

CLÉCIO FERREIRA DE SANTANA, CLÁUDIO TENÓRIO COTIAS, ARI LINS LACERDA, LAURO P. LINS, EDVALDO RODRIGUES DE ALMEIDA, DINÁ GIMINO MARTINS & IVONE A. DE SOUZA.

ESTUDO FARMACODINÂMICO, ANTINEOPLÁSICO E QUIMIORADIOTERÁPICO DAS ACTINOMICINAS 6779, 7958, 8929 e 6742.

As actinomicinas obtidas das cepas de *Streptomyces* 8929, 7958, 6779 e 6742 isoladas pela equipe do Prof. Oswaldo Gonçalves de Lima, pertencem a um grupo de antibióticos cromopeptídicos. Os testes toxicológicos apresentaram os seguintes resultados em camundongos por via intraperitoneal. Actinomicina 8929 DL₅₀ de 780 ± 71,58 mcg/kg; actinomicina 7958 DL₅₀ de 710 ± 66,25 mcg/kg; actinomicina 6779 DL₅₀ de 500 ± 63,58 mcg/kg e actinomicina 6742 DL₅₀ de 202,5 ± 17,61 mcg/kg.

Os testes antineoplásicos mostraram que a actinomicina 6779 apresentou na dose de 20 mcg/kg no sarcoma de Yoshida, 37,18% de inibição; no carcino-sarcoma de Walker 256 70,15% de inibição. A actinomicina 7958 apresentou resultado negativo na dose de 30 mcg/kg tanto para o sarcoma de Yoshida como para o carcino-sarcoma de Walker 256. A actinomicina 8929 apresentou 43,07% de inibição para o sarcoma de Yoshida e 48,64% de inibição para o carcino-sarcoma de Walker 256, na dose de 30 mcg/kg; a actinomicina 6742 apresentou 70,28% de inibição na dose de 6 mcg/kg para o sarcoma de Yoshida e 55,12% na dose de 20 mcg/kg para o carcino-sarcoma de Walker 256. Foram feitos estudos histopatológicos e eletrocardiográficos.

Key words

Antibiotic
Antineoplastic
Actinomycin
Pharmacology
Toxicity
Electrocardiography
Radiotherapy

INTRODUÇÃO

As actinomicinas pertencem a um grupo de antibióticos cromopeptídicos que apresentam em comum o grupo cromóforo diferenciando-se pela formação das cadeias pentapeptídicas lactônicas que se acoplam às carboxilas do cromóforo. Estes antibióticos foram isolados pela equipe do Prof. Oswaldo Gonçalves de Lima, a partir das cepas IA-6742 *Streptomyces spadicis*; IA-6779 *Streptomyces regensis*; IA-7958 *Streptomyces felleus* e IA-8929 *Streptomyces parvullus*.

As associações das substâncias com as radiações visando modificações na radio-sensibilidade celular, vêm sendo objeto de constantes estudos, no tratamento dos tumores malignos. Algumas drogas quando em combinação com as irradiações ionizantes, modificam a radio-sensibilidade da célula tumoral, embora a célula normal também responda desta maneira, com menor intensidade.

Dentro do princípio básico da radioterapia as células tumorais sofrem mais com o efeito das radiações e o seu poder de recuperação é precário em relação à célula normal. Chega-se a afirmar que mais importante que a supervoltagem seria um método capaz de aumentar a diferença entre a destruição tumoral e os danos ao tecido normal.

O presente trabalho consiste em provas pré-clínicas abrangendo estudos farmacológicos, quimioterápicos e rádio-quimioterápicos, em ratos portadores de tumores malignos.

PARTE EXPERIMENTAL

Os estudos farmacológicos consistiram na determinação da dose letal 50% (DL_{50}) e ação das referidas substâncias sobre os diversos órgãos.

Para avaliar a toxicidade das actinomicinas estudadas, empregamos a técnica de MILLER E TAINTER¹ em camundongos albinos suíços, por via intraperitoneal, cujos resultados em mcg/kg foram os seguintes durante o período de 3 dias de observação: actinomicina 8929 foi de $780 \pm 71,58$ mcg/kg; actinomicina 7958 foi de $710 \pm 66,25$ mcg/kg; actinomicina 6779 foi de $500 \pm 63,58$ mcg/kg e actinomicina 6742 foi de $202,5 \pm 17,61$ mcg/kg.

A atividade sobre a musculatura lisa, até a concentração de 20 mcg/kg demonstrou que nas substâncias estudadas não foi constatada nenhuma modificação no fluxo do líquido perfundido através da árvore brônquica, como também no tonus do íleo isolado do cobaio e na musculatura lisa dos vasos sanguíneos.

O estudo histopatológico das actinomicinas foi realizado em ratos Wistar na dose de 25 a 50 mcg/kg. Os animais foram submetidos à toxidez crônica no período de 30 dias, após o qual foram retirados vários órgãos e submetidos ao exame histopatológico, apresentando os seguintes resultados:

Fígado: parênquima congestionado com a maioria dos sinusóides dilatados; degeneração acidófila de células hepáticas distribuídas ao acaso, hepatócito com área de necrose focal.

Rins: congestão tanto na zona medular como na cortical.

Pulmão: congestão com processo inflamatório peribrônquico, hemorragia intersticial.

Coração: dentro dos padrões normais.

A ação das drogas na mecânica respiratória² em coelhos apresentou uma bradipnea e uma discreta diminuição da ventilação pulmonar, retornando em seguida a respiração normal 15 minutos após administração das substâncias na concentração de 20 mcg/kg.

Para comprovar o efeito exercido pelas actinomicinas na pressão arterial foram utilizados ratos da cepa Wistar. As actinomicinas em suspensão aquosa foram administradas pela veia femoral na concentração de até 20 mcg/kg, não ocasionando nenhuma modificação da pressão arterial.

A ação da atividade cardíaca das actinomicinas demonstrou nos diversos tipos de preparação, coração "in situ", coração isolado e átrio isolado, na concentração

de até 20 mcg/kg, que as referidas substâncias não apresentaram ação sobre o período refratário efetivo, sobre o inotropismo e o cronotropismo.

O eletrocardiograma³ apresentou uma inversão do segmento S-T e do espaço P-Q e bradicardia, em alguns casos constatou-se taquicardia bidirecional. O estudo eletrocardiográfico foi realizado na derivação D2 com velocidade de 50 mm/s e o tempo de duração foi de 15 dias de aplicação. As doses empregadas para todas as actinomicinas foram de 10 e 20 mcg/kg/dia.

Entretanto, apesar dessas alterações descritas, os animais permaneceram vivos durante o período de um mês de observação.

Dando prosseguimento aos nossos estudos, procuramos verificar a ação anti-inflamatória e analgésica das substâncias, o que foi realizado usando-se como padrão o cloridrato de éster etílico do ácido 1-metil-4-fenil-piperidina-4-carbônico, cujo nome comercial é Dolantina, aplicado na dose de 5 mg/kg. O método utilizado por nós é o de WOOLF E MACDONALD⁴, modificado. As actinomicinas foram empregadas na dose de 10 e 20 mcg/kg. Os resultados observados não demonstraram qualquer ação analgésica.

Na determinação da ação anti-inflamatória, seguimos a orientação dos trabalhos de OLIVEIRA⁵, OGA⁶ e colaboradores. O agente inflamatório empregado, foi a formalina a 3% no volume de 0,1 ml e o controle de eficácia, a butazona, na dose de 150 mg/kg; as medidas foram realizadas em 3 intervalos de 60 minutos após aplicação das actinomicinas. Os resultados demonstraram que essas substâncias não apresentaram ação anti-inflamatória.

A ação das várias actinomicinas na permeabilidade capilar, foi realizada em ratos Wistar, fazendo-se um estudo comparativo com uma solução aquosa de dicloridrato de histamina na dose de 0,5 mcg/kg e empregando-se como corante uma solução aquosa de azul de Evans a 1%. Os resultados obtidos demonstraram que as actinomicinas não provocaram um extravasamento do corante, enquanto que com o dicloridrato de histamina observou-se o extravasamento, o que vem demonstrar que as actinomicinas não determinam modificação da permeabilidade capilar.

No teste de irritação local, as actinomicinas utilizadas em suspensão aquosa, na concentração de 5 mcg/kg, foram instiladas no saco conjuntival e administradas na veia marginal dos coelhos. Os resultados obtidos mostraram uma ligeira irritação em ambos os testes. Os testes quimioterápicos foram realizados em ratos da cepa Wistar, portadores de diferentes neoplasias malignas. A actinomicina 6779, apresentou na dose de 20 mcg/kg, um fraco efeito inibitório no sarcoma de Yoshida, com uma inibição tumoral de 37,18% e um bom percentual de inibição no carcino-sarcoma de Walker 256, apresentando uma inibição de 70,15%. Os resultados obtidos pela actinomicina 7958, apresentaram ação antineoplásica negativa na dose de 30 mcg/kg, tanto para o sarcoma de Yoshida como para o carcino-sarcoma de Walker 256.

Os estudos realizados com as actinomicinas 8929 e 6742 apresentaram inibição tumoral de 43,07% para o sarcoma de Yoshida e 48,69% no carcino-sarcoma de Walker 256, respectivamente.

As doses utilizadas para a actinomicina 8929 foram de 30 mcg/kg em ambos os tumores. Da actinomicina 6742, empregamos a dose de 6 mcg/kg para o sarcoma de Yoshida e para o carcino-sarcoma de Walker 256, apresentando 70,28% de inibição sobre o sarcoma de Yoshida e 55,12% sobre o carcino-sarcoma de Walker 256.

O período de experiência foi de 7 dias, fim do qual foi feita a devida avaliação.

Os experimentos visando a associação das actinomicinas às irradiações foram realizados em ratos da cepa Wistar transplantados com carcino-sarcoma de Walker 256 e sarcoma de Yoshida, utilizando-se técnicas de transplante e avaliação preconizadas por centros internacionais de pesquisas^{7,8,9,10,11}.

Quanto à fonte de irradiação foi empregada uma bomba de cobalto marca Eldorado, da Atomic Energy of Canada, e também seguimos a metodologia de trabalhos publicados anteriormente por nós¹².

A actinomicina 7958 não apresentou atividade antineoplásica quando empregada isoladamente e em associação com o Co^{60} teve apenas inibição da irradiação (Quadros I e II).

A actinomicina 6779 apresentou uma inibição de 37,18 em tumores de Yoshida e associada com o Co^{60} inibiu 40% (Quadro II). No carcino-sarcoma de Walker 256, testada na dose de 20 mcg/kg de peso, confirmou o resultado de 70,15% de inibição. Em associação com o Co^{60} , obtivemos o resultado inibitório de 73% (quadro I).

A actinomicina 6742, na dose de 6 mcg/kg de peso, em sarcoma de Yoshida, inibiu o tumor em 70,28%, e no carcino-sarcoma de Walker 256, inibiu 55,12%.

Associada à radiação aumentou o percentual de inibição para 79,31%, no sarcoma de Yoshida, permanecendo quase inalterado (58,4%) no carcino-sarcoma de Walker 256.

Quanto à actinomicina 8929, em dose de 30 mcg/kg de peso, teve como resultados: 43,07% no sarcoma de Yoshida e 48,69% no carcino-sarcoma de Walker 256, melhorando assim sua atividade em relação aos primeiros testes. Sua associação à cobaltoterapia não apresentou percentuais satisfatórios.

QUADRO I

RESULTADOS DA ASSOCIAÇÃO DAS ACTINOMICINAS ÀS RADIAÇÕES IONIZANTES SOBRE O TUMOR CARCINO-SARCOMA DE WALKER 256

ACTINOMICINAS	DOSE (mcg/kg)	ISOLADA	+ Co^{60}	Co^{60}
2084	50,0	56,40%	69,64%	57,00%
6742	6,0	55,12%	58,40%	59,00%
8929	30,0	48,69%	50,06%	54,00%
6779	20,0	70,15%	73,00%	60,00%
7958	30,0	Negativo	58,00%	55,00%

QUADRO II

RESULTADOS DA ASSOCIAÇÃO DAS ACTINOMICINAS ÀS RADIAÇÕES IONIZANTES SOBRE O TUMOR DE YOSHIDA

ACTINOMICINAS	DOSE (mcg/kg)	ISOLADA	+Co ⁶⁰	Co ⁶⁰
2084	50,0	30,00%	71,06%	83,33%
6742	6,0	70,28%	79,31%	81,04%
8929	30,0	43,07%	44,05%	50,00%
6779	20,0	37,18%	40,00%	50,00%
7958	30,0	Negativo	55,10%	56,66%

DISCUSSÃO

Inicialmente foi estudada a toxidez das actinomicinas 7958, 8929, 6742 e 6779, pela determinação da DL₅₀, em camundongos. Os resultados obtidos permitiram concluir pela toxidez aguda dessas substâncias nesta espécie de animal.

O estudo da toxidez crônica do exame histopatológico apresentou macroscopicamente presença de líquido de aspecto turvo na cavidade abdominal, principalmente nos animais submetidos às actinomicinas 6779 e 6742, como também a perda de peso, anorexia e fezes pastosas, dados constatados em todos os animais submetidos à ação das várias actinomicinas.

As observações microscópicas dos vários órgãos estudados apresentaram ação tóxica sobre o fígado, rins e pulmão.

A atividade sobre a musculatura lisa demonstrou que nas substâncias estudadas não foi constatada nenhuma modificação no fluxo do líquido perfundido através do pulmão, nem modificações no tonus do íleo do cobaio, como também no trem posterior do sapo.

O estudo da atividade cardíaca das actinomicinas nos diversos tipos de preparações, coração "in situ", coração isolado e átrio isolado, possibilitou apreciar que as referidas substâncias não apresentaram nenhuma ação sobre o período refratário efetivo, sobre o inotropismo e o cronotropismo. O eletrocardiograma apresentou uma inversão do segmento S-T e do espaço P-Q e bradicardia, contudo em alguns casos constatou-se taquicardia bidirecional. Estas observações apresentaram divergências com os estudos realizados com o órgão isolado e "in situ", o que se pode concluir que no estudo do eletrocardiograma a ação das drogas foi crônica enquanto que nas outras preparações, a ação foi aguda. Entretanto, apesar dessas alterações descritas, os animais permaneceram vivos durante o período de um mês sob observação.

Dando prosseguimento aos nossos estudos procuramos verificar a ação anti-inflamatória e analgésica das substâncias, o que foi realizado utilizando-se padrões conhecidos. Nas observações não foi constatada qualquer ação analgésica e anti-inflamatória.

Para comprovar o efeito exercido pelas actinomicinas em estudo, na pressão arterial, foi usado este tipo de preparação, utilizando-se ratos. As várias doses foram administradas de modo lento não ocasionando nenhuma modificação tensional. Com estes resultados sugerimos que as referidas substâncias não parecem interferir no mecanismo tensional dos animais empregados em nosso experimento.

No estudo da mecânica respiratória em coelhos, verificou-se bradipnea e uma discreta diminuição da ventilação pulmonar, retornando a respiração normal 15 minutos após a administração da substância.

A ação das várias actinomicinas na permeabilidade capilar foi realizada em ratos Wistar, fazendo-se um estudo comparativo com o dicloridrato de histamina e empregando-se como corante uma solução aquosa de azul de Evans a 1%.

A injeção intradérmica de dicloridrato de histamina, provocou o extravasamento do corante, demonstrando a ação da histamina na modificação da permeabilidade capilar, enquanto as actinomicinas não apresentaram esta propriedade.

No teste de irritação local constatamos na conjuntiva do coelho como também no endotélio vascular da veia marginal da orelha, uma ligeira irritação.

A actinomicina 7958 não apresentou resultados inibitórios nas doses mais elevadas permitidas.

A actinomicina 6779 apresentou um fraco efeito inibitório no sarcoma de Yoshida, porém no carcino-sarcoma de Walker 256 obteve uma boa inibição. Comparando-a com a actinomicina-D (2084), que tomamos como padrão, podemos dizer que tem efeitos semelhantes. A associação com o Co^{60} não melhorou significativamente sua ação.

A actinomicina 6742 apresentou ótimo resultado inibitório superando a actinomicina-D (2094), quando tratamos o sarcoma de Yoshida. O mesmo não foi obtido quanto ao seu emprego no carcino-sarcoma de Walker 256. A associação às radiações também não melhorou os resultados.

A actinomicina 8929 mostrou fracos resultados em ambos os tipos de tumores experimentais e em associação com o cobalto.

CONCLUSÃO

1º-) As determinações das DL_{50} , usadas para avaliar a toxidez das substâncias feitas em camundongos, por via intraperitoneal, foram respectivamente as seguintes

em mcg/kg: actinomicina 8929 a $DL_{50} = 780 \pm 71,58$; actinomicina 7958 a $DL_{50} = 710 \pm 66,25$; actinomicina 6779 a $DL_{50} = 500 \pm 63,58$; actinomicina 6742 a $DL_{50} = 202,5 \pm 17,61$.

2º.) O estudo histopatológico dos diversos órgãos, após serem submetidos os animais a uma toxidez crônica, mostrou os seguintes resultados:

Pulmão: hemorragia interalveolar.

Fígado: degeneração acidófila de células hepáticas distribuídas ao acaso, hepatócito com área de necrose focal.

Rim: congestão da cortical e medular.

Coração: dentro dos padrões normais.

3º.) Em nenhuma das doses usadas, foi constatada atividade das substâncias sobre a musculatura lisa dos brônquios e íleo de cobaio como também na musculatura lisa dos vasos sanguíneos.

4º.) Na permeabilidade capilar não foi observada nenhuma modificação.

5º.) As doses empregadas não apresentaram modificação da pressão sanguínea do rato.

6º.) No coração "in situ" e isolado, as substâncias não modificaram as propriedades fundamentais.

7º.) No estudo eletrocardiográfico observamos uma bradicardia supraventricular e supradesnivelamento do segmento RS-T para as actinomicinas 7958 e 8929. Para as actinomicinas 6779 e 6742 ocorreu inversão do segmento Q-T, e bradicardia.

8º.) Constatamos uma discreta diminuição da ventilação pulmonar e uma bradipnea, porém reversível nas actinomicinas 7958 e 8929.

9º.) As várias actinomicinas apresentaram uma ligeira ação irritante no endotélio vascular como também no sítio da aplicação das substâncias.

10º.) Os resultados demonstraram que as várias actinomicinas testadas não apresentaram nenhuma ação analgésica e anti-inflamatória.

11º.) A actinomicina 7958 teve resultados antineoplásicos negativos nos tumores tratados, nas doses mais elevadas possíveis, contudo é aconselhável prosseguirmos com outros experimentos.

12º.) A actinomicina 6779 tem bom percentual de inibição no carcinoma de Walker 256, sendo viável ser testada no homem, devido principalmente à sua baixa toxicidade.

13º.) A actinomicina 6742 tem ótimo resultado inibitório no sarcoma de

Concluímos também que sejam realizados testes antineoplásicos em pacientes humanos.

149.) A actinomicina 8929 apresentou-se com pequena atividade sobre o carcinoma sarcoma de Walker 256 e sarcoma de Yoshida, sendo aconselhável prosseguirmos os estudos em outros tipos de tumores.

150.) Destas actinomicinas, só a 6742 aumentou o seu potencial de inibição com a radioterapia (Co^{60}). As demais mostraram discretos e insignificantes aumentos do percentual.

Concluimos que a actinomicina 6742 apresenta-se com boa atividade antitumoral, quer isolada ou associada às radiações ionizantes e com baixa toxicidade, podendo ser testada em pacientes humanos.

SUMMARY

The authors present in this paper some results concerning pharmacological, chemotherapeutic, and radiochemotherapeutic studies on actinomycins from the *Streptomyces* strains nr. IA-6742, IA-6779, IA-7958 and IA-8929.

The actinomycin from strain IA-6779 presented poor effect on Yoshida sarcoma and a good one on Walker 256 carcinosarcoma; that from strain IA-7958 did not respond to the dosage used to the same tumors; the actinomycin from strain IA-8929 and IA-6742 presented some tumoral inhibition of Yoshida sarcoma and Walker 256 carcinosarcoma.

Some pharmacological and radiochemoterapeutic considerations are presented.

REFERÊNCIAS

1. MILLER, C. & TAINTER, M. L. — Estimation of the ED50 and its error by means of logarithmic-probit graph paper. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*. 57 (2), 261-64, 1944.
2. PERREL-CARRAL, F. G. — Métodos de farmacologia experimental. México, Uteha, 1946, p. 124-125.
3. TRANCHESI, J. — Eletrocardiograma normal e patológico. Ed. El Atheneu, 3ª. ed., São Paulo, 1967.
4. WOOLF, G. & MACDONALD, A. D. — The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). *Jour. Pharmacol. Exper. Therap.* Baltimore, 80 (2): 300, 1941.

5. OLIVEIRA, M. M., SANTOS, M. & CARLINI, E. A. – Testes farmacológicos com extratos brutos e purificados de Ipê Roxo. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 37: 40-2 (supl. 1), 1970.
6. OGA S. & SEKINO, T. – Toxicidade e atividade antiinflamatória de *Tabebuia avellanedae* Lorentz e Grisebach (Ipê Roxo). *Rev. Farm. Bioquim.*, São Paulo, 7 (1): 47-53, 1969.
7. HOLLAND, J. F. & FREI, E. III – Principles of antitumor Antibiotic Therapy. *Cancer Medicine*, Philadelphia, 817-26, 1973.
8. PHILLIPS, T. L. & FU, K. K. – Quantification of combined Radiation Therapy and Chemotherapy effects on critical normal tissues. *Cancer*, 37 (2) 1186-200, Feb. 1976.
9. FLETCHER, G. H. & SUIT, H. D., PHILL, D. – Radiation Biology: A Basic for Radiotherapy. *Textbook of Radiotherapy*, 65-97, Philadelphia, 1966.
10. DUNCAN, W. & NIAS, A. H. W. – Developments in Radiotherapy. *Clinical Radiobiology*, Edinburgh, 203-221, 1977.
11. KUNKLER, P. B. & RAINS, A. J. H. – Principípios y Metodos de Radioterapia. Tratamiento del cancer en la Pratica Clínica. Barcelona, 53-70, 1962.
12. LINS, L. P., LACERDA, A. L., SANTANA, C. F., D'ALBUQUERQUE, I. L. & SOUZA, I. A. – Estudo visando potencialização da radiação ionizante quando em associação com quimioterápicos sobre o sarcoma de Yoshida. *Revista do Instituto de Antibióticos*, 15: (1/2), 57-61, 1975.