UNICAMP, 7 dias antes da inoculação tumoral. O peso dos animais foi controlado antes, imediatamente após a irradiação e durante uma semana para total recuperação. O pré-tratamento com a droga MAPA iniciou-se a partir do 4º dia após a irradiação e as células tumorais foram inoculadas no 7º dia. Neste experimento também foi efetuado um controle do consumo de alimento por grupo.

### **2.5.3 Tratamento com MAPA x 1 Sítio de Inoculação de Células Tumorais de Walker-256 sublinhagem Ar**

Ratas Wistar procedentes do Centro de Bioterismo da UNICAMP foram acondicionadas em gaiolas plásticas e aclimatadas às condições do laboratório. Os animais foram agrupados ao acaso em número de 4 por gaiola e pesados a cada 2 dias.

Células tumorais de Walker-256 sublinhagem Ar, obtidas após 5-6 passagens sucessivas pela cavidade peritoneal das ratas doadoras, foram diluídas com solução Ringer-lactato estéril gelada a uma concentração final de  $24 \times 10^6$  células viáveis/mL. Um volume de 0,25 mL/sítio da suspensão celular foi administrado, através de inoculação SC, a apenas 1 sítio na região dorsal tóraco-lombar de cada rata, nos respectivos grupos experimentais.

As suspensões da droga MAPA foram preparadas em solução Ringer-lactato estéril e mantidas a uma temperatura de 4°C por no máximo 4 dias. O início da administração coincidiu com o dia da inoculação das células tumorais. Aos animais placebo foi administrado solução Ringer-lactato na mesma razão dose-volume por peso corporal utilizada para os animais tratados. Os animais foram tratados diariamente até o óbito ou sacrifício, inclusive nos finais de semana e feriados. O protocolo usado para o sacrifício submeteu os animais à anestesia prévia com éter etílico sem que sinais de dor ou estresse fossem detectados.

O diâmetro médio percutâneo dos tumores (mm) foi medido com o auxílio de um paquímetro com um intervalo de um dia (média entre os dois diâmetros transversais maiores). Após o óbito ou sacrifício os animais foram submetidos à autópsia detalhada e tiveram os tumores dissecados e pesados. Metástases em linfonodos regionais foram identificadas e pesadas. Metástases distantes, invasão tecidual ou quaisquer outras anormalidades macroscópicas foram registradas.

**Grupo 1:** 8 ratas placebo inoculadas em 1 sítio SC.

**Grupo 2:** 8 ratas inoculadas em 1 sítio SC e tratadas com MAPA em doses de 0,5 mg/Kg diárias, administradas SC.

## **2.6 ESTUDO DA VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CÉLULAS DO SANGUE**

### **2.6.1 Tratamento com MAPA x Tratamento com $Mg_3(PO_4)_2$ na Variação dos Níveis das Células do Sangue**

Ratas Wistar procedentes do Centro de Bioterismo da UNICAMP foram divididos em grupos de 4, ao acaso, compartilhando a mesma gaiola. Foram utilizados 2 animais para cada dose e substância testada.

As substâncias testes foram administradas diretamente no peritônio dos animais (IP), utilizando-se doses de 1; 10 e 100 mg/Kg/dia. O veículo de administração foi tampão PBS-A, pH 7,2, tendo-se preparado a suspensão imediatamente antes da administração aos animais. As substâncias testes foram administradas logo após a pesagem dos animais em dose volume de 10 mL/Kg de peso corporal. O peso dos animais foi monitorado a cada coleta de sangue.

Aos animais placebo foi administrado tampão PBS-A, pH 7,2, IP, na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados.

Os animais foram anestesiados com éter etílico e o sangue foi coletado para análise através do plexo ocular (0,5 mL), utilizando-se capilares heparinizados para hematócrito, antes da administração da droga e após 4 e 7 doses. Os hemogramas foram processados pelo laboratório de hematologia no HEMOCENTRO do Hospital das Clínicas, UNICAMP.

As contagens das células do sangue foram efetuadas no contador modelo Cell-Dyn 1600.

### **2.6.2 Tratamento com MAPA x Tratamento com $\text{NH}_4\text{MgPO}_4$ na Variação dos Níveis das Células do Sangue**

Ratas Wistar procedentes do Centro de Bioterismo da UNICAMP foram divididos em dois grupos de 5, ao acaso, compartilhando a mesma gaiola para cada substância testada.

As substâncias testes foram administradas IP em doses de 1,0 mg/Kg/dia, utilizando-se tampão PBS-A, pH 7,2, como veículo de administração. As suspensões das substâncias testes foram administradas logo após a pesagem dos animais e em dose volume de 10 mL/Kg de peso corporal tendo sido preparadas imediatamente antes da administração. O peso dos animais foi monitorado a cada coleta de sangue.

Aos animais placebo foi administrado tampão PBS-A, pH 7,2, IP, na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados.

Os animais foram previamente anestesiados com éter etílico e o sangue foi coletado diretamente do plexo ocular (0,5 mL), utilizando-se capilares heparinizados para hematócrito, antes e após 4 doses das substâncias envolvidas no experimento. Os hemogramas foram gentilmente

processados pelo laboratório de hematologia no HEMOCENTRO do Hospital das Clínicas da UNICAMP.

As contagens das células do sangue foram efetuadas no contador modelo Cell-Dyn 1600.

### **2.6.3 Variação dos Níveis das Células do Sangue (35 dias) x Diferentes Doses de MAPA**

Ratas Wistar procedentes do Centro de Bioterismo da UNICAMP foram acondicionados às condições do laboratório em gaiolas plásticas. Os animais foram distribuídos, ao acaso, em três grupos de 5 animais por gaiola. O peso dos animais foi monitorado a cada três dias durante o período do experimento.

A substância teste foi administrada SC, utilizando-se solução Ringer-lactato estéril como veículo de administração. As suspensões da droga foram mantidas a uma temperatura de 4°C por um período de, no máximo, 4 dias.

Os animais foram anestesiados com éter etílico e submetidos a coletas de sangue antes do início do tratamento com a droga e a cada 7 dias durante o período de 35 dias de tratamento. O sangue foi coletado diretamente pelo plexo ocular (0,5 mL), utilizando-se capilares heparinizados para hematócrito, e processados pelo laboratório de hematologia no HEMOCENTRO do Hospital das Clínicas, UNICAMP.

As contagens das células do sangue foram efetuadas no contador modelo Cell-Dyn 1600.

**Grupo 1:** 5 ratas placebo que receberam solução Ringer-lactato, administrado SC, na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados.

**Grupo 2:** 5 ratas tratadas com MAPA em doses de 0,5 mg/Kg diárias, administradas SC.

**Grupo 3:** 5 ratas tratadas com MAPA em doses de 1,0 mg/Kg diárias, administradas SC.

## **2.7 Métodos Estatísticos**

Para a análise dos resultados foram aplicados diferentes métodos estatísticos segundo o tipo de parâmetro avaliado.

Para amostras paramétricas aplicou-se análise de variância (ANOVA), ao nível de significância de 5%. Quando  $p < 0,05$ , o teste de Dunnett foi utilizado afim de se comparar as diferenças mínimas de diferentes grupos com o grupo controle. Já o teste de Tukey foi utilizado para se testar as diferenças mínimas existentes entre todos os grupos.

O teste t-Student, ao nível de significância de 5%, foi aplicado apenas no caso de amostras pareadas.

Para amostras não-paramétricas aplicou-se ANOVA de Kruskal-Wallis, ao nível de significância de 5%. Quando  $p < 0,05$ , o teste para comparações múltiplas foi empregado afim de se testar as diferenças mínimas entre os grupos.

O teste de Mann-Whitney, ao nível de significância de 5%, foi empregado quando dois grupos independentes foram testados.

O teste exato de Fisher, ao nível de significância de 5%, foi empregado quando foram comparadas proporções.

## **CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Com a finalidade de facilitar ao leitor, alguns conceitos fundamentais a respeito da metodologia empregada em algumas seções foram propositalmente introduzidos previamente à apresentação e discussão dos resultados.

### 3.1 INTERFERÊNCIA DE Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> NA DETERMINAÇÃO DO Mg<sup>2+</sup> NO PLASMA (item 2.4.4, capítulo 2)

Devido o conhecimento prévio de que íons Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> estão presentes nos fluidos biológicos e tecidos, conduziu-se um estudo para avaliar as possibilidades de interferência destes cátions na determinação do Mg<sup>2+</sup> nas amostras de plasma e de órgãos (seção 2.4.4, capítulo 2). Os animais foram designados segundo dose alta - 1500 mg/Kg (DA), dose média - 750 mg/Kg (DM) ou dose baixa - 375 mg/Kg (DB) e segundo o número da amostragem seguido do tempo de exposição à droga. Assim, por exemplo, DA 1.2 indica dose alta (1500 mg/Kg), animal 1, após duas horas de exposição ao MAPA. Os animais controle foram designados por CTRL 1.30', que indica controle negativo, animal 1, após 30 minutos de exposição à solução placebo. As amostras de plasma selecionadas para o estudo de interferência por íons Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> encontram-se na tabela 3, seguida das concentrações observadas para tais componentes.

Tabela 3: Concentrações de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> em amostras de plasma (ppm)

Amostra	Na <sup>+</sup> (ppm)	K <sup>+</sup> (ppm)	Ca <sup>2+</sup> (ppm)
CTRL 1.30	410 ± 8,8	5,8 ± 2,8	3,9 ± 2,9
DA 1.30	408 ± 6,7	7,8 ± 3,7	2,9 ± 1,5
DA 2.4	ND	7,1 ± 2,5	2,9 ± 2,7
DM 2.4	404 ± 5,7	7,6 ± 3,8	2,9 ± 1,7
DA 1.2	406 ± 3,7	7,2 ± 3,0	2,9 ± 1,5
DA 1.8	395 ± 9,5	6,8 ± 3,9	2,9 ± 1,5
DA 1.24	398 ± 8,2	4,5 ± 4,5	2,9 ± 1,9

ND = não determinado. Os valores descritos na tabela correspondem à média ± desvio padrão da média de 2 animais por amostra.

Os valores obtidos para o teor de  $K^+$  e  $Ca^{2+}$  foram relativamente baixos, e nossos esforços se concentraram em estabelecer qual a influência exercida pela presença de  $Na^+$  na determinação do  $Mg^{2+}$  presente nestas amostras.

Soluções padrões de  $Mg^{2+}$  foram contaminadas com concentrações conhecidas de 35 e 400 ppm de  $Na^+$ . O resultado está disponível na tabela 4, a qual também contém os valores médios para a absorvância do  $Mg^{2+}$  de diferentes curvas padrões preparadas. Para exemplificar, alguns valores obtidos para a absorvância do  $Mg^{2+}$  de diferentes preparações de soluções padrões, bem como diferentes leituras de uma mesma solução padrão, foram dispostos na tabela 5.

A contaminação das soluções padrões de  $Mg^{2+}$  com 35 e 400 ppm de  $Na^+$  (tabela 4) não mostrou diferença significativa em relação aos valores obtidos para soluções padrões puras de  $Mg^{2+}$  (determinado dos valores de t-student). Ademais, considerando-se o desvio padrão da média das concentrações de  $Mg^{2+}$  nas amostras do plasma dos animais experimentais (apêndice 1), a presença de altas concentrações de  $Na^+$  não interfere na determinação do  $Mg^{2+}$ .

Tabela 4: Absorvância a 570,4 nm de soluções padrões de  $Mg^{2+}$  puras e dopadas com 35 e 400 ppm de  $Na^+$

soluções puras	$A_{570,4}^{(a)}$	soluções dopadas	$A_{570,4}$
0,2	$0,127 \pm 0,03$	0,2 + 400 ppm $Na^+$	$0,130 \pm 0,02$
0,5	$0,288 \pm 0,02$	0,5 + 400 ppm $Na^+$	$0,296 \pm 0,02$
0,6	$0,327 \pm 0,02$	0,6 + 400 ppm $Na^+$	$0,333 \pm 0,02$
0,8	$0,441 \pm 0,01$	0,8 + 400 ppm $Na^+$	$0,450 \pm 0,03$
0,5	$0,288 \pm 0,02$	0,5 + 35 ppm $Na^+$	$0,291 \pm 0,02$
0,8	$0,441 \pm 0,01$	0,8 + 35 ppm $Na^+$	$0,440 \pm 0,02$

(a) Os valores descritos para as soluções puras e contaminadas com  $Na^+$  correspondem à média  $\pm$  desvio padrão de 8 curvas independentes. O teste t de Student foi utilizado para testar as diferenças entre as médias ao nível de 5%.

Tabela 5: Curvas padrões de Mg<sup>2+</sup> (Absorbância a 570,4 nm) <sup>(a)</sup>

solução (ppm)	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	4ª leitura
0,2	0,098	0,111	0,123	0,128
0,4	0,202	0,221	0,233	0,236
0,5	0,269	0,271	0,283	0,288
0,6	0,310	0,316	0,328	0,332
0,8	0,439	0,431	0,443	0,445
1,0	0,536	0,551	0,563	0,565

(a) As mesmas soluções padrões foram utilizadas para as leituras 1 e 2, com um intervalo de aproximadamente 30 min entre elas. Outras soluções padrões foram preparadas para as leituras 3 e 4, seguindo-se o mesmo procedimento.

### 3.2 BIODISPONIBILIDADE DO MAPA

A quantificação do curso temporal da absorção, distribuição, biotransformação e excreção química é denominada como cinética do agente químico ou mais frequentemente farmacocinética e/ou toxicocinética. O uso de modelos matemáticos para descrever estes processos permite previsões acerca do comportamento do organismo, tempo de permanência da substância teste no corpo após o término da exposição, e outras informações que podem ajudar na pesquisa de novos fármacos.

A confiança na extrapolação de dados de toxicidade de animais de laboratório para humanos pode ser aumentada pela aplicação de princípios farmacocinéticos integrados aos dados de toxicidade crônica e ao conhecimento dos eventos macromoleculares associados com toxicidade, por exemplo as relações que levam à carcinogênese.<sup>102</sup> A comparação dos parâmetros farmacocinéticos de uma substância química entre diferentes espécies de animais pode dar informações sobre a suscetibilidade diferencial relacionada à extrapolação interespecies de dados de toxicidade.<sup>102, 103</sup>

O objetivo deste estudo foi obter o maior número de informações possíveis acerca da biodisponibilidade do MAPA. Estes resultados além de fornecerem informações úteis sobre a absorção da droga, permitem interpretar alguns dos resultados obtidos em outros ensaios.

## **Farmacocinética**

A farmacocinética é a disciplina que estuda a dinâmica da absorção, distribuição, metabolismo e excreção de uma substância química no corpo. A quantificação dos parâmetros farmacocinéticos de uma substância química como função da dose administrada fornece o comportamento do modelo farmacocinético em relação a diferentes quantidades da substância química no corpo. Este tipo de estudo considera as características da substância ensaiada, sendo o ensaio adaptado de acordo com elas, fornecendo informações sobre o nível e a taxa de absorção; as características da distribuição entre os tecidos, órgãos e fluidos corporais; sobre a fixação reversível da substância de ensaio nos sítios de ação ou nas proteínas plasmáticas; sobre o metabolismo; taxa de excreção; e sobre os parâmetros bioquímicos (fixação irreversível do produto químico sobre um tecido ou sobre macromoléculas, efeitos sobre os sistemas enzimáticos do metabolismo ou a depleção dos compostos sulfidríla endógenos e não protéicos, por exemplo glutatona). Entretanto, isto não significa que todos estes aspectos sejam, necessariamente, avaliados.<sup>104</sup>

O tratamento com drogas, ou terapêutico, está historicamente associado à farmacodinâmica, o estudo de “o que a droga faz ao organismo”. Já se reconhece que a morbidez pode modificar as relações entre dosagem da droga e ambos, eficácia e toxicidade da droga. Mais recentemente, tornou-se óbvio que a morbidez pode modificar a farmacocinética e/ou a farmacodinâmica, e que é impossível isolar o efeito particular da doença nestes dois processos sem a investigação do decurso temporal (“time

course”), distribuição, absorção, metabolismo e excreção da droga e seus metabólitos no paciente.<sup>104</sup>

Quando animais experimentais doentes são utilizados, o objetivo é coletar o maior número de informações possíveis concernente ao efeito da morbidez na farmacocinética, que é a informação a qual descreve “o que o organismo faz à droga”. Estas informações podem servir como base racional para o ajuste inicial do tratamento terapêutico em um paciente em particular.<sup>104</sup>

Quando um clínico prescreve uma droga, e um paciente a utiliza, a preocupação fundamental gira em torno do efeito benéfico do agente na doença do paciente, apesar do efeito colateral (“side effect”). O espectro de efeitos indesejáveis de uma substância química é bastante amplo, alguns sendo deletérios e outros não. Em terapêutica, cada droga produz uma série de efeitos, mas geralmente apenas um deles está associado com o objetivo inicial da terapia; todos os outros efeitos são denominados indesejáveis ou colaterais daquela droga para a indicação terapêutica prescrita, ainda que alguns desses efeitos colaterais pudessem ser desejáveis para uma outra indicação terapêutica. Alguns dos efeitos colaterais de drogas são sempre indesejáveis, sendo deletérios ao bem estar dos humanos. Tais efeitos são denominados como adversos, deletérios ou tóxicos.

Na prática o fator crítico não é a toxicidade intrínseca da substância, mas o risco ou perigo associados à sua utilização. Risco é a probabilidade que uma substância tem de causar dano sob condições específicas. Segurança, a recíproca do risco, é a probabilidade de ocorrência do dano sob condições específicas. Substâncias potencialmente supertóxicas podem ser usadas com segurança quando controladas em função do ambiente, afim de prevenir absorção de quantidades suficientes para produzir toxicidade, não sendo perigosas da maneira como estão sendo utilizadas. Portanto, dependendo das condições de utilização, um agente químico muito tóxico pode ser menos perigoso do que um relativamente atóxico. A avaliação dos

riscos leva em conta possíveis efeitos prejudiciais para indivíduos ou para a sociedade, através da utilização de uma substância na quantidade e da maneira proposta. É importante considerar os efeitos prejudiciais ao ambiente e, mais diretamente, à saúde humana. Entretanto, a questão sobre o que constitui um risco aceitável é matéria de julgamento. Tais decisões são multifacetadas e complexas, e envolvem um balanço do risco e benefício. Altos riscos podem ser aceitáveis no caso de drogas utilizadas para salvar vidas, mas inaceitáveis no caso de aditivos alimentícios. Alguns dos fatores considerados na determinação de um risco aceitável são: (1) os benefícios adquiridos com a utilização da substância, (2) a adequação e disponibilidade de substâncias alternativas para o uso identificado, (3) a extensão antecipada do uso público, (4) as considerações empregadas, (5) as considerações econômicas, (6) os efeitos à qualidade ambiental, e (7) a conservação das fontes naturais.<sup>105</sup>

A principal proposta dos testes de toxicidade, tais como toxicidade aguda, crônica, teratologia e reprodução, é fornecer informações que possam ser usadas para avaliar o risco (ou estimar o perigo) aos humanos, em uma situação na qual o agente químico, o indivíduo e as condições de exposição são definidas. A aproximação tradicional para se estabelecerem os níveis de segurança ou tolerância para um agente químico ao qual humanos possam ser expostos é reduzir o nível onde nenhum efeito foi observado ("NOEL, no-observed-effect-level") a um fator seguro, que leva em consideração ambas as variações, intraespécies e interespecies.<sup>105</sup> É óbvio que para se calcular a dosagem máxima a qual humanos poderiam ser expostos a uma determinada droga ou substância sem exceder um certo risco, o risco necessita primeiro ser determinado. Um risco aceitável depende de uma série de fatores, que incluem seus benefícios à sociedade. O estabelecimento de níveis de risco aceitáveis é uma tarefa que intera toda a sociedade e não apenas a comunidade científica.

As características da exposição e o espectro dos efeitos se correlacionam de diversas maneiras para diferentes drogas. Esta correlação é denominada como relação dose-resposta, e constitui o conceito mais fundamental em farmacologia e toxicologia. Na verdade, a compreensão desta relação é fundamental para o estudo de substâncias tóxicas ou terapêuticas. As curvas dose-resposta descrevem a relação entre um agente químico e um efeito observado ou resposta. Para tanto, deve-se saber com razoável certeza se a resposta observada é o resultado da exposição àquela determinada substância. Assim sendo, a toxicidade de uma determinada substância e o seu efeito terapêutico são dependentes da dose administrada, sendo que uma maior toxicidade é observada após altas doses de uma substância do que após uma dose baixa. Entretanto, com relação ao conceito dose-resposta, mais importante é a concentração do agente químico que atinge o órgão alvo do que a dose administrada. Tal concentração dependerá da disponibilidade da substância, isto é, da sua absorção, distribuição, biotransformação e excreção, estando todos interrelacionados quando se deseja determinar quais as possibilidades terapêuticas de uma nova substância, bem como seu grau de toxicidade.<sup>105</sup>

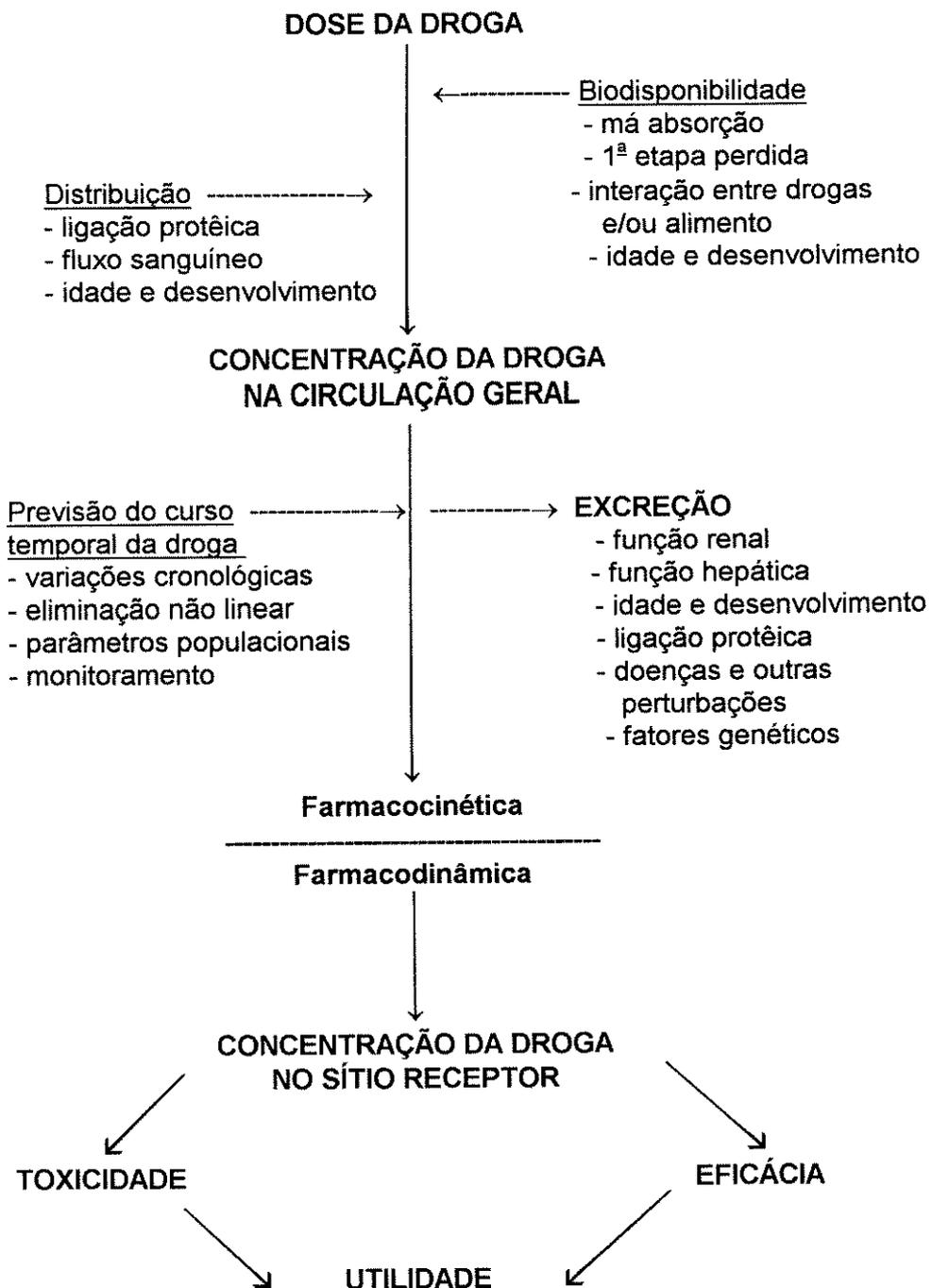
Entretanto, como ilustrado no esquema 1, muitos processos se interpõem entre a administração da dose, a concentração resultante no plasma ou no sangue e o aparecimento do efeito terapêutico da droga. Processos fisiológicos, que na maior parte das vezes estão alterados pelo estado de morbidez, determinam quão rápida, ou seja em quanto tempo, e em qual concentração a droga irá atingir o órgão alvo, por quanto tempo irá permanecer nele e ainda quem é responsável pela atividade terapêutica observada, se a droga ou algum produto de seu metabolismo. As três etapas mostradas no esquema 1, biodisponibilidade, distribuição e excreção ("clearance"), representam as três variáveis farmacocinéticas mais importantes.<sup>104</sup>

As drogas são eliminadas do sangue através da biotransformação, excreção, e acumulação em vários sítios de armazenagem. A importância relativa destes processos depende das propriedades físico-químicas da droga. Os rins representam as principais vias de eliminação de muitas drogas do organismo, embora outros órgãos tenham papel fundamental na eliminação de outras. Embora o fígado seja o órgão mais ativo na biotransformação de drogas, enzimas em outros tecidos, como as esterases no plasma, também podem biotransformar drogas. A biotransformação é frequentemente pré-requisito para a excreção renal, principalmente no caso de drogas lipossolúveis, sendo subseqüentemente reabsorvidas pelos túbulos renais após filtração. Após a droga ser biotransformada, seus metabólitos podem ser preferencialmente excretados na bile ou urina. A eliminação das drogas dependerá da velocidade na qual a substância é eliminada do organismo, ou seja, da sua distribuição.<sup>105</sup>

A concentração de uma droga que atinge o sangue dependerá do seu volume aparente de distribuição, conhecido como  $V_d$ , uma medida do espaço aparente disponível no organismo para conter a droga. Entretanto a distribuição de uma droga é usualmente bastante complexa.<sup>104</sup>

Se uma droga se distribui rapidamente nos tecidos, sua concentração no plasma irá diminuir exponencialmente com o tempo. Quando os dados são representados em um gráfico como concentração logarítmica no plasma em função do tempo, uma linha reta é obtida e o corpo pode ser considerado como um sistema de um compartimento para a substância em questão. A concentração da droga nos tecidos atinge o equilíbrio com aquela no plasma muito rapidamente. Entretanto, muitas das drogas necessitam longos tempos para que suas concentrações nos tecidos alcancem o equilíbrio com aquelas no plasma, resultando em uma eliminação biexponencial da droga. Neste caso, a disposição da droga obedece um modelo de dois compartimentos. Durante a fase distributiva, também chamada de fase  $\alpha$ , as concentrações da droga no plasma diminuirão mais rapidamente do que na fase pós-

distributiva, também chamada de equilíbrio ou eliminação, fase  $\beta$ . A fase distributiva pode durar desde alguns minutos até dias. Se a fase distributiva é aparente ou não, dependerá do tempo em que as primeiras amostras plasmáticas forem obtidas.<sup>105</sup>



ESQUEMA 1: Interrelação esquemática entre farmacocinética e farmacodinâmica no paradigma dose-utilidade. Os tópicos indicam alguns fatores que podem alterar tais parâmetros.

A eliminação de algumas drogas pode ser ainda muito complexa para ser descrita por um modelo de um ou dois compartimentos, sendo

necessários modelos multicompartimentais, os quais descrevem a disposição de drogas lentamente distribuídas e liberadas de compartimentos mais profundos. Neste caso, o volume de distribuição, uma constante, não tem significado fisiológico e usualmente não se refere ao volume real, e dependerá da afinidade da droga por proteínas plasmáticas e/ou pelos tecidos.<sup>105</sup> De fato, a ligação aos tecidos pode ser tão grande de forma que o volume farmacocinético para a droga seja muito maior do que o volume real do corpo. Os vários órgãos do corpo concentram muitas drogas em diferentes extensões, e se alguns órgãos têm alta capacidade para remover uma droga do plasma, esta droga irá exibir um largo volume de distribuição. Se a droga tem um largo volume de distribuição, é o mesmo que ser excretada lentamente já que uma quantidade menor está disponível no plasma para a excreção.

Além desses fatores, a distribuição de uma droga no organismo pode variar com o tempo. O sítio inicial onde uma droga se localiza depende do fluxo sanguíneo na área, da permeabilidade do tecido à droga e da disponibilidade dos sítios de ligação. Uma droga pode, por último, se redistribuir em tecidos menos perfundidos quando mais sítios de ligação estão disponíveis. Similarmente, a redistribuição de drogas altamente lipofílicas de tecidos bem perfundidos, tal como o cérebro, a tecidos menos perfundidos, tais como os tecidos adiposos, ocorre em função do tempo.<sup>105</sup>

O volume aparente de distribuição ( $V_d$ ) de uma droga é importante para determinar a quantidade total da droga no corpo, sendo função da concentração logarítmica da droga no plasma, após administração endovenosa.<sup>105</sup> A necessidade de administração endovenosa para a determinação de  $V_d$ , entre outros parâmetros cinéticos, pelos métodos convencionais, dificulta a avaliação do comportamento de uma droga no corpo quando não é possível obter a cinética da droga após administração endovenosa.

Os parâmetros de biodisponibilidade podem ser analisados por diferentes métodos matemáticos, segundo o procedimento selecionado e a decisão do operador.<sup>106</sup> A absorção de uma droga depende das propriedades físicas do composto, tais como lipossolubilidade e velocidade de dissolução. Embora seja frequente a associação entre aumento da solubilidade lipídica e aumento da absorção, uma substância extremamente lipossolúvel não irá se dissolver nos fluídos gastrointestinais e a absorção será lenta.<sup>107</sup> A absorção de uma substância é o processo pelo qual os compostos atravessam as membranas do organismo e atingem o fluxo sanguíneo.

Entretanto, a quantidade da droga que atinge a circulação sistêmica depende de uma série de fatores. Primeiro, ela dependerá da quantidade absorvida pelas células gastrointestinais. Antes que a droga atinja a circulação sistêmica geral, ela pode ser biotransformada pelas células gastrointestinais, extraída pelo fígado e excretada na bile, biotransformada pelo fígado ou biotransformada pelos pulmões. Este fenômeno de remoção da droga após a absorção, antes de atingir a circulação sistêmica geral, é conhecido como eliminação pré-sistêmica, ou efeito de primeira passagem. A quantidade de composto que atinge a circulação sistêmica geral após a administração é conhecida como a biodisponibilidade do composto.<sup>104</sup>

Entretanto, a determinação deste parâmetro é limitada pelas possibilidades de obtenção da cinética para administração endovenosa, o que nem sempre é possível, considerando-se que nem todas as drogas podem ser administradas por via endovenosa.<sup>104</sup>

Um número elevado de outros fatores também altera a absorção. Por exemplo, desnutrição, idade do animal, interação com outras drogas, EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) e outros agentes quelantes que aumentam a solubilidade e a absorção de metais, o fato de que um metal pode alterar a absorção de outro etc.<sup>105</sup>

A maioria das drogas atingem a circulação sanguínea de humanos após a absorção da pele, pulmões, ou trato gastrointestinal. Entretanto, ao

serem estudadas, as drogas são administradas aos animais de laboratório por vias especiais, sendo as mais comuns: (1) intraperitoneal, (2) subcutânea, (3) intramuscular, e (4) endovenosa. A absorção de drogas depende da via de administração, sendo que a via endovenosa introduz a droga diretamente no fluxo sanguíneo, eliminando o processo de absorção. Além disso, a formulação da droga também pode afetar a velocidade de absorção.<sup>105</sup>

Informações preliminares acerca da biotransformação e excreção de drogas podem ser obtidas comparando-se a cinética de absorção da droga, quando diferentes vias de administração são utilizadas. Por exemplo, uma droga que tenha uma toxicidade seletiva por algum outro órgão que não o fígado e o trato gastrointestinal será muito menos tóxica quando administrada intraperitonealmente do que quando administrada subcutaneamente ou intramuscularmente. Compostos que não são biotransformados pelo fígado ou excretados na bile deverão apresentar uma toxicidade independente da via de administração.<sup>105</sup>

## **Experimentos**

Por ser insolúvel nos veículos de administração convencionais, o MAPA não pode ser administrado diretamente no fluxo sanguíneo. A via intraperitoneal foi selecionada pois drogas administradas subcutaneamente e intramuscularmente são usualmente absorvidas a uma velocidade mais lenta.<sup>107</sup> A execução de testes de biodisponibilidade oral é uma hipótese limitada pela grande quantidade de droga a ser administrada e a grande amplitude de pH do tubo gastrointestinal poderia afetar a velocidade de absorção da droga.

Outra razão que contribuiu para a escolha da via intraperitoneal foi o conhecimento de que as drogas são mais lentamente absorvidas de suspensões do que de soluções.<sup>105</sup> A cavidade peritoneal oferece uma

grande superfície de absorção através da qual as substâncias atingem mais rapidamente a circulação e suspensões do MAPA foram preparadas para a administração aos animais.

#### EXPERIMENTO 1 (item 2.4.1, capítulo 2)

Foram selecionados 6 animais ao acaso para cada tempo de exposição à droga. Esses animais foram tratados com 750 mg/Kg de MAPA, administrados em dose volume de 10 mL/Kg de peso corporal, diretamente no peritônio dos animais. Aos animais controle foi administrado tampão PBS-A, na mesma razão dose-volume. Após diferentes tempos de exposição à droga, o teor de  $Mg^{2+}$  foi medido em amostras tratadas de plasma e dos principais órgãos. O tratamento do plasma e dos órgãos foi descrita nos itens 2.4.2 e 2.4.3 do capítulo 2.

A farmacocinética é a relação matemática que existe entre a dose de uma droga e sua concentração em um sítio prontamente acessível no organismo (por exemplo, plasma ou sangue), não sendo direta ou simples para muitas drogas. O perfil das curvas de concentração plasmática de  $Mg^{2+}$  x tempo de exposição à droga MAPA (Figuras 2 e 5) é uma função da biodisponibilidade, distribuição e fatores de perda.

De acordo com o gráfico, figura 2, nossos resultados da concentração plasmática de  $Mg^{2+}$  sugerem que a absorção da droga é rápida e não se trata de um modelo monocompartimental de absorção. Um segundo pico de concentração pode ser observado, indicando uma reabsorção entero-hepática após eliminação biliar ou uma acumulação em algum órgão, seguida da distribuição na circulação periférica. Os valores obtidos para a variação da concentração de  $Mg^{2+}$  plasmática foram estatisticamente analisados utilizando-se ANOVA. A análise de variância estabeleceu existirem diferenças significativas entre as médias obtidas ao nível de significância de 5% ( $p < 0,001$ ). Em função deste resultado, o teste de Tukey foi utilizado para testar as diferenças mínimas significativas entre as médias

obtidas, confirmando a presença de dois picos máximos de concentração de  $Mg^{2+}$ , após 1 h e 2,5 h ( $p < 0,001$ ).

O valor obtido para a concentração média de  $Mg^{2+}$  após 1 h é estatisticamente significativo em relação aos valores obtidos após 30 min e 1,5 h ( $p < 0,001$  e  $p < 0,01$  respectivamente). Da mesma forma, o valor obtido para a concentração média de  $Mg^{2+}$  após 2,5 h é estatisticamente significativo em relação aos valores obtidos após 2 h e 3 h ( $p < 0,001$ ).

Segundo Graves e colaboradores<sup>108</sup>, erros experimentais podem ser frequentemente observados e, nestes casos, a cinética resulta em um modelo monocompartimental, entretanto, na maioria dos casos, picos secundários indicam que uma absorção diferenciada esteja ocorrendo.<sup>108, 109</sup> Sendo assim, a hipótese de erro analítico pode ser descartada devido as condições experimentais, pois o método utilizado é amplamente empregado na literatura para determinações de  $Mg^{2+}$ .<sup>41, 58, 64, 66, 71, 94, 110-114</sup>

As concentrações de  $Mg^{2+}$  plasmáticas e os respectivos desvios padrões em função do tempo estão disponíveis na tabela 1 do apêndice 1.

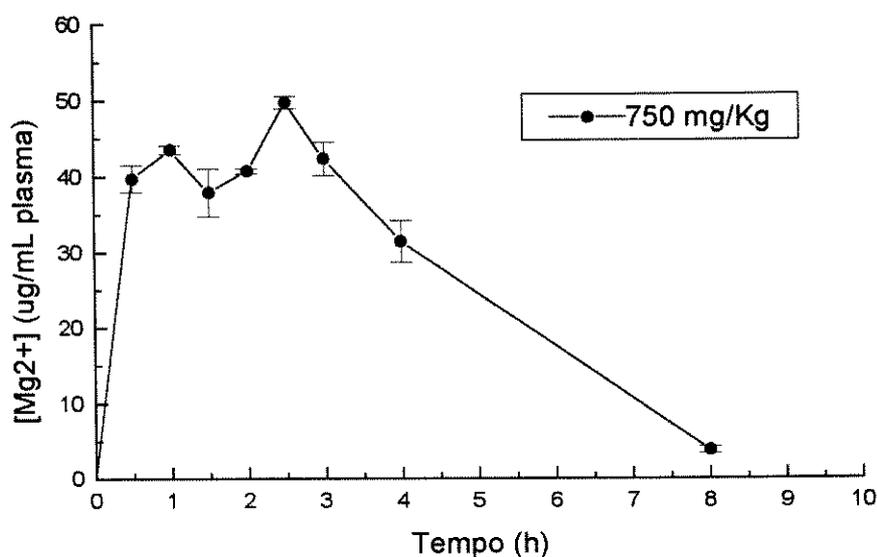


Figura 2: Curva da concentração plasmática de  $Mg^{2+}$  (ug/mL) em função do tempo de exposição à dose única de 750 mg/Kg MAPA (h).

A hipótese de diferentes rotas de excreção, com possibilidade de reabsorção pelos túbulos renais após filtração e mecanismo de primeira

passagem através do fígado, previamente à distribuição na circulação periférica, é reforçada pelos resultados obtidos para o teor médio de  $Mg^{2+}$  encontrados nos órgãos selecionados para análise. Os resultados representados nas figuras 3 e 4 revelam um maior acúmulo do  $Mg^{2+}$  no fígado, pâncreas, baço e rins. Segundo Lukas e colaboradores<sup>107</sup>, a via parenteral intraperitoneal de administração resulta em uma rápida absorção da droga devido o rico suprimento sanguíneo da cavidade peritoneal e a grande superfície de absorção. Compostos administrados intraperitonealmente são primeiramente absorvidos através da circulação portal, devendo, em seguida, passar através do fígado antes de atingir outros órgãos. Então, uma droga que é administrada intraperitonealmente deve ser completamente biotransformada ou extraída pelo fígado e excretada na bile, através de mecanismo de primeira passagem. Os resultados obtidos para o aparecimento do  $Mg^{2+}$  nos diferentes órgãos e no plasma concordam com o mecanismo proposto por Lukas e colaboradores<sup>108</sup>; os picos máximos de absorção do  $Mg^{2+}$  para o fígado, após 30 min e 2,0 h da administração da droga, antecederam o aparecimento no plasma e nos outros órgãos.

Os promissores resultados obtidos em fase pré-clínica da administração de MAPA, principalmente em pacientes que apresentam diferentes tipos de tumores sugerem sua ação como um modificador da resposta biológica (imunomodulador/imunoestimulante).<sup>1</sup> Resultados clínicos fase I da administração da droga (5 mg/dia) em pacientes com câncer de pâncreas, sem resposta à cirurgia ou à quimioterapia, mostraram significativo efeito nas células brancas, sem qualquer desvio hematológico ou efeito tóxico. O acúmulo de  $Mg^{2+}$  mais pronunciado neste órgão (Figura 3), sugere uma possível contribuição deste íon, como um dos componentes majoritários do MAPA, na resposta clínica observada: manutenção das características físicas e continuidade das atividades normais dos pacientes tratados.<sup>1</sup>

O aumento do teor de  $Mg^{2+}$  no baço (Figura 3), concorda com resultados preliminares do aumento no nível de células linfóides (T e B) observados em achados anatomopatológicos em ratos tratados.<sup>1</sup>

As concentrações de  $Mg^{2+}$  nos diferentes órgãos e os respectivos desvios padrões em função do tempo estão disponíveis nas tabelas 2 e 3 do apêndice 1.

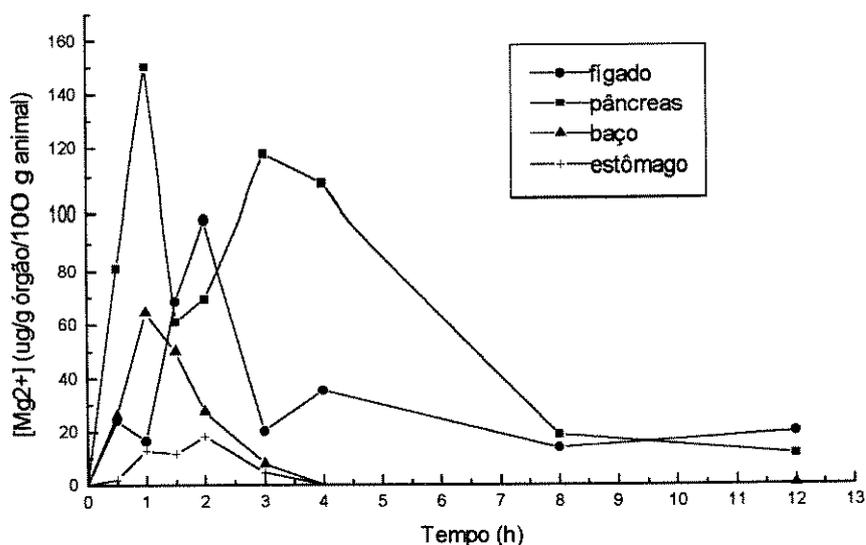


Figura 3: Concentração média de  $Mg^{2+}$  ( $ug/g$  órgão/ $100 g$  animal) no pâncreas, baço, fígado e estômago em função do tempo de exposição à dose única de 750 mg/Kg de MAPA (h).

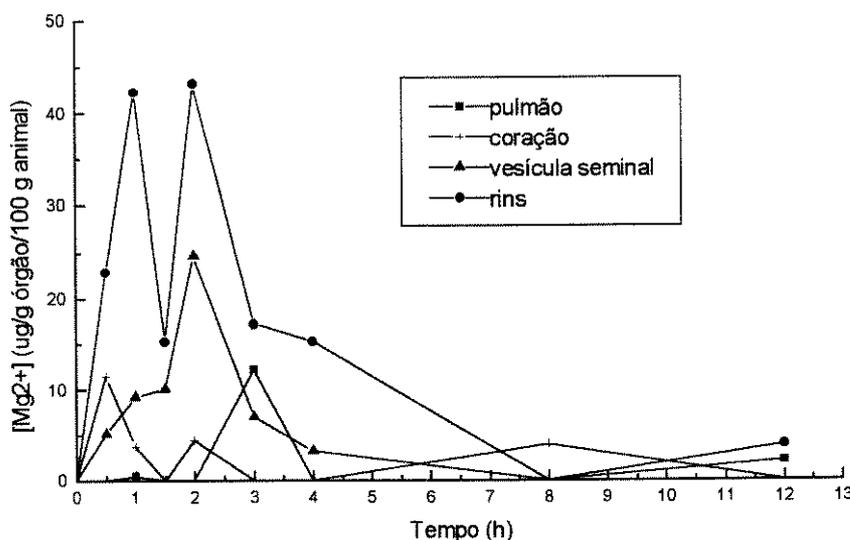


Figura 4: Concentração média de Mg<sup>2+</sup> (ug/g órgão/100g animal) nos pulmões, rins, coração e vesícula seminal em função do tempo de exposição à dose única de 750 mg/Kg de MAPA (h).

Nossos resultados de concentração plasmática de Mg<sup>2+</sup> x tempo (Figura 2) foram analisados segundo métodos não-compartimentais. Os parâmetros determinados diretamente do gráfico incluem a concentração pico ( $C_{máx}$ ) e o tempo para se alcançar o pico de concentração após a administração da dose ( $t_{máx}$ ). A área sob a curva (AUC) foi determinada pelo método trapezoidal. A AUC, após uma administração em dose única, foi determinada pela extrapolação ao tempo infinito como descrito por Blum e colaboradores.<sup>115</sup>

$$AUC = AUC_{0 \rightarrow t} + C_t / \beta$$

onde  $AUC_{0 \rightarrow t}$  é a área sob a curva, calculada do tempo zero até a última concentração plasmática coletada, denominada por  $C_t$ , e  $\beta$  é a constante de velocidade terminal descrita a seguir.

Segundo Niedworok<sup>116</sup>, a  $AUC_{0 \rightarrow t}$  pode ser calculada pelo método trapezoidal:

$$AUC_{0 \rightarrow t} = \sum \frac{1}{2} [ C_n + C_{n+1} \cdot (t_{(n+1)} - t_{(n)}) ]$$

onde (n) e (n + 1) são as concentrações plasmáticas do  $Mg^{2+}$  em dois intervalos consecutivos de tempo, e  $(t_{(n+1)} - t_{(n)})$  representa o intervalo de tempo entre as duas amostras de plasma.

A área sob a curva da última amostra de plasma ( $t'$ ) ao infinito pode ser calculada pela relação:

$$\text{Área de } t' \text{ ao } \infty = C_{t'} / \beta$$

onde  $\beta$  é a inclinação da curva na fase linear terminal do gráfico semilogarítmico da concentração plasmática de  $Mg^{2+}$  x tempo.<sup>115</sup>

O tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) foi determinado a partir do gráfico semilogarítmico da concentração plasmática de  $Mg^{2+}$  x tempo :

$$t_{1/2} = 0,693 / \beta$$

Os parâmetros farmacocinéticos obtidos para a absorção de  $Mg^{2+}$  após a administração IP de MAPA, 750 mg/Kg, estão sumarizados na tabela 6.

Tabela 6: Parâmetros farmacocinéticos da droga MAPA administrada via IP em dose única de 750 mg/Kg/dia

Dose (mg/Kg)	$C_{m\acute{a}x}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$t_{m\acute{a}x}$ (h)	AUC ( $\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (h)
750	49,5	2,5	255,9	5,3

## EXPERIMENTO 2 (item 2.4.1, capítulo 2)

Um exame do comportamento da cinética do  $Mg^{2+}$  plasmático quando diferentes doses de droga são utilizadas, também fornece informações úteis quanto ao decurso temporal da concentração da substância no organismo.

Este segundo experimento teve como finalidade avaliar o comportamento da cinética da concentração plasmática de  $Mg^{2+}$  quando diferentes doses de MAPA foram administradas. Para o experimento 3 doses

foram selecionadas, 375, 750 e 1500 mg/Kg, as quais foram administradas em grupos separados de 2 animais por tempo de exposição à droga. A determinação do  $Mg^{2+}$  nas amostras de plasma foi feita empregando-se o mesmo procedimento do experimento 1.

Embora todas as estruturas secretoras do organismo tenham a capacidade de excretar substâncias, os pulmões, o fígado e principalmente os rins são as vias mais importantes de eliminação de substâncias químicas do organismo. O tempo necessário para que a concentração de uma determinada substância diminua pela metade é conhecido como tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) ou meia-vida de eliminação. A eliminação inclui todas as vias de biotransformação e excreção.<sup>105</sup>

O tempo de meia-vida de uma substância que obedece a cinética de eliminação de primeira ordem é independente da dose; ou seja, um gráfico da concentração química/dose em função do tempo fornece uma linha reta, independente da dose. Este comportamento é conhecido como princípio da superposição para drogas que seguem o modelo monocompartimental (cinética de primeira ordem). As características mais importantes de uma eliminação de primeira ordem são: (1) a representação semilogarítmica do log da concentração plasmática versus o tempo resulta em uma linha reta simples; (2) a razão ou a quantidade da substância eliminada em qualquer tempo é diretamente proporcional à concentração ou quantidade da substância no corpo naquele tempo; (3) a meia-vida ( $t_{1/2}$ ) é independente da dose; e (4) a concentração da substância no plasma e outros tecidos diminui à uma fração constante por unidade de tempo, sendo denominada de constante de velocidade de eliminação.<sup>105</sup>

Quando a representação semilogarítmica da concentração plasmática de uma substância em função do tempo é melhor descrita por uma curva exponencial em lugar de uma linha reta, então uma análise multicompartmental é necessária.<sup>104, 105</sup>

O resultado do perfil de absorção-eliminação de  $Mg^{2+}$  no plasma em função do tempo, quando diferentes doses de MAPA foram utilizadas, foi analisado segundo os critérios de eliminação em modelos mono e multicompartimentais.

A figura 5 ilustra típicas curvas de concentração de  $Mg^{2+}$  plasmáticas em função do tempo para as três diferentes doses de MAPA utilizadas no experimento. Os valores e os respectivos desvios padrões representados na figura 5 estão disponíveis na tabela 4 do apêndice 1.

O perfil das curvas de concentração plasmática de  $Mg^{2+}$  em função do tempo para as três doses seguiu o mesmo comportamento do experimento 1, no qual 6 ratos foram injetados IP com doses únicas de 750 mg/Kg de MAPA. De fato, a eliminação da maioria das drogas não é exponencial, já que as concentrações de drogas normalmente não atingem os níveis necessários para a saturação do processo de eliminação.<sup>104, 107</sup> Os parâmetros farmacocinéticos obtidos para a absorção de  $Mg^{2+}$  após a administração da droga MAPA, nas três doses mencionadas, estão disponíveis na tabela 7. Nesta tabela foram incluídos os valores dos dois picos de concentração de  $Mg^{2+}$  e o tempo em que ocorreram. Os cálculos para a AUC e para o  $t_{1/2}$  foram efetuados utilizando-se a mesma metodologia do experimento 1.

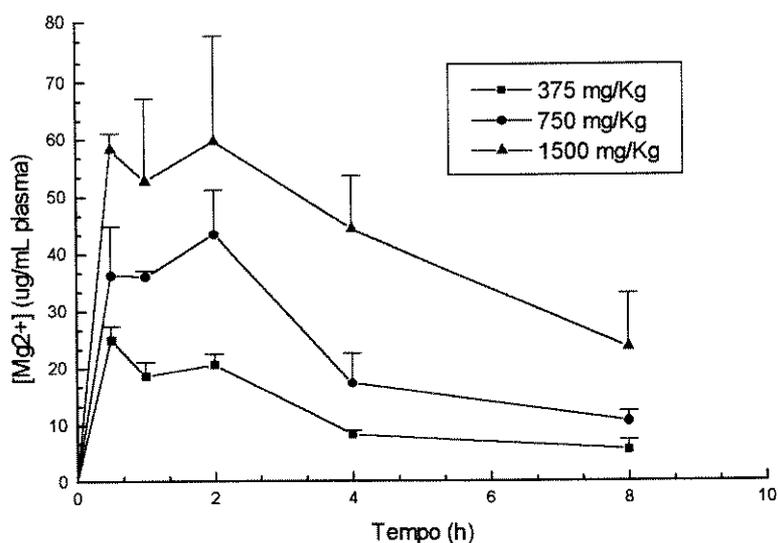


Figura 5: Curva da concentração plasmática de Mg<sup>2+</sup> (ug/mL) em função do tempo de exposição ao MAPA (h), nas três doses indicadas.

Tabela 7: Parâmetros farmacocinéticos da droga MAPA administrada via IP em doses únicas de 375, 750 e 1500 mg/Kg

Dose (mg/Kg)	C <sub>máx</sub> - 1 (µg/mL)	t <sub>máx</sub> - 1 (h)	C <sub>máx</sub> - 2 (µg/mL)	t <sub>máx</sub> - 2 (h)	AUC (µg/mL.h <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> (h)
375	24,95	0,5	20,55	2,0	146,95	4,5
750	36,25	0,5	43,25	2,0	254,59	4,7
1500	58,25	0,5	59,55	2,0	593,75	11,7

Os resultados da tabela 7 confirmam a hipótese de que a droga não segue uma cinética monocompartimental. O principal critério que propõem tal afirmação é o fato de que um gráfico semilogarítmico do log da concentração de Mg<sup>2+</sup> em função do tempo não fornece uma linha reta.

O maior tempo de meia-vida (t<sub>1/2</sub>) calculado para a dose de 1500 mg/Kg coloca em dúvida a utilização de doses acima de 750 mg/Kg quanto à extrapolação de resultados para doses menores. De fato, a eliminação de drogas, tenha sido esta metabolizada e modificada ou não, é feita, principalmente, pelos rins (depuração renal); e, em geral, tanto ocorre eliminação por filtração glomerular como secreção tubular ativa, podendo

haver diminuição percentual da eliminação corporal total, quando há comprometimento renal ou ainda hepático (nos casos em que ocorre mecanismo de primeira passagem). Conseqüentemente, a diminuição da eliminação da droga, seja por alterações nos processos de excreção ou metabolismo, pode ser observada por um  $t_{1/2}$  prolongado. Esta meia-vida prolongada leva à retenção da droga no corpo, podendo aumentar a atividade da droga (efetividade) ou aumentar a possibilidade de toxicidade química.<sup>105</sup>

### 3.3 EFEITOS DA DROGA MAPA EM RATAS INOCULADAS COM CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER-256

É de fundamental importância a descoberta de novos agentes úteis no tratamento de neoplasias. O avanço para a descoberta de novas drogas para o tratamento de doenças, em especial aquelas consideradas graves ou fatais, como AIDS e câncer, frequentemente dependem da colaboração entre a indústria e centros de pesquisa. Os esforços dedicados ao desenvolvimento de novas drogas com destinos específicos, muitas vezes contribuem para o descobrimento não intencional de uma atividade terapêutica diferente.

Resultados preliminares demonstraram que o MAPA não apresenta atividade citotóxica contra células tumorais *in vitro*, tendo sido testado contra 53 linhagens de células tumorais, as quais representam 8 tipos diferentes de tumores.<sup>37</sup> Entretanto, efeitos antitumorais *in vivo* foram observados em estudos preliminares contra diferentes tipos de tumores.<sup>1, 2</sup>

Esta aparente contradição sugeriu a hipótese de que a atividade observada para o MAPA poderia estar relacionada aos mecanismos protetores do hospedeiro. O modelo do tumor de Walker-256 (W256) foi proposto para o estudo dos efeitos antitumorais do MAPA *in vivo* e sua possível relação com o sistema imunológico.

Os objetivos específicos destes experimentos foram: (1) avaliar se o tratamento de ratas portadoras do tumor de W256 com a droga MAPA resulta em efeitos benéficos; (2) avaliar se os eventuais efeitos benéficos dependem de um efeito antitumoral direto (citotóxico) contra o tumor, ou se ocorrem através da estimulação do sistema imune; (3) avaliar qual a potência do efeito benéfico, por exemplo, através da frequência da manifestação e da relação existente com a agressividade do modelo tumoral empregado; (4) avaliar se o efeito observado é dependente das doses de MAPA empregadas.

### **O tumor de Walker-256**

Em 1928, o pesquisador George Walker da Universidade John Hopkins observou o aparecimento de um tumor na região da glândula mamária de uma rata albina prenhe. Tratava-se de uma neoplasia de crescimento espontâneo que regrediu totalmente durante o período de lactação e que voltou a crescer rapidamente após o desmame da prole. Naquela ocasião foi observado se tratar de um adenocarcinoma, e testes de transplantabilidade mostraram a capacidade de fragmentos do tumor original crescerem em ratos receptores.<sup>118</sup> Além do implante SC de fragmentos do tecido tumoral (tumores sólidos), transplantes puderam ser realizados através de inoculação de suspensão de células tumorais obtidas do próprio tumor sólido na cavidade peritoneal de ratos, ou mesmo de células tumorais mantidas através de culturas *in vitro*, resultando no crescimento de células livres na cavidade com a formação abundante de líquido ascítico.<sup>118-121</sup>

Diferentes patólogos têm diagnosticado o tumor de W256 como: sarcoma, carcinosarcoma e carcinoma.<sup>120, 121</sup> Mais recentemente, Simpkins e colaboradores<sup>122</sup> sugeriram uma origem hematopoiética para este tumor.

Diversas vias de inoculação já foram utilizadas para a administração das células tumorais. Especificamente quando utilizada a via subcutânea, há

um desenvolvimento tumoral com características próprias. No início do desenvolvimento, o tumor de Walker se apresenta firme à apalpação, localizado e de forma arredondada, mas com o seu desenvolvimento em tumores maiores, ocorre infiltração da pele e da musculatura adjacente.<sup>118, 123</sup> Ademais, tal via de inoculação oferece certas vantagens para o estudo dos efeitos sistêmicos humorais provocados pelo tumor, principalmente quando sítios dorsais, longe das regiões cervical e caudal, são utilizados, com o intuito de não produzir dificuldades mecânicas à ingestão de alimentos ou paralisias do trem posterior.<sup>124</sup> Além disso, Rettori e colaboradores<sup>124</sup> salientaram que quando tumores sólidos são usados para iniciar experimentos (transplante de pedaços, injeções após tripsinização tumoral etc), outra fonte de variabilidade é adicionada aos modelos: o início do crescimento tumoral. Através da injeção de uma amostra de células livres obtidas da cavidade peritoneal, todas as injeções levam imediatamente ao crescimento tumoral contínuo e independente.

Em humanos, o início dos efeitos sistêmicos usualmente coincide com a disseminação metastática e os efeitos invasivos e/ou mecânicos associados às metástases são geralmente implicados na causa da morte.<sup>125</sup> Por outro lado, modelos experimentais têm sido descritos nos quais a morte ocorre na ausência dos efeitos locais provocados pelas metástases.<sup>126, 127</sup>

Apesar de Walker não ter relatado o aparecimento de metástases na rata que originou o tumor primário e nem naquelas que receberam transplantes subsequentes, trabalhos posteriores descreveram a formação de metástases em órgãos preferenciais, inclusive sendo dependentes da via de inoculação utilizada.<sup>118, 128</sup> Atualmente existem duas linhagens do tumor de W256, identificadas como A e B. Guaitani e colaboradores<sup>129</sup>, mostraram que a linhagem B, apesar de exibir uma morfologia geral muito semelhante, apresenta-se distinta, principalmente na invasividade e na capacidade de induzir caquexia. Foi observado que os animais portadores da linhagem A apresentavam frequentemente disseminações metastáticas, caquexia tardia

e maior sobrevida do que os portadores da linhagem B. Nos portadores da linhagem B não foram observadas metástases, porém a indução de anorexia e caquexia precoce, acompanhada de lesões renais, resultam em uma redução considerável do tempo de vida médio destes animais.<sup>129</sup> Segundo Rettori e colaboradores<sup>124</sup>, independentemente da localização e complicações locais, as metástases antecipam o início dos efeitos sistêmicos do câncer e o desencadeamento dos efeitos sistêmicos determinam uma mudança crítica no curso temporal da doença.

Após a inoculação das células tumorais foi possível descrever a ocorrência de dois períodos no desenvolvimento da doença. Inicialmente um período muito variável assintomático, denominado subclínico (PsC), seguido por um período denominado clínico (PC), no qual os sintomas observados permitiram subdividi-lo em uma fase moderada (PCm) e outra grave (PCg). O término do PsC é definido pelo aparecimento repentino de anorexia, anemia, imunodepressão (atrofia do timo), retenção de Na<sup>+</sup> e água. O último dia dos efeitos sistêmicos que caracterizam a fase moderada é marcado pelo agravamento na anorexia e por mudanças agudas no peso corporal e/ou no balanço de água estimado.<sup>124</sup>

Uma grande variabilidade individual quanto ao aparecimento dos efeitos sistêmicos é observada em ratos inoculados unifocalmente com células tumorais de Walker. Segundo Rettori e colaboradores<sup>124</sup>, a grande variabilidade individual na sobrevida, 16 a 60 dias ou mais (biologicamente equivalente a 1-4 anos ou mais para o câncer humano), não está relacionada à variabilidade observada na duração do PC (6-9 dias). Descontinuidade e alta variabilidade individual também são características importantes na história natural do câncer em humanos e em outros modelos experimentais.<sup>125, 126, 130</sup> Inoculações unifocais compreendem experimentos longos, não sendo conclusivos quanto à evolução dos efeitos sistêmicos do tumor, devido as diferenças individuais pronunciadas no grau de

comprometimento sistêmico, embora sejam particularmente úteis para estudos de sobrevivência e desenvolvimento da massa tumoral.

A grande variabilidade observada no tempo de iniciação dos efeitos sistêmicos em ratos inoculados unifocalmente com células do tumor de W256 (6-47 dias ou mais), pode ser contornada através do modelo de inoculações multifocais proposto por Rettori e colaboradores<sup>124</sup>. Neste modelo, a inoculação SC de células tumorais de W256 em dois ou mais sítios separados na região dorsal do rato simula a disseminação metastática, levando a uma redução considerável do tempo experimental, por antecipar e induzir uma sincronização dos efeitos sistêmicos observados nos animais. Embora não haja diferença significativa para a duração do PC, a duração do período assintomático é reduzida em todos os animais para 3-5 dias, facilitando o estudo dos mecanismos envolvidos na transição do PsC ao PC. Devido aos efeitos sistêmicos se manifestarem antes do desenvolvimento significativo das metástases este modelo é útil nas investigações da natureza destes efeitos, bem como dos mediadores humorais envolvidos.<sup>124</sup>

O tumor de Walker tem sido amplamente utilizado em estudos experimentais, principalmente dos processos fisiopatológicos envolvidos na indução de anorexia, caquexia e formação de metástases, por ser facilmente transplantável, com porcentagem de “pega” de até 100% e por ter evolução rápida, com o aparecimento de metástases em diversos órgãos.<sup>124, 128, 131, 132</sup> Em geral, os modelos experimentais disponíveis para o estudo do câncer, através da inoculação de uma suspensão de células tumorais em uma população homogênea, permitem o estudo da fase final de seus efeitos em condições onde muitos fatores, conhecidos por influenciar no prognóstico, são controlados. Apesar disso, a evolução da doença mantém uma alta variabilidade individual no curso-temporal. Nos ratos portadores do tumor de W256, o câncer também evolui, aparentemente, sem causar distúrbios fisiológicos durante um período imprevisível de tempo, o qual é repentinamente interrompido pelo início de um período no qual

alterações homeostáticas graves tornam-se evidentes e levam à morte dos animais.<sup>124, 126, 130, 133-135</sup>

Nestes estudos foi empregada a linhagem A do tumor de W256, que é agressiva quanto à capacidade de induzir efeitos sistêmicos, mesmo quando utilizada em uma única inoculação subcutânea, e uma sublinhagem denominada Ar, que manifestou-se durante experimentos realizados com a linhagem A pelo Dr. Rettori (CAISM), sendo menos agressiva, com um crescimento tumoral mais lento. Com frequência, 60-80% de regressões são obtidas quando uma única inoculação SC é utilizada, após os tumores terem atingido 15-30 mm de diâmetro. Estes animais ficam totalmente imunes a reinoculações com células tanto da linhagem A como da sublinhagem Ar. Entretanto, apenas 20% de regressões são observadas quando os animais recebem 2 inoculações SC, enquanto que com 4 ou mais inoculações os tumores progridem e matam 100% dos animais. O crescimento tumoral mais lento da sublinhagem Ar e sua posterior regressão não estão associados a uma mudança no mecanismo interno destas células que estabelece o tempo de duplicação. Células de ambas, linhagem A e sublinhagem Ar, apresentam o mesmo tempo de duplicação enquanto crescem na cavidade peritoneal (aproximadamente 14,5 h). A diferença não estaria associada ao aparecimento de antígenos de histocompatibilidade na sublinhagem Ar, pois a imunidade desenvolvida posteriormente é também contra a linhagem A. Portanto, é possível que a diferença esteja associada a uma menor produção de fatores humorais permitindo o ataque das células protetoras e a aquisição de mecanismos mais efetivos de defesa contra este tumor.<sup>136</sup>

### **A defesa do hospedeiro contra o tumor**

A primeira vista pareceria que o hospedeiro não impusera nenhuma resistência ao tumor, pois quase sempre a vantagem do câncer é arrasadora sobre os mecanismos de defesa do organismo. Esta defesa é comandada

principalmente pelo sistema imune através da imunidade celular e humoral (anticorpos). Entretanto, o importante papel da defesa exercida pelo hospedeiro pode ser devidamente avaliado quando, previamente à inoculação tumoral, o sistema imune é experimentalmente suprimido. Nestas condições, tumores pequenos rapidamente provocam a morte em 100% dos animais em poucos dias, praticamente com nenhuma variabilidade individual.

A participação dos mecanismos de defesa nestes estudos foi avaliada em animais com imunodepressão parcial (pré-irradiação gama, 400 rads, 7 dias antes da inoculação tumoral). Os animais apresentam anorexia e uma diminuição de 90% nos linfócitos circulantes 24 h após a irradiação. Decorridos 7 dias, o apetite é normal e os linfócitos atingem 40% dos valores normais. Outro fator importante avaliado que deprime as respostas imunes é o estresse. O papel deste fator foi avaliado comparando os estudos realizados com animais alojados em gaiolas metabólicas individuais com os estudos realizados com animais em gaiolas comunitárias. A permanência em gaiolas coletivas simula melhor as condições normais de vida, especialmente aquelas relacionadas à atividade física e à convivência.

## **Experimentos**

Os experimentos foram montados diferindo no tipo de células tumorais de W256 utilizadas, linhagem A (agressiva) e sublinhagem Ar (pouco agressiva); no número de inoculações tumorais simultâneas SC, unifocais (menor agressividade) e multifocais (marcada agressividade); na depressão do sistema de defesa do hospedeiro através de depressão moderada, estresse, e depressão grave, pré-irradiação dos animais; e nas diferentes doses de MAPA utilizadas, 0,5, 1,0, 1,5, 10 e 100 mg/Kg/dia.

## Diferentes doses de MAPA x inoculações multifocais de células tumorais de Walker-256 (linhagem A)

### EXPERIMENTO I (item 2.5.1, capítulo 2)

O primeiro experimento consistiu de um estudo exploratório acerca do efeito de uma dose de MAPA (1,0 mg/Kg/dia), num modelo do tumor de W256 de agressividade relativamente alta, mas que produz resultados rápidos e reproduzíveis.

Foram montados 4 grupos de 4 ratas cada, as quais foram mantidas em gaiolas metabólicas individuais. Em 2 grupos os animais receberam inoculações simultâneas em 2 sítios SC da região dorso-lombar e foram submetidos aos tratamentos placebo (grupo 1) e doses diárias SC de 1,0 mg/Kg de MAPA (grupo 2). Os outros 2 grupos receberam inoculações simultâneas bilaterais em 4 sítios SC da região dorso-lombar e receberam os mesmos tratamentos (grupos 3 e 4 respectivamente). Dentre as variáveis dependentes estudadas os principais parâmetros fisiológicos foram individualmente e diariamente monitorados: peso corporal, ingestão alimentar e de água, e urina (volume,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e osmolalidade), sendo posteriormente correlacionados com as respectivas autópsias. Os resultados obtidos para o PsC, PC e SV foram comparados utilizando-se ANOVA de Kruskal-Wallis, ao nível de significância de 5%. Quando  $p < 0,05$ , as diferenças mínimas entre os grupos foram testadas empregando-se o teste para comparações múltiplas.

Todos os inóculos deram origem a tumores de crescimento contínuo e independente, todos palpáveis dentro de 2 a 3 dias.

A evolução clínica dos animais concordou com as observações já descritas para animais inoculados com células ascíticas na região dorso-lombar.<sup>124</sup> Todas as ratas apresentaram um período sem anormalidades clínicas (PsC) e outro sintomático (PC). A fase grave foi marcada por uma acentuada perda de apetite, acompanhada por uma diminuição marcada na razão  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . A duração dos períodos nos 4 grupos de animais inoculados

em 2 e 4 sítios não foi significativamente diferentes, apresentando um PsC médio de 5 dias e um PC médio de 9 dias (ANOVA Kruskal-Wallis,  $p < 0,001$  e  $p < 0,05$  respectivamente; mas, teste para comparações múltiplas  $p > 0,05$ ).

As figuras 6 e 7 representam o curso temporal das alterações dos principais parâmetros estudados.

Não foram registradas diferenças significativas entre os grupos; entretanto, nos animais tratados com MAPA, observou-se uma tendência a apresentar valores ligeiramente maiores no consumo alimentar e no peso corporal durante o PC (Figuras 6 B e 7 B). Não houve diferença no tempo de sobrevivência entre os 4 grupos, correspondendo a 14 dias após a inoculação tumoral (ANOVA Kruskal-Wallis,  $p < 0,01$ ; mas, teste para comparações múltiplas,  $p > 0,05$ ).

Segundo Rettori e colaboradores<sup>124, 137</sup>, a diminuição da relação  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  é devida ao efeito específico do tumor sobre o  $\text{Na}^+$  (diminuição da excreção), já que o  $\text{K}^+$  e a excreção de outros solutos na urina (excreção osmolar) não diferem dos animais sadios controles, que foram privados de alimento proporcionalmente à queda no consumo de alimento apresentado por animais portadores de tumor. Os efeitos sobre a excreção osmolar na urina durante a evolução tumoral estão disponíveis nas figuras 1 e 2 do apêndice 2.

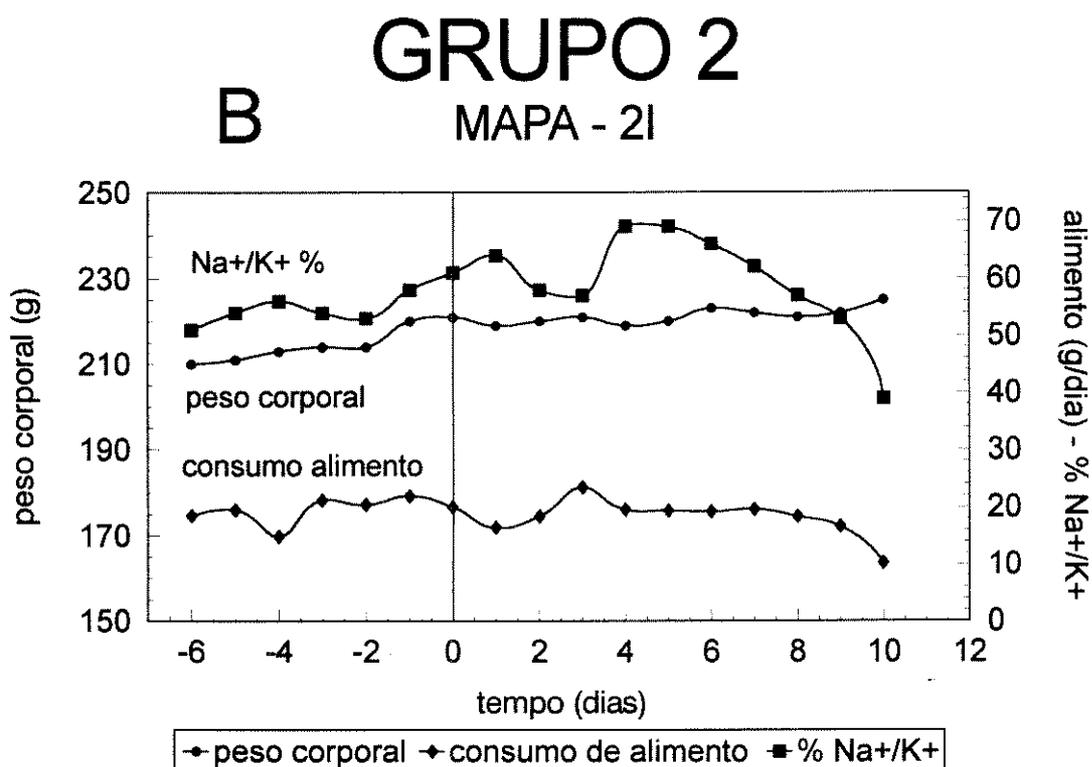
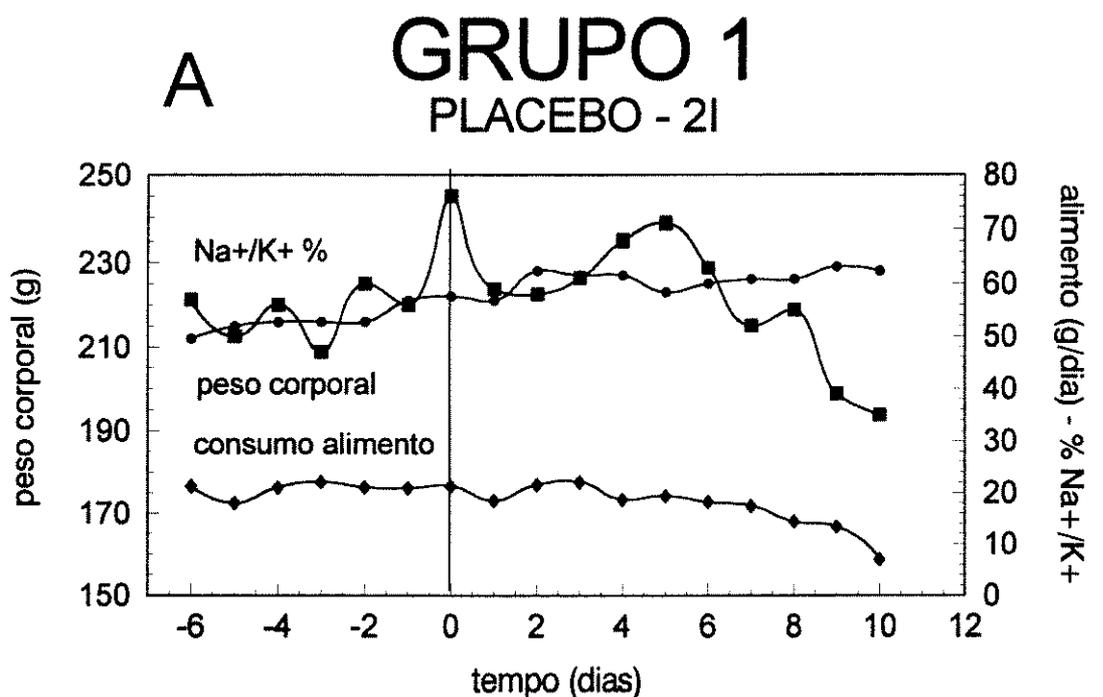


Figura 6: Variações no peso corporal, consumo de alimento e %  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  de ratas inoculadas em 2 sítios SC. **A:** ratas placebo. **B:** ratas tratadas com doses diárias de 1,0 mg/Kg de MAPA. O dia 0 corresponde ao dia da inoculação das células tumorais.

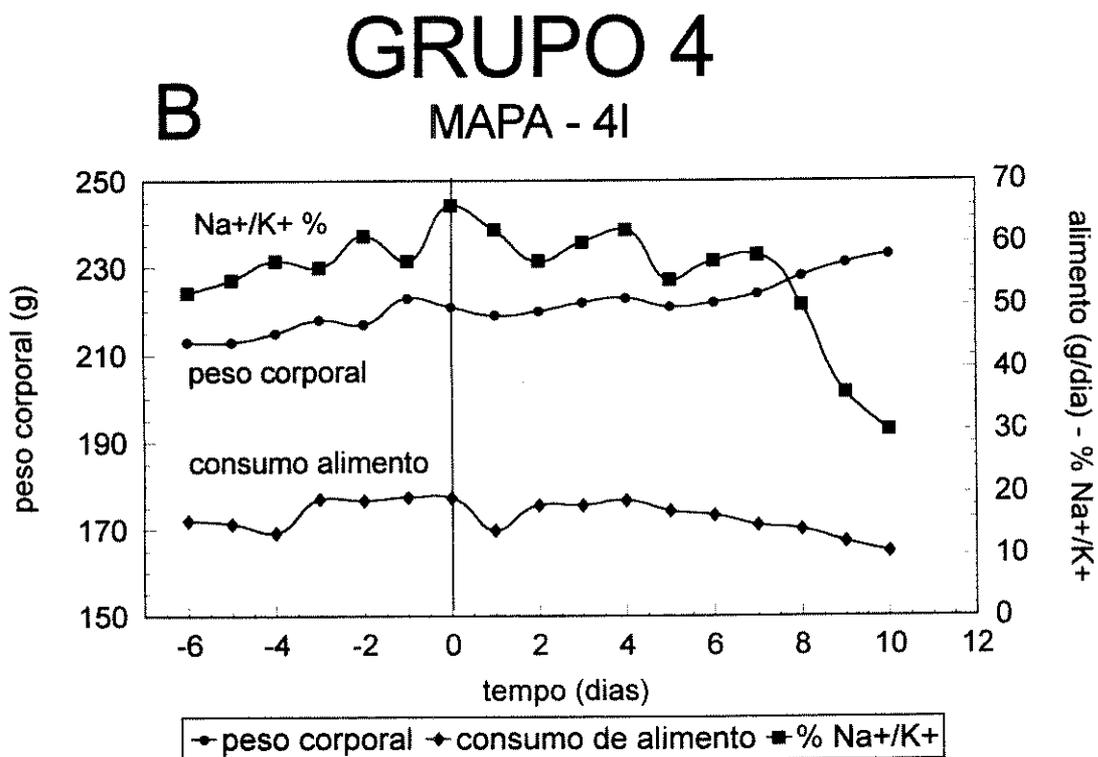
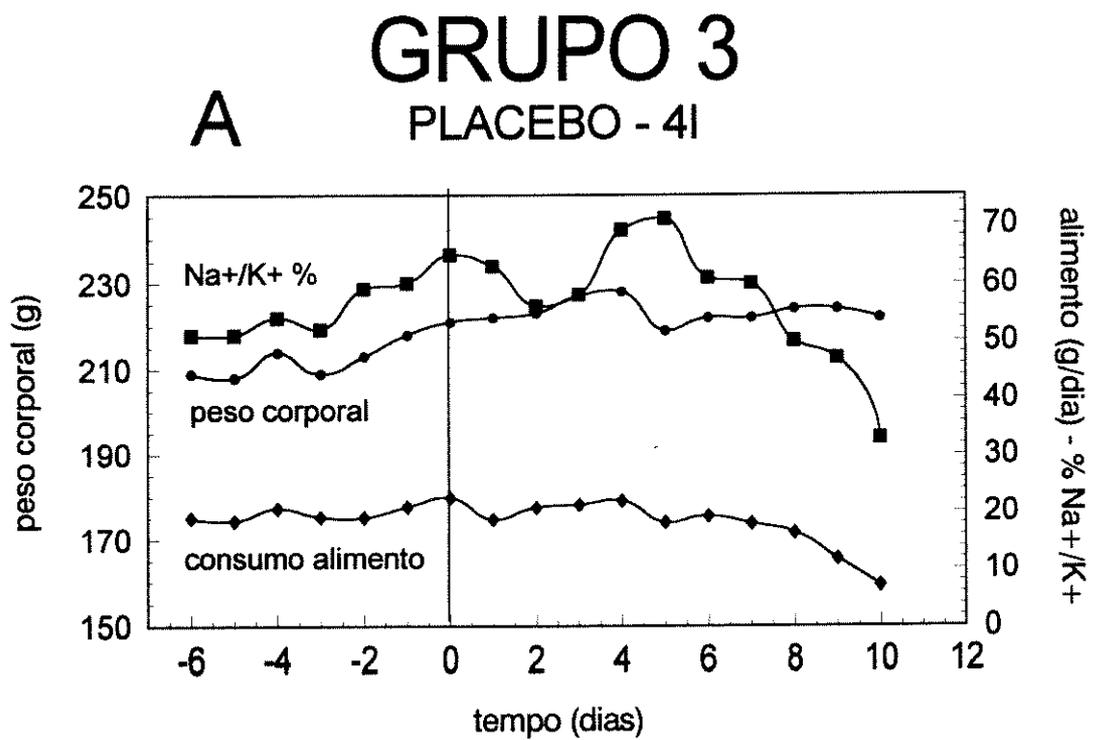


Figura 7: Variações no peso corporal, consumo de alimento e %  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  de ratas inoculadas em 4 sítios SC. **A:** ratas placebo. **B:** ratas tratadas com doses diárias de 1,0 mg/Kg de MAPA. O dia 0 corresponde ao dia da inoculação das células tumorais.

Outros efeitos observados foram incontinência urinária, perda de pelos, hipodinamia e palidez (anemia sem haver perda de sangue).

A autópsia revelou extensa disseminação metastática aos linfonodos regionais, torácicos e abdominais. Na maioria dos animais submetidos à autópsia, em quaisquer dos tratamentos, observou-se hipertrofia das glândulas adrenais e o timo mostrou-se atrófico. A tabela 8 contém a média dos pesos correspondentes aos tumores, baço, adrenais e timo dos animais pertencentes aos 4 grupos do experimento I.

Tabela 8: Média dos pesos (g) dos tumores, baço, glândulas adrenais e timo dos animais pertencentes aos 4 grupos do experimento I

GRUPO	NÚMERO DE INÓCULOS	TUMOR	BAÇO	ADRENAIS	TIMO <sup>(a)</sup>
placebo	2	9,9 ± 2,1	0,79 ± 0,32	0,13 ± 0,01	atrófico
MAPA	2	14,0 ± 5,6	0,64 ± 0,30	0,15 ± 0,02	atrófico
placebo	4	18,0 ± 9,6	0,49 ± 0,21	0,11 ± 0,01	atrófico
MAPA	4	15,9 ± 3,4	0,53 ± 0,20	0,12 ± 0,02	atrófico

Os valores correspondem à média ± desvio padrão da média de 4 ratas por grupo de tratamento. Os pesos do baço, das 2 glândulas adrenais e do timo de um rato sadio variam entre 0,5 - 0,9; 0,04 - 0,05 e 0,3 - 0,4 g, respectivamente. <sup>(a)</sup> O timo foi considerado atrófico quando o peso obtido foi menor do que 0,2 g.

## EXPERIMENTO II (item 2.5.1, capítulo 2)

Um segundo experimento foi proposto considerando-se que o experimento I sugeriu a possibilidade de que o tratamento com MAPA poderia apresentar efeitos benéficos, refletidos pelo menos na anorexia induzida pelo câncer. Entretanto, devido a agressividade do tumor de W256, decidiu-se pelo emprego de altas doses de MAPA.

Os objetivos foram os mesmos do experimento I, introduzindo-se duas modificações: (1) testar as doses de 10 e 100 mg/Kg/dia de MAPA e empregar o modelo de 8 inoculações tumorais/rata. Esta inovação foi acrescentada pois, nos grupos do experimento anterior, incluindo os

placebos, o aparecimento da anorexia e a retenção hidrossalina (aumento de peso) não foram tão acentuados como habitualmente. Este fato poderia estar relacionado a características particulares da suspensão de células tumorais empregadas ou a variações temporárias nas ratas, por exemplo genéticas, circadianas etc.

Foram montados 3 grupos de 6 ratas cada, as quais foram mantidas em gaiolas metabólicas individuais. Os animais receberam inoculações simultâneas bilaterais em 8 sítios SC da região dorso-lombar e foram tratados com solução placebo e doses de MAPA SC de 10 e 100 mg/Kg/dia (grupos 1-3 respectivamente). As variáveis dependentes estudadas foram as mesmas do experimento I. Os resultados obtidos para o PsC, PC, PCm, Pcg e SV foram comparados utilizando-se ANOVA de Kruskal-Wallis, ao nível de significância de 5%. Quando  $p < 0,05$ , as diferenças mínimas entre os grupos foram testadas utilizando-se o teste para comparações múltiplas.

Os 8 tumores separados cresceram independentemente e como esperado o aparecimento dos efeitos sistêmicos ocorreu quando as massas tumorais totais apresentavam-se muito pequenas. Os animais inoculados em 8 sítios simultâneos apresentaram atrofia tímica e hipertrofia adrenal, como verificado nos animais inoculados em 2 e 4 sítios; entretanto, a maioria dos animais com 8 inoculações somente apresentaram pequenas metástases, principalmente nos linfonodos adjacentes. Com relação aos efeitos sistêmicos, representados nas figuras 8 e 9, somente a retenção hidrossalina (aumento no peso corporal) foi bem definida em todos os grupos e ocorreu conforme demonstrado por Rettori e colaboradores<sup>124</sup>. No grupo de animais tratados com doses de 100 mg/Kg/dia de MAPA (Figura 9 B) foi registrada uma evolução mais marcada da anorexia. Na fase final do PC, fase grave, houve um agravamento bem definido no consumo de alimento, com uma maior diminuição nas ratas tratadas com MAPA proporcionalmente ao aumento da dose (Figuras 9 A e B). Estes resultados sugerem um efeito desfavorável do MAPA quando altas doses são empregadas. Os efeitos sobre a excreção

osmolar na urina durante a evolução tumoral encontram-se representados nas figuras 3 e 4 do apêndice 2.

Em nossos experimentos, a inoculação em 8 sítios SC simultâneos, induziu uma maior sincronização entre os animais. O limite do PsC foi reduzido a 3 dias em todos os animais e na presença de uma massa tumoral total muito pequena. Esta aparente contradição pode ser explicada através da hipótese que propõe o início dos efeitos sistêmicos como o resultado de interações opostas entre um efeito indesejável de origem tumoral (um mediador humoral) e um desejável do hospedeiro (mecanismos protetores, os quais poderiam, por exemplo, produzir velocidades altas de bioinativação do mediador).<sup>124</sup> O aumento do número de tumores independentes crescendo simultaneamente num mesmo animal, multiplica efetivamente o número de células tumorais ativas (ou “proliferantes”). Quando uma única injeção tumoral é feita o aumento no número de células proliferantes é praticamente detido ao atingir uma massa de 1,0-1,5 g (independentemente do número de células injetadas inicialmente), devido a fatores limitantes locais (irrigação sanguínea). Portanto, a cada duplicação, 95% ou mais das novas células formadas não dispõem de nutrientes adequados.<sup>138, 139</sup> A maior velocidade de crescimento tumoral total de animais multifocalmente inoculados resulta em altas velocidades de aumento do mediador, capazes de sobrepor rapidamente à capacidade de adaptação dos mecanismos protetores do hospedeiro.<sup>124</sup> Por outro lado, os níveis de mediadores produzidos em animais com apenas uma inoculação SC de células tumorais poderiam ser tolerados, pelo menos nos primeiros estágios do crescimento tumoral, ou até o momento do desenvolvimento de metástases.

Os resultados da tabela 9 também indicam a tendência a um efeito desfavorável do tratamento com altas doses de MAPA: encurtamento do PC e, portanto, antecipação da morte dos animais tratados com o aumento da dose de MAPA administrada, embora tais resultados não fossem

estatisticamente significativos (ANOVA Kruskal-Wallis,  $p < 0,001$ ; mas, teste para comparações múltiplas,  $p > 0,05$ ).

Tabela 9: Efeito de 8 inoculações tumorais simultâneas e dos tratamentos placebo e com doses diárias de 10 e 100 mg/Kg de MAPA na evolução clínica do tumor de Walker-256

número de inoculações	Tratamento	EVOLUÇÃO CLÍNICA (dias)				
		PsC	PC	PCm	PCg	SV
8	placebo	3,0	7,0	3,0	4,0	10
8	10 mg/Kg	3,0	7,0	3,0	4,0	10
8	100 mg/Kg	3,0	6,2	3,0	3,0	9,0

PsC = período subclínico; PC = período clínico; PCm e PCg = fases moderada e grave do período clínico; e SV = sobrevivência. Os valores correspondem à mediana de 6 ratas por grupo de tratamento.

## GRUPO 1 PLACEBO - 8I

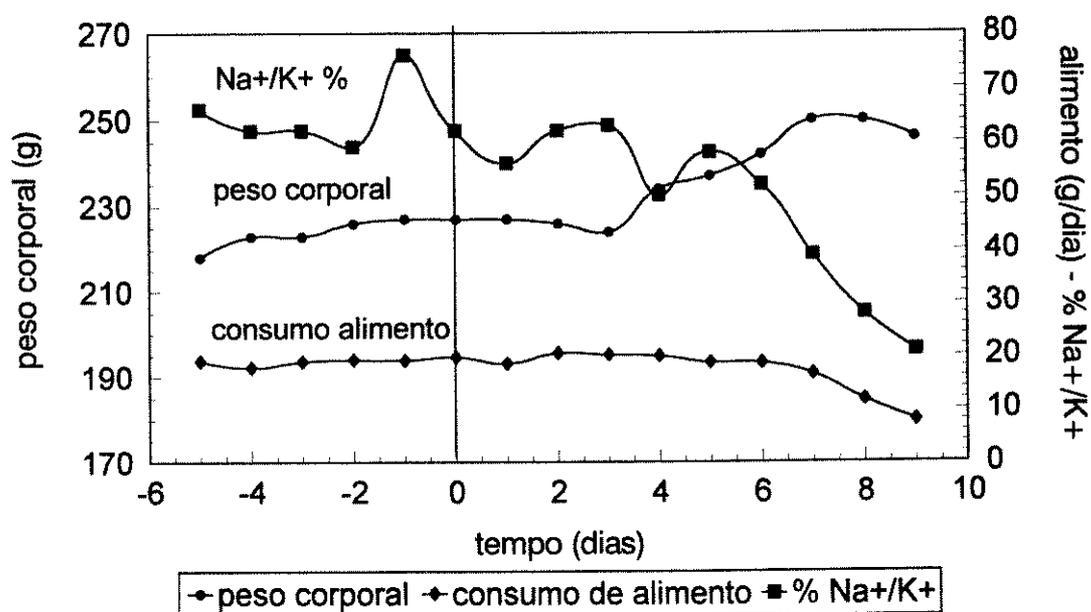
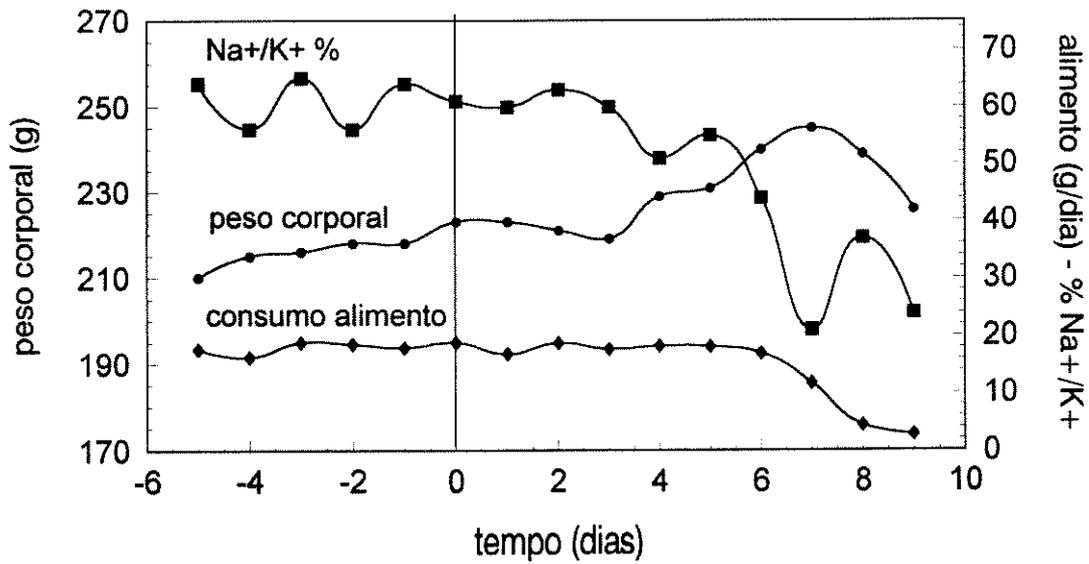


Figura 8: Variações no peso corporal, consumo de alimento e %  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  de ratas placebo inoculadas em 8 sítios SC. O dia 0 corresponde ao dia da inoculação das células tumorais.

# GRUPO 2

## A MAPA (10 mg/Kg/dia) - 8I



# GRUPO 3

## B MAPA (100 mg/Kg/dia) - 8I

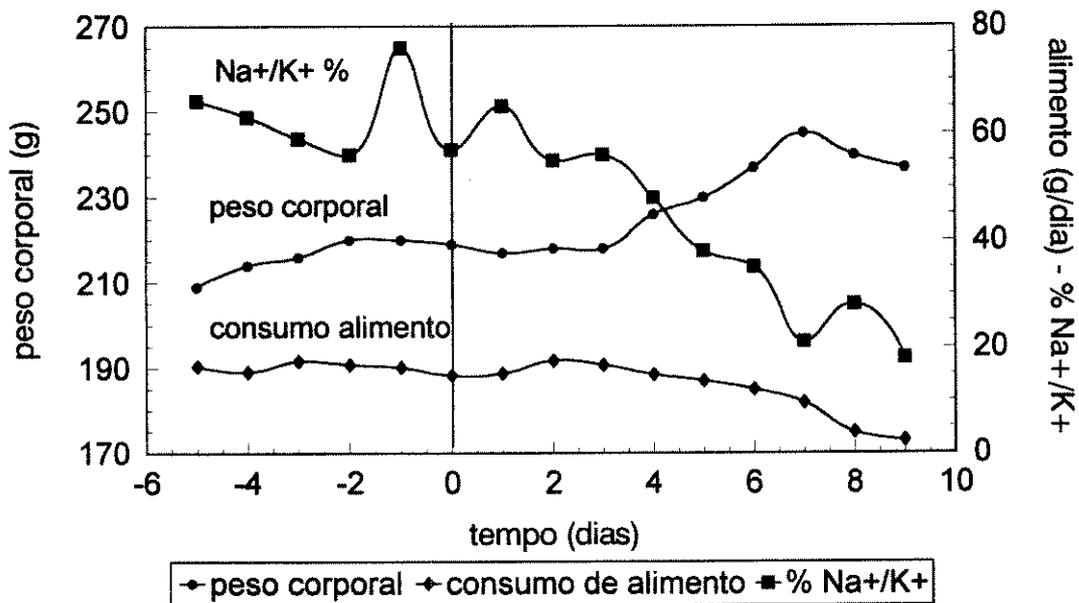


Figura 9: Variações no peso corporal, consumo de alimento e % Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> de ratas inoculadas em 8 sítios SC. **A:** ratas tratadas com doses diárias de 10 mg/Kg de MAPA. **B:** ratas tratadas com doses diárias de 100 mg/Kg de MAPA. O dia 0 corresponde ao dia da inoculação das células tumorais.

## Diferentes doses de MAPA x 1 sítio de inoculação de células tumorais de Walker-256 (linhagem A)

Em função destes resultados e da agressividade do tumor de W256, especialmente quando múltiplas inoculações são utilizadas, uma segunda série de experimentos foi proposta, empregando-se o modelo clássico, menos agressivo, do tumor de W256 (inoculação unifocal). Ademais, os experimentos com inoculações multifocais simultâneas sugeriram um efeito desfavorável das doses elevadas de MAPA, as quais foram evitadas.

### EXPERIMENTO I (item 2.5.2, capítulo 2)

O objetivo específico deste experimento foi testar doses de 0,5 e 1,0 mg/Kg/dia de MAPA em animais inoculados com células tumorais em apenas 1 sítio SC e alojados em um ambiente pouco estressante.

As variáveis dependentes estudadas foram o perfil do crescimento tumoral e a sobrevida.

Três grupos de 8 ratas cada receberam 1 inóculo SC da linhagem A na região dorso-lombar e foram tratados com solução placebo e doses de MAPA SC de 0,5 e 1,0 mg/Kg/dia (grupos 1-3 respectivamente). Nestes experimentos os animais foram alojados em gaiolas comunitárias e os resultados se mostraram surpreendentes.

Foram observadas 50% (4 em 8 animais) e 40% (2 em 5 animais) de regressão tumoral quando os animais foram tratados com 0,5 mg/Kg/dia e 1,0 mg/Kg/dia de MAPA, respectivamente. Dentre os animais placebo, submetidos à injeções SC diárias de solução Ringer-lactato, apenas uma regressão, considerada espontânea, foi observada. A proporção de regressão observada para o grupo de animais tratados com 0,5 mg/Kg/dia de MAPA (50%) é estatisticamente significativa em relação ao grupo placebo ( $p < 0,05$ ; empregando-se o teste exato de Fisher, ao nível de significância de 5%). Houve o crescimento independente de dois tumores em 3 animais

pertencentes ao grupo 3, os quais foram desprezados. A injeção do inóculo pode provocar o rompimento de algumas fibras que constituem o tecido subcutâneo, propiciando o espalhamento indesejado de pequenas quantidades de células tumorais. Por apresentar uma alta porcentagem de “pega” e um crescimento muito rápido, uma quantidade ínfima de células tumorais de W256 resulta no desenvolvimento de outros tumores independentes. Neste caso, considerando-se o crescimento de dois tumores, estaria o modelo de múltiplas inoculações de células tumorais sob investigação ao contrário do objetivo proposto. O modelo de inoculação multifocal difere do modelo clássico de uma inoculação quanto à agressividade e ao desencadeamento dos efeitos sistêmicos, sendo, portanto, o período clínico antecipado.<sup>124</sup>

O perfil do crescimento tumoral nos 3 grupos foi representado considerando-se o dia médio em que os tumores atingiram o diâmetro tumoral máximo nos animais que manifestaram progressão e regressão tumoral (Figuras 10-12). Na tabela 10 foram agrupados os resultados referentes ao número de animais que manifestaram regressão tumoral, número de animais que não sobreviveram, o diâmetro médio tumoral máximo (mm) e o dia médio em que foi registrado.

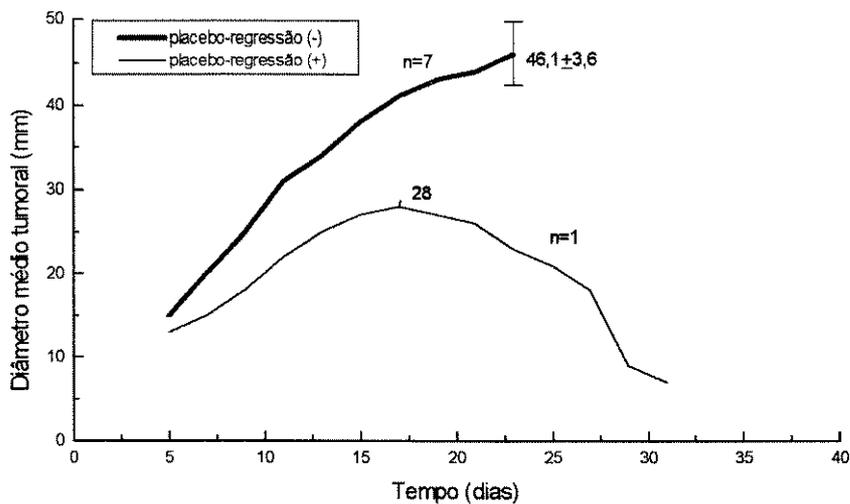


Figura 10: Média do diâmetro tumoral (mm) de ratos placebo-regressão (-) e ratos placebo-regressão (+) em função do tempo (dias). Os valores inseridos no gráfico correspondem à média do diâmetro tumoral máximo de n ratos  $\pm$  desvio padrão da média.

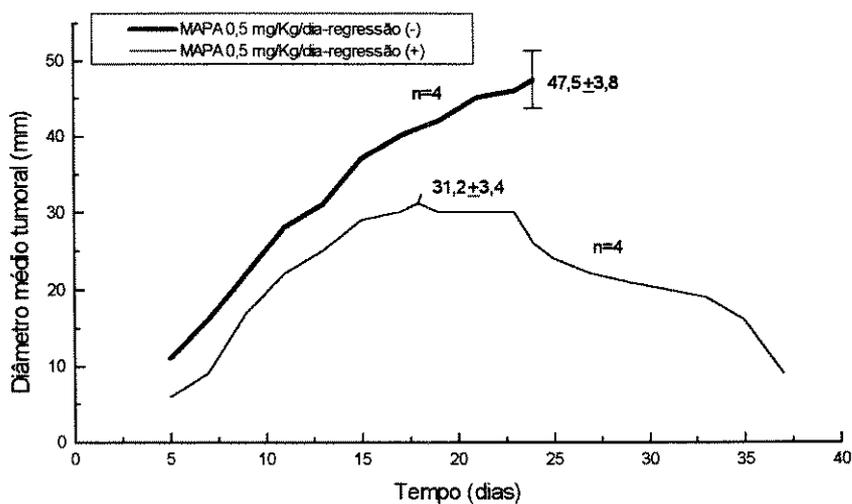


Figura 11: Média do diâmetro tumoral (mm) de ratos tratadas com MAPA 0,5 mg/Kg/dia-regressão (-) e ratos tratadas com MAPA 0,5 mg/Kg/dia-regressão (+) em função do tempo (dias). Os valores inseridos no gráfico correspondem à média do diâmetro tumoral máximo de n ratos  $\pm$  desvio padrão da média.

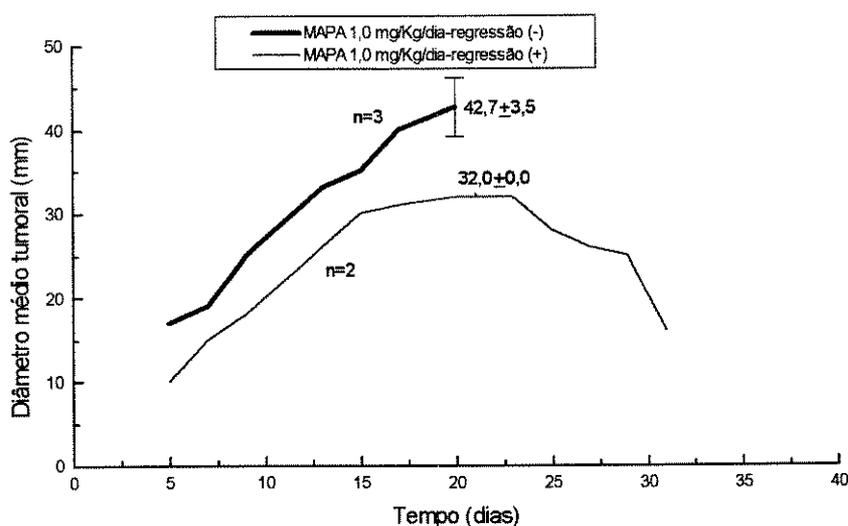


Figura 12: Média do diâmetro tumoral (mm) de ratos tratados com MAPA 1,0 mg/Kg/dia-regressão (-) e ratos tratados com MAPA 1,0 mg/Kg/dia-regressão (+) em função do tempo (dias). Os valores inseridos no gráfico correspondem à média do diâmetro tumoral máximo de n ratos  $\pm$  desvio padrão da média.

Nos casos de regressão total, os tumores passaram a regredir após terem atingido dimensões consideráveis. Os tempos de sobrevivência dos animais que não manifestaram regressão tumoral foram: 27 dias para o grupo placebo, 29 dias para o grupo tratado com 0,5 mg/kg/dia de MAPA e 26 dias para o grupo tratado com 1,0 mg/kg/dia de MAPA. Estes resultados não são estatisticamente significativos (ANOVA Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ).

Tabela 10: Efeito dos tratamentos placebo e com doses diárias de 0,5 e 1,0 mg/Kg/dia de MAPA na evolução tumoral

Tratamento	Regressão	número ratas <sup>(a)</sup>	diâmetro médio	dia médio
placebo	-	7/8	46,1 $\pm$ 3,6	22,7 $\pm$ 6,3
placebo	+	1/8	28	17
0,5 mg/Kg/dia	-	4/8	47,5 $\pm$ 3,8	24,0 $\pm$ 4,6
0,5 mg/Kg/dia	+	4/8	31,2 $\pm$ 3,4	18,5 $\pm$ 3,4
1,0 mg/Kg/dia	-	3/5 <sup>(b)</sup>	42,7 $\pm$ 3,5	20,3 $\pm$ 3,0
1,0 mg/Kg/dia	+	2/5 <sup>(b)</sup>	32,0 $\pm$ 0,0	21,0 $\pm$ 2,8

( + ) = houve regressão tumoral; ( - ) = não houve regressão tumoral. Os valores representam a média de n animais  $\pm$  desvio padrão da média. <sup>(a)</sup> O denominador corresponde ao número total de animais por grupo de tratamento. <sup>(b)</sup> Neste grupo houve o crescimento de 2 tumores em 3 animais, os quais foram desprezados.

Todos os animais sobreviventes em decorrência da regressão dos tumores, pertencentes aos grupos 1-3, foram reinoculados 45 dias após a primeira inoculação. Para a reinoculação foi utilizada suspensão de células tumorais de W256 pertencentes a linhagem A ( $6 \times 10^6$  células/sítio), seguindo-se o mesmo procedimento utilizado para a primeira inoculação de células tumorais (experimento I; item 2.5.2, capítulo 2). Foi observado que, após a reinoculação das células tumorais de W256 linhagem A nas ratas pertencentes aos três grupos onde houve regressão tumoral anteriormente, não houve “pega” tumoral; nenhum crescimento foi registrado durante as duas semanas de observação que se seguiram após a reinoculação. Este resultado sugere imunização destes animais após a primeira inoculação de células tumorais de W256.

#### EXPERIMENTO II (item 2.5.2, capítulo 2)

No experimento anterior uma maior porcentagem de regressão foi obtida para a menor dose de MAPA empregada. Este resultado sugeriu um segundo experimento com uma dose mais alta de MAPA, com o objetivo de verificar se o efeito observado é dependente da dose empregada.

Os animais foram mantidos nas mesmas condições do experimento anterior e as mesmas variáveis dependentes foram estudadas.

Os animais foram divididos em 2 grupos de 8 cada e inoculados em 1 sítio SC da região dorso-lombar com células da linhagem A de Walker. Doses de 1,5 mg/Kg/dia SC de MAPA foram administradas em um dos grupos, enquanto que o outro recebeu solução placebo. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas.

O resultado do crescimento tumoral foi representado na figura 13.

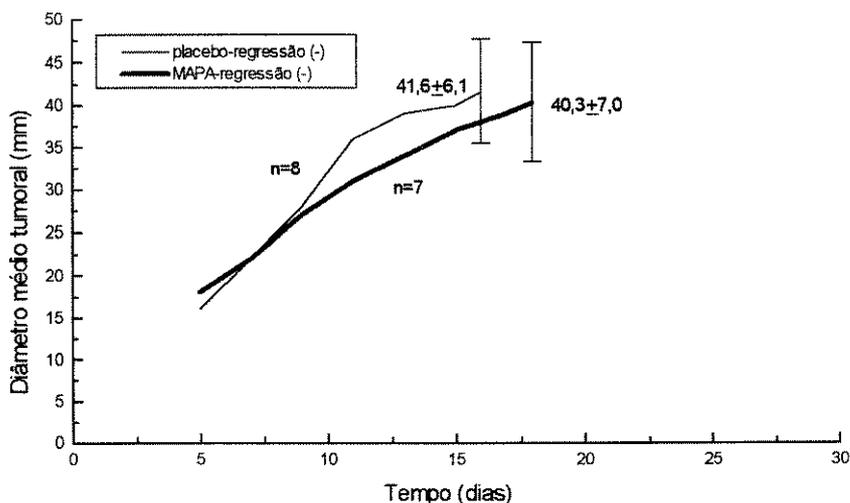


Figura 13: Média do diâmetro tumoral (mm) de ratos placebo-regressão (-) e ratos tratadas com MAPA 1,5 mg/Kg/dia-regressão (-) em função do tempo (dias). Os valores inseridos no gráfico correspondem à média do diâmetro tumoral máximo de n ratos  $\pm$  desvio padrão da média.

Não foi observado crescimento tumoral em um animal pertencente ao grupo tratado com 1,5 mg/Kg/dia de MAPA, mesmo após a inoculação das células tumorais e nenhuma regressão espontânea ocorreu nos demais animais pertencentes a este grupo ou ao grupo placebo. Na tabela 11 foram agrupados os resultados referentes ao número de animais que não sobreviveram, o diâmetro médio tumoral máximo (mm) e o dia médio em que foi registrado, além da sobrevida (dias) dos animais pertencentes aos dois grupos.

Tabela 11: Efeito dos tratamentos placebo e com doses diárias de 1,5 mg/Kg/dia de MAPA na evolução tumoral

	placebo	1,5 mg/Kg/dia
número de ratas	8/8 <sup>(a)</sup>	7/8 <sup>(a)</sup>
diâmetro médio tumoral	41,6 $\pm$ 6,1	40,3 $\pm$ 7,0
dia médio	16,0 $\pm$ 4,8	18,1 $\pm$ 4,4
sobrevida <sup>(b)</sup>	18	21

Os valores representam a média de n animais  $\pm$  desvio padrão da média. <sup>(a)</sup> O denominador corresponde ao número total de animais por grupo de tratamento. <sup>(b)</sup> Os valores para a sobrevida dos animais pertencentes aos grupos placebo e tratado com MAPA correspondem à mediana e não são estatisticamente diferentes (teste de Mann-Whitney,  $p > 0,05$ ).

Os resultados deste experimento confirmaram uma maior eficiência da droga nas menores doses administradas.

As autópsias dos animais inoculados em um sítio SC com células da linhagem A pertencentes aos grupos placebo e tratados com 0,5, 1,0 e 1,5 mg/Kg/dia de MAPA, revelou metástases visíveis nos linfonodos inguinais e axilares, além de extensa disseminação aos linfonodos torácicos e/ou abdominais. Os efeitos, à distância, observados nos animais submetidos à autópsia foram atrofia do timo e hipertrofia adrenal. Com a evolução da doença, acentuou-se a perda de apetite, sendo registrados os seguintes sintomas: palidez; incontinência urinária manifestada, principalmente, na fase terminal; e edema. Em muitos casos o baço mostrou-se hipertrofiado e, em alguns casos, também foi observada hidronefrose uni ou bilateral, com ou sem comprometimento dos ureteres correspondentes. A variação no peso dos animais durante os experimentos, nos quais doses de 0,5, 1,0 e 1,5 mg/Kg/dia de MAPA foram utilizadas, está disponível no apêndice 3. O apêndice 4 contém respectivamente os pesos do tumor primário e das metástases inguinais e axilares.

Associado à estes resultados, observou-se aumento nos gânglios regionais (regiões axilar e inguinal) mais pronunciado nos animais tratados. Tal fato poderia estar clinicamente relacionado à defesa do hospedeiro contra o tumor.

Nestes experimentos, a menor agressividade do modelo tumoral de inoculação unifocal, e o alojamento menos estressante dos animais em gaiolas coletivas provavelmente estariam favorecendo a atividade do MAPA sobre os mecanismos de defesa do hospedeiro, beneficiando o controle da evolução tumoral.

### EXPERIMENTO III (item 2.5.2, capítulo 2)

O efeito antitumoral do MAPA manifestado apenas quando são minimizados o estresse (depressão moderada do sistema imune) e a

agressividade do modelo tumoral empregado, sugeriram a participação dos mecanismos de defesa na atividade da droga.

Um terceiro experimento foi proposto para avaliar a importância do sistema imunológico nos efeitos antitumorais do MAPA. Neste experimento, 2 grupos de 4 animais cada, alojados em gaiolas coletivas, foram submetidos à uma depressão marcada da capacidade imunoprotetora, tanto humoral quanto celular, através de irradiação com bomba de cobalto ( $\gamma = 400$  rads) 7 dias antes da inoculação das células tumorais. O período de 7 dias foi estabelecido principalmente, para a recuperação do peso corporal, devido a anorexia provocada pela irradiação. Os animais receberam 1 inóculo SC de células da linhagem A e foram submetidos aos tratamentos placebo e com 0,5 mg/Kg/dia de MAPA. Desta forma, os efeitos em animais com o sistema imune intacto foram comparados aos efeitos em animais pré-irradiados, nos quais os linfócitos estão reduzidos pelo menos à metade.

As variáveis dependentes estudadas foram o perfil do crescimento tumoral e o tempo de sobrevida dos animais.

Neste experimento obtêve-se 100% de “pegas” tumorais.

Os animais mostraram-se anêmicos logo após o período de irradiação, registrado pela palidez dos olhos e das extremidades, patas e orelhas. Devido a anorexia provocada pela irradiação, o consumo de alimento foi controlado após a inoculação das células tumorais. Os valores correspondem à quantidade de ração consumida por dia e por gaiola, ou seja, entre 4 animais. As variações no consumo de alimento em função do tempo, referentes ao grupo placebo (Grupo I) e ao grupo tratado com 0,5 mg/Kg/dia de MAPA (Grupo II), estão disponíveis na figura 14. O mesmo perfil para o consumo de alimento em função do tempo foi observado para os dois grupos.

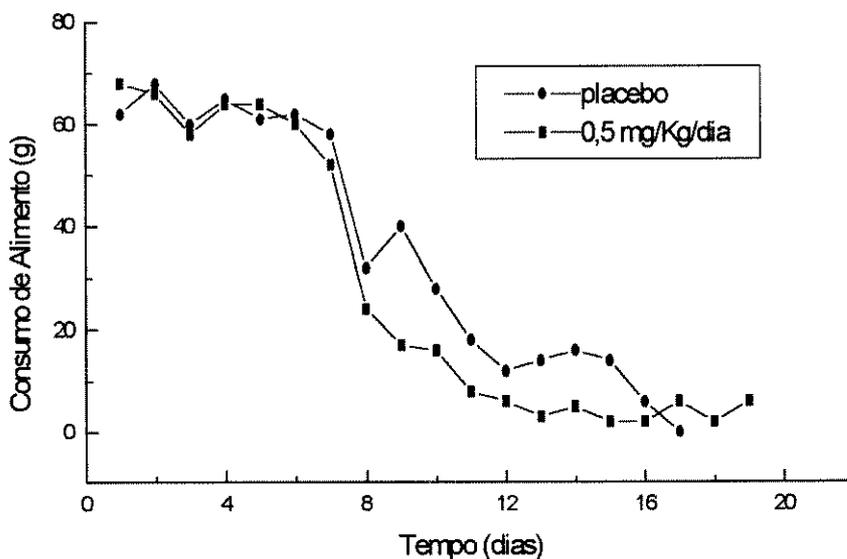


Figura 14: Consumo médio de alimento (g) em função do tempo (dias), após a inoculação das células tumorais de Walker-256 (linhagem A) em ratos pré-irradiados, placebo e tratadas com 0,5 mg/Kg/dia de MAPA.

A evolução tumoral está representada na figura 15.

Os mesmos valores foram observados para a sobrevivência dos animais pertencentes aos dois grupos (Grupo 1: irradiado - placebo e Grupo 2: irradiado - tratado com 0,5 mg/Kg/dia de MAPA). O tempo observado foi de 14 dias para os grupos 1 e 2 (diferença estatisticamente não significativa para a sobrevivência; teste de Mann-Whitney,  $p > 0,05$ ).

Embora nenhuma diferença tenha sido observada na evolução tumoral dos grupos de animais pré-irradiados placebo e tratados com MAPA, 50% de regressão foi observada no grupo de animais com o sistema imune intacto submetidos às mesmas doses de MAPA (experimento I; item 2.5.2, capítulo 2). Ademais, a depressão dos mecanismos de proteção antecipou significativamente a morte dos animais (para 14 dias) em relação aos animais com o sistema imune intacto e que foram submetidos ao mesmo protocolo experimental, ou seja, inoculação unifocal de células da linhagem A e tratamentos placebo e com 0,5 mg/Kg/dia de MAPA (experimento I).

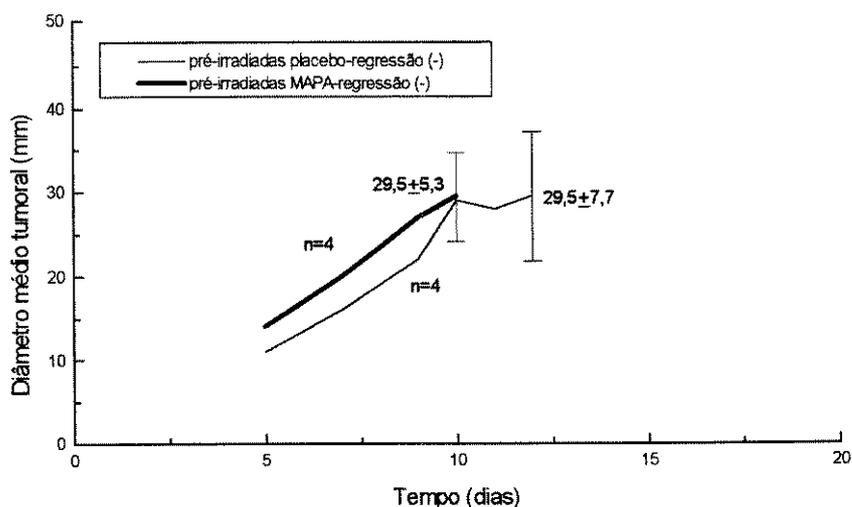


Figura 15: Média do diâmetro tumoral (mm) de ratos pré-irradiados placebo-regressão (-) e ratos pré-irradiados tratados com MAPA 0,5 mg/Kg/dia-regressão (-) em função do tempo (dias). Os valores inseridos no gráfico correspondem à média do diâmetro tumoral máximo de n ratos  $\pm$  desvio padrão da média.

A tabela 12 contém os valores observados para a sobrevivência dos animais placebo e tratados com MAPA, submetidos à pré-irradiação ou não (experimentos I e III).

Tabela 12: Sobrevivência (dias) dos animais pré-irradiados que receberam tratamento placebo e doses diárias de 0,5 mg/Kg de MAPA e dos animais com o sistema imune intacto, que receberam o mesmo protocolo de tratamento.

tratamento	número ratos	irradiação	sobrevivência	p
placebo	4/4	+	14	p < 0,05
placebo	7/8	-	27	
MAPA	4/4	+	14	p < 0,05
MAPA	4/8	-	29	

( + ) = animais que receberam pré-irradiação; ( - ) = animais com o sistema imune intacto (não foram pré-irradiados, experimento I; item 2.5.2, capítulo 2). As diferenças na sobrevivência entre os animais placebo, e na sobrevivência entre os animais tratados com MAPA foram testadas utilizando-se o teste de Mann Whitney, a um nível de 5%. Os valores correspondem à mediana.

Apenas metástases incipientes em linfonodos regionais foram encontradas nestes animais. A variação no peso dos animais durante o experimento encontra-se no apêndice 3.

Este experimento confirmou que a presença do sistema imune é importante na manifestação dos efeitos antitumorais do MAPA.

#### Tratamento com MAPA x 1 sítio de inoculação de células tumorais de Walker-256 sublinhagem Ar (item 2.5.3, capítulo 2)

Devido o comportamento menos agressivo das células tumorais de Walker-256 sublinhagem Ar, principalmente quando se utiliza uma única inoculação subcutânea, decidiu-se realizar um experimento preliminar, apenas exploratório, para avaliar o efeito de uma dose de MAPA na regressão tumoral da sublinhagem Ar. A dose de 0,5 mg/Kg/dia foi selecionada por ter apresentado maior eficiência na regressão de tumores da linhagem A.

Dois grupos de 8 animais cada, receberam 1 inóculo SC de células tumorais de W256 sublinhagem Ar e foram tratados com 0,5 mg/Kg/dia de MAPA. Os animais foram alojados em gaiolas coletivas. A variação no peso dos animais durante o experimento encontra-se no apêndice 3.

As variáveis dependentes estudadas foram o perfil do crescimento tumoral e a sobrevida.

O resultado confirmou a expectativa, sendo observadas 100% de regressões tumorais no grupo tratado com MAPA e 75% no grupo placebo. A proporção obtida de regressão tumoral no grupo tratado com MAPA não é estatisticamente significativa em relação ao grupo placebo, empregando-se o teste exato de Fisher ao nível de significância de 5%. O início da regressão tumoral no grupo tratado com MAPA (dia 16) não foi estatisticamente significativo comparado ao grupo placebo (dia 20), utilizando-se o teste de

Mann Whitney, a um nível de 5%. O perfil do crescimento tumoral está representado na figura 16.

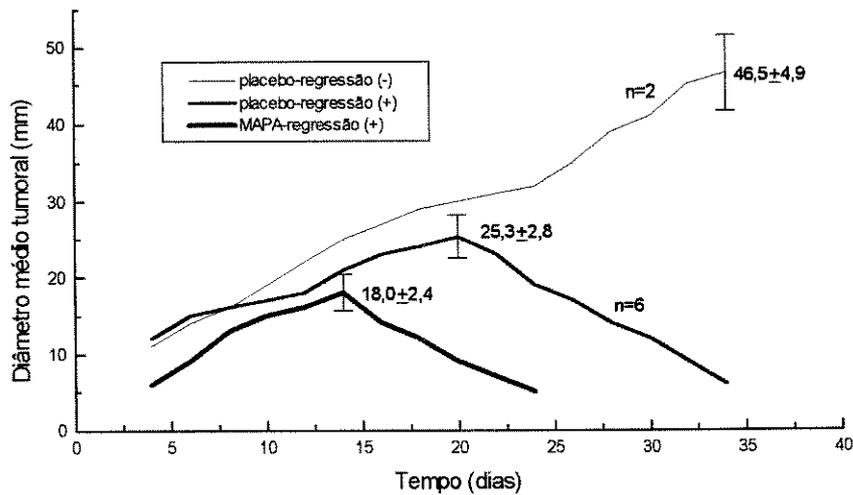


Figura 16: Média do diâmetro tumoral (mm) de ratos placebo-regressão (-), ratos placebo-regressão (+) e ratos tratadas com MAPA 0,5 mg/Kg/dia-regressão (+) em função do tempo (dias). Os valores inseridos no gráfico correspondem à média do diâmetro tumoral máximo de n ratos ± desvio padrão da média.

## Desenhos experimentais

Um resumo dos desenhos experimentais empregados e seus resultados é apresentado na tabela 13, a seguir.

Todos os experimentos incluíram um grupo de animais tratados com placebo: o veículo do MAPA.

Tabela 13: Desenhos experimentais utilizando-se o tumor de Walker-256 linhagem A e sublinhagem Ar

<u>EXP. #</u>	<u>LINH.</u>	<u>Nº INOC.</u>	<u>GAIOLA</u>	<u>PRÉ-IRR.</u>	<u>MAPA</u>	<u>RESULTADO</u>
I (2.5.1)	A	2	M	-----	1,0	SUGERE
I (2.5.1)	A	4	M	-----	1,0	MELHORIA
II (2.5.1)	A	8	M	-----	10	TENDÊNCIA
II (2.5.1)	A	8	M	-----	100	DESFAVORÁVEL
I (2.5.2)	A	1	C	-----	0,5	50% REGRESSÃO (p<0,05; teste exato Fisher)
I (2.5.2)	A	1	C	-----	1,0	40% REGRESSÃO
I Reinoc.*	A	1	C	-----	----	REJEIÇÃO TUM.
II (2.5.2)	A	1	C	-----	1,5	0% REGRESSÃO
III (2.5.2)	A	1	C	SIM	0,5	0% REGRESSÃO + ALT. LETAL
2.5.3	SUB Ar	1	C	-----	0,0	75% REGRESSÃO
					0,5	100% REGRESSÃO (mas teste exato Fisher: n.s.)

Os resultados obtidos nestes experimentos com o tumor de Walker-256, sugerem que o efeito benéfico do MAPA ocorre diretamente através do sistema imune, ou seja, estimulando os mecanismos protetores do hospedeiro.

### 3.4 ESTUDO DA VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CÉLULAS DO SANGUE EM RATAS TRATADAS COM MAPA, $Mg_3(PO_4)_2$ e $NH_4MgPO_4$

Os efeitos terapêuticos do MAPA *in vitro* e *in vivo*, associados ao efeito linfoproliferativo observado *in vitro* por Durán e colaboradores<sup>1</sup>, sugerem uma atividade imunomoduladora para a droga. Levando-se em conta que a droga MAPA, um agregado polimérico de fosfato de amônio magnésio associado à proteínas e lipídios, possui um expressivo percentual de  $Mg^{2+}$  e o papel deste cátion na expressão das reações imunes, surgiu a hipótese de que a ação da droga ocorresse, principalmente, através da porção que contém magnésio.

Além dos estudos relacionando os efeitos da deficiência ou carência de magnésio, alguns pesquisadores examinaram os efeitos da suplementação com diferentes sais de magnésio em certas funções fisiológicas.<sup>94, 140-142</sup> Em função destes resultados, decidiu-se proceder um estudo comparativo dos efeitos da droga contra diferentes sais de magnésio que se assemelhassem à porção do MAPA que contém o magnésio, nos níveis sanguíneos, principalmente nas células brancas cujas alterações estão reconhecidamente relacionadas ao  $Mg^{2+}$ .

Esta série de experimentos teve como objetivo comparar a efetividade do composto MAPA, verificada anteriormente em estudos realizados *in vitro* e *in vivo*, com o tratamento convencional com sais de magnésio; além de investigar a possibilidade da relação entre os efeitos observados e o  $Mg^{2+}$ .

#### **Efeito da suplementação com magnésio em certas funções biológicas**

No trabalho de Stankiewicz e colaboradores<sup>94</sup>, camundongos receberam quantidades suplementares de  $MgCl_2$  ou  $MgSO_4$  na alimentação e o seguinte foi verificado: aumento da atividade hemolítica do complemento no soro, utilizando-se eritrócitos de coelhos; aumento da fagocitose de

pérolas de latex pelas células peritoneais, diminuição do crescimento tumoral de melanomas, utilizando-se células de melanoma B16, e diminuição de infecções parasitárias severas por *Trichinella spiralis*.

Recentemente, foi relatada a utilização de diferentes compostos de magnésio para o tratamento e profilaxia de doenças neoplásicas e autoimunes. Ademais, foi ressaltado que melhores índices terapêuticos foram obtidos quando pirofosfato de magnésio foi administrado, via oral ou parenteral, associado à vitamina B<sub>6</sub>.<sup>143</sup>

Além disso, já está bem documentado na literatura que níveis adequados de diferentes cátions divalentes, como zinco, cobre e magnésio, são essenciais para a proliferação celular e, portanto, também vitais na função imune de muitas espécies, já que a proliferação celular é um passo importante no desenvolvimento da resposta imune.<sup>43, 52, 62, 63, 144, 145</sup>

Por muitos anos o interesse no papel de cátions divalentes na mitose se concentrou quase que exclusivamente nos transientes de íons Ca<sup>2+</sup>; entretanto, seu papel permanece ainda obscuro.<sup>146-148</sup> Enquanto isso, a disponibilidade de outro principal componente, o Mg<sup>2+</sup>, está ligada à síntese de proteínas e DNA, estimulação de linfócitos por lecitinas, além de outros tipos de células. A resposta de células T à lipopolissacarídeos é reduzida no caso de deficiência de Mg<sup>2+</sup> e pode ser devido a anormalidades funcionais de células acessórias e/ou de células T. O papel de macrófagos e células T produtoras de linfocinas, interleucina-1 (IL-1) e interleucina-2 (IL-2), na resposta imune das células T também já foi estabelecida.<sup>52, 62, 63, 144</sup> Além disso, deficiências severas de Mg<sup>2+</sup> diminuem significativamente as proteínas plasmáticas totais, com redução expressiva dos níveis de IgM e IgG, embora a resposta de anticorpos não seja alterada por níveis subótimos de Mg<sup>2+</sup>.<sup>41, 63</sup>

## Experimentos

### Tratamento com MAPA x tratamento com $Mg_3(PO_4)_2$ em doses de 1, 10 e 100 mg/Kg/dia IP (item 2.6.1, capítulo 2)

Foram montados 7 grupos de 2 animais cada (n=14), que diferiram quanto a substância e a dose administrada. As substâncias testes MAPA e  $Mg_3(PO_4)_2$  foram administradas IP em doses de 1,0, 10 e 100 mg/Kg/dia, durante 7 dias. Aos animais placebo foi administrado tampão PBS-A, pH 7,2, IP diariamente, na mesma razão dose-volume de 10 mL/Kg de peso corporal administrada aos animais tratados. Os hemogramas foram monitorados antes e após 4 e 7 doses das substâncias testes. Os parâmetros sanguíneos relatados foram o número de células brancas totais (WBC), número de linfócitos (LYM), número de células MID e GRAN, e o número de eritrócitos (RBC).

Os animais foram alojados em gaiolas comunitárias e o peso foi monitorado a cada coleta de sangue.

As variações no peso médio dos animais, por dose e substância injetada em função do tempo encontram-se na tabela 14. Os animais placebo e os animais tratados com doses de 1,0 e 10 mg/Kg/dia ganharam peso normalmente durante o experimento. Entretanto, os animais que receberam doses de 100 mg/Kg/dia manifestaram uma perda de peso logo após o 4<sup>o</sup> dia de tratamento, mais acentuada no grupo tratado com o sal e que persistiu até o final do experimento.

Nas tabelas 15-20 foram agrupados os valores absolutos e as respectivas porcentagens dos níveis das células do sangue contra o tempo de tratamento. Estes dados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão da média de dois animais por grupo, submetidos aos tratamentos placebo e com 1, 10 e 100 mg/Kg/dia de MAPA respectivamente.

Tabela 14: Variação no peso corporal médio (g) de ratas placebo e ratas tratadas com doses diárias de 1,0; 10 e 100 mg/Kg de MAPA e  $Mg_3(PO_4)_2$  em função do tempo (dias)

TEMPO (dias)	PLACEBO	MAPA	$Mg_3(PO_4)_2$
dose = 1,0 mg/Kg			
0	323 $\pm$ 21	345 $\pm$ 6	342 $\pm$ 8
4	336 $\pm$ 23	350 $\pm$ 11	353 $\pm$ 7
7	341 $\pm$ 18	351 $\pm$ 9	358 $\pm$ 18
dose = 10 mg/Kg			
0	323 $\pm$ 21	308 $\pm$ 18	305 $\pm$ 6
4	336 $\pm$ 23	312 $\pm$ 22	314 $\pm$ 13
7	341 $\pm$ 18	321 $\pm$ 12	318 $\pm$ 9
dose = 100 mg/Kg			
0	323 $\pm$ 21	319 $\pm$ 0	319 $\pm$ 12
4	336 $\pm$ 23	312 $\pm$ 13	306 $\pm$ 6
7	341 $\pm$ 18	310 $\pm$ 15	305 $\pm$ 9

Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio padrão da média de 2 animais por grupo. Ao dia 0 correspondem os pesos corporais dos animais antes do tratamento com cada substância.

A média  $\pm$  desvio padrão da média dos níveis das células do sangue antes do tratamento foi obtida considerando-se os resultados individuais dos 14 animais utilizados no experimento. É oportuno lembrar que estes animais foram separados em 7 grupos para avaliação dos efeitos do placebo, do MAPA e do sal.

Tabela 15: Variação absoluta e percentual das células do sangue de ratas placebo e ratas tratadas com 1 mg/Kg/dia IP de MAPA e  $Mg_3(PO_4)_2$  após 4 doses

célula	antes do tratamento		PLACEBO		MAPA		$Mg_3(PO_4)_2$	
	absoluto	%	absoluto	%	absoluto	%	absoluto	%
	n=14	n=14	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2
WBC	14,7+5,6		15,7+3,0		15,3+0,1		18,1+4,5	
LYM	11,4+4,5	76,6+7,1	13,8+1,3	80,4+4,4	13,6+0,6	88,6+4,4	15,1+4,0	83,2+0,6
MID	1,6+0,8	11,0+4,1	2,3+0,2	11,6+0,4	1,3+0,4	8,6+2,3	2,0+0,1	11,2+0,1
GRAN	1,6+0,8	12,4+4,9	1,5+0,6	8,0+4,0	0,45+0,4	2,8+2,1	1,0+0,1	5,6+0,7
RBC	7,9+0,4		7,3+0,0		7,3+0,04		7,3+0,04	

WBC, LYM e RBC correspondem respectivamente a: células brancas totais (100%), linfócitos e eritrócitos. Células MID e GRAN incluem neutrófilos, células cuja ocorrência é rara ou pouco frequente, correspondendo aos eosinófilos, monócitos, basófilos, blastos e outros precursores das células brancas. Os valores absolutos para WBC, LYM, MID e GRAN são dados em  $K/\mu L$ , onde K representa o milhar ( $10^3$ ). Os valores absolutos encontrados para RBC são dados em  $M/\mu L$ , onde M representa o milhão ( $10^6$ ). Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio padrão da média de n animais por grupo de tratamento. Aos animais placebo foi administrado diariamente tampão PBS-A, pH 7,2, na mesma razão dose-volume de 10 mL/Kg de peso corporal.

Tabela 16: Variação absoluta e percentual das células do sangue de ratas placebo e ratas tratadas com 1 mg/Kg/dia IP de MAPA e  $Mg_3(PO_4)_2$  após 7 doses

célula	antes do tratamento		PLACEBO		MAPA		$Mg_3(PO_4)_2$	
	absoluto	%	absoluto	%	absoluto	%	absoluto	%
	n=14	n=14	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2
WBC	14,7+5,6		15,8+4,5		15,4+0,9		28,1+6,2	
LYM	11,4+4,5	76,6+7,1	12,1+2,3	76,8+8,2	13,2+0,1	86,0+3,5	16,9+4,5	77,5+1,3
MID	1,6+0,8	11,0+4,1	1,8+0,8	11,1+1,8	1,35+0,1	8,7+0,2	2,6+0,9	11,7+0,9
GRAN	1,6+0,8	11,1+4,9	2,1+1,6	12,1+6,4	0,85+0,6	5,35+3,7	2,4+0,8	10,8+0,4
RBC	7,9+0,4		7,5+0,08		7,4+0,0		7,2+0,0	

WBC, LYM e RBC correspondem respectivamente a: células brancas totais (100%), linfócitos e eritrócitos. Células MID e GRAN incluem neutrófilos, células cuja ocorrência é rara ou pouco frequente, correspondendo aos eosinófilos, monócitos, basófilos, blastos e outros precursores das células brancas. Os valores absolutos para WBC, LYM, MID e GRAN são dados em  $K/\mu L$ , onde K representa o milhar ( $10^3$ ). Os valores absolutos encontrados para RBC são dados em  $M/\mu L$ , onde M representa o milhão ( $10^6$ ). Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio padrão da média de n animais por grupo de tratamento. Aos animais placebo foi administrado diariamente tampão PBS-A, pH 7,2, na mesma razão dose-volume de 10 mL/Kg de peso corporal.

Tabela 17: Variação absoluta e percentual das células do sangue de ratas placebo e ratas tratadas com 10 mg/Kg/dia IP de MAPA e  $Mg_3(PO_4)_2$  após 4 doses

célula	antes do tratamento		PLACEBO		MAPA		$Mg_3(PO_4)_2$	
	absoluto	%	absoluto	%	absoluto	%	absoluto	%
	n=14	n=14	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2
WBC	14,7+5,6		15,7+3,0		15,4+0,6		16,0+3,3	
LYM	11,4+4,5	76,6+7,1	13,8+1,3	80,4+4,4	13,0+0,6	83,6+0,6	14,0+3,3	87,2+2,3
MID	1,6+0,8	11,0+4,1	2,3+0,2	11,6+0,4	1,9+0,07	12,0+0,6	1,5+0,0	9,6+1,2
GRAN	1,6+0,8	12,4+4,9	1,5+0,6	4,0+4,0	0,7+0,0	4,4+0,0	0,5+0,0	3,2+0,7
RBC	7,9+0,4		7,3+0,0		7,8+0,7		7,7+0,08	

WBC, LYM e RBC correspondem respectivamente a: células brancas totais (100%), linfócitos e eritrócitos. Células MID e GRAN incluem neutrófilos, células cuja ocorrência é rara ou pouco frequente, correspondendo aos eosinófilos, monócitos, basófilos, blastos e outros precursores das células brancas. Os valores absolutos para WBC, LYM, MID e GRAN são dados em  $K/\mu L$ , onde K representa o milhar ( $10^3$ ). Os valores absolutos encontrados para RBC são dados em  $M/\mu L$ , onde M representa o milhão ( $10^6$ ). Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio padrão da média de n animais por grupo de tratamento. Aos animais placebo foi administrado diariamente tampão PBS-A, pH 7,2, na mesma razão dose-volume de 10 mL/Kg de peso corporal.

Tabela 18: Variação absoluta e percentual das células do sangue de ratas placebo e ratas tratadas com 10 mg/Kg/dia IP de MAPA e  $Mg_3(PO_4)_2$  após 7 doses

célula	antes do tratamento		PLACEBO		MAPA		$Mg_3(PO_4)_2$	
	absoluto	%	absoluto	%	absoluto	%	absoluto	%
	n=14	n=14	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2
WBC	14,7+5,6		15,8+4,5		20,8+5,7		25,4+7,3	
LYM	11,4+4,5	76,6+7,1	12,1+2,3	76,8+8,2	15,6+4,7	75,0+2,0	19,9+3,9	78,4+1,6
MID	1,6+0,8	11,0+4,1	1,8+0,8	11,1+1,8	3,0+0,07	14,9+4,0	2,75+1,1	10,7+1,3
GRAN	1,6+0,8	12,4+4,9	2,1+1,6	12,1+6,4	2,2+1,0	10,1+1,8	2,75+0,9	10,9+0,4
RBC	7,9+0,4		7,5+0,08		7,36+0,7		7,6+0,2	

WBC, LYM e RBC correspondem respectivamente a: células brancas totais (100%), linfócitos e eritrócitos. Células MID e GRAN incluem neutrófilos, células cuja ocorrência é rara ou pouco frequente, correspondendo aos eosinófilos, monócitos, basófilos, blastos e outros precursores das células brancas. Os valores absolutos para WBC, LYM, MID e GRAN são dados em  $K/\mu L$ , onde K representa o milhar ( $10^3$ ). Os valores absolutos encontrados para RBC são dados em  $M/\mu L$ , onde M representa o milhão ( $10^6$ ). Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio padrão da média de n animais por grupo de tratamento. Aos animais placebo foi administrado diariamente tampão PBS-A, pH 7,2, na mesma razão dose-volume de 10 mL/Kg de peso corporal.

Tabela 19: Variação absoluta e percentual das células do sangue de ratas placebo e ratas tratadas com 100 mg/Kg/dia IP de MAPA e  $Mg_3(PO_4)_2$  após 4 doses

célula	antes do tratamento		PLACEBO		MAPA		$Mg_3(PO_4)_2$	
	absoluto	%	absoluto	%	absoluto	%	absoluto	%
	n=14	n=14	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2
WBC	14,7+5,6		15,7+2,3		16,9+4,4		20,1+2,6	
LYM	11,4+4,5	76,6+7,1	13,8+1,3	80,4+4,4	7,0+2,3	58,7+1,6	7,0+2,1	77,2+0,6
MID	1,6+0,8	11,0+4,1	2,3+0,2	11,6+0,4	2,95+0,1	18,0+3,5	2,6+0,3	13,0+0,4
GRAN	1,6+0,8	12,4+4,9	1,5+0,6	8,0+4,0	4,05+1,8	23,3+5,0	1,95+0,1	9,8+0,2
RBC	7,9+0,4		7,3+0,0		7,75+1,0		7,36+0,3	

WBC, LYM e RBC correspondem respectivamente a: células brancas totais (100%), linfócitos e eritrócitos. Células MID e GRAN incluem neutrófilos, células cuja ocorrência é rara ou pouco frequente, correspondendo aos eosinófilos, monócitos, basófilos, blastos e outros precursores das células brancas. Os valores absolutos para WBC, LYM, MID e GRAN são dados em  $K/\mu L$ , onde K representa o milhar ( $10^3$ ). Os valores absolutos encontrados para RBC são dados em  $M/\mu L$ , onde M representa o milhão ( $10^6$ ). Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio padrão da média de n animais por grupo de tratamento. Aos animais placebo foi administrado diariamente tampão PBS-A, pH 7,2, na mesma razão dose-volume de 10 mL/Kg de peso corporal.

Tabela 20: Variação absoluta e percentual das células do sangue de ratas placebo e ratas tratadas com 100 mg/Kg/dia IP de MAPA e  $Mg_3(PO_4)_2$  após 7 doses

célula	antes do tratamento		PLACEBO		MAPA		$Mg_3(PO_4)_2$	
	absoluto	%	absoluto	%	absoluto	%	absoluto	%
	n=14	n=14	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2
WBC	14,7+5,6		15,8+4,5		21,0+13		17,3+5,8	
LYM	11,4+4,5	76,6+7,1	12,1+2,3	76,8+8,2	14,6+8,9	75,0+2,0	10,2+1,6	60,6+12
MID	1,6+0,8	11,0+4,1	1,8+0,8	11,1+1,8	3,0+1,8	10,5+0,7	2,8+0,1	17,0+4,7
GRAN	1,6+0,8	12,4+4,9	2,1+1,6	12,1+6,4	7,0+2,7	14,5+2,0	7,0+4,2	22,4+17
RBC	7,9+0,4		7,5+0,08		6,9+7,1		7,15+0,3	

WBC, LYM e RBC correspondem respectivamente a: células brancas totais (100%), linfócitos e eritrócitos. Células MID e GRAN incluem neutrófilos, células cuja ocorrência é rara ou pouco frequente, correspondendo aos eosinófilos, monócitos, basófilos, blastos e outros precursores das células brancas. Os valores absolutos para WBC, LYM, MID e GRAN são dados em  $K/\mu L$ , onde K representa o milhar ( $10^3$ ). Os valores absolutos encontrados para RBC são dados em  $M/\mu L$ , onde M representa o milhão ( $10^6$ ). Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio padrão da média de n animais por grupo de tratamento. Aos animais placebo foi administrado diariamente tampão PBS-A, pH 7,2, na mesma razão dose-volume de 10 mL/Kg de peso corporal.

Os resultados obtidos foram analisados considerando-se principalmente as variações nas populações das células brancas do sangue: linfócitos (LYM) e células MID e GRAN, as quais incluem neutrófilos, células

pouco frequentes, tais como eosinófilos, monócitos, basófilos e blastos, além de outros precursores das células brancas.

Após o tratamento com doses de 1,0 mg/Kg/dia de MAPA, observou-se principalmente uma diminuição de células MID e GRAN, e um aumento de linfócitos. Após o tratamento com doses de 1,0 mg/Kg/dia de  $Mg_3(PO_4)_2$ , foi registrado um aumento nas células MID e GRAN, embora uma diminuição nas células GRAN tenha sido observada após a administração de 4 doses. Um aumento mais pronunciado na contagem de linfócitos foi registrado após o tratamento com o sal do que com MAPA (Tabelas 15 e 16).

O tratamento com doses diárias de 10 mg/Kg de MAPA, aparentemente, provocou um efeito oposto sobre as populações de células MID e, principalmente, GRAN em relação ao tratamento com 1,0 mg/Kg/dia. Um maior aumento de linfócitos também foi registrado após 7 doses. O mesmo efeito sobre estas células foi verificado no tratamento com o sal (Tabelas 17 e 18).

Quando as ratas foram submetidas à doses de 100 mg/Kg/dia de MAPA ou sal, o aumento das células MID e GRAN foi ainda mais pronunciado. Embora após 4 doses de MAPA tenha sido observada uma diminuição nos linfócitos, as doses subsequentes restabeleceram os níveis normais destas células. Ao contrário, o tratamento com o sal não recuperou os níveis normais de linfócitos circulantes (Tabelas 19 e 20).

Estes resultados sugerem o aparecimento de efeitos indesejáveis quando doses maiores de ambas as substâncias foram administradas. Da mesma forma, o tratamento de ratas transplantadas com tumor de Walker-256 com doses de 10 e 100 mg/Kg/dia de MAPA, sugeriu um efeito desfavorável do MAPA sobre a evolução tumoral.

A tabela 21 contém um resumo das variações observadas nas populações de linfócitos e células MID e GRAN após 4 e 7 doses de MAPA e  $Mg_3(PO_4)_2$ .

Tabela 21: Resumo das variações nos níveis de LYM, MID e GRAN após 4 e 7 doses de MAPA e  $Mg_3(PO_4)_2$

GRUPO EXP.	DOSE	N <sup>o</sup> ANIM.	RESULTADO	
			após 4 doses	após 7 doses
MAPA	1,0	2	↑ LYM, ↓ MID e GRAN	
$Mg_3(PO_4)_2$	1,0	2	↑ LYM e MID, ↓ GRAN	↑ LYM, MID e GRAN
MAPA	10	2	↑ LYM e MID, ↓ GRAN	↑ LYM, MID e GRAN
$Mg_3(PO_4)_2$	10	2	↑ LYM e MID, ↓ GRAN	↑ LYM, MID e GRAN
MAPA	100	2	↓ LYM, ↑ MID e GRAN	↑ LYM, MID e GRAN (LYM = níveis antes trat.)
$Mg_3(PO_4)_2$	100	2	↓ LYM, ↑ MID e GRAN	

Tratamento com MAPA versus tratamento com  $NH_4MgPO_4$  na dose de 1,0 mg/Kg/dia (item 2.6.2, capítulo 2)

Os objetivos deste experimento foram os mesmos do anterior; entretanto, optou-se pela utilização de um sal que conferisse maior similaridade à porção fosfato de amônio-magnésio do MAPA. Além disso, um número maior de animais foi submetido ao experimento favorecendo a análise e a confiança nos resultados.

Foram montados 3 grupos de 5 animais cada (n=15), que diferiram quanto à substância administrada. As substâncias testes MAPA e  $NH_4MgPO_4$  foram administradas IP na dose de 1,0 mg/Kg/dia, durante 4 dias. Aos animais placebo foi administrado tampão PBS-A, pH 7,2, IP diariamente, na mesma razão dose-volume de 10 mL/Kg de peso corporal administrada aos animais tratados. Os hemogramas foram monitorados antes e após 4 doses das substâncias testes. Os parâmetros sanguíneos relatados foram o número de células brancas totais (WBC), número de linfócitos (LYM), número de

células MID e GRAN, número de eritrócitos (RBC) e o número de plaquetas (PLT).

Os animais foram alojados em gaiolas comunitárias e o peso foi monitorado a cada coleta de sangue.

Tanto os animais placebo como os animais tratados com 1,0 mg/Kg/dia de MAPA e sal, ganharam peso normalmente durante o experimento. A variação no peso corporal médio dos animais em função do tempo está disponível na tabela 22.

Tabela 22: Variação no peso corporal médio (g) de ratas placebo e ratas tratadas com 1 mg/Kg/dia de MAPA e  $\text{NH}_4\text{MgPO}_4$  em função do tempo

TEMPO	PLACEBO	MAPA	$\text{NH}_4\text{MgPO}_4$
	n=5	n=5	n=5
antes do tratamento	316 $\pm$ 26	329 $\pm$ 30	305 $\pm$ 39
após 4 dias	326 $\pm$ 22	335 $\pm$ 32	326 $\pm$ 22

Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio padrão da média. O tempo de 4 dias equivale a 4 doses.

Os resultados para a variação dos níveis de células do sangue após 4 dias de tratamento foram agrupados na Tabela 23. Os valores antes do tratamento correspondem à média  $\pm$  desvio padrão da média entre os 15 animais que foram utilizados nos diferentes grupos experimentais. Os valores após o tratamento correspondem à média  $\pm$  desvio padrão da média entre os 5 animais pertencentes aos 3 grupos de tratamento, placebo, MAPA e  $\text{NH}_4\text{MgPO}_4$ .

Tabela 23: Variação absoluta e percentual das células do sangue de ratas placebo e ratas tratadas com 1 mg/Kg/dia IP de MAPA e  $\text{NH}_4\text{MgPO}_4$  após 4 doses

célula	antes do tratamento		PLACEBO		MAPA		$\text{NH}_4\text{MgPO}_4$	
	absoluto n=15	% n=15	absoluto n=5	% n=5	absoluto n=5	% n=5	absoluto n=5	% n=5
WBC	11,4+3,5		11,0+2,7		11,4+2,0		8,53+3,8	
LYM	9,3+3,0	81,7+2,7	9,2+2,7	83,2+4,0	9,82+2,0	85,4+2,7	7,0+3,7	78,7+14
MID	1,1+0,4	9,5+1,9	0,9+0,09	8,3+1,5	1,1+0,09	9,3+1,3	1,1+0,3	14,2+8,7
GRAN	1,0+0,3	8,8+2,1	1,1+0,4	8,5+2,6	0,6+0,2	5,3+1,8	0,5+0,3	7,1+6,0
RBC	8,3+0,3		8,4+0,2		7,53+0,4		7,8+1,0	
PLT	402+174		308+101		551+235		605+246	

WBC, LYM, RBC, e PLT correspondem respectivamente a: células brancas totais (100%), linfócitos, eritrócitos e plaquetas. Células MID e GRAN incluem neutrófilos, células cuja ocorrência é rara ou pouco frequente, correspondendo aos eosinófilos, monócitos, basófilos, blastos e outros precursores das células brancas. Os valores absolutos para WBC, LYM, MID, GRAN e PLT são dados em  $\text{K}/\mu\text{L}$ , onde K representa o milhar ( $10^3$ ). Os valores absolutos encontrados para RBC são dados em  $\text{M}/\mu\text{L}$ , onde M representa o milhão ( $10^6$ ). Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio padrão da média de n animais por grupo de tratamento. Aos animais placebo foi administrado diariamente tampão PBS-A, pH 7,2, na mesma razão dose-volume de 10 mL/Kg de peso corporal.

Na figura 17 foram representados os principais parâmetros da tabela 23: LYM, MID, GRAN E RBC, antes do tratamento e após 4 doses de placebo, MAPA e  $\text{NH}_4\text{MgPO}_4$ .

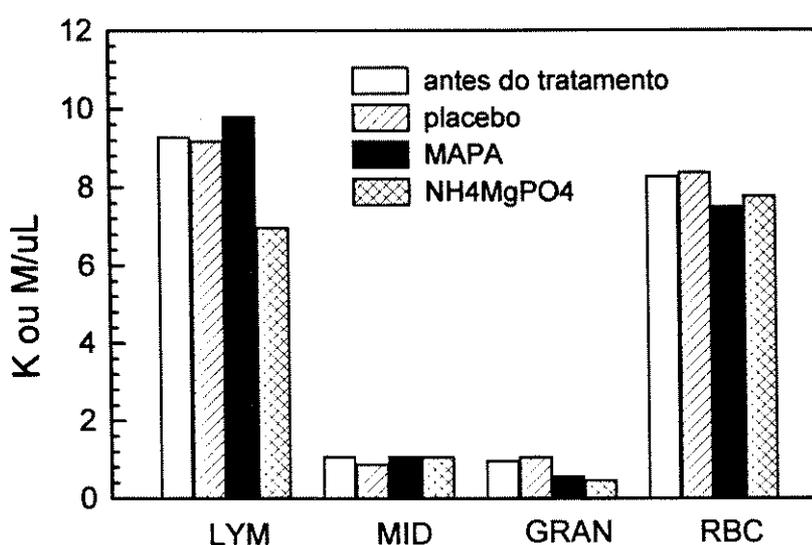


Figura 17: Níveis de linfócitos (LYM), células MID, células GRAN e eritrócitos (RBC) antes do tratamento e após 4 doses de placebo, MAPA (1,0 mg/Kg/dia) e  $\text{NH}_4\text{MgPO}_4$  (1,0 mg/Kg/dia).

Os resultados apresentados na tabela 23 foram estatisticamente analisados através de análise de variância (ANOVA). O mesmo efeito foi verificado sobre as populações de células MID, GRAN e eritrócitos, após o tratamento com o MAPA e o sal. Apenas após o tratamento com o MAPA foi registrado um aumento nos linfócitos totais. Entretanto, as alterações observadas nestes parâmetros sanguíneos não foram estatisticamente significativas (ANOVA).

Os resultados obtidos quando diferentes sais de  $Mg^{2+}$  foram utilizados favorecem o tratamento com a droga MAPA. Ademais, estes resultados indicam que provavelmente a porção da droga que contém o  $Mg^{2+}$  esteja relacionada aos efeitos observados. Entretanto, outros componentes da molécula poderiam ser responsáveis por diferenças na absorção do  $Mg^{2+}$  disponível. Embora não sejam conclusivos, alguns autores sugerem que a retenção de  $Mg^{2+}$  depende da magnitude de alterações na absorção aparente de  $Mg^{2+}$  e sua perda na urina, podendo ser dependentes de proteínas. Estudos futuros são necessários para definir a possível influência das proteínas em diferentes aspectos do metabolismo de  $Mg^{2+}$ .<sup>43, 110</sup>

Obviamente que tais propriedades biológicas sustentam a importância do estudo e desenvolvimento do MAPA comparado à administração de sais de  $Mg^{2+}$ .

### **3.5 ESTUDO DA VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CÉLULAS DO SANGUE DE RATAS TRATADAS COM DIFERENTES DOSES DE MAPA DURANTE 35 DIAS (item 2.6.3, capítulo 2)**

A capacidade da droga MAPA em modificar os níveis das células brancas do sangue sugerida nos dois experimentos discutidos na seção 3.4, nos levou a avaliar o efeito dose-resposta de diferentes doses da droga nas populações celulares do sangue periférico de ratas tratadas por um período mais longo (35 dias). As doses empregadas neste experimento foram

selecionadas considerando-se o aparente efeito desfavorável do MAPA quando altas doses são empregadas, e a observação de regressões do tumor de W256 nos animais tratados com 0,5 e 1,0 mg/Kg/dia de MAPA. Além disso, considerando-se que nos estudos com o tumor de W256, o MAPA foi administrado SC, optou-se por utilizar a via subcutânea para a administração da substância.

Foram montados 3 grupos de 5 ratas cada, alojadas em gaiolas comunitárias (n=15) e submetidas ao tratamento placebo e doses diárias de 0,5 e 1,0 mg/Kg/dia de MAPA. A substância teste foi administrada SC, utilizando-se solução Ringer-lactato estéril como veículo. Os animais placebo receberam o veículo do MAPA na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados. Os hemogramas foram processados antes do tratamento e a cada 7 dias durante o período experimental. O peso dos animais foi monitorado a cada 3 dias.

Tanto os animais placebo como os animais tratados com diferentes doses ganharam peso normalmente durante o experimento. As variações no peso médio dos animais pertencentes aos 3 grupos foram representados na figura 18.

As figuras 19-24 representam os efeitos do tratamento com diferentes doses de MAPA sobre as células brancas totais, linfócitos, células MID, células GRAN, eritrócitos e plaquetas do sangue periférico respectivamente. As figuras relativas às variações nos valores percentuais de LYM, MID e GRAN estão disponíveis no apêndice 5.

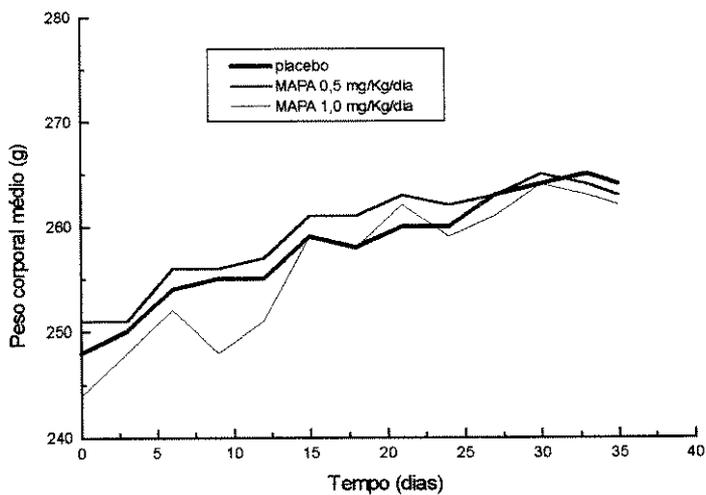


Figura 18: Peso corporal médio (g) de ratas placebo-controle e ratas tratadas com doses diárias de 0,5 e 1,0 mg/Kg/dia de MAPA em função do tempo (dias). O dia 0 corresponde ao peso dos animais antes do tratamento.

Os resultados obtidos para os parâmetros sanguíneos foram estatisticamente analisados através de análise de variância (ANOVA). Quando a hipótese nula foi rejeitada, as diferenças entre as médias foram testadas utilizando-se o teste de Dunnett a um nível de significância de 5%.

Nos animais que receberam doses de 0,5 mg/Kg/dia os seguintes efeitos puderam ser observados: uma diminuição estatisticamente significativa das células brancas totais (WBC) e um aumento estatisticamente significativo de linfócitos (LYM) do sangue após 14 e 21 dias respectivamente, em relação ao controle antes do tratamento (CTRL), persistindo até o final do experimento (Figuras 19 e 20 respectivamente).

A diminuição das células MID (Figura 21) foi estatisticamente significativa imediatamente após 1 semana de tratamento.

Embora um valor de  $p=0,059$  tenha sido obtido na análise de variância no caso das células GRAN; decidiu-se aplicar, igualmente, o teste de Dunnett afim de se avaliar as diferenças mínimas entre as médias obtidas. Diferenças estatisticamente significativas foram observadas apenas no 21<sup>o</sup> e 35<sup>o</sup> dias em relação ao CTRL (Figura 22).

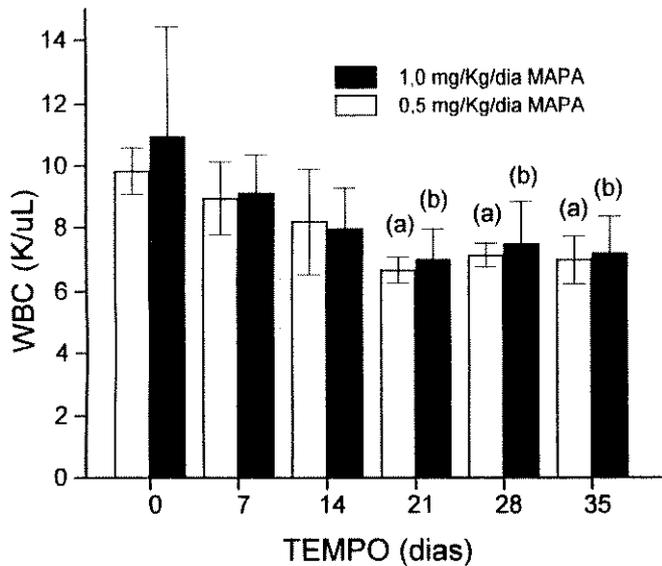


FIGURA 19: Evolução temporal das células brancas totais do sangue (WBC) de ratas Wistar, durante o tratamento com MAPA em doses diárias de 0,5 e 1,0 mg/Kg. Os valores correspondem à média de 5 animais por grupo  $\pm$  desvio padrão da média. (a)  $p < 0,001$  e (b)  $p < 0,05$  em relação ao controle antes do tratamento com 0,5 e 1,0 mg/Kg/dia MAPA respectivamente; determinados utilizando-se teste de Dunnett.

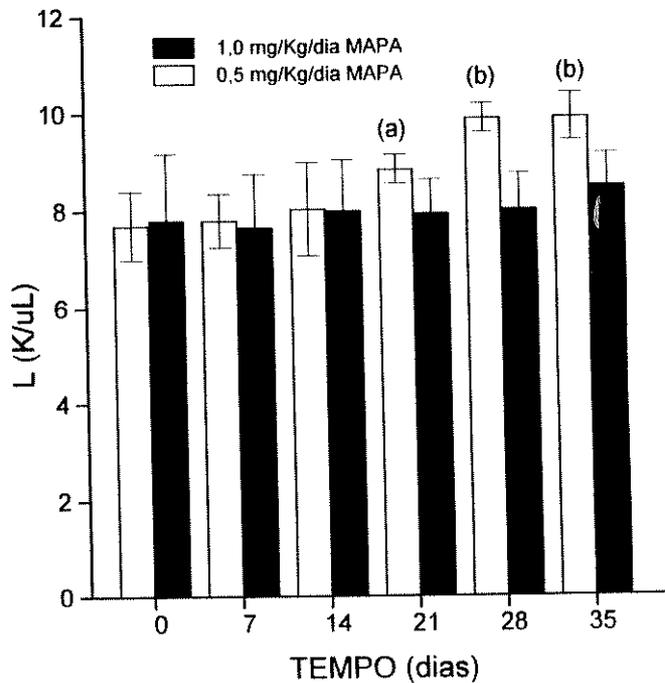


FIGURA 20: Evolução temporal de linfócitos totais do sangue (L) de ratas Wistar durante o tratamento com MAPA em doses diárias de 0,5 e 1,0 mg/Kg. Os valores correspondem à média de 5 animais por grupo  $\pm$  desvio padrão da média. (a)  $p < 0,05$ , (b)  $p < 0,001$  em relação ao controle antes do tratamento com 0,5 mg/Kg/dia MAPA; determinados utilizando-se teste de Dunnett.

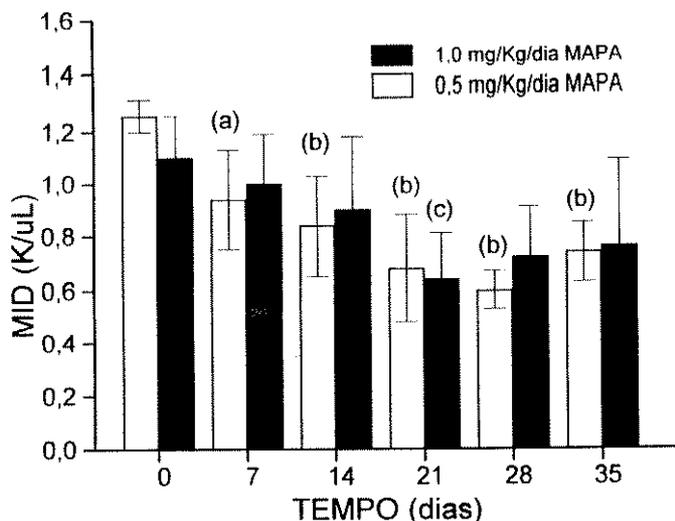


FIGURA 21: Evolução temporal de células MID totais do sangue (MID) de ratos Wistar durante o tratamento com MAPA em doses diárias de 0,5 e 1,0 mg/Kg. Os valores correspondem à média de 5 animais por grupo  $\pm$  desvio padrão da média. (a)  $p < 0,05$ , (b)  $p < 0,001$  em relação ao controle antes do tratamento com 0,5 mg/Kg/dia MAPA; (c)  $p < 0,05$  em relação ao controle antes do tratamento com 1,0 mg/Kg/dia MAPA; determinados utilizando-se teste de Dunnett.

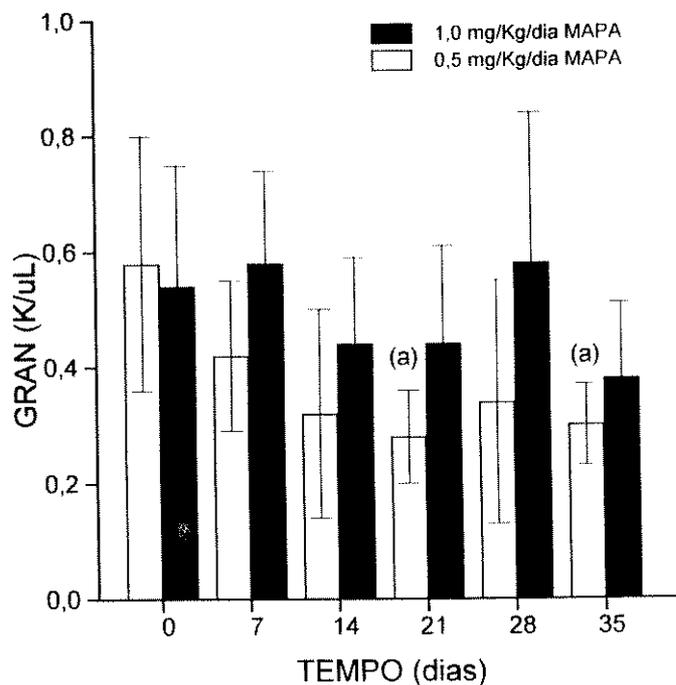


FIGURA 22: Evolução temporal de células GRAN totais do sangue de ratos Wistar durante o tratamento com MAPA em doses diárias de 0,5 e 1,0 mg/Kg. Os valores correspondem à média de 5 animais por grupo  $\pm$  desvio padrão da média. (a)  $p < 0,05$  em relação ao controle antes do tratamento com 0,5 mg/Kg/dia MAPA; determinado utilizando-se teste de Dunnett.

Não foram observadas alterações estatisticamente significativas nas contagens de eritrócitos (RBC) e plaquetas (PLT) durante o período experimental (Figuras 23 e 24 respectivamente). Estes dois últimos resultados são particularmente importantes, já que, em geral, novos agentes antitumorais com pré-disposição a causarem eritropenia e/ou plaquetopenia não têm sido aconselhados para a terapia de neoplasias.<sup>149</sup>

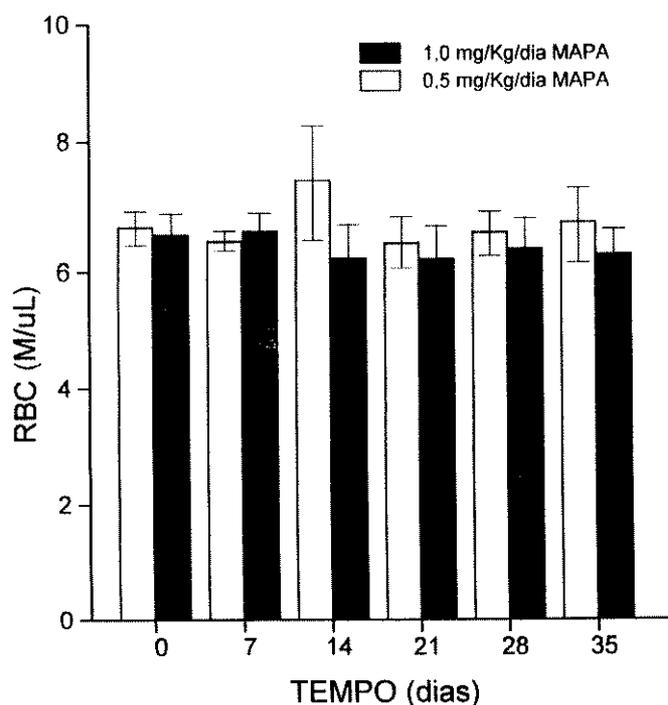


FIGURA 23: Evolução temporal de eritrócitos totais do sangue (RBC) de ratas Wistar durante o tratamento com MAPA em doses diárias de 0,5 e 1,0 mg/Kg. Os valores correspondem à média de 5 animais por grupo  $\pm$  desvio padrão da média.

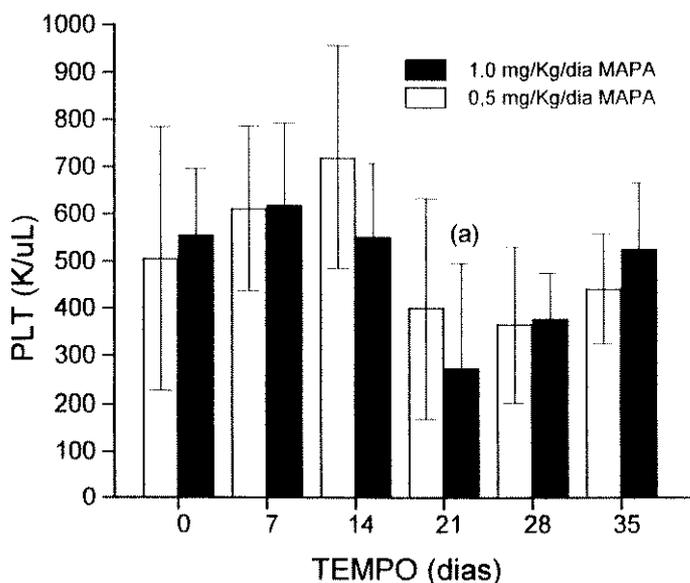


FIGURA 24: Evolução temporal de plaquetas totais do sangue (PLT) de ratas Wistar durante o tratamento com MAPA em doses diárias de 0,5 e 1,0 mg/Kg. Os valores correspondem à média de 5 animais por grupo  $\pm$  desvio padrão da média. (a)  $p < 0,05$  em relação ao controle antes do tratamento com 1,0 mg/Kg/dia MAPA; determinado utilizando-se teste de Dunnett.

O tratamento com doses de 1,0 mg/Kg/dia resultou em uma diminuição estatisticamente significativa das células brancas totais do sangue (WBC) após 21 dias de tratamento, em relação ao CTRL (Figura 19). O aumento de linfócitos observado não foi estatisticamente significativo, assim como as alterações nas células GRAN ocorridas durante o experimento (Figuras 20 e 22 respectivamente).

Os resultados estatisticamente significativos obtidos para a queda de células MID e plaquetas (Figuras 21 e 24 respectivamente) após 21 dias de tratamento, não se mantiveram durante os dias que se seguiram. Nenhuma alteração significativa foi observada para a contagem de eritrócitos (RBC) (Figura 23).

Nenhuma alteração significativa foi observada nas populações das células do sangue dos animais placebo em relação ao controle antes do tratamento, durante o período experimental. Os efeitos sobre as populações celulares encontram-se representados nas figuras 4-10 do apêndice 5.

O experimento com animais placebo é importante para que conclusões acerca do tratamento com a substância teste não sejam

confundidas com alterações provocadas pelo estresse ao qual o animal é submetido. Por exemplo, a resposta imune, celular e humoral, do organismo são mediadas também por hormônios e o estado de estresse pode liberar mediadores responsáveis por alterações na função imune e, conseqüentemente, nas populações celulares envolvidas.<sup>149-153</sup>

Além disso, diferenças nas populações celulares do sangue registradas em dias isolados durante o período experimental muitas vezes devem-se a outros fatores e não à administração da substância teste propriamente, como, por exemplo, variações temporárias normais nos níveis sanguíneos das ratas ou o fato do aparelho responsável pela contagem estar calibrado para células humanas e não células de rato, as quais diferem quanto ao tamanho e morfologia, além de problemas como coagulação e hemólise.

Neste experimento, apenas o aumento de linfócitos (após 21 dias) e a diminuição de células MID e WBC (após 7 e 14 dias respectivamente) de ratas tratadas com 0,5 mg/Kg/dia de MAPA, bem como, a diminuição de WBC após 21 dias de tratamento com 1,0 mg/Kg/dia de MAPA se mantiveram estatisticamente significativos nas análises posteriores que compreenderam o período experimental. Estes resultados sugerem que o tratamento com a droga MAPA seja responsável pelas diferenças registradas, mais especificamente, a dose de 0,5 mg/Kg/dia foi eficiente em modificar a população de células brancas do sangue periférico, particularmente induzindo aumento no número de linfócitos circulantes. Entretanto, o MAPA poderia atuar como um modificador da resposta observada no sangue direta ou indiretamente. Por exemplo, o aumento de linfócitos poderia estar relacionado à uma linfoproliferação induzida pela droga ou à uma liberação destas células dos órgãos comprometidos na diferenciação, como, por exemplo, o timo.

## Discussão geral dos efeitos biológicos do MAPA (seções 3.3-3.5)

Os experimentos empregando o modelo clássico de 1 inoculação de células do tumor de Walker-256 (menor agressividade), mostraram um efeito antitumoral para o MAPA quando os efeitos do estresse foi minimizado, pelo uso de gaiolas coletivas, e quando doses menores da droga foram utilizadas.

A participação dos mecanismos de defesa nos efeitos antitumorais do MAPA foi avaliada nos experimentos com imunossupressão parcial dos animais. Estes experimentos sugeriram que provavelmente os eventuais efeitos benéficos da droga contra o tumor ocorrem através da estimulação do sistema imune.

Por outro lado, os resultados do experimento no qual os efeitos de diferentes doses de MAPA sobre os níveis das células do sangue foram avaliados, sugeriram que o MAPA seja o responsável direto pelas diferenças registradas. Além disso, os experimentos nos quais os animais foram submetidos ao tratamento com MAPA,  $Mg_3(PO_4)_2$  e  $NH_4MgPO_4$  sugeriram que a porção da droga que contém o  $Mg^{2+}$  seja responsável pelos efeitos observados.

Durán e colaboradores<sup>1</sup> verificaram em estudos preliminares aumento no número de linfócitos totais de 2 voluntários tratados com MAPA, além de atividade linfoproliferativa em cultura de células. Estes resultados favorecem a hipótese de que o MAPA seja o responsável direto pelas diferenças registradas nos níveis das células brancas do sangue das ratas tratadas. Associado a estas informações, Flynn e Yen<sup>77</sup> demonstraram que a mitogênese de linfócitos do baço e do timo de ratos é dependente de  $Mg^{2+}$ . Outros autores têm sugerido o papel do  $Mg^{2+}$  na regulação da proliferação celular.<sup>40, 46, 58-61, 65, 69, 70</sup> Estas informações em conjunto indicam que, provavelmente, o aumento estatisticamente significativo de linfócitos observado no tratamento com a dose mais baixa de MAPA seja devido a uma estimulação de linfoproliferação.

Estes resultados sustentam a importância de estudos futuros acerca da atividade do MAPA comparada a administração de sais de  $Mg^{2+}$ , e levanta a questão acerca do papel do MAPA nas regressões observadas para o tumor de W256 em animais tratados com doses de 0,5 e 1,0 mg/Kg/dia.

Durán e colaboradores<sup>1</sup> publicaram resultados preliminares de atividade antitumoral do MAPA *in vivo*, utilizando outros modelos experimentais. Além desses resultados, o MAPA também induziu a formação de colônias de células esplênicas e aumento significativo de IgG e IgM. Estudos preliminares sugeriram que a produção de interleucinas poderia estar aparentemente relacionada à indução de linfoproliferação após o tratamento com MAPA.<sup>36, 38, 39</sup> A importância do magnésio na regulação imune contra células tumorais parece estar relacionado principalmente à aderência pré-lítica das células imunes às células alvo.<sup>40, 77, 79-87</sup> Outros pesquisadores mostraram que a atividade antineoplásica de diferentes sais de magnésio observada *in vivo*, estaria relacionada ao papel do  $Mg^{2+}$  em aumentar a resistência do hospedeiro. Macrófagos, células citotóxicas naturais e células T citotóxicas foram estimuladas nestas condições com o propósito de reconhecer e destruir as células tumorais.<sup>40, 44, 94, 143</sup>

Apesar dos numerosos estudos utilizando o tumor de Walker-256 pouco se sabe sobre o aspecto imunológico desta neoplasia. Algumas investigações têm mostrado o desenvolvimento de certa resistência ao implante do tumor de Walker por ratos que tiveram contato imunogênico prévio.<sup>136, 154-157</sup> Contudo, as controvérsias e dificuldades na detecção da resposta imune humoral de ratos contra o tumor de Walker-256 sugerem que este não seja o principal mecanismo imunológico envolvido. Mota e Rezkallah-Iwasso<sup>154</sup> mostraram uma resposta imune celular específica discreta nos animais portadores de tumor de Walker-256 pela técnica de inibição da migração de macrófagos. Por outro lado, Steiner e Watne<sup>158</sup> que trabalharam com tumor de Walker-256 implantado no tecido subcutâneo,

descreveram resultados positivos para o teste, em 5 de 10 animais estudados.

A resposta imunológica celular inespecífica foi mostrada, por Mota e Rezkallah-Iwasso<sup>154</sup>, ser independente do tempo da evolução do tumor. Todos os animais estudados mantiveram a capacidade de resposta à fitohemaglutinina, um mitógeno inespecífico para linfócitos timo-dependentes, mesmo aqueles com tumor disseminado e em mau estado geral.

Estas observações, em conjunto, sugerem que a atividade antineoplásica da droga MAPA deve envolver um mecanismo complexo. Macrófagos, células citotóxicas naturais e células T citotóxicas devem ter sido particularmente estimuladas nas condições de nossos experimentos. Entretanto, os resultados de Durán e colaboradores<sup>1</sup> quanto aos elevados índices de IgG e IgM obtidos após a exposição ao MAPA, não descartam a possibilidade de ação da droga na resposta imune humoral.

## CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Para conciliar essas observações estabelecemos a hipótese de que a atividade do MAPA *in vivo* deve envolver o sistema imune.

Nossos resultados acerca da biodisponibilidade do composto demonstraram que a absorção da droga MAPA, quando administrada IP, ocorre rapidamente através de um mecanismo de 1ª passagem pelo fígado. A drenagem para o sistema da veia porta é conduzida através do peritônio visceral (membrana que envolve os principais órgãos abdominais), do mesentério e do omento. A veia porta, então, conduz para o fígado o sangue proveniente dos intestinos delgado e grosso, do baço, de partes do estômago, do duodeno e do pâncreas. A consequência da absorção portal é a passagem de compostos através do fígado antes de alcançar outros órgãos, inclusive o coração. Consequentemente, eles devem ser detectados primeiramente no fígado, antes de serem detectados no sangue sistêmico.

Nossos resultados demonstraram um primeiro pico de absorção para o magnésio no fígado, após 30 min da administração da droga, além do acúmulo registrado principalmente no pâncreas, baço e rins. Um segundo pico máximo de absorção para o magnésio foi detectado, após 2 h, no fígado, seguido de um segundo pico máximo de absorção detectado no plasma (após 2,5 h). Estes resultados sugeriram uma reabsorção entero-hepática do composto e/ou de seus metabólitos, após ter sido eliminado pela via biliar. O acúmulo, principalmente no pâncreas e baço, coincide com os efeitos observados *in vivo* para o composto, sugerindo participação do magnésio na atividade biológica da droga.

Embora não citotóxico, nossos resultados mostraram a indução significativa de regressão de tumor de Walker-256, confirmando a hipótese de atividade antineoplásica da droga proposta por Durán e colaboradores<sup>1</sup> em ensaios anteriores. Ademais, os estudos envolvendo depressão grave do

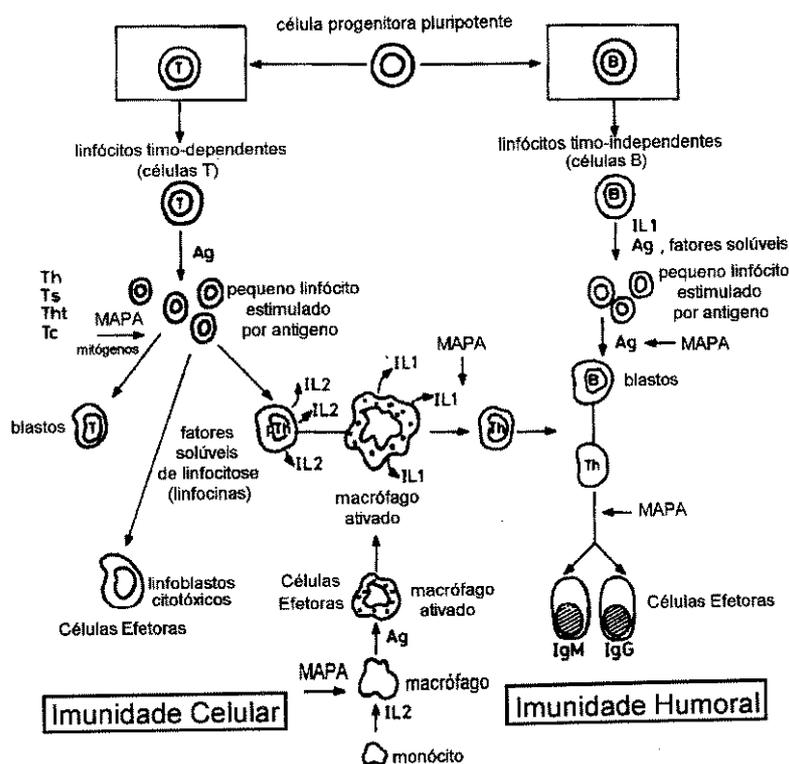
sistema imunológico sugeriram que os mecanismos de defesa do hospedeiro sejam fundamentais para a atividade do MAPA.

O mecanismo preciso pelo qual o MAPA pode ativar o sistema imunológico permanece desconhecido; entretanto, é possível considerar que os efeitos observados para o MAPA ocorram através da presença dos íons magnésio, um dos componentes majoritários do composto.

Quando diferentes sais de magnésio foram utilizados no tratamento de ratas sadias, efeitos semelhantes sobre as populações celulares foram observados. Ademais, o maior acúmulo de  $Mg^{2+}$  observado no baço, através dos estudos da biodisponibilidade do composto, favorecem a hipótese de que a atividade do MAPA seja dependente da presença deste íon. O baço é um dos principais órgãos linfóides responsáveis pela diferenciação das células de defesa que compõem o sistema imunológico e é indiscutível o fato de que o MAPA tem efeitos diretamente nos linfócitos, embora fossem observadas alterações nas células brancas do sangue em geral.

O esquema 2 resume hipoteticamente e de maneira bastante simplificada algumas possibilidades de atuação da droga MAPA no desenvolvimento e interação de células efetoras do sistema imune.

O MAPA poderia atuar como um mitógeno, estimulando a proliferação de linfócitos timo-dependentes e/ou timo independentes. Além disso, poderia participar no processo de ativação de macrófagos, bem como, nos mecanismos de cooperação entre células T helper e células B. Os macrófagos, quando ativados pelo antígeno (Ag), produzem a interleucina-1 (IL-1), que age sobre os linfócitos T (pTh), também ativados pelo Ag, induzindo-os à proliferação e secreção de interleucina-2 (IL-2). Os linfócitos T ativados pelo Ag expressam receptores para IL-2, respondendo à esta com proliferação. Os LTh reconhecem esta mesma associação antigênica nos LB e interagem com estes secretando uma série de fatores solúveis que induzem proliferação e diferenciação de LB, resultando em células terminais produtoras de anticorpos (IgG/IgM), os plasmócitos.



Esquema 2

Embora a participação do sistema imune nos eventos neoplásicos esteja pouco esclarecida<sup>159, 160</sup>, os conhecimentos acumulados em conjunto sugerem que a atividade antineoplásica da droga MAPA deve envolver um mecanismo complexo. Em animais experimentais, bem como em humanos, uma série de mecanismos protetores, classificados como imunidade natural e adquirida compreendem a defesa individual. Os resultados desta tese, associados às observações de Durán e colaboradores<sup>1</sup> acerca do comportamento da droga, além do conhecimento do papel do  $Mg^{2+}$  na função imune, reforçam a hipótese de se tratar de um composto imunomodulador, cuja porção que contém  $Mg^{2+}$  parece exercer um papel importante na resposta clínica observada.

Em suma, dentro do contexto da investigação dos mecanismos imunológicos envolvidos na resposta biológica da droga MAPA, esta tese levanta a questão sobre o papel de outros componentes da molécula na

regulação dos mecanismos de defesa e/ou na atividade do MAPA. As próprias características de obtenção da droga a partir do fungo parecem justificar se tratar de uma substância que pode exibir diferentes atividades biológicas. Uma vez que o fungo demora para produzir o composto (aproximadamente 120 h de cultura), provavelmente trata-se de um produto da fase estacionária do crescimento fúngico, não sendo essencial para o seu crescimento como aqueles produzidos na primeira fase. Contudo, ele parece exercer função semelhante a dos antibióticos que são o resultado do metabolismo secundário das bactérias, visando sua própria proteção contra contaminações.<sup>161, 162</sup>

Uma evidência direta da necessidade de estudos futuros se traduz no comportamento multidirecional observado para a droga em aumentar a resistência. O estudo em diferentes modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, certamente contribuirá para os estudos de fase clínica, como terapia alternativa no tratamento de neoplasias. Isto beneficiaria uma maior atividade e redução da toxicidade a que são submetidos os pacientes nos tratamentos atuais.

Claramente, ainda existem muitas questões a serem respondidas para melhor compreender a atividade biológica deste composto. Entretanto, nossos resultados sugerem um possível modo de ação da droga principalmente no sistema linfopoiético através das células do estroma do baço, timo e/ou linfonodos.

## BIBLIOGRAFIA

- 1- Durán, N., Souza-Brito, A. R. M., Haun, M., Nunes, O. D. S., De Oliveira, J. A., Hetem, S., Vargas, L., Saavedra, I. e Justo, G. Z., *Drugs Fut.*, 18, 327-334 (1993).
- 2- Durán, N., Haun, M., Pereira-da-Silva, L., Pisani, R., Pisani, F. J. C., Souza-Brito, A. R. M., Mazetto, M. N. e Nunes, O. D. S., *Brazil. J. Med. Biol. Res.*, 23, 1303-1313 (1990).
- 3- Strannegaard, O., *Adv. Pharmacol.*, 32, 249-287 (1995).
- 4- Dainiak, N., Worthington, M., Riordan, M. A., Kreczko, S. e Goldman, L., *Brit. J. Haemat.*, 69, 299-304 (1988).
- 5- Safrin, S., *Adv. Exp. Med. Biol.*, 394, 59-66 (1996).
- 6- Gold, D. e Corey, L., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 31 (3), 361-367 (1987).
- 7- Bean, B., *Clin. Microbiol. Rev.*, 5 (2), 146-152 (1992).
- 8- Clumeck, N., *J. Antimicrobiol. Chemother.*, 32, (suplem. A), 133-138 (1993).
- 9- Harnden, M. R., *La Recherche*, 19, (195), 31-41 (1988).
- 10- Eigen, M., *Naturwissenschaften*, 76, 341-350 (1989).
- 11- Azulay, R. D., *Arq. Bras. Med.*, 59 (4), 231-237 (1985).

12- Stretcher, B. N., Pesce, A. J., Hurtubise, P. E. e Frame, P. T., *Ther. Drug Monit.*, 14 (4), 281-285 (1992).

13- Jacobson, M. A., Abrams, D. I., Volberding, P. A., Bacchetti, P., Wilber, J., Chaisson, R. E., Crowe, S., Howard, W. e Moss, A., *J. Infec. Dis.*, 159 (6), 1029-1036 (1989).

14- Richman, D. D., Fischl, M. A., Grieco, M. H., Gottlieb, M. S., Volberding, P. A., Laskin, O. L., Leedom, J. M., Groopman, J. E., Mildvan, D., Hirsch, M. S., Jackson, G. G., Durack, D. T. e Nusinoff-Lehrman, S., *N. Engl. J. Med.*, 317 (4), 192-197 (1987).

15- Yarchoan, R. e Broder, S., *N. Engl. J. Med.*, 316 (9), 557-564 (1987).

16- Escolano, S., Mentré, F., Golmard, J. L., Diquet, B. e Mallet, A., *N. Engl. J. Med.*, 324 (14), 995 (1991).

17- Fischl, M. A. e Tsiats, A., *N. Engl. J. Med.*, 324 (14), 995-996 (1991).

18- Zhang, W.-W., Fujiwara, T., Grimm, E. A. e Roth, J. A., *Adv. Pharmacol.*, 32, 289-341 (1995).

19- Mans, D. R. A., Jung, F. A. e Scharfsmann, G., *Ciência e Cultura*, 46, 70-81 (1994).

20- Chabner, B. A. e Collins, J. M. (eds), "Cancer Chemotherapy: principles and practice", J. B. Lippincott Co., Philadelphia, 1990.

21- Wagstaff, J., *Eur. J. Cancer*, 31A (718), 1323-1325 (1995).

- 22- Wilson, C. e Kay, M. A., *Nat. Med.*, 1 (9), 887-889 (1995).
- 23- Rosenberg, B., Van Camp, L. e Krigan, T., *Nature*, 205, 698-699 (1965).
- 24- White, R. J. e Durr, F. E., *Invest. New Drugs*, 3, 85-93 (1985).
- 25- Jenks, S., *J. Natl. Cancer Inst.*, 84, 220 (1992).
- 26- Durán, N., Justo, G. Z., Esposito, E. e Nunes, I., "X Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental", (Serra Negra) 1995, pag 403.
- 27- Durán, N. e Nunes, O. D. S., *Brazil. J. Med. Biol. Res.*, 23, 1289-1302 (1990).
- 28- Nunes, O. D. S. e Durán, N., U.S. Patent 5.073.630 (1991).
- 29- Nunes, O. D. S. e Durán, N., EP 400477 (1991).
- 30- Centro de Desenvolvimento de Compostos com Atividade Biológica Patente, submetida (1996).
- 31- Prince, A. M., Pascual, D. e Vargas, L., "Report of effect of SB-73 on HIV.", New York Blood Center e Long Island Jewish Medical Center, N. Y., 1991, pag 3.
- 32- De Oliveira, J. A., Nunes, O. D. S., Nunes, I. S., Macedo, A. M., Botocin, P. R. e Durán, N., "8<sup>th</sup> Int. Conf. AIDS / 3<sup>rd</sup> STD World Cong", (Amsterdam) 1992, abst PuB7394.

- 33- Souza-Brito, A. R. M., Arcifa, S., Haun, M. e Nunes, O. D. S., "7<sup>th</sup> Int. Conf. AIDS", (Florença) 1991, abst 1238.
- 34- Hetem, S., Kanno, C. M. e Nunes, O. D. S., "8<sup>th</sup> Int. Conf. AIDS / 3<sup>rd</sup> STD World Cong.", (Amsterdam) 1992, abst PuA6072.
- 35- Hetem, S., Kanno, C. M. e Nunes, I. S., "8<sup>th</sup> Int. Conf. AIDS / 3<sup>rd</sup> STD World Cong.", (Amsterdam) 1992, abst PuA6159.
- 36- Durán, N., Nunes, O. D. S., Haun, M., Ciampi, D. B., Bellucci, S., Dawood, F., Pisani, R. Ficher, E. e Souza-Brito, A. R. M., "Int. Cong. Infect. Dis.", (Montreal) 1990, abst. D-99.
- 37- Grever, B. R., "Report Experiment ID: 9201SRO4", Nat. Cancer Inst. Develop. Therap. Prog., 1992, pag 4.
- 38- Melnikova, L. A., Novikov, D. K., Gres A. A. e Dotsenko, E. A., *Immunologiya*, 5, 57-59 (1994).
- 39- Haun, M., Ciampi, D. B., Durán, N. e Nunes, O. D. S., "Proc. VIII Bioorg. Workshop Brazil - Chile", (Talca) 1992, pag 9-12.
- 40- Galland, L., *Magnesium*, 7, 290-299 (1988).
- 41- Windhauser, M. M., Kappel, L. C. e Hegsted, M., *J. Nutr. Biochem.*, 2, 541-546 (1991).
- 42- McCoy, J. H. e Kenney, M. A., em "Handb. Met. - Ligand Interact. Biol. Fluids Bioinorg. Med.", B. Guy ed., Dekker: New York, N.Y., 1995, vol. 2, pag 871-876.

- 43- Averdunk, R., Bippus, P. H., Gunther, T. e Merker, H. J., J. Cancer Res. Clin. Oncol., 104, 63-73 (1982).
- 44- McCoy, J. H. e Kenney, M. A., em "Clinical and Experimental Nutrition", R. R. Watson ed., Marcel Dekker Inc., N.Y. and Basel, 1984, vol. 1, pag 223-247.
- 45- Kubena, K. S., Landmann, W. A. e Carpenter, Z. L., Nutr. Res., 3, 385-394 (1983).
- 46- Ryan, M.F., Ann. Clin. Biochem., 28 (parte1), 19-26 (1991).
- 47- Vernon, W. B., Magnesium, 7, 234-248 (1988).
- 48- Kulaev, I. S. e Okorokov, L. A., Biokhimiya, 32, 695-704 (1967).
- 49- Cowan, J. A. (ed.), "Biological Chemistry of Magnesium", VCH: New York, N.Y., 1995.
- 50- Okorokov, L. A., Lichko, L. P. e Kulaev, I. S., J. Bacteriol., 144, 661-665 (1980).
- 51- Cramer, C. L. e Davis, R. H., J. Biol. Chem., 259, 5152-5157 (1984).
- 52- Szelenyi, I., Drugs Today, 27 (4), 275-283 (1991).
- 53- Altura, B. M. e Altura, B. T., Cell. Mol. Biol. Res., 41 (5), 347-359 (1996).
- 54- Lareau, S., Boyle, A. J., Stewart, L. C., Deslauriers, R., Hendry, P., Keon, W. J. e Labow, R. S., Magnesium Res., 8, (1), 85-97 (1995).

- 55- Hardwick, L. L., Jones, M. R., Brautbar, W. e Lee, D. B. N., *J. Nutr.*, 121, 13-23 (1991).
- 56- Zofkova, I. e Kanvheva, R. L., *Magnesium Res.*, 8 (1), 77-84 (1995).
- 57- Moraria, V. V., Simplaceanu, T. e Neamtu, S., *Rom. J. Biophys.*, 4 (2), 73-78 (1994).
- 58- González-Revaldería, J., Garcia-Bermejo, S., Menchén-Herreros, A. e Fernandez-Rodriguez, E., *Clin. Chem.*, 36, 2140-2141 (1990).
- 59- Walker, G. M., *Magnesium*, 5, 9-23 (1986).
- 60- Amyard, N., Leyris, A., Monier, C., Frances, H., Boulu, R. G. e Henrotte, J. G., *Magnesium Res.*, 8 (1), 5-9 (1995).
- 61- NG, L. L., Davies, J. E. e Ameen, M., *Metabolism*, 41 (4), 772-777 (1992).
- 62- Yiangou, M. e Hadjipetrou-Kourounakis, L., *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 89, 217-221 (1989).
- 63- NG, L. L., Davies, J. E. e Garrido, M. C., *Clin. Science*, 80, 539-547 (1991).
- 64- Cittadini, A. e Scarpa, A., *Acta Med. Rom.*, 22, 389-399 (1984).
- 65- Guenther, T., Schuemann, K. e Vormann, J., *Magnesium Bull.*, 17 (4), 109-114 (1995).

- 66- Kubena, K. S., Cohill, D. T. e McMurray, D. N., *Am. Nutr. Metab.*, 33, 7-14 (1989).
- 67- Zeromski, J., Jezewska, E. e Kasprzak, K. S., *Toxicology*, 97, 39-42 (1995).
- 68- Campbell, S., Kim, H., Donkas, M. e Haley, B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1243-1246 (1990).
- 69- Searles, G. E., Dixon, W. T., Thomas, P. D. e Jimbow, K., *J. Invest. Dermatol.*, 105 (2), 301-308 (1995).
- 70- Von Mandach, U., Burgi, M. e Huch, R., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 35 (3), 324-330 (1993).
- 71- YingYang, X., Hosseini, J. M., Ruddel, M. E. e Elin, R. J., *Magnesium*, 8, 100-105 (1989).
- 72- Averdunk, R. e Gunther, T., *Magnesium Bull.*, 1, 11-15 (1985).
- 73- Elin, R. J., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 148, 620-624 (1975).
- 74- McEwen, L. M., Nicholson, M., Kitchen, I. e White, S., *Ann. Allergy*, 31, 543-550 (1973).
- 75- Rolink, A. e Melchers, F., *Adv. Immunol.*, 53, 123-156 (1993).
- 76- Klein, J. (ed.), "Immunology", Blackwell Scientific Pub., Boston, 1991.
- 77- Flynn, A. e Yen, B. R., *J. Nutr.*, 111, 907-913 (1981).

- 78- Gately, M. K. e Martz, E., *J. Immunol.*, 122, 482-489 (1979).
- 79- Galili, U., Galili, N., Vanky, F. e Klein, E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 2396-2400 (1978).
- 80- Berke, G. e Amos, D. B., *Transplant. Rev.*, 17, 71-107 (1973).
- 81- Golstein, P. e Smith, E. T., *Eur. J. Immunol.*, 6, 31-37 (1976).
- 82- Golstein, P. e Gomperts, B. D., *J. Immunol.*, 114, 1264-1268 (1975).
- 83- Huwylar, T., Hert, A., Felix, D. e Morell, A., *Eur. J. Immunopharmacol.*, 7, 573-576 (1985).
- 84- Lichenstein, A., *Blood*, 67, 657-665 (1986).
- 85- Williams, A. J. e Cole, P. J., *Immunology*, 44, 847-858 (1981).
- 86- Lima, A.O., Javierre, M. Q., Da Silva, W. D. e Massuda, H. K., *Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.*, 6, 387-392 (1973).
- 87- Fearon, D. T., Austen, K. F., *New Engl. J. Med.*, 303, 259-262 (1980).
- 88- Walia, A. S., Shaw, D. R. e Fuson, E. W., *J. Exp. Med.*, 151, 1528-1533 (1980).
- 89- Patarryo, M. e Jondal, M., *Immunology*, 170, 305-319 (1985).
- 90- Badenoch-Jones, P., Rouveix, B. e Turk, J. L., *Immunology*, 37, 361-366 (1979).

- 91- King, P. P., Batchelor, A. H., Lawlor, P. e Katz, D. R., Eur. J. Immunol., 20, 363-368 (1990).
- 92- Witkowsky, J., Immunology, 55, 339-345 (1985).
- 93- James, K., Am. J. Med. Tech., 48, 735-742 (1982).
- 94- Stankiewicz, M., Migdalska, A., Bankowska, E. e Jeska, E. L., Magnesium, 8, 87-93 (1989).
- 95- Stevens, P., Young, L. S. e Adamu, S., Immunology, 50, 497-502 (1983).
- 96- Grewal, A. S. e Babiuk, L. A., Immunology, 40, 151-161 (1980).
- 97- Korner, M., Bellon, A. H., Brini, A. T. e Farrar, W. L., Biochem. J., 265, 547-554 (1990).
- 98- Askenase, P. W., Schwartz, A., Siegal, J. N. e Gershon, R. K., Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 66 (supl. 1), 225-233 (1981).
- 99- Elisaf, M. e Siamopoulos, K. C., Magnesium Bull., 17 (2), 70-73 (1995).
- 100- Fantidis, P., Cacho, J. R., Marin, M., Jarabo, R. M., Solera, J. e Herrero, E., J. R. Soc. Med., 88 (8), 441-445 (1995).
- 101- Tepel, M., Schlotmann, R., Teupe, C. e Zidek, W., Biol. Chem., 375, 349-351 (1994).
- 102- Gehring, P. J. e Blau, G. E., J. Environ. Pathol. Toxicol., 1, 163-179 (1977).

- 103- Ramsey, J. C. e Gehring, P. J., Fed. Proc., 39, 60-65 (1980).
- 104- Benet, L. Z., Massoud, N. e Gambertoglio, J. G. (eds.), "Pharmacokinetic Basis for Drug Treatment", Raven Press, N. Y., 2ª edição, 1985.
- 105- Casarett, L. J. e Doull, J., "Toxicology, The Basic Science of Poisons", C. D. Klaassen, M. O. Amdur e J. Doull eds., MacMillan Pub. Co., N.Y., 3ª edição, 1986.
- 106- Kaufmann, B., Meth. Find. Exptl. Pharmacol., 10, 615-618 (1986).
- 107- Lukas, G., Brindle, S. D. e Greengard, P., J. Pharmacol. Exp. Ther., 178, 562-566 (1971).
- 108- Graves, D. A., Locke, C. S., Muir, K. T. e Miller, R. P., Pharm. Biopharm., 17, 571-592 (1989).
- 109- Leferink, J. G., Van den Berg, W., Wagemaker-Engels, I., Kreukniet, J. e Maes, R. A. A., Drug Res., 32, 159-164 (1982).
- 110- Kenney, M. A., Nutr. Rep. Intern., 23, 1073-1076 (1981).
- 111- Reichrtová, E., Acta Biol. Hung., 37 (1), 7-12 (1986).
- 112- Davenport, G. M., Boling, J. A. e Gay, N., J. Anim. Sci., 68, 3765-3772 (1990).
- 113- Geven, W. B., Vogels-Mentink, G. M., Willems, J. L., De Boo, T. H., Lemmens, W. e Monnens, L. A. H., Magnesium Bull., 10, 45-50 (1988).

- 114- Gallacher, R. E., Browning, M. C. K., Fraser, C. G., Wilkinson, S. P. e MacLennan, W. J., Clin. Chem., 33 (8), 1326-1330 (1987).
- 115- Blum, M. R., Liao, S. H. T., Good, S. S. e Miranda, P., Am. J. Med., 85 (supl. 2A), 189-194 (1988).
- 116- Niedworok, E., Acta Pharm. Jugosl., 40, 501-506 (1990).
- 117- Stretcher, B. N., Pesce, A. J., Hurtubise, P. E. e Frame, P. T., Ther. Drug Monit., 14, 281-285 (1992).
- 118- Earle, W. R., Am. J. Cancer, 24, 566-612 (1935).
- 119- Agostino, D. e Clifton, E. E., Experimentia, 24, 166-167 (1968).
- 120- Iwama-Mattos, M. C. F., Montenegro, M. R. e Vieira e Silva, C. R., Ciência e Cultura, 32 (7), 849-856 (1980).
- 121- Pereira, O. C. M. e Gustale, H. A., Rev. Ciênc. Bioméd., 13, 63-68 (1992).
- 122- Simpkins, H., Lehman, J. M., Mazurkiewicz, J. E. e Davis, B. H., Cancer Res., 51, 1334-1338 (1991).
- 123- Iwama-Mattos, M. C. F., Franco, M. F. e Lemonica, L., Ciência e Cultura, 23 (3), 267-271 (1971).
- 124- Rettori, O., Vieira-Matos, A. N. e Tahin, Q. S., Tumori, 81, 370-377 (1995).

- 125- Eastern Cooperative Oncology Group, *Am. J. Med.*, 69, 491-497 (1980).
- 126- Guaitani, A., Recchia, M., Carli, M., Rocchetti, M., Bartosek, I. e Garattini, S., *Oncology*, 39, 173-178 (1982).
- 127- Sandstrom, R., Gelin, J. e Lundholm, K., *Eur. J. Cancer*, 26, 811-814 (1990).
- 128- Iwama-Mattos, M. C. F., *Rev. Bras. Pesq. Méd. e Biol.*, 12 (2-3), 147-153 (1979).
- 129- Guaitani, A., Torre, P. D., Morasca, L., Pintus, C. e Bartosek, I., *Tumori*, 69, 1-9 (1983).
- 130- Garattini, S., Bizzi, A., Donelli, M. G., Guaitani, A., Samanin, R. e Spreatico, F., *Cancer Treat. Rev.*, 7, 115-140 (1980).
- 131- Iwama-Mattos, M. C. F., Franco, M. F. e Basso, N. A., *Ciência e Cultura*, 26 (2), 175-179 (1974).
- 132- Morrison, S. D., *J. Nat. Cancer Inst.*, 46 (4), 825-830 (1971).
- 133- Murayama-Oda, K., Imamura, K., Kim, H. e Tanaka, T., *Jpn. J. Cancer Res.*, 82, 98-108 (1991).
- 134- Tayek, J. A. e Brasel, J. A., *Cancer Res.*, 48, 4567-4572 (1988).
- 135- Toal, J. N., Millar, F. K., Brooks, R. H. e White, J., *Am. J. Physiol.*, 200, 175-181 (1961).

- 136- Guimarães, F., Costa, P. M., Cavalcanti, T. C. e Zollner, R. L., "X Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental", (Serra Negra) 1995, pag 414.
- 137- Rettori, O., Vieira-Matos, A. N. e Gontijo, J. A. R., APPTLA, 46, 111-118 (1996).
- 138- Watson, J. V., Br. Med. Bull., 47 (1), 47-63 (1991).
- 139- Tannock, I. F., em "The Basic Science of Oncology", I. F. Tannock e R. P. Hill eds., Mac Graw Hill Inc., Toronto, 2<sup>a</sup> edição, 1992, pag 154-177.
- 140- Altura, B. M., Altura, B. T., Gebrewold, A., Ising, H. e Gunter, T., Science, 223, 1315-1317 (1984).
- 141- Classen, H. G., Magnesium Bull., 3-1a, 148-154 (1981).
- 142- Zunkley, H., Losse, H., Spieker, C. e Zidek, W., Magnesium, 6, 12-17 (1987).
- 143- Valletta, G., PCT Int. Appl. WO95 31, 991 (1995).
- 144- Flynn, A., Nutr. Res., 5, 487-495 (1985).
- 145- Kashiwa, H. K. e Hungerford, G. F., P. S. E. B. M., 99, 441-443 (1958).
- 146- Modiano, J. F., Kelepouris, E., Kern, J. A. e Nowell, P. C., J. Cell Physiol., 135, 451-458 (1988).
- 147- Hepler, P. K., J. Cell Biol., 109, 2567-2573 (1989).

- 148- Gelfand, G. W., Cheung, R. K. e Grinstein, S., *J. Immunol.*, 140, 246-252 (1988).
- 149- Goyns, M. H., *Drugs Fut.*, 20 (6), 601-608 (1995).
- 150- Shavit, Y., Terman, G. W., Martin, F. C., Lewis, J. W., Liebeskind, J. C. e Gale, R. P., *J. Immunol.*, 135 (2), 834-837 (1985).
- 151- Lundholm, K., Gelin, J., Hyltander, A., Lonroth, C., Sandstrom, R. e Svaninger, G., *Cancer Res.*, 54, 5602-5606 (1994).
- 152- Tessitore, L., Costelli, P. e Baccino, F. M., *Br. J. Cancer*, 67, 15-23 (1993).
- 153- Kumara-Siri, M. H., Lee, K. e Surks, M. I., *Endocrinology*, 109 (5), 1760-1767 (1981).
- 154- Mota, N. G. S. e Rezkallah-Iwasso, M. T., *Rev. Ciênc. Bioméd.*, 2, 55-60 (1981).
- 155- Dinh, B. L. e Brassard, A., *Br. J. Exp. Pathol.*, 49, 145-151 (1968).
- 156- Meyers, R. L., *Immunochemistry*, 12, 589-595 (1975).
- 157- Buinauskas, P., Brown, E. R. e Cole, W. H., *Surgery*, 60 (4), 902-907 (1966).
- 158- Steiner, T. e Watne, A. L., *Cancer Res.*, 30, 2265-2270 (1970).
- 159- Yamaguchi, N. H. e Inocêncio, C. G., *Vitrô*, 1 (2), 68-72 (1993).

160- Benítez, S., *Cancerologia*, nº 5, 30-33 (1995).

161- Brock, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M. e Parker, J., "Biology of Microorganisms", Prentice-Hall International, Inc., N.J., 7ª edição, 1994.

162- Nester, E. W., Roberts, C. E. e Nester, M. T., "Microbiology, a human, perspective", E. M. Sievers ed., Wm. C. Brown Publishers, Dubuque, 1995.

## APÊNDICE 1

Tabela 1: Média da concentração plasmática de  $Mg^{2+}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) de ratos, após o tratamento com dose única de 750 mg/Kg de MAPA IP, em função do tempo de exposição à droga

TEMPO	$[Mg^{2+}] \pm \sigma^{n-1}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
após 30 min	$61,7 \pm 1,78$
após 1,0 h	$66,5 \pm 0,58$
após 1,5 h	$60,9 \pm 3,15$
após 2,0 h	$63,7 \pm 0,35$
após 2,5 h	$72,4 \pm 0,81$
após 3,0 h	$65,3 \pm 2,19$
após 4,0 h	$54,4 \pm 2,79$
após 8,0 h	$26,8 \pm 0,44$
após 12 h	$33,0 \pm 2,68$
após 24 h	$32,5 \pm 3,83$
após 48 h	$26,9 \pm 2,78$
após 96 h	$26,0 \pm 2,38$

Os valores correspondem à média de 6 animais por tempo de exposição à droga  $\pm$  desvio padrão da média. O valor médio para os animais controle foi de  $23,0 \pm 1,14$   $\mu\text{g/mL}$ . Os animais controle receberam dose única de tampão PBS-A, pH 7,2, IP, na mesma razão dose-volume de 10 mL/Kg administrada aos animais tratados com MAPA e o sangue foi coletado após 48 h da administração do placebo.

Tabela 2: Média da concentração de  $Mg^{2+}$  ( $\mu\text{g/g}$  órgão/100g peso animal) no fígado, pâncreas, estômago e baço de ratos, após o tratamento com dose única de 750 mg/Kg de MAPA IP, em função do tempo de exposição à droga

TEMPO	$[Mg^{2+}] \pm \sigma^{n-1}$ ( $\mu\text{g/g}$ órgão/100 g peso animal)			
	fígado	pâncreas	estômago	baço
após 30 min	80,7 $\pm$ 10,5	129,5 $\pm$ 9,2	47,3 $\pm$ 8,1	98,5 $\pm$ 10,9
após 1,0 h	73,1 $\pm$ 9,1	198,7 $\pm$ 19,0	58,2 $\pm$ 13,8	136,9 $\pm$ 12,9
após 1,5 h	125,0 $\pm$ 12,4	109,4 $\pm$ 20,0	56,8 $\pm$ 7,8	122,3 $\pm$ 13,9
após 2,0 h	154,5 $\pm$ 10,8	117,9 $\pm$ 15,9	63,2 $\pm$ 9,0	100,0 $\pm$ 10,5
após 2,5 h	116,6 $\pm$ 7,1	150,4 $\pm$ 13,1	56,4 $\pm$ 10,0	91,1 $\pm$ 11,0
após 3,0 h	76,71 $\pm$ 4,4	166,3 $\pm$ 13,2	49,7 $\pm$ 8,1	80,1 $\pm$ 13,5
após 4,0 h	91,9 $\pm$ 7,3	156,3 $\pm$ 14,3	39,4 $\pm$ 6,8	65,7 $\pm$ 11,0
após 8,0 h	70,4 $\pm$ 5,4	67,2 $\pm$ 6,1	42,9 $\pm$ 5,4	71,1 $\pm$ 8,8
após 12 h	76,3 $\pm$ 12,5	59,8 $\pm$ 9,0	34,6 $\pm$ 4,0	72,8 $\pm$ 11,2
após 24 h	84,5 $\pm$ 17,5	61,4 $\pm$ 12,1	35,3 $\pm$ 6,1	80,5 $\pm$ 18,8
após 48 h	56,9 $\pm$ 10,6	45,2 $\pm$ 11,1	40,9 $\pm$ 6,4	73,8 $\pm$ 16,6
após 96 h	71,4 $\pm$ 14,7	37,0 $\pm$ 11,7	36,3 $\pm$ 6,5	47,8 $\pm$ 11,0
CTRL após 48 h	56,6 $\pm$ 6,1	48,5 $\pm$ 10,0	45,3 $\pm$ 12,7	72,4 $\pm$ 12,6

Os valores correspondem à média de 6 animais por tempo de exposição à droga  $\pm$  desvio padrão da média. Os animais controle (CTRL) receberam dose única de tampão PBS-A, pH 7,2, IP, na mesma razão dose-volume de 10 mL/Kg administrada aos animais tratados com MAPA e o sangue foi coletado após 48 h da administração do placebo.

Tabela 3: Média da concentração de  $Mg^{2+}$  ( $\mu\text{g/g}$  órgão/100g peso animal) nos pulmões, coração, vesícula seminal e rins de ratos, após o tratamento com dose única de 750 mg/Kg de MAPA IP, em função do tempo de exposição à droga

TEMPO	$[Mg^{2+}] \pm \sigma^{n-1}$ ( $\mu\text{g/g}$ órgão/100 g peso animal)			
	pulmões	coração	vesícula seminal	rins
após 30 min	$43,9 \pm 7,5$	$68,3 \pm 14,2$	$31,3 \pm 9,6$	$74,6 \pm 13,4$
após 1,0 h	$49,4 \pm 14,2$	$60,6 \pm 10,4$	$35,3 \pm 9,1$	$94,0 \pm 11,4$
após 1,5 h	$39,9 \pm 7,8$	$47,2 \pm 6,8$	$36,2 \pm 8,0$	$67,0 \pm 10,0$
após 2,0 h	$48,7 \pm 11,4$	$61,2 \pm 12,2$	$50,8 \pm 10,1$	$95,0 \pm 13,2$
após 2,5 h	$56,1 \pm 12,0$	$59,9 \pm 12,0$	$41,3 \pm 6,0$	$97,8 \pm 10,1$
após 3,0 h	$61,2 \pm 10,4$	$43,6 \pm 7,4$	$33,1 \pm 9,9$	$69,0 \pm 10,9$
após 4,0 h	$44,3 \pm 9,5$	$56,1 \pm 12,8$	$29,3 \pm 7,6$	$67,0 \pm 8,9$
após 8,0 h	$45,6 \pm 5,4$	$60,8 \pm 9,1$	$25,5 \pm 3,7$	$51,7 \pm 7,6$
após 12 h	$51,1 \pm 15,2$	$51,9 \pm 9,3$	$24,5 \pm 3,9$	$55,6 \pm 8,5$
após 24 h	$47,8 \pm 10,5$	$51,4 \pm 8,4$	$34,2 \pm 6,3$	$56,6 \pm 9,0$
após 48 h	$43,8 \pm 7,6$	$52,9 \pm 15,8$	$46,5 \pm 21,5$	$58,5 \pm 9,4$
após 96 h	$52,7 \pm 10,5$	$70,7 \pm 13,7$	$55,2 \pm 11,3$	$47,7 \pm 8,8$
CTRL após 48 h	$49,0 \pm 13,7$	$56,8 \pm 14,7$	$26,1 \pm 7,5$	$51,7 \pm 10,1$

Os valores correspondem à média de 6 animais por tempo de exposição à droga  $\pm$  desvio padrão da média. Os animais controle (CTRL) receberam dose única de tampão PBS-A, pH 7,2, IP, na mesma razão dose-volume de 10 mL/Kg administrada aos animais tratados com MAPA e o sangue foi coletado após 48 h da administração do placebo.

Tabela 4: Média da concentração plasmática de  $Mg^{2+}$  ( $\mu g/mL$ ) de ratos, após o tratamento com doses únicas de 375, 750 e 1500mg/Kg de MAPA IP, em função do tempo de exposição à droga

TEMPO	$[Mg^{2+}] \pm \sigma^{n-1}$ ( $\mu g/mL$ )		
	375 mg/Kg/dia	750 mg/Kg/dia	1500 mg/Kg/dia
após 30 min	60,2 $\pm$ 2,47	71,5 $\pm$ 8,49	93,5 $\pm$ 2,83
após 1 h	53,8 $\pm$ 2,47	71,3 $\pm$ 1,03	87,8 $\pm$ 14,50
após 2 h	55,8 $\pm$ 1,77	78,5 $\pm$ 7,78	94,8 $\pm$ 18,00
após 4 h	43,5 $\pm$ 0,75	52,6 $\pm$ 5,09	79,5 $\pm$ 9,19
após 8 h	40,8 $\pm$ 1,77	45,8 $\pm$ 1,77	58,8 $\pm$ 9,54
após 12 h	48,5 $\pm$ 10,6	45,8 $\pm$ 4,60	49,5 $\pm$ 7,78
após 24 h	38,5 $\pm$ 2,83	38,0 $\pm$ 5,66	48,5 $\pm$ 4,95
após 36 h	36,5 $\pm$ 1,41	35,2 $\pm$ 1,77	40,0 $\pm$ 0,71
após 48 h	37,0 $\pm$ 4,24	42,2 $\pm$ 1,77	43,7 $\pm$ 3,89
após 72 h	42,2 $\pm$ 1,77	36,2 $\pm$ 3,89	33,8 $\pm$ 3,89

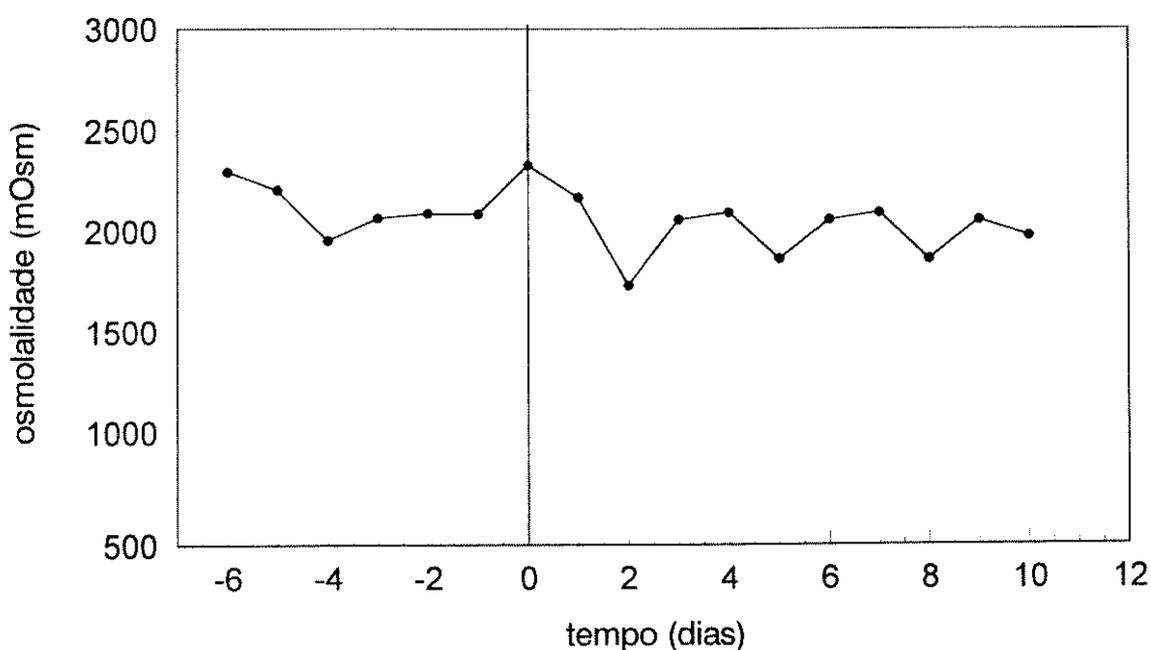
Os valores correspondem à média de 2 animais por tempo de exposição à droga  $\pm$  desvio padrão da média. O valor médio para os animais controle foi de 35,3  $\pm$  2,94  $\mu g/mL$ . Os animais controle receberam dose única de tampão PBS-A, pH 7,2, IP, na mesma razão dose-volume de 10 mL/Kg administrada aos animais tratados com MAPA e o sangue foi coletado após 30 min e 48 h da administração do placebo.

## APÊNDICE 2

# GRUPO 1

PLACEBO - 2I

A



# GRUPO 2

MAPA - 2I

B

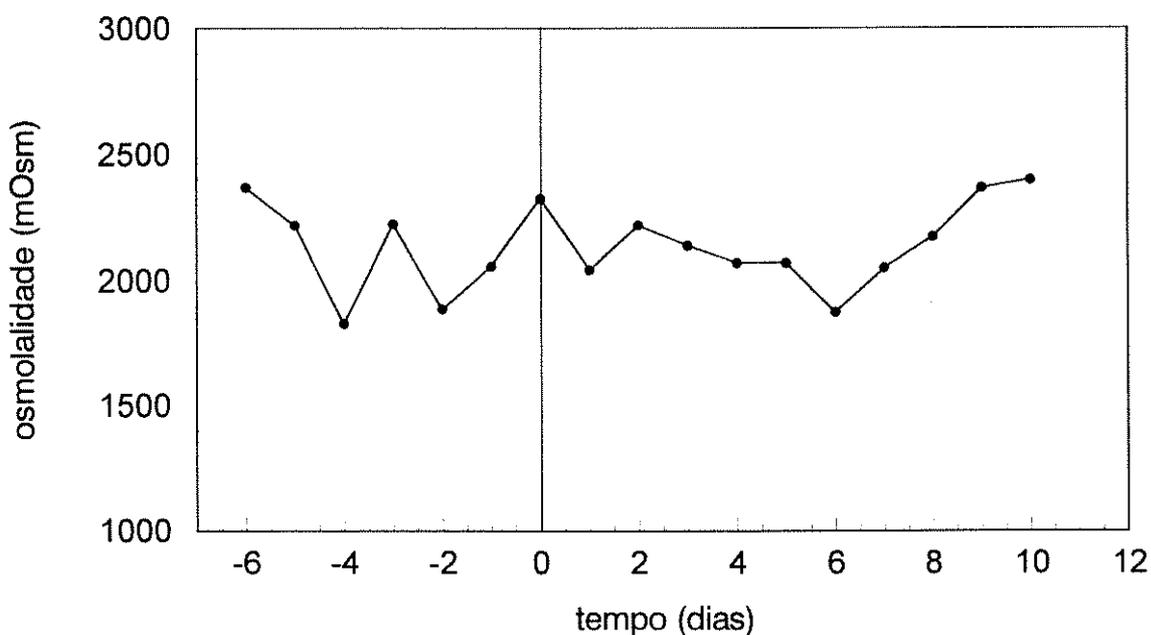
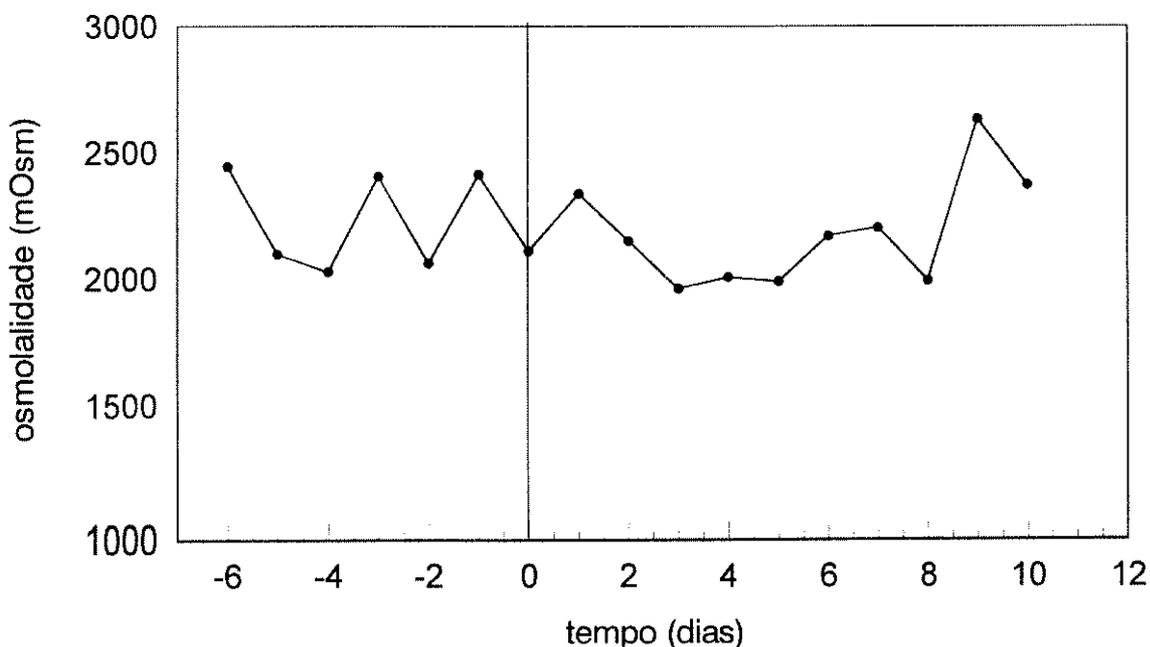


Figura 1: Variação na osmolalidade (mOsm) de ratos inoculadas em 2 sítios simultâneos SC com células de Walker-256, linhagem A. **A:** Ratos placebo (solução Ringer-lactato estéril administrada SC na mesma razão dose-volume dos animais tratados). **B:** Ratos tratadas com doses diárias de 1,0 mg/Kg de MAPA SC. O dia 0 corresponde ao dia da inoculação das células tumorais.

# GRUPO 3

## A

### PLACEBO - 4I



# GRUPO 4

## B

### MAPA - 4I

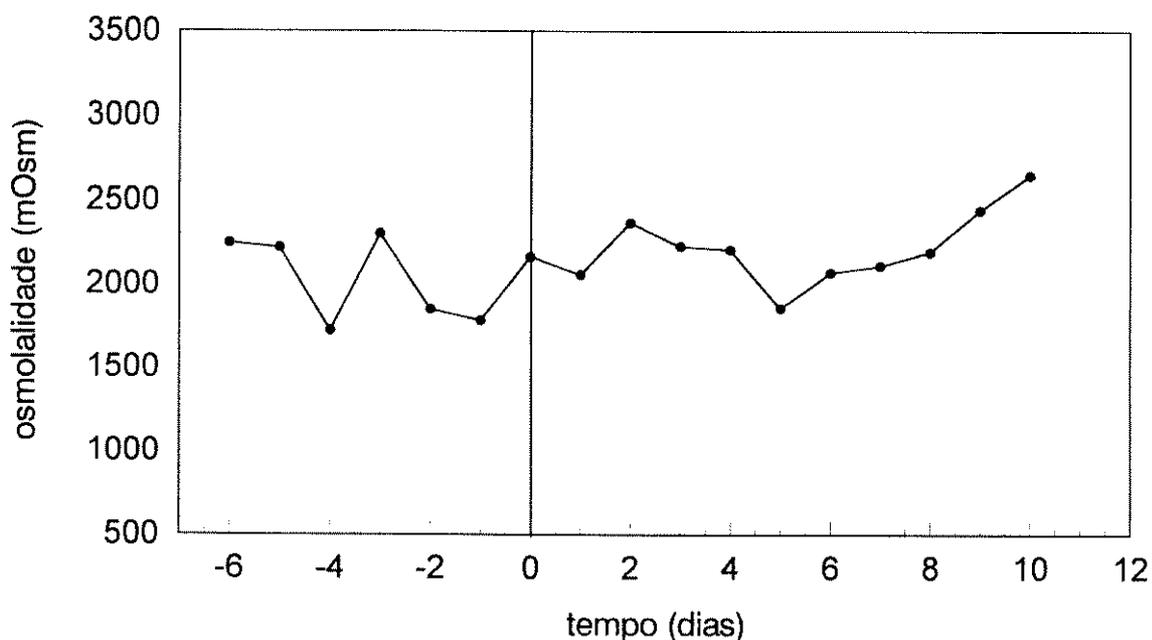


Figura 2: Variação na osmolalidade (mOsm) de ratas inoculadas em 4 sítios simultâneos SC com células de Walker-256, linhagem A. **A:** Ratas placebo (solução Ringer-lactato estéril administrada SC na mesma razão dose-volume dos animais tratados). **B:** Ratas tratadas com doses diárias de 1,0 mg/Kg de MAPA SC. O dia 0 corresponde ao dia da inoculação das células tumorais.

# GRUPO 1

## PLACEBO - 8I

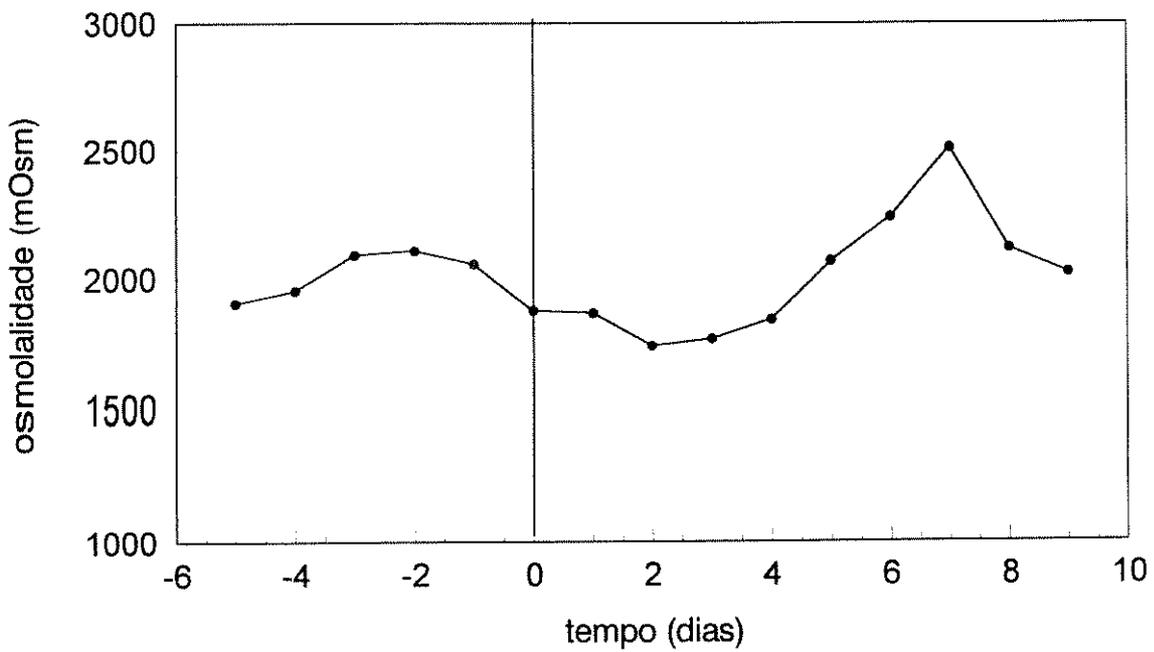
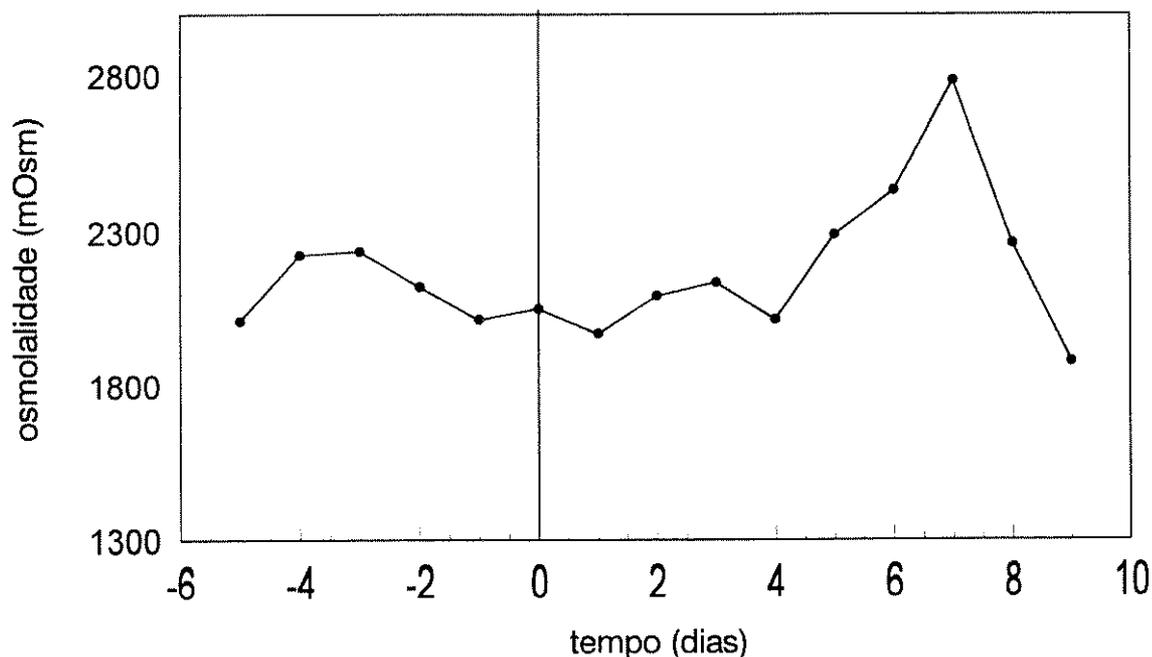


Figura 3: Variação na osmolalidade (mOsm) de ratas placebo inoculadas em 8 sítios simultâneos SC com células de Walker-256, linhagem A. Os animais receberam solução Ringer-lactato estéril, administrada SC, na mesma razão dose-volume dos animais tratados. O dia 0 corresponde ao dia da inoculação das células tumorais.

# GRUPO 2

**A** MAPA (10 mg/Kg/dia) - 8l



# GRUPO 3

**B** MAPA (100 mg/Kg/dia) - 8l

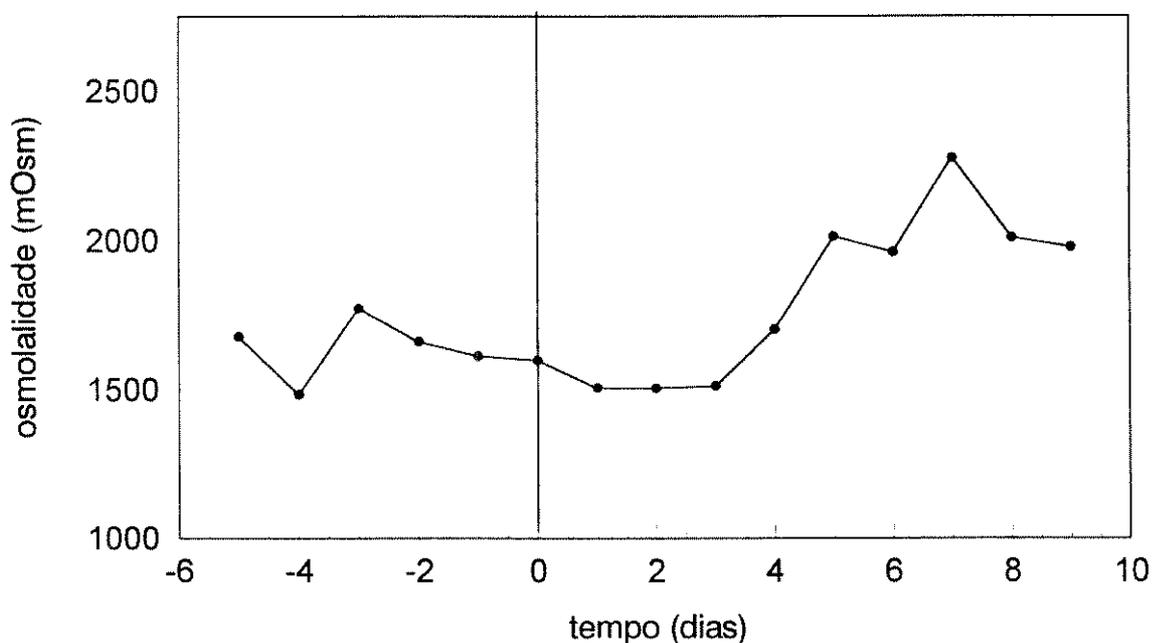


Figura 4: Variação na osmolalidade (mOsm) de ratas inoculadas em 8 sítios simultâneos SC com células de Walker-256, linhagem A. **A:** Ratas tratadas com doses diárias de 10 mg/Kg de MAPA SC. **B:** Ratas tratadas com doses diárias de 100 mg/Kg de MAPA SC. O dia 0 corresponde ao dia da inoculação das células tumorais.

### APÊNDICE 3

Tabela 1: Variação no peso (g) de ratas placebo e ratas tratadas com 0,5 e 1,0 mg/Kg/dia de MAPA SC, após a inoculação de células tumorais de W256 linhagem A, em 1 sítio de inoculação SC, na região dorso-lombar, em função do tempo (dias)

rata	Tempo (dias)													
	0	1	2	3	4	5	7	9	11	13	15	17	19	21
1	200	200	205	206	202	208	210	210	213	225	226	236	236	M
2	250	249	252	254	248	250	261	256	260	266	268	274	276	276
3	188	187	192	190	190	188	196	196	200	208	206	212	208	208
4	232	231	232	234	232	234	236	242	244	256	254	265	268	262
5	210	208	203	206	210	212	218	217	226	240	236	248	244	234
6	182	182	188	186	186	186	193	190	202	212	215	M		
7	190	193	192	196	198	194	200	202	210	214	213	230	230	212
8	204	202	212	220	216	214	224	220	232	232	232	238	252	250
9	244	246	258	258	252	256	256	258	268	272	268	278	286	286
10	198	197	200	202	200	202	201	206	210	208	214	202	201	206
11	174	180	182	178	180	182	187	184	190	192	190	190	194	188
12	234	234	238	240	244	247	253	248	260	266	270	279	282	286
13	229	228	231	238	236	235	244	238	250	252	232	246	256	252
14	197	202	204	203	216	208	208	214	219	223	206	223	228	222
15	198	201	209	206	202	204	212	214	216	220	200	232	232	224
16	206	218	228	228	220	224	224	228	238	241	232	256	276	270
17	228	230	235	237	236	240	232	244	250	255	254	258	260	250
18	246	240	252	258	248	252	256	254	265	266	272	264	270	272
19	198	200	206	207	212	204	220	212	223	232	237	232	235	240
20	216	218	225	226	224	226	228	226	242	250	266	238	M	
21	206	204	208	220	212	216	218	218	228	236	228	218	206	M
22	207	209	210	210	208	210	210	214	212	222	232	224	218	M
23	204	200	207	212	206	210	210	219	224	236	238	228	M	
24	232	231	230	230	234	234	234	235	240	248	246	246	240	250

Ratas placebo-ctrl (1-8), ratas tratadas com 0,5 mg/Kg/dia de MAPA SC (9-16) e ratas tratadas com 1,0 mg/kg/dia de MAPA SC (17-24). O dia "0" corresponde ao dia da inoculação das células tumorais ( $4 \times 10^6$  células/sítio). Os animais placebo receberam solução Ringer-lactato SC, na mesma razão dose-volume administrada aos animais tratados. Nos animais 21-23 cresceram dois tumores.

(a) M = morte.

Tabela 2: Continuação da tabela 1: Variação no peso (g) de ratas placebo e ratas tratadas com 0,5 e 1,0 mg/Kg/dia de MAPA SC, após a inoculação de células tumorais de W256 linhagem A, em 1 sítio de inoculação SC, na região dorso-lombar, em função do tempo (dias)

rata	Tempo (dias)							
	23	25	27	29	31	33	35	37
1	M							
2	262	254	242	M				
3	208	206	198	198	202	204	206	206
4	258	260	270	274	292	295	M	
5	M							
6	M							
7	222	212	M					
8	254	264	268	266	268	M		
9	300	303	310	288	M			
10	244	M						
11	190	194	194	196	202	200	202	200
12	300	302	302	268	272	M		
13	256	255	256	252	255	260	266	266
14	232	228	232	228	234	236	236	236
15	232	228	236	228	238	238	238	240
16	258	234	M					
17	256	258	258	250	248	250	247	248
18	272	270	276	277	276	264	270	M
19	238	232	226	232	234	226	228	228
20	M							
21	M							
22	M							
23	M							
24	248	252	244	244	243	244	246	247

Ratas placebo-ctrl (1-8), ratas tratadas com 0,5 mg/Kg/dia de MAPA SC (9-16) e ratas tratadas com 1,0 mg/kg/dia de MAPA SC (17-24). O dia "0" corresponde ao dia da inoculação das células tumorais ( $4 \times 10^6$  células/sítio). Os animais placebo receberam solução Ringer-lactato SC, na mesma razão dose-volume administrada aos animais tratados. Nos animais 21-23 cresceram dois tumores.

(a) M = morte.

Tabela 3: Variação no peso (g) de ratas placebo e ratas tratadas com 1,5 mg/Kg/dia de MAPA SC, após a inoculação de células tumorais de W256 linhagem A, em 1 sítio de inoculação SC, na região dorso-lombar, em função do tempo (dias)

rata	Tempo (dias)								
	0	1	3	5	7	9	11	13	15
1	193	196	194	204	206	204	204	212	218
2	191	192	194	204	206	214	221	M	
3	173	176	174	182	185	186	194	202	207
4	176	176	174	184	190	190	192	197	200
5	183	188	186	188	202	200	214	230	234
6	196	197	194	206	211	218	220	196	M
7	182	181	178	183	187	188	192	206	202
8	194	191	196	202	210	212	215	212	M
9	191	188	194	200	200	213	218	212	202
10	202	204	206	210	215	215	228	235	244
11	224	220	226	228	232	232	241	252	250
12	194	200	198	204	202	207	210	214	214
13	165	168	172	176	179	180	190	182	166
14	182	180	180	190	188	192	196	200	M
15	207	202	215	220	223	220	228	230	242
16	164	164	168	170	180	180	184	190	196

Ratas placebo-ctrl (1-8) e ratas tratadas com 1,5 mg/Kg/dia de MAPA SC (9-16). O dia "0" corresponde ao dia da inoculação das células tumorais ( $4 \times 10^6$  células/sítio). Os animais placebo receberam solução Ringer-lactato SC, na mesma razão dose-volume administrada aos animais tratados.

(a) M = morte.

Tabela 4: Continuação da tabela 3: Variação no peso (g) de ratas placebo e ratas tratadas com 1,5 mg/Kg/dia de MAPA SC, após a inoculação de células tumorais de W256 linhagem A, em 1 sítio de inoculação SC, na região dorso-lombar, em função do tempo (dias)

rata	Tempo (dias)								
	17	19	21	23	25	27	29	31	33
1	231	212	M						
2	-----								
3	207	218	226	216	220	218	200	148	M
4	192	180	M						
5	245	230	M						
6	-----								
7	M								
8	-----								
9	M								
10	230	212	M						
11	251	258	256	258	262	250	240	224	M
12	214	216	226	228	222	224	226	226	227
13	M								
14	-----								
15	246	250	236	228	197	M			
16	200	193	184	184	182	M			

Ratas placebo-ctrl (1-8) e ratas tratadas com 1,5 mg/Kg/dia de MAPA SC (9-16). O dia "0" corresponde ao dia da inoculação das células tumorais ( $4 \times 10^6$  células/sítio). Os animais placebo receberam solução Ringer-lactato SC, na mesma razão dose-volume administrada aos animais tratados. Na rata 12 foi observada rejeição tumoral.

(a) M = morte.

Tabela 5: Variação no peso (g) de ratas pré-irradiadas placebo e ratas pré-irradiadas tratadas com 0,5 mg/Kg/dia de MAPA SC, antes da inoculação de células tumorais de W256 linhagem A, em 1 sítio de inoculação SC, na região dorso-lombar, em função do tempo (dias)

rata	Tempo (dias)					
	-6 (antes)	-6 (após)	-4	-3	-2	-1
1	152	144	132	140	142	148
2	138	141	138	140	142	146
3	138	141	138	145	150	149
4	144	138	136	136	138	138
5	141	138	132	132	144	148
6	155	158	148	148	154	162
7	144	145	135	138	144	146
8	124	125	124	128	130	134

Ratas placebo-ctrl (1-4) e ratas tratadas com 0,5 mg/Kg/dia de MAPA SC (5-8). Os animais foram pré-irradiados 6 dias antes da inoculação tumoral, utilizando-se cobalto radioativo ( $\gamma = 400$  rads). Os dias negativos correspondem aos dias que antecederam à inoculação tumoral (designado por dia "0", na tabela a seguir). As designações -6 (antes) e -6 (após) correspondem aos pesos corporais obtidos imediatamente antes e depois da irradiação respectivamente. Os animais placebo receberam solução Ringer-lactato SC, na mesma razão dose-volume administrada aos animais tratados.

Tabela 7: Continuação da tabela 6: Variação no peso (g) de ratas pré-irradiadas placebo e ratas pré-irradiadas tratadas com 0,5 mg/Kg/dia de MAPA SC, após a inoculação de células tumorais de W256 linhagem A, em 1 sítio de inoculação SC, na região dorso-lombar, em função do tempo (dias)

rata	Tempo (dias)							
	13	14	15	16	17	18	19	20
1	-----							
2	-----							
3	172	174	188	197	192	M		
4	-----							
5	160	160	158	158	156	152	144	M
6	-----							
7	-----							
8	-----							

Ratas pré-irradiadas placebo-ctrl (1-4) e ratas pré-irradiadas tratadas com 0,5 mg/Kg/dia de MAPA SC (5-8). Os animais foram pré-irradiados 6 dias antes da inoculação tumoral, utilizando-se cobalto radioativo ( $\gamma = 400$  rads). O dia "0" corresponde ao dia da inoculação das células tumorais ( $4 \times 10^6$  células/sítio). Os animais placebo receberam solução Ringer-lactato SC, na mesma razão dose-volume administrada aos animais tratados.

(a) M = morte.

Tabela 8: Variação no peso (g) de ratas placebo e ratas tratadas com 0,5 mg/Kg/dia de MAPA SC, após a inoculação de células tumorais de W256 sublinhagem A, em 1 sítio de inoculação SC, na região dorso-lombar, em função do tempo (dias)

rata	Tempo (dias)								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
1	196	200	199	216	220	219	224	231	233
2	205	203	209	218	225	233	236	248	249
3	196	200	218	216	221	233	240	241	253
4	186	183	183	204	214	220	220	219	220
5	221	217	217	218	219	219	221	233	238
6	219	219	225	230	231	230	236	248	255
7	201	201	200	209	219	224	228	233	245
8	199	208	210	215	218	220	230	234	234
9	220	221	218	223	226	231	230	231	230
10	232	233	236	240	242	248	247	250	249
11	202	206	205	204	206	210	213	216	220
12	198	197	198	203	208	218	223	228	232
13	186	190	192	191	200	207	209	212	215
14	200	202	201	208	212	220	226	231	238
15	188	190	193	201	208	214	220	227	234
16	194	205	206	206	209	209	216	225	226

Ratas placebo-ctrl (1-8) e ratas tratadas com 0,5 mg/Kg/dia de MAPA SC (9-16). O dia "0" corresponde ao dia da inoculação das células tumorais ( $6 \times 10^6$  células/sítio). Os animais placebo receberam solução Ringer-lactato SC, na mesma razão dose-volume administrada aos animais tratados.

Tabela 9: Continuação da tabela 8: Variação no peso (g) de ratas placebo e ratas tratadas com 0,5 mg/Kg/dia de MAPA SC, após a inoculação de células tumorais de W256 sublinhagem A, em 1 sítio de inoculação SC, na região dorso-lombar, em função do tempo (dias)

rata	Tempo (dias)										
	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38
1	245	246	245	240	241	240	241	240	242	240	242
2	248	253	255	254	253	253	254	252	253	251	251
3	255	260	261	260	257	244	240	240	236	236	M
4	225	233	243	250	255	258	248	240	M		
5	240	245	253	254	253	248	247	245	245	245	249
6	261	259	260	258	259	256	258	259	258	258	258
7	252	253	253	248	248	250	251	250	251	252	251
8	233	232	231	230	231	231	232	230	231	231	232
9	238	241	243	243	245	250	252	253	255	256	255
10	250	252	255	256	255	255	257	260	266	266	267
11	225	231	235	240	242	248	250	249	251	250	253
12	238	245	246	247	248	252	253	257	256	255	256
13	222	228	230	229	230	230	235	236	238	240	240
14	242	244	247	248	247	248	250	251	250	251	252
15	239	241	242	244	245	245	246	248	248	250	252
16	231	230	232	231	235	238	240	246	248	245	243

Ratas placebo-ctrl (1-8) e ratas tratadas com 0,5 mg/Kg/dia de MAPA SC (9-16). O dia "0" corresponde ao dia da inoculação das células tumorais ( $6 \times 10^6$  células/sítio). Os animais placebo receberam solução Ringer-lactato SC, na mesma razão dose-volume administrada aos animais tratados.

(a) M = morte.

## APÊNDICE 4

Tabela 1: Peso do tumor primário e das metástases nas regiões inguinal e axilar (g) após a autópsia de ratas placebo e ratas tratadas com 0,5 e 1,0 mg/Kg/dia de MAPA SC, as quais foram inoculadas em 1 sítio SC com células tumorais de W256 linhagem A.

rata	tumor	inguinal direita	inguinal esquerda	axilar direita	axilar esquerda
1	20,4	5,0	3,2	3,6	0,9
2	13,8	9,2	ND	ND	ND
4 <sup>a</sup>	28,0	4,8	ND	1,3	ND
5	ND	ND	ND	ND	ND
6	21,9	ND	ND	ND	ND
7	29,4	ND	ND	ND	ND
8	40,1	1,6	ND	ND	ND
9	21,9	6,1	6,0	ND	2,3
10	14,4	13,5	7,0	ND	6,0
12	22,6	5,0	4,7	2,0	ND
16	15,2	4,4	1,2	3,9	1,7
18 <sup>b</sup>	16,5	13,0	ND	1,0	ND
20	24,6	ND	ND	ND	ND
21	18,7	ND	ND	ND	ND
22	18,8	ND	ND	ND	ND
23	21,5	ND	ND	ND	ND

Ratas placebo-ctrl (1-8), ratas tratadas com 0,5 mg/Kg/dia de MAPA SC (9-16) e ratas tratadas com 1,0 mg/kg/dia de MAPA SC (17-24). Os animais placebo receberam solução Ringer-lactato SC, na mesma razão dose-volume administrada aos animais tratados. O peso dos tumores primários dos animais 21-23 corresponde à soma do crescimento de dois tumores independentes.

ND = não determinado.

a = peso das metástases nas regiões: SC dorso-torácica = 8,1 g, retroperitoneal = 7,6 g e SC abdominal = 7,0 g.

b = peso da metástase na região dorsal posterior esquerda = 4,7 g.

Tabela 2: Peso do tumor primário e das metástases nas regiões inguinal e axilar (g) após a autópsia de ratas placebo e ratas tratadas com 1,5 mg/Kg/dia de MAPA SC, as quais foram inoculadas em 1 sítio SC com células tumorais de W256 linhagem A.

rata	tumor	inguinal direita	inguinal esquerda	axilar direita	axilar esquerda
1	20,7	1,2	0,9	ND	0,3
2	15,4	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	ND
4	13,1	0,8	ND	ND	ND
5	20,2	2,7	0,8	1,2	0,5
6	12,6	ND	ND	ND	ND
7	17,5	3,3	ND	2,2	ND
8	15,2	ND	ND	ND	ND
9	11,8	3,1	ND	ND	ND
10	12,1	6,2	1,3	ND	ND
11 <sup>a</sup>	19,1	2,7	ND	ND	ND
13	13,6	2,4	ND	1,2	ND
14	8,9	1,2	ND	ND	ND
15	16,9	4,4	2,1	3,8	ND
16	17,4	6,4	ND	ND	ND

Ratas placebo-ctrl (1-8) e ratas tratadas com 1,5 mg/Kg/dia de MAPA SC (9-16). Os animais placebo receberam solução Ringer-lactato SC, na mesma razão dose-volume administrada aos animais tratados.

ND = não determinado.

a = peso da metástase na região submaxilar direita = 1,7 g.

## APÊNDICE 5

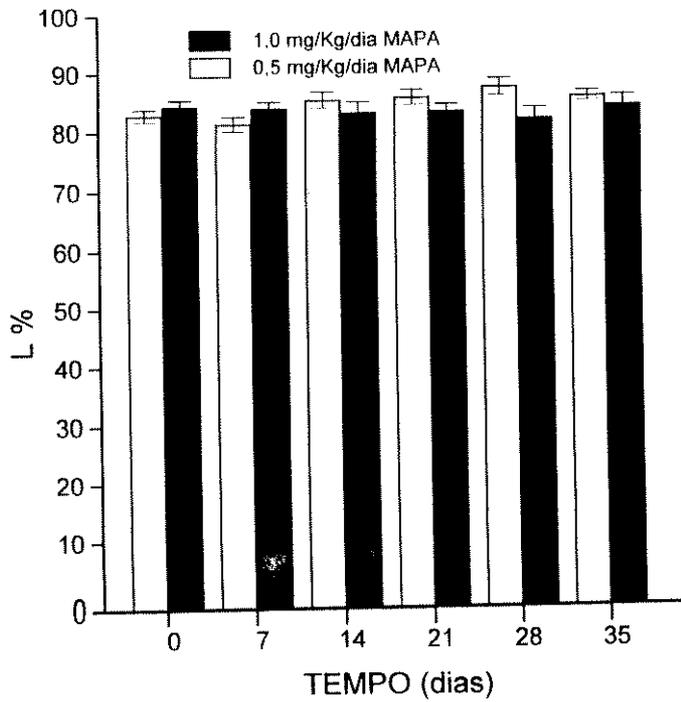


FIGURA 1: Evolução percentual de linfócitos do sangue (L %) de ratos Wistar em função do tempo, durante o tratamento com MAPA em doses diárias de 0,5 e 1,0 mg/Kg. Os valores correspondem à média de 5 animais por grupo  $\pm$  desvio padrão da média.

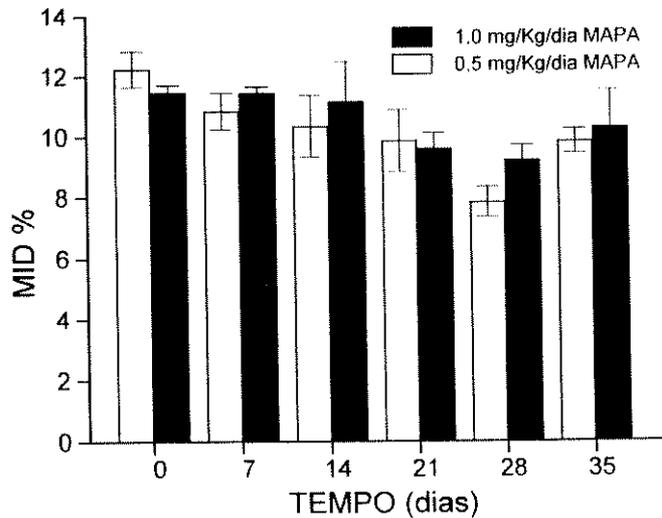


FIGURA 2: Evolução percentual de células MID do sangue (MID %) de ratos Wistar em função do tempo, durante o tratamento com MAPA em doses diárias de 0,5 e 1,0 mg/Kg. Os valores correspondem à média de 5 animais por grupo  $\pm$  desvio padrão da média.

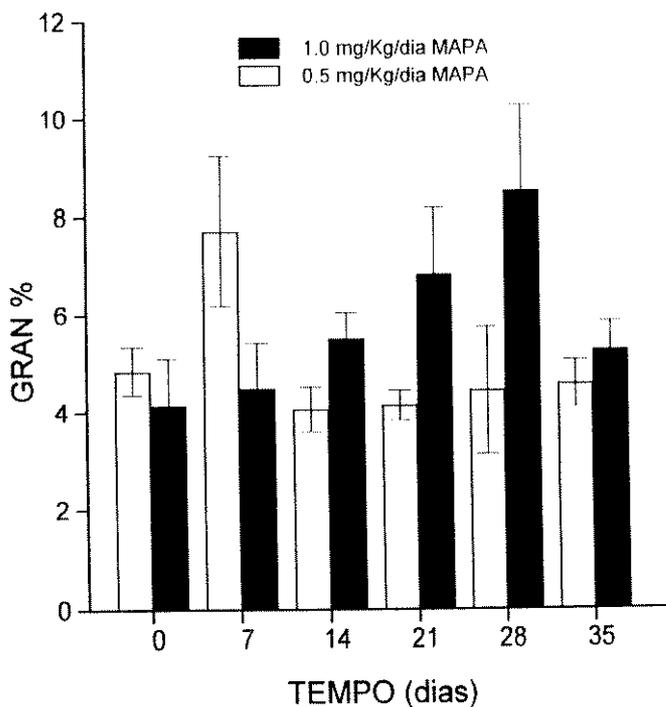


FIGURA 3: Evolução percentual de células GRAN do sangue (GRAN %) de ratas Wistar em função do tempo, durante o tratamento com MAPA em doses diárias de 0,5 e 1,0 mg/Kg. Os valores correspondem à média de 5 animais por grupo  $\pm$  desvio padrão da média.

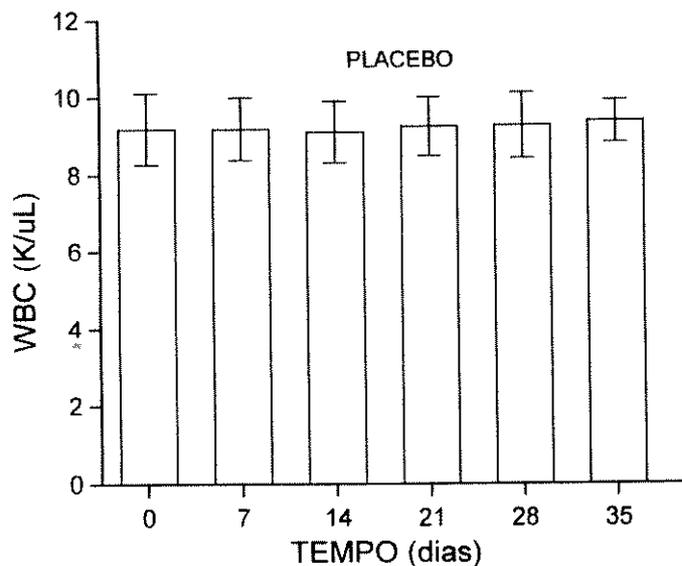


Figura 4: Evolução temporal das células brancas totais do sangue (WBC) de ratas Wistar durante o tratamento com solução placebo Ringer-lactato, na mesma razão dose-volume administrada aos animais tratados com MAPA. Os valores correspondem à média de 5 animais  $\pm$  desvio padrão da média.

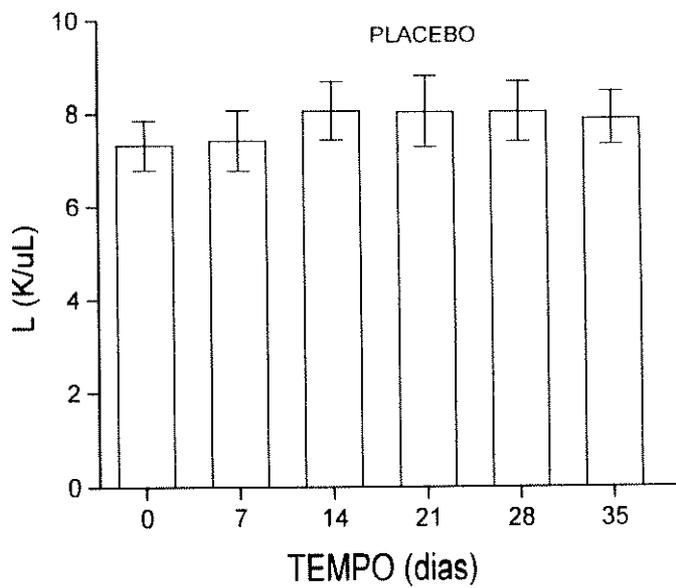


Figura 5: Evolução temporal de linfócitos totais do sangue (L) de ratas Wistar durante o tratamento com solução placebo Ringer-lactato, na mesma razão dose-volume administrada aos animais tratados com MAPA. Os valores correspondem à média de 5 animais  $\pm$  desvio padrão da média.

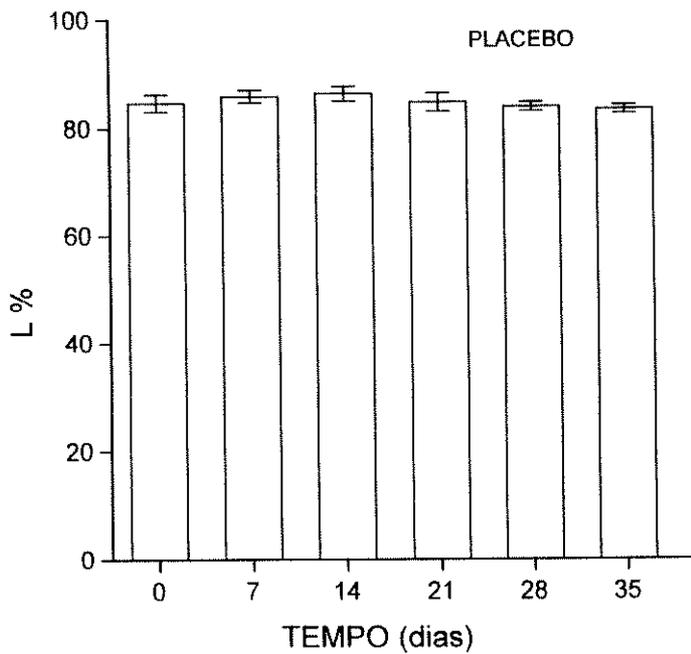


Figura 6: Evolução percentual de linfócitos totais do sangue (L %) de ratas Wistar em função do tempo, durante o tratamento com solução placebo Ringer-lactato, na mesma razão dose-volume administrada aos animais tratados com MAPA. Os valores correspondem à média de 5 animais  $\pm$  desvio padrão da média.

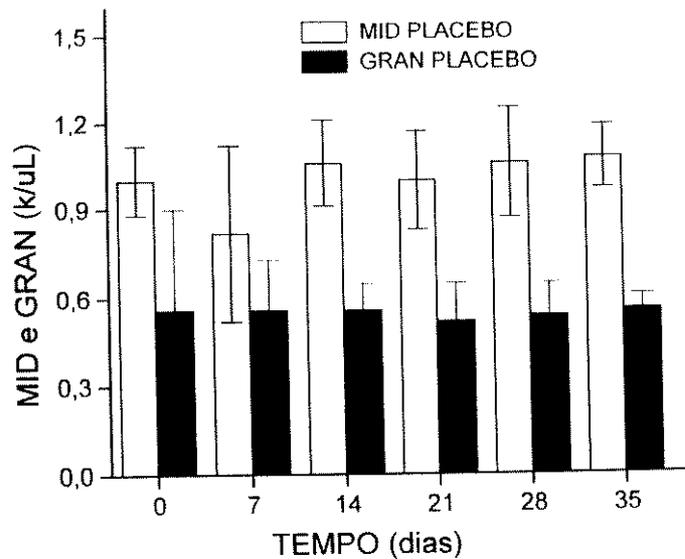


Figura 7: Evolução temporal de células GRAN e células MID totais do sangue de ratos Wistar durante o tratamento com solução placebo Ringer-lactato, na mesma razão dose-volume administrada aos animais tratados com MAPA. Os valores correspondem à média de 5 animais  $\pm$  desvio padrão da média.

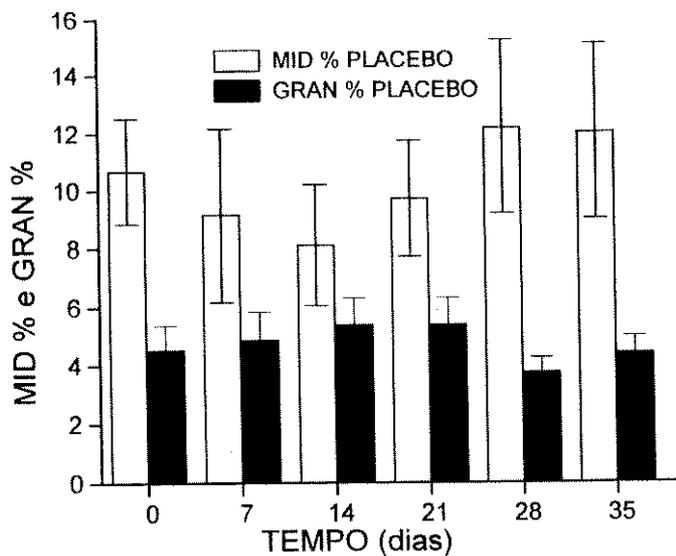


Figura 8: Evolução percentual de células GRAN (GRAN %) e células MID totais (MID %) do sangue de ratos Wistar em função do tempo, durante o tratamento com solução placebo Ringer-lactato, na mesma razão dose-volume administrada aos animais tratados com MAPA. Os valores correspondem à média de 5 animais  $\pm$  desvio padrão da média.

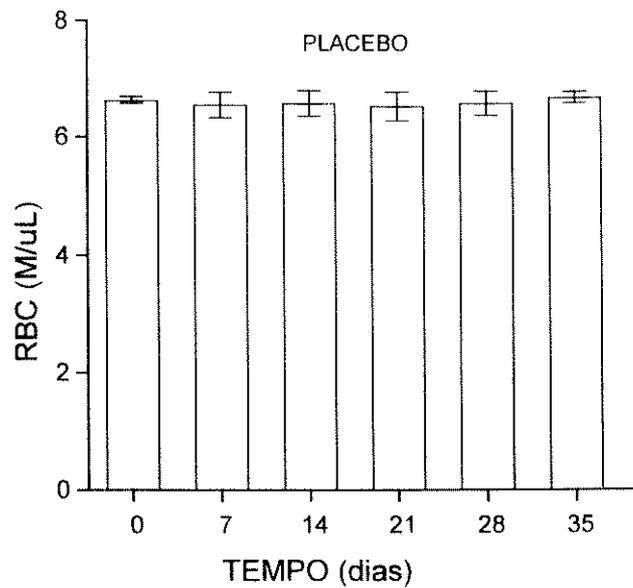


Figura 9: Evolução temporal de eritrócitos (RBC) totais do sangue de ratos Wistar durante o tratamento com solução placebo Ringer-lactato, na mesma razão dose-volume administrada aos animais tratados com MAPA. Os valores correspondem à média de 5 animais  $\pm$  desvio padrão da média.

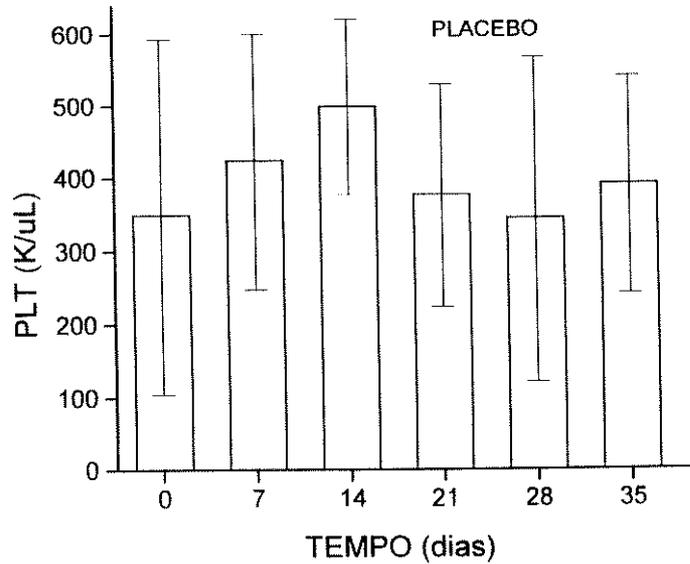


Figura 10: Evolução temporal de plaquetas totais do sangue (PLT) de ratos Wistar durante o tratamento com solução placebo Ringer-lactato, na mesma razão dose-volume administrada aos animais tratados com MAPA. Os valores correspondem à média de 5 animais  $\pm$  desvio padrão da média.

# ATIVIDADES ACADÊMICAS DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORADO

## CURSOS EXTRACURRICULARES

1. "Metabolic Aspects of Calcium", Novembro - Dezembro 1992, Prof. Dr. Richard Hansford (National Institute of Aging, Baltimore), UNICAMP, Campinas, S.P..
2. "Biologia e Patofisiologia do Câncer Mamário e Ginecológico", Agosto - Dezembro 1994, Profs. Dra. Ana Neuza Vieira-Matos, Dr. Ovídio Retori e Dra. Tereza Cristina Cavalcanti, UNICAMP, Campinas, S.P., (ouvinte).

## PESQUISA ASSOCIADA

"Estudos de um Novo Modulador da Resposta Biológica no Crescimento do Carcinoma Mamário de Ratas Sprague-Dawley Induzido por DMBA (7,12-dimetilbenzo[ $\alpha$ ]antraceno)", G. Z. Justo, T. C. Cavalcanti e N. Durán, Laboratório de Pesquisas Bioquímicas, CAISM - Hospital das Clínicas, UNICAMP, Campinas, S.P., Dezembro 1994 - Março 1996.

## TRABALHOS EM CONGRESSOS

1. G. Z. Justo, A. R. M. Souza-Brito, O. D. S. Nunes e N. Durán, "Pharmacokinetics of a new biological modulator", XVIII Encontro Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Agosto 1993, Caxambú, M.G., Brasil.
2. N. Durán, M. Haun, G. Z. Justo, O. D. S. Nunes, I. D. S. Nunes, R. V. Antônio, I. Saavedra, S. de Castro e L. Vargas, "Biotechnology in the development of new drugs: antichagastic and immunomodulator", III Congresso Latinoamericano de Biotecnologia e II Congresso Nacional de Biotecnologia, Novembro 1993, Santiago de Chile, Chile.

3. G. Z. Justo, A. R. M. Souza-Brito, O. Retori e N. Durán, "Bioavailability of MAPA in rats and a comparison of their blood cells levels over other Mg salts", 1<sup>st</sup> International Seminar of Pharmaceutics, 4<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Produtos Farmacêuticos, Cosméticos e Afins e 9<sup>o</sup> Congresso Estadual de Farmacêuticos, Maio 1995, São Paulo, S.P., Brasil.

4. G. Z. Justo, O. Retori, A. N. Vieira-Matos e N. Durán, "Antitumor activity of MAPA in rats with Walker-256 carcinosarcoma", XX Encontro Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Agosto 1995, Serra Negra, S.P., Brasil.

5. N. Durán, G. Z. Justo, E. Esposito e I. Nunes, "A revised structure and new activities of the immunomodulator SB-73 obtained from *A. oryzae*", XX Encontro Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Agosto 1995, Serra Negra, S.P., Brasil.

6. G. Z. Justo, A. R. M. Souza-Brito e N. Durán, "Aspectos cinéticos da droga MAPA em ratos", XXI Encontro Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, a realizar-se em Caxambú, M.G., em agosto do corrente ano.

## **CONFERÊNCIAS E SEMINÁRIOS**

1. N. Durán, M. Haun, A. R. M. Souza-Brito, G. Z. Justo e I. Saavedra, "Critical aspects of magnesium in the immunological system", conferência, Novembro 1993, Universidade de Santiago do Chile, Santiago de Chile, Chile.

2. G. Z. Justo e N. Durán, "Estudos preliminares da ação do agregado protêico de fosfolinoleato-palmitoleato de amônio e magnésio (MAPA) em infecções virais", mesa redonda sobre Procedimentos Alternativos para o Controle e Terapia de Viroses Animais, VIII Encontro Nacional de Virologia, a realizar-se em São Lourenço, M.G., em novembro do corrente ano.

## PUBLICAÇÕES

1. N. Durán, A. R. M. Souza-Brito, M. Haun, O. D. S. Nunes, J. A. de Oliveira, S. Hetem, L. Vargas e G. Z. Justo, "SB-73, immunostimulant agent", *Drugs Fut.*, **18**, 327 (1993).
2. G. Z. Justo, P. Livotto e N. Durán, "Chemical and photochemical generated carbon-centered radical intermediate and its reaction with deoxiribonucleic acid", *Free Rad. Med. Biol.*, **19** (4), 431 (1995).
3. L. H. Innocentini-Mei, G. Z. Justo, A. Faljoni-Alário, M. Haun e N. Durán, "The role of bilirubin in the oxidative enzymatic system and DNA. An evidence for the interaction of singlet oxygen and DNA guanine residues", *Brazil. J.*, submetido.
4. N. Durán, M. Haun, A. R. M. Souza-Brito, G. Z. Justo e I. Saavedra, "Critical aspects of magnesium in the immunological functions", *Rev. Latinoam. Biotecn.*, submetido.