

**LEYGE ELVIRA THOMAZ DO COUTO**

**ANÁLISE FIBRINOLÍTICA DE CINCO  
FORMULAÇÕES COMERCIAIS DE  
ESTREPTOQUINASE**

*Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Biomédica – Leyge Elvira Thomaz do Couto.*

*Campinas, 27 de julho de 2004.*

*Prof. Dr. José Luiz Donato  
- Orientador -*

**Campinas**

**2004**

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÕES

**LEYGE ELVIRA THOMAZ DO COUTO**

**ANÁLISE FIBRINOLÍTICA DE CINCO  
FORMULAÇÕES COMERCIAIS DE  
ESTREPTOQUINASE**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

**Orientador:** *Dr. José Luiz Donato, Faculdade de Ciências Médica da Universidade Estadual de Campinas.*

**Campinas  
2004**

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	UNICAMP
	C836a
V	EX
TOMBO BC/	60688
PROC.	16-217-04
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	17.11.04
Nº CPD	

Bib Id 330653

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP**

C836a

Couto, Leyge Elvira Thomaz do  
Análise fibrinolítica de cinco formulações comerciais de estreptoquinase. / Leyge Elvira Thomaz do Couto. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : José Luiz Donato  
Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Plasmina. 2. Fibrinólise. 3. Coagulação. 4. Hemostase. I. José Luiz Donato. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



---

## **Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado**

---

---

### **Orientador:**

**Prof. Dr. José Luiz Donato**

---

---

### **Membros:**

**Prof. Dr. José Luiz Donato**

**Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo**

**Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno**

---

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas  
da Universidade Estadual de Campinas.**

---

**Data: 27/07/2004**

---

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>HEMOSTASE E COAGULAÇÃO SANGÜÍNEA.....</b>	<b>10</b>
Aspectos Gerais.....	10
Endotélio vascular e ativação pró-inflamatória.....	13
Plaquetas.....	13
Cascata de coagulação.....	15
<b>SISTEMA FIBRINOLÍTICO.....</b>	<b>16</b>
Plasminogênio e plasmina .....	17
Ativadores de plasminogênio.....	18
Inibidores de plasminogênio.....	19
Inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI) .....	20
<b>AGENTES FIBRINOLÍTICOS.....</b>	<b>20</b>
<b>ESTREPTOQUINASE.....</b>	<b>22</b>
Administração e efeitos adversos.....	24
<b>MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA.....</b>	<b>25</b>
Fibrinólise.....	25
Substratos cromogênicos.....	26
Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS: teoria e aplicações.....	27
Formulações comerciais de estreptoquinase.....	28
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
<b>CAPÍTULO 1: Analysis of five streptokinase formulations using the euglobulin lysis test and plasminogen activation assay.....</b>	<b>32</b>
<b>CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>54</b>
<b>APÊNDICE 1: Publicação em congresso.....</b>	<b>66</b>
<b>APÊNDICE 2: Participação em concurso.....</b>	<b>67</b>
<b>APÊNDICE 3: Processo de avaliação do paper referente ao trabalho.....</b>	<b>68</b>

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha_2$ -AP	$\alpha_2$ -antiplasmina
$\alpha_2$ -Mg	$\alpha_2$ -macroglobulina
APSAC	complexo estreptoquinase-plasminogênio não acetilado
ATIII	antitrombina III
C1-INH	C1-inibidor
DCB	Denominação Comum Brasileira
DCI	Denominação Comum Internacional
DTT	ditiotreitól
EGF	fator de crescimento epidermal
ELT	tempo de lise do coágulo euglobulina
Fator VIII	fator anti-hemofílico
FII	protrombina
FIIa	trombina
FPA e FPB	fibrinopeptídeos A e B
GP Ia/IIa	glicoproteína Ia/IIa
GPIV	glicoproteína IV
Hka	cininogênio de alto peso molecular
IAM	infarto agudo do miocárdio
kat	unidade de atividade enzimática
PAI-1	inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1
PAI-2	inibidor do ativador do plasminogênio tipo 2
PAI-3	inibidor do ativador do plasminogênio tipo 3
PAI-4	inibidor do ativador do plasminogênio tipo 4
PC	proteína C
Pg	plasminogênio
PI	plasmina
PL	fosfolipídeos
PI- $\alpha_2$ -antiplasmina	plasmina- $\alpha_2$ -antiplasmina

pNA ou p-Nitroanilida	paranitroanilida
pró-acelerina	fator V
PS	proteína S
RGD	arginina-glicina-ácido aspártico
r-pro-UK	pró-uroquinase
scu-PA	ativador de plasminogênio do tipo uroquinase de cadeia simples
SDS	dodecilsulfato de sódio
SK	estreptoquinase
SK-Pg	complexo estreptoquinase-plasminogênio
TAFI	inibidor da fibrinólise ativado pela trombina
TAFIa	inibidor da via do fator tecidual ativado
tcu-PA	ativador de plasminogênio do tipo uroquinase de cadeia dupla
TF	fator tecidual
TFPI	inibidor da via do fator tecidual
TGF- $\beta$	fator de crescimento beta
TM	trombomodulina
tPA	ativador de plasminogênio tecidual
TXA <sub>2</sub>	tromboxano A <sub>2</sub>
U	unidade
u-PA	uroquinase
vWF	fator de von Willebrand

A estreptoquinase é uma proteína de 47 kDa secretada pelas bactérias *Streptococcus* do grupo  $\beta$ -hemolítico. A estreptoquinase ativa o plasminogênio do soro humano formando um complexo capaz de converter moléculas de plasminogênio em plasmina. O nosso objetivo foi avaliar cinco formulações comerciais de estreptoquinase disponíveis no Brasil, comparando as suas capacidades *in vitro* de induzir a formação do coágulo de euglobulina e de ativar o plasminogênio *in vitro*. O tempo de lise da euglobulina foi analisado em microplaca na presença de: trombina humana e estreptoquinase. A formação do coágulo foi iniciada com a adição da euglobulina plasmática. A turbidez foi medida a 340 nm durante 30 s. No teste de lise da euglobulina a Streptase™ apresentou uma maior atividade fibrinolítica, sendo usada como formulação de referência. As formulações Unitinase™ e Solustrep™ foram as menos ativas, com cerca de 50% da atividade observada na formulação de referência. A ativação do plasminogênio foi analisada usando o substrato S-2251™ específico para plasmina. Todas as estreptoquinasas testadas ativaram o plasminogênio, observando diferenças significantes. Streptase™ ( $15,13 \pm 1,00$  kU/L; M  $\pm$  D.P., n=14) e Streptonase™ ( $18,94 \pm 0,92$  kU/L, n=16) foram as formulações mais ativas, enquanto Unitinase™ ( $6,19 \pm 0,48$  kU/L, n=12) e Strek™ ( $6,57 \pm 0,65$  kU/L, n=14) foram as menos ativas. Solustrep™ ( $10,66 \pm 0,54$  kU/L, n=15) apresentou uma atividade intermediária. As variações entre as diferentes formulações, em ambos os testes citados acima, apresentaram correlação com os resultados densitométricos após separação das proteínas através da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Nós concluímos que as formulações testadas apresentaram uma variação significativa na atividade *in vitro*. A relevância clínica destas diferenças ainda precisa ser estabelecida.



Streptokinase, a 47 kDa protein secreted by most group A, C and G  $\beta$ -hemolytic streptococci, activates human plasminogen to form an active complex capable of converting other plasminogen molecules to plasmin. The aim of this study was to evaluate five commercially available streptokinase formulations in Brazil by comparing their activity in euglobulin clot formation and plasminogen activation. The euglobulin lysis time was evaluated in 96-well microtiter plates. Initially, human thrombin and streptokinase were placed in individual wells and clot formation was initiated by the addition of plasma euglobulin. The increase in turbidity was measured at 340 nm every 30 s. Plasminogen activation was assayed using the plasmin specific substrate S-2251<sup>TM</sup>. Streptase<sup>TM</sup> was used as the reference formulation and showed the strongest fibrinolytic activity in the euglobulin lysis test. The formulations Unitinase<sup>TM</sup> and Solustrep<sup>TM</sup> were the least active, with about 50% of the activity of the reference formulation. All streptokinases tested activated plasminogen but there were significant differences in their activities. Streptase<sup>TM</sup> ( $15.13 \pm 1.00$  kU/L; mean  $\pm$  S.E.M., n=14) and Streptonase<sup>TM</sup> ( $18.94 \pm 0.92$  kU/L, n=16) were the most active formulations while Unitinase<sup>TM</sup> ( $6.19 \pm 0.48$  kU/L, n=12) and Strek<sup>TM</sup> ( $6.57 \pm 0.65$  kU/L, n=14) were the weakest; Solustrep<sup>TM</sup> ( $10.66 \pm 0.54$  kU/L, n=15) showed intermediate activity. The variations in the activities of the different formulations in the euglobulin lysis test and in the hydrolysis of the chromogenic substrate were closely correlated with their electrophoretic (SDS-PAGE) profiles. We conclude that the streptokinase formulations examined varied significantly in their activity *in vitro*. The clinical implications of these differences remain to be established.

## **HEMOSTASE E COAGULAÇÃO SANGÜÍNEA**

### **Aspectos gerais**

O sistema vascular fornece oxigênio e nutrientes aos tecidos e remove os produtos para excreção. Este sistema também tem a habilidade de reparar danos sofridos pelas paredes dos vasos sangüíneos e assim evitar a perda de sangue pelo local atingido. No entanto, mesmo em situações normais, os capilares estão permanentemente expostos a pequenas injúrias ocasionadas por lesões mecânicas ou químicas. Desta forma, a manutenção da integridade do sistema vascular é absolutamente vital para a sobrevivência de um indivíduo.

O sistema hemostático é capaz de identificar rapidamente um dano causado na parede de um vaso sangüíneo e promover a sua recuperação através do recrutamento inicial de células e enzimas que promovem a formação de um tampão insolúvel cuja função primordial é estancar o sangramento. O sistema hemostático, normalmente, não envolve apenas enzimas proteolíticas responsáveis pela cascata de coagulação e fibrinólise, mas também outras enzimas ativas na inflamação, manutenção da pressão sangüínea e ativação do sistema complemento.

Estas enzimas estão organizadas em cascatas na qual uma protease ativada em um passo determinado, ativa a protease do passo seguinte, promovendo assim uma amplificação do sinal resultante da ativação destas enzimas. Devido às implicações fisiológicas da ativação de uma cascata de proteases, como é a cascata de coagulação, a atividade destas enzimas deve estar sob constante controle. E este processo de ativação de proteases a partir de um precursor inativo (zimogênio) representa um fenômeno irreversível.

Após o coágulo ser formado e estabilizado, torna-se necessário à inativação e remoção destas proteases da corrente sangüínea, a fim de que não ocorra a

formação desnecessária de coágulo ou este não cresça indefinidamente e promova a oclusão do vaso sanguíneo (trombose).

A fisiopatologia da hemostasia pode ser dividida em componentes primários e secundários e é geralmente iniciada por trauma, cirurgia ou patologias. Em todos os casos ocorre lesão do endotélio vascular:

- A hemostasia primária é o processo de adesão e agregação plaquetária no sítio da lesão da parede do vaso sanguíneo. Representa a primeira ação no sentido de deter extravasamento sanguíneo pelos capilares, vênulas e arteríolas. Sua ação é bastante rápida e ocorre em apenas alguns segundos após a lesão.
  
- A hemostasia secundária consiste na ativação do sistema de coagulação sanguínea que resulta na formação da rede de fibrina. Sua ação é um pouco mais tardia do que a primária e requer alguns minutos para se completar.

Embora descrito como eventos separados, as hemostasia primária e secundária são interligadas entre si, pois as plaquetas ativadas aceleram a coagulação sanguínea e alguns componentes da cascata de coagulação, como a trombina, induzem a ativação plaquetária.

Depois de iniciada a hemostasia primária com adesão e agregação plaquetária, proteínas da coagulação plasmáticas são ativadas e inicia-se a hemostasia secundária, tanto pela via intrínseca como a extrínseca, levará ao último estágio de coagulação que é a formação do coágulo de fibrina. Este se forma a partir da conversão da protrombina em trombina, que por sua vez atua na conversão do fibrinogênio em fibrina. A trombina, além de desempenhar papel fundamental na hemostasia, ao converter o fibrinogênio em fibrina ativa também os fatores V (pró-acelerina), VI (acelerina), XII (fator Hageman), VII (proconvertina) e estimula a agregação e secreção plaquetária.

Assim que a hemostasia é completada, inicia-se o processo de lise do coágulo e reparação das veias, com participação da uroquinase e tPA (ativador de plasminogênio tecidual), que transformam o plasminogênio (Pg) em plasmina (PI). A plasmina é a principal enzima do sistema fibrinolítico que desempenha uma importante função na degradação do coágulo da rede de fibrina. Desta forma, a hemostasia é resultante do equilíbrio entre proteínas pró-coagulantes e anticoagulantes, na qual estão envolvidos os vasos, as plaquetas, as proteínas da coagulação e da fibrinólise e os anticoagulantes naturais (TABOR *et al.*, 1992). Muitos fatores, genéticos ou adquiridos, podem contribuir para romper este equilíbrio, levando a estados de hipo ou hipercoagulabilidade. Como manifestação de um estado de hipercoagulabilidade, a trombose constitui um problema clínico de considerável gravidade e morte ocasional (DAHLBÄCK, 1995; JANSSEN, 1997).

Evidências têm mostrado que a trombose pode contribuir para a ocorrência da doença cardíaca coronariana, não somente como uma complicação aguda do desprendimento e ruptura da placa de ateroma, mas também como uma causa contínua do processo crônico da aterogênese (DAHLBÄCK, 1995; JANSSEN, 1997).

A trombose da artéria coronária ocorre principalmente em um local acometido por lesão aterosclerótica e resulta em uma situação clínica denominada de infarto agudo do miocárdio (IAM). Considerando-se as características patológicas aterotrombóticas do IAM, é razoável especular que os efeitos dos fatores de risco trombóticos interagem sinergicamente com os fatores de risco ateroscleróticos, aumentando a sua ocorrência (SISCOVICK *at al.*, 1997). São muitos os fatores de risco relacionados com o infarto, entre eles a idade e o sexo, sendo rara a sua incidência em pessoas com menos de 45 anos de idade e em mulheres jovens. Outros fatores de risco como o tabagismo, a obesidade, a hipercolesterolemia, a hipertensão e o diabetes contribuem para o desenvolvimento do IAM (SISCOVICK *at al.*, 1997). Fatores de risco trombótico, como o aumento dos níveis plasmáticos de fibrinogênio, fator VII, inibidor do

ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) e outros, também estão relacionados com a incidência de doença coronária (GRUNDY, 1998).

### **Endotélio vascular e ativação pró-inflamatória**

Em primeira análise, o endotélio vascular é uma barreira protetora que separa as células sangüíneas e os fatores plasmáticos dos elementos reativos de camadas internas do vaso sangüíneo (fator de Willebrand e fator tissular). O endotélio vascular é um órgão regulador da hemostase, como exemplo, na hemostase cardiovascular, onde a disfunção endotelial está presente em diversas doenças cardiovasculares (CHAGAS e PEREIRA; 2004).

A ativação de células endoteliais por citocinas pró-inflamatórias ou agentes infecciosos pode estar associada à diminuição das propriedades antitrombóticas. A disfunção endotelial é caracterizada pela redução na capacidade vasodilatadora decorrente da redução ou atenuação dos efeitos do fator de relaxamento endotelial (óxido nítrico), da bradicinina, prostaglandinas, fator natriurético atrial e um aumento de stress oxidativo, um importante promotor no processo inflamatório (BONETTI *et al.*; 2003; SELA *et al.*; 2002; BATLOUNI *et al.*; 1999). Dessa forma, a ativação pró-inflamatória exerce um papel importante na fisiopatologia, como por exemplo, na insuficiência cardíaca onde ocorre uma correlação entre níveis elevados de fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa), interleucina 1 e 6, e piora da função miocárdica. (BACAL *et al.*; 2002).

Portanto, o endotélio vascular tem a função de manter a fluidez sangüínea, promovendo a fibrinólise e inibindo a agregação plaquetária e a coagulação sangüínea.

### **Plaquetas**

A principal função das plaquetas na hemostase consiste em iniciar o processo hemostático, auxiliando a interromper o extravasamento de sangue e reparar lesões nas paredes dos vasos sangüíneos. Após ruptura do endotélio, as plaquetas aderem à estrutura exposta da matriz subendotelial. Entre os componentes da matriz subendotelial encontram-se várias glicoproteínas

adesivas, como: fator de von Willebrand (vWF), fibronectina, vitronectina, trombospondina, colágeno e laminina (McEVER, 1990). Estas proteínas contêm domínios reconhecidos por receptores específicos da superfície plaquetária, o que permite a interação da superfície celular com a matriz. O domínio melhor caracterizado é a seqüência do tripeptídeo arginina-glicina-ácido aspártico (RUOSLAHTI *et al.*, 1987). Esta seqüência pode ser identificada por várias integrinas presentes na superfície celular, muitas das quais reconhecem a seqüência arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) em mais de uma glicoproteína adesiva. As plaquetas possuem muitos receptores para proteínas adesivas tornando-as muito eficientes no processo de adesão à matriz subendotelial.

A interação das plaquetas com o subendotélio ocorre inicialmente através da ligação do FVIII/fator de von Willebrand (FVIII/vWF) com o complexo glicoproteína Ib-IX. Esta interação ocorre com o fator de vWF presente no subendotélio ou com aquele circulante no plasma (RUGGERI *et al.*, 1983; TURITTO *et al.*, 1985). Quando as plaquetas são submetidas a condições experimentais sob fluxo lento e, principalmente, na ausência deste, a adesão pode ocorrer com outras glicoproteínas. Esta adesão com diferentes proteínas adesivas é um fator importante após a interação inicial das plaquetas com o vWF. A interação do colágeno com a GPIV (glicoproteína IV) e com a integrina GP Ia/IIa (glicoproteína Ia/IIa) é a mais importante destas interações (KUNICKI *et al.*, 1981; TIMMONS *et al.*, 1984). Além disso, o receptor para vitronectina pode se ligar também ao fibrinogênio, vWF e trombospondina (LAM *et al.*, 1989).

Após a adesão das plaquetas ao subendotélio, a ativação de receptores presentes na membrana plasmática altera o metabolismo plaquetário e induz a secreção e agregação. A interação com o colágeno promove a ativação e agregação plaquetária. Isto é confirmado pelos experimentos *in vitro* onde o colágeno funciona como um forte agonista plaquetário (WILNER *et al.*, 1968), induzindo a secreção dos grânulos e a síntese do TXA<sub>2</sub> mesmo na ausência de agregação. Somente o colágeno presente na sua conformação nativa de tripla hélice pode estimular a mudança de forma e a secreção dos grânulos plaquetários (CHESNEY *et al.*, 1972; ZACHARSK *et al.*, 1992).

## Cascata de Coagulação

A coagulação se dá em decorrência da transformação do fibrinogênio em fibrina insolúvel. O sistema de coagulação consiste em um conjunto de proteínas próteolíticas, que atuam umas sobre as outras, num sistema de cascata. Em cada etapa, o zimogênio de um fator de coagulação sofre uma proteólise limitada e é convertido numa protease ativa. Esta protease ativa o fator seguinte da coagulação, até que, afinal, se forme o coágulo sólido de fibrina.

O sistema de coagulação é ativado em duas vias: via intrínseca e via extrínseca. Na via intrínseca todos os fatores estão presentes na corrente sangüínea, já na extrínseca temos o início da ativação do sistema pela ativação do FVII a FVIIa por atuação de um fator que não está presente no sangue, o fator tecidual, proveniente do subendotélio vascular. Porém, *in vivo*, esta divisão não ocorre, pois o complexo fator tecidual/ fator VIIa é um potente ativador de fator IX e fator X, fazendo a coagulação se desenvolver rapidamente (COLMAN *et al*, 1994).

Na lesão de um vaso, temos a ruptura do endotélio e exposição do subendotélio. No subendotélio, dentre outras proteínas, encontramos o fator tecidual (TF). Este TF, na “via extrínseca”, em combinação com fator VIIa e fosfolípídeos (PL) converte fator IX em IXa e fator X em Xa. A “via intrínseca” inclui a ativação do fator XI pelo complexo cininogênio de alto peso molecular (Hka)/ fator XIIa. O fator XIa também converte fator IX em IXa que por sua vez, em combinação com fator VIIIa, PL e íons cálcio (complexo tenase) converte fator X em Xa. O fator Xa mais o fator Va, PL e íons cálcio formam o complexo protrombinase, que converte protrombina (FII) em trombina (FIIa).

A trombina é uma proteína multifuncional, atuando em várias etapas da coagulação regulando positivamente ou negativamente o processo. A trombina converte fibrinogênio em fibrina por hidrólise e liberação de fibrinopeptídeos A e B (FPA e FPB), ativa FXIII (transglutaminase) que estabiliza o coágulo de fibrina por ligações cruzada e ativa as plaquetas, FV, FVIII e FXI. Na presença de trombomodulina, inibe o processo ativando a proteína C, o melhor anticoagulante natural que degrada os fatores Va e VIIIa (MANN, 1998; DIBELLA *et al.*, 1995)

impedindo que a reação de coagulação ocorra, já que estas proteínas fazem parte dos complexos protrombinase e tenase, respectivamente.

Alguns inibidores plasmáticos naturais retardam a coagulação: o C1-inibidor (C1-INH) neutraliza fator XIIa, o inibidor da via do fator tissular (TFPI) bloqueia o complexo fator VIIa/TF, enquanto que a antitrombina III (ATIII) bloqueia os fatores IXa, Xa e trombina (COLMAN *et al.*, 1994). A atividade inibitória da ATIII é fortemente potencializada pela heparina (BAUER, 2002; ROEMISCH *et al.*, 2002; WEITZ, 2002). Na inibição da cascata de coagulação temos também as proteínas C (PC) e S (PS). A PC torna-se uma protease ativa ao formar um complexo com a TM (trombomodulina) e a FIIa (trombina), sendo auxiliada pelo co-fator PS. A PC promove a proteólise dos fatores V (pró-acelerina) e VIII (anti-hemofílico) inibindo a produção adicional de trombina.

## **SISTEMA FIBRINOLÍTICO**

A fibrina formada ativa uma pequena quantidade de t-PA (ativador tissular de plasminogênio), que por sua vez transforma o Pg em PI. Esta plasmina pode seguir quatro vias possíveis de reação: (a) ser inibida pela  $\alpha_2$ -antiplasmina ( $\alpha_2$ -Pn), (b) ativar o zimogênio pro-uroquinase a uroquinase, (c) ativar t-PA e (d) degradar o coágulo de fibrina. A reação (a) inibe a fibrinólise, enquanto (b) e (c) reforçam a fibrinólise. A reação (d) é o curso da fibrinólise, processo que dissolve o coágulo sangüíneo restabelecendo a fluidez do sangue. A ativação do t-PA e da pro-uroquinase é inibida pelo inibidor de ativador de plasminogênio (PAI) (SCHOUSBOE e HALKIER, 1991).

Até 1990, o sistema fibrinolítico era descrito com base nos mecanismos de ativação do Pg e nos mediadores de ativação da PI em locais onde ocorre formação e acúmulo da rede de fibrina. Recentemente, métodos desenvolvidos para promover a ativação ou inativação específica de diversos genes responsáveis pela expressão de proteínas essenciais para o desenvolvimento da



cascata de coagulação ou da fibrinólise, demonstraram que o sistema fibrinolítico não tem função restrita apenas à dissolução de rede de fibrina, mas também na regulação da atividade celular e desenvolvimento de tecidos (DOBROVOLSKY e TITAEVA, 2002).

### **Plasminogênio e plasmina**

O plasminogênio é secretado pelo fígado como uma glicoproteína de cadeia única e com 791 resíduos de aminoácidos possuindo um Glu na extremidade amino-terminal. As moléculas de Pg contem vários domínios para ligação de lisina (Lys) e o domínio C-terminal é homólogo a outras enzimas do tipo tripsina (DOBROVOLSKY e TITAEVA, 2002). O Pg pode ser clivado pela PI nas ligações peptídicas entre Arg67-Met68, Lys76-Lys77, ou Lys77-Val78, liberando um peptídeo da extremidade amino-terminal de 8 kDa e formação do Lys-plasminogênio, o qual na ausência de fibrina é ativado mais rapidamente do que Glu-plasminogênio.

A clivagem da ligação peptídica Arg561-Val562 converte o Pg na enzima ativa Pg, a qual consiste de duas cadeias polipeptídicas ligadas por uma ligação de dissulfeto. A cadeia pesada-A é originada da extremidade amino-terminal e possui todos os domínios para ligação de Lys. A cadeia leve-B possui o sítio catalítico constituído de His602, Asp645 e Ser740. A cadeia leve quando é isolada da PI após redução da ligação de dissulfeto, apresenta especificidade ao substrato similar a tripsina. A especificidade da PI é conferida pelas propriedades da sua cadeia pesada (DOBROVOLSKY e TITAEVA, 2002).

A PI é uma serino-protease produzida continuamente na circulação e está envolvida no processo de dissolução dos coágulos do modo fibrina-dependente (BACHMAN, 1994). Esta enzima não degrada somente as fibras de fibrina, mas também atua como enzima proteolítica digerindo fibrinogênio e outros fatores da coagulação.

A produção contínua de PI circulante não impede que o sistema de coagulação seja ativado, pois ocorre a formação do complexo PI- $\alpha$ 2-antiplasmina

(GUYTON *et al.*, 1996). Além da  $\alpha$ 2-antiplasmina ( $\alpha$ 2-AP), a  $\alpha$ 2-macroglobulina ( $\alpha$ 2-Mg) é um importante inibidor desta enzima proteolítica (KEYT *et al.*, 1994). A  $\alpha$ 2-antiplasmina é uma glicoproteína de cadeia única de 70 kDa, pertencente à família dos inibidores de serino-protease e é secretada pelo fígado (BANGERT *et al.*, 1993).

### **Ativadores de plasminogênio**

O ativador de plasminogênio tecidual (t-PA) é sintetizado e secretado pelas células endoteliais como uma enzima ativa de cadeia única com 70 kDa. À semelhança da PI, o domínio C-terminal do t-PA é homólogo às enzimas do tipo tripsina. O sítio ativo é composto de His322, Asp371 e Ser478 (PENNICA *et al.*, 1983). O uso da tecnologia do DNA recombinante tem permitido a produção em larga escala do t-PA e seu uso na terapia trombolítica.

Na ausência de fibrina, t-PA ativa o Pg muito lentamente. No entanto, quando fibrina está presente tanto o t-PA como o Pg ligam-se nas moléculas de fibrina. A formação deste complexo de três componentes aumenta a eficiência do t-PA em mais de 1000 vezes (NORMAN *et al.*, 1985). A ativação do Pg pode ser induzida, com menor eficiência, por outros fatores além da PI, tais como membranas celulares e proteínas da matriz extracelular, principalmente trombospondina e colágeno tipo IV (STACK *et al.*, 1990).

Uroquinase (u-PA) representa outro ativador do Pg (RIJKEN e SAKHAROV, 2001). A uroquinase tem 54 kDa e pode estar presente em duas formas, uma de cadeia simples, chamada de ativador de plasminogênio do tipo uroquinase de cadeia simples (scu-PA), e outra com duas cadeias polipeptídicas unidas por uma ligação de dissulfeto chamado de ativador de plasminogênio do tipo uroquinase de cadeia dupla (tcu-PA). O domínio amino-terminal da uroquinase é homólogo ao fator de crescimento epidermal (EGF) e a extremidade C-terminal é homóloga às enzimas do tipo tripsina (VERSTRAETE, 2001; MAKSIMENKO, 1995).

### **Inibidores da ativação do plasminogênio**

Quatro proteínas distintas da família dos inibidores de serino-protease (serpinas) têm sido descritas como inibidores da ativação do fibrinogênio. No sangue normal, t-PA e tcn-PA são inibidos principalmente por uma glicoproteína de 52kDa sintetizada pelo endotélio, chamada de inibidor do ativador de plasminogênio do tipo 1 (PAI-1). Inibidor do tipo 2 (PAI-2) inibe fortemente tcn-PA e é sintetizado pela placenta, monócitos e macrófagos. Em indivíduos normais PAI-2 não é detectado, mas pode estar presente em diferentes doenças (DROBROVOLSKY e TITAEVA, 2002). Inibidores descritos como dos tipos 3 e 4, PAI-3 e PAI-4, foram identificados posteriormente como potentes inibidores da proteína-C e da protease nexin-I, respectivamente (KRISHNAMURTI e ALVING, 1992; JUHAN-VAGUE e ALESSI, 1997).

Uma grande quantidade de PAI-1 (aproximadamente 90% do total) é armazenado nos  $\alpha$ -grânulos de plaquetas. Após ativação, as plaquetas liberam o PAI-1, aumentando de forma significativa a concentração local de PAI-1 no sítio de formação do trombo. Desta forma, as plaquetas podem contribuir para a estabilização da rede de fibrina (KRUITHOF *et al.*, 1986; KEYT *et al.*, 1994).

A síntese de PAI-1 é afetada por vários fatores, incluindo: insulina, citosinas, TGF- $\beta$  (fator de crescimento beta), trombina, lipoproteínas aterogênicas, além de outros (DROBROVOLSKY e TITAEVA, 2002). Os níveis sanguíneos de PAI-1 aumentam drasticamente em doenças provocadas por alterações da hemostasia. Desta forma, os níveis de PAI-1 em indivíduos normais e pacientes variam enormemente, indicando que este inibidor pode ser um determinante principal da atividade fibrinolítica *in vivo*. Evidências diretas da relação entre os níveis de expressão do PAI-1 e trombose foram obtidas em camundongos transgênicos para o cDNA do PAI-1 humano. Nestes animais, trombos venosos foram desenvolvidos em maior número durante o período de síntese aumentada do PAI-1 e foram eliminados após diminuição da expressão do PAI-1 (ERICKSON *et al.*, 1990).

### **Inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI)**

O inibidor da fibrinólise ativado pela trombina é secretado pelo fígado e possui uma cadeia glicoproteica única de 58-kDa estando presente em uma concentração plasmática de aproximadamente 200 nM (EATON *et al.*, 1991; STRÖMQVIST *et al.*, 2001). A ativação do TAFI é catalisada pelo complexo plasmina-plasminogênio (EATON *et. al*, 1991; MAO *et al.*, 1999), tripsina (EATON *et. al*, 1991) e trombina (EATON *et. al*, 1991; BAJZAR *et. al*, 1996).

A sua ativação depende da clivagem na posição Arg92, originando um peptídeo de ativação com 92 aminoácidos ( $\cong$ 15 kDa) e uma enzima com 309 aminoácidos (TAFIa) e massa de 35 kDa (EATON *et. al*, 1991). TAFIa (inibidor da via do fator tecidual ativado) possui afinidade pelo Pg dez vezes menor, o que sugere que a ligação ao Pg é facilitada pelo peptídeo de ativação, mesmo que o papel fisiológico exato desta interação não tenha ainda sido elucidado (TAN E EATON, 1995).

TAFIa possui atividade enzimática do tipo carboxipeptidase B, inibindo a fibrinólise pela provável remoção de lisinas da extremidade C-terminal da fibrina, parcialmente degradada pela PI. Sendo assim, TAFI e sua ativação constituem uma via antifibrinolítica análoga à via anticoagulante da PC (BAJZAR *et. al*, 2000).

### **AGENTES FIBRINOLÍTICOS**

Os agentes fibrinolíticos são drogas de escolha na terapia de lise dos coágulos no IAM (THE GUSTO INVESTIGATORS, 1993). Esses compostos estimulam a degradação da fibrina. Esta degradação do coágulo ocorre normalmente pela ativação do Pg (FRANGOS *et al.*, 2000).

As opiniões quanto a glicosilação da cadeia polipeptídica da estreptoquinase são controversas. A estreptoquinase foi classificada como uma glicoproteína em estudos realizados nas décadas de 60 e 70 (TAYLOR e BOTTS, 1968; CASTELLINO *et al.*, 1976). Dados mais recentes que seguiram o

sequenciamento do DNA genômico da bactéria *Streptococcus* beta-hemolítico nos grupos A, C e G e análises de seus produtos gênicos, não evidenciaram nenhuma modificação pós-traducional. Conseqüentemente, não foi confirmada nestes estudos a presença de glicosilação em proteínas sintetizadas por cada grupo específico de bactéria. Uma outra informação obtida quanto ao sequenciamento do DNA genômico da bactéria *Streptococcus* beta-hemolítico é de que esta proteína não apresenta nenhum aminoácido cisteína, portanto, não contém pontes de dissulfeto na sua constituição (JACKSON e TANG, J., 1982; MALKE *et al*, 1985; WALTER *et al.*, 1989, a, b; FERRATI *et al.*, 2001).

Os agentes fibrinolíticos de primeira geração são: estreptoquinase (SK) e uroquinase (UK); A SK é uma proteína de 47 kDa produzida por *Streptococcus* dos grupos A, C e G que interage com o Pg para formar um complexo estreptoquinase-plasminogênio capaz de converter outras moléculas de Pg em PI. Já a UK é sintetizada pelo rim humano, não é uma droga antigênica, e apesar do seu alto custo, tem sido utilizada em pacientes alérgicos à SK (ROSCHLAU, 1988). Os agentes fibrinolíticos de segunda geração são os ativadores de plasminogênio tecidual recombinante (rt-PA), ativadores de plasminogênio do tipo UK de cadeia única, ativador do complexo SK-Pg acetilado ou não acetilado (APSAC) e pró-uroquinase (r-pro-UK). Todos os agentes fibrinolíticos, incluindo o APSAC (não disponível comercialmente), rt-PA e r-pro-UK produzem uma grande quantidade de produtos de degradação do Pg ou fibrina (BELL, 2002).

Resultados de avaliações de casos clínicos isolados ou como parte de um estudo mais abrangente, mostraram a ocorrência de hemorragias como efeito colateral em pacientes tratados tanto com agentes de primeira como de segunda geração (BELL, 2002).

## ESTREPTOQUINASE

Estreptoquinase, um derivado bacteriano que não está presente no organismo humano, representa um potente ativador de Pg. Estreptoquinase e tPA recombinante têm sido usados terapeuticamente para induzir fibrinólise em pacientes com desordens agudas de trombose.

Estreptoquinase é uma proteína produzida por *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos dos grupos A, C e G (TILLET e GARNER, 1933). Esta proteína interage com o Pg para formar um complexo estreptoquinase-plasminogênio capaz de converter outras moléculas de Pg em PI. Diferentemente da uroquinase e do tPA, a estreptoquinase não ativa o Pg pela sua clivagem, mas forma um complexo na proporção molar de 1:1 com o Pg. Esta interação resulta na exposição de um sítio ativo no Pg, seguida pela rápida degradação da estreptoquinase para uma forma com 36 kDa e conversão de Pg em PI.

O nome estreptoquinase (streptokinase) foi atribuído em 1945 (CHRISTENSEN e MACLEOD, 1945) e a reação estequiométrica com o plasminogênio foi descrita em 1948 (RATNOFF, 1948). A estreptoquinase é uma glicoproteína com uma única cadeia polipeptídica e massa que varia de 45 a 50 kDa. O conteúdo total de carboidrato na molécula é muito baixo, correspondendo a menos de 10% da massa final da proteína (TAYLOR e BOTTS, 1968; CASTELLINO *et al.*, 1976). Determinação da sua estrutura primária mostra uma isoleucina na extremidade amino-terminal, lisina na carboxi-terminal e ausência de ligação de dissulfeto intracadeia (MORGAN e HENSCHEN, 1969). A estrutura secundária é predominantemente enovelamento ao acaso e cerca de 10% de alfa-hélice (TAYLOR e BOTTS, 1968; CASTELLINO *et al.*, 1976). A cadeia polipeptídica um ponto isoelétrico de 4,0 (JOHNSON e McCARTY, 1959; LOCH *et al.*, 1968).

O complexo estreptoquinase-plasminogênio tem uma serina no sítio catalítico (REDDY e MARKUS, 1972). Desta forma, o complexo é capaz de clivar a ligação Arg560-Val561, convertendo tanto o Pg complexado como o livre em PI. Sendo assim, o complexo estreptoquinase-plasmina formado nesta reação atua

também como um ativador de outras moléculas de Pg (McCLINTOCK *et al.*, 1974; SUMMARIA *et al.*, 1974). Ao mesmo tempo em que o Pg é convertido em PI, a molécula de estreptoquinase dentro do complexo ativador sofre degradação proteolítica. Fragmentos de 10 a 40 kDa são formados durante este processo, sendo que todos possuem atividade residual para ativação de Pg (BROCKWAY e CASTELLINO, 1974; CASTELLINO *et al.*, 1976).

O complexo ativador da SK promove uma rápida produção de PI circulante em locais distantes dos coágulos de fibrina. No entanto, o aumento na produção de PI acarreta na formação de bradicinina, o que por sua vez causa uma diminuição da pressão sangüínea. Sendo assim, a infusão intravenosa de SK é realizada muito lentamente a fim de reduzir estes efeitos adversos, mas este procedimento pode reduzir o seu potencial de ação (POLGAR e REED, 1999).

A estreptoquinase interage com várias formas do Pg, incluindo Glu-plasminogênio, Lys77-plasminogênio, Val442-plasminogênio e cadeia  $\beta$ -plasmina (SUMMARIA *et al.*, 1974). Estudos *in vitro* demonstraram que a atividade do complexo ativador varia de acordo com o tamanho do fragmento de estreptoquinase e a forma do plasminogênio/plamina que faz parte deste complexo. A função ativadora do complexo é proporcional ao tamanho do fragmento de estreptoquinase e inversamente proporcional à forma do componente plasminogênio/plamina. A maior atividade é observada com o componente  $\beta$ -plasmina (MARKUS *et al.*, 1976; WOHL *et al.*, 1978; LEE *et al.*, 1988; TAKADA, A. e TAKADA, Y.; 1982).

Devido ao fato da estreptoquinase não ser uma proteína natural em humanos, ela possui propriedades antigênicas e pode induzir a produção de anticorpos anti-estreptoquinase. O "clearance" da estreptoquinase depende da disponibilidade do Pg. Duas meias vidas distintas foram encontradas para a eliminação da estreptoquinase (BELL, 2002). A primeira é de 18 minutos e representa o clearance após a ligação com anticorpos ou inibidores (representa cerca de 80-85% de uma dose única administrada por via intravenosa). A segunda meia vida é em aproximadamente 83 minutos e representa cerca de 10 a 15% da dose administrada.

## **Administração e efeitos adversos**

A administração de SK normalmente é intravenosa e geralmente ocorre associada à administração de aspirina e anticoagulantes (CAMPO, 1999). Os efeitos colaterais mais freqüentes associados à administração de SK são: braquicardia, arritmias, náusea (CAMPO, 1999). Durante a infusão de SK a formação de bradicinina resulta em hipotensão arterial e pode acarretar em danos aos túbulos renais (SMITH e MILLS, 1998).

Portanto a administração de SK deve ser avaliada considerando seus riscos e benefícios (PETCH, 1990). Estudos indicam que três em dez pacientes com infarto agudo do miocárdio tem suas vidas salvas com terapias trombolítica. (NAZARI *et al.*, 1987) e que a sobrevida vem acompanhada de melhora da função ventricular e na redução de complicações cardiovasculares. A administração trombolítica pode prolongar a sobrevida em aproximadamente oito anos (FOX, 1999). No Brasil, 27,6% das doenças relacionadas ao aparelho circulatório no Brasil resultam em óbito. E dessa porcentagem 29,5% são devido a doenças isquêmicas do coração (BRASIL, 2000). Segundo projeções para o ano de 2020, no Brasil a cardiopatia isquêmica será uma das principais causas de morte e incapacitação (MATOS *et al.*, 2004).

Em todo o mundo, entre 400.000 e 500.000 pacientes recebem terapia trombolítica por ano. Baseados em estudos clínicos multicêntricos, alguns autores recomendam a dose de 1.500.00 UI como sendo apropriada para o tratamento do infarto agudo do miocárdio. No entanto, não se sabe ao certo os efeitos provenientes do uso de doses significativamente diferentes daquela recomendada (CANNON, 2000; WARDLAW, 2003).

Cinco formulações de estreptoquinase comercializadas no Brasil e provenientes de diferentes fornecedores foram analisadas quanto à sua atividade fibrinolítica *in vitro*. Cada uma das estreptoquinases utilizadas neste trabalho é comercialmente disponível nas concentrações de 250.000, 750.000 e 1.500.000 UI por frasco. Neste trabalho, comparamos as formulações com 1.500.000 UI por frasco, sendo que a atividade enzimática contida em diferentes formulações pode



variar entre 80-125% (P= 0,95) da sua potência original, como estabelecido pela Farmacopéia Européia (SCHNADELBACH, 1997).

## **METODOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA**

### **Fibrinólise**

O método para determinação do tempo de lise do coágulo da euglobulina (TLE) tem sido utilizada como teste de rotina para avaliação da fibrinólise sistêmica, principalmente para estudar o efeito dos ativadores de Pg (HOLMDAHL *et al.*, 1981).

A fração de euglobulina plasmática é um precipitado isoelétrico contendo Pg, fibrinogênio e ativadores de Pg, enquanto muitos inibidores de PI concentram-se no sobrenadante (DAVIDSON *et al.*, 1990). Portanto, os ativadores de Pg podem expressar sua atividade, sem interferência dos inibidores plasmáticos. A atividade fibrinolítica da fração de euglobulina correlaciona-se diretamente com a concentração de ativadores de Pg extrínsecos ( RIJKEN *et al.*, 1983; BROMMER *et al.*, 1984).

A análise turbidimétrica para avaliar a dissolução do coágulo de fibrina em um sistema purificado foi reportado por CARLSON *et al.* (1988) utilizando o sistema de análise de microcentrifuga e por URANO *et al.* (1989) com o uso de leitura da absorbância em microplaca. Visto que a fração plasmática de euglobulina possui pouca opacidade, a diferença de absorbância entre o coágulo de euglobulina e a solução inicial de euglobulina a 340 nm é suficientemente grande para se identificar o ponto da dissolução do coágulo. Esse método é conveniente, pois o leitor de microplaca é um equipamento comum nos laboratórios e permite analisar várias amostras simultaneamente. A análise descrita segue os princípios determinados pela Farmacopéia Européia (COMMISSIO, EUROPEAN PHARMACOPOEIA; 1998).

## **Substratos cromogênicos**

Medições feitas utilizando-se substratos sintéticos refletem a atividade enzimática. Muitas vezes é mais importante ter o conhecimento a respeito da atividade enzimática do que a quantificação da proteína normalmente obtida através de ensaios imunológicos.

Substratos sintéticos são muito sensíveis e podem detectar atividades enzimáticas presentes em baixas concentrações. Na verdade, muitas vezes eles são muito mais sensíveis do que o próprio substrato natural daquela enzima. A habilidade dos substratos cromogênicos em detectar baixas concentrações de enzimas torna-os úteis na investigação de atividades enzimáticas para pesquisa ou em controle de qualidade. Algumas vezes a correlação entre o substrato natural e sintético não é perfeita.

A hidrólise de substratos cromogênicos peptídicos por enzimas proteolíticas segue, em geral, a cinética de Michaelis-Menten. Isto significa que, se o substrato é presente em concentração suficientemente alta ou se apenas uma pequena fração do substrato é hidrolisada, a taxa de formação do produto resultando em formação de cor é proporcional à atividade da enzima. Por exemplo, a taxa de formação de paranitroanilida (pNA ou p-Nitroalanida) é medida espectrofotometricamente a 405 nm. Neste comprimento de onda o coeficiente de extinção do pNA é  $9600 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Uma unidade de atividade enzimática (kat) é definida como a quantidade de enzima que converte um mole de substrato por segundo em condições padrão. Tais condições como tipo e concentração do substrato, tampão, pH, força iônica e temperatura são fornecidas juntamente com as unidades. De acordo com a nomenclatura, uma unidade (U) é a quantidade de atividade enzimática que converte um  $\mu\text{mole}$  de substrato por minuto em condições padrão.

Quando um substrato cromogênico sensível a PI é incubado com o complexo estreptoquinase-plasminogênio, ele é hidrolisado resultando na liberação do pNA. Esta liberação é medida a 405 nm de forma contínua ao longo da reação em um espectrofotômetro ou após parar a reação com ácido acético ou

cítrico. O sinal fotométrico é diretamente proporcional à atividade da PI, a qual reflete a quantidade de Pg funcional originalmente presente na amostra.

### **Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS: teoria e aplicações**

Eletroforese pode ser resumida com a migração de moléculas carregadas em um campo elétrico. A migração destas moléculas depende da força do campo elétrico da carga líquida, tamanho e forma do composto. Outros fatores que afetam a migração são a força iônica, viscosidade e temperatura do meio no qual as moléculas estão migrando. Como ferramenta analítica, eletroforese é simples, rápida e altamente sensível. A eletroforese tem sido utilizada analiticamente para estudar as propriedades de moléculas com carga elétrica e também como técnica de separação. Geralmente a amostra migra em uma matriz tal como o gel de poliacrilamida. Este polímero é manuseado com facilidade e pode ser utilizado em concentrações superiores à do gel de agarose. A poliacrilamida é utilizada amplamente para separar muitas proteínas e pequenos oligonucleotídeos, aos quais requerem migração em um gel com poros pequenos que possibilitem a separação das moléculas.

Proteínas são compostos anfóteros e sua carga líquida depende do pH da solução. Em pH acima do seu ponto isoelétrico, a proteína assume carga negativa e migra para o pólo anodo. Em pH abaixo do ponto isoelétrico a carga líquida da proteína é positiva fazendo com que a mesma migre para o catodo.

Dodecilsulfato de sódio (SDS) é um detergente aniônico que promove a desnaturação das proteínas devido a sua capacidade de se ligar aos resíduos de aminoácidos e forma uma capa de cargas negativas em volta do esqueleto polipeptídico. O SDS liga-se a proteína em proporção da massa de 1.4:1 o que proporciona carga negativa proporcional ao comprimento da cadeia polipeptídica. Desta forma, as cadeias polipeptídicas possuem a mesma densidade de cargas por unidade de comprimento. Faz-se necessário à redução de pontes de dissulfeto a fim de se garantir que as proteínas assumam uma configuração de filamentos o que é necessário para a separação por tamanho. A redução é normalmente feita

na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol ou ditioneitol (DTT). Em gel de poliacrilamida-SDS sob condições desnaturantes, a migração pelo peso molecular e não pela carga elétrica intrínseca da cadeia polipeptídica.

No sistema descontínuo, utiliza-se um gel com poros grandes chamado de gel de empacotamento, montado no topo de um gel de separação chamado de gel de resolução. Em cada gel utiliza-se tampão com pH diferente. O tampão utilizado nos reservatórios superior e inferior é diferente daquele utilizado no preparo dos géis. A resolução obtida em sistema descontínuo é muito maior do que no sistema contínuo.

### **Formulações comerciais de Estreptoquinase**

É denominada de princípio ativo ou fármaco a substância presente na formulação do medicamento e responsável pelo efeito terapêutico.

No mercado nacional os medicamentos são classificados como:

- Medicamento de referência ou de marca – é um produto inovador registrado na ANVISA e comercializado no Brasil. Nestes medicamentos, a eficácia, segurança e qualidade foram comprovadas cientificamente junto ao Ministério da Saúde através da ANVISA, por ocasião do registro (BRASIL, 1999).
- Medicamento genérico - é similar a um produto de referência, que se pretende ser com este intercambiável, ou seja, equivalente terapêutico a um medicamento de referência, sendo comprovado os mesmos efeitos quanto à eficácia e segurança (BRASIL, 1999). Este tipo de medicamento é geralmente produzido após a expiração ou renúncia da proteção patentária ou de outros direitos de exclusividade, comprovada a sua eficácia, segurança e qualidade, e designado pela DCB (Denominação Comum Brasileira) ou, na sua ausência, pela DCI (Denominação Comum Internacional). E o mais importante: é tão seguro e eficaz quanto o medicamento de marca, mas em geral custa menos (BRASIL, 1999).
- O medicamento similar contém o mesmo ou os mesmos princípios ativos, apresenta a mesma concentração, forma farmacêutica, via de

administração, posologia e indicação terapêutica, e que é equivalente ao medicamento registrado no Ministério da Saúde através da ANVISA, podendo diferir somente em características relativas ao tamanho e forma do produto, prazo de validade, embalagem, rotulagem, excipientes e veículos, devendo sempre ser identificado por nome comercial ou marca (BRASIL, 1999). Os medicamentos similares são comercializados sob nomes-fantasia e também sob a DCB que, de um modo geral, não comprovaram - através de testes apropriados - a equivalência com os medicamentos de referência. Devido aos medicamentos similares possuírem o mesmo princípio ativo (na mesma concentração), mesma formulação farmacêutica, via de administração e posologia do medicamento de referência (ou marca), não comprovaram - através de testes apropriados - a equivalência com os medicamentos de referência. Ou seja, não comprovaram sua intercambialidade (BRASIL, 1999).

As cinco formulações de estreptoquinase que analisamos neste trabalho são classificadas como:

- Streptase™ (Hoechst Marion Roussel S/A), classificada como medicamento de referência;
- As demais formulações são classificadas como medicamentos similares: Unitinase™ (Meizler Comércio Internacional S/A), Solustrep™ (Laboratório Químico Farmacêutico Bergamo Ltda), Streptonase™ (Blausigel Ind. e Com. Ltda) e Streck™ (Libra Produtos Laboratoriais Ltda).

Foi verificado no dia 05/08/2004 o valor médio e absoluto comercial de cada uma das cinco formulações de estreptoquinase (1.500.000 UI):

- \* Streptase™ – R\$774,23 (n=3)
- \* Unitinase™ - R\$912,25 (n=1)
- \* Solustrep™ - R\$334.14 (n=1)
- \* Streptonase™ – R\$780,74 (n=3)
- \* Streck™ – R\$ 912,45 (n=2)

Nós analisamos o princípio ativo estreptoquinase das cinco formulações comerciais através de testes bioquímicos *in vitro*.

Esse trabalho teve como objetivo analisar cinco formulações de estreptoquinase disponíveis em hospitais do Brasil através dos seguintes parâmetros:

1. Comparação das propriedades fibrinolíticas presentes nas formulações de estreptoquinase através dos métodos:
  - Teste de lise da euglobulina plasmática humana (TLE);
  - Ativação do plasminogênio e hidrólise do substrato sintético S-2251 específico para plasmina.
2. Análise comparativa dos resultados obtidos com os métodos de avaliação da atividade fibrinolítica.
3. Avaliação da composição protéica através da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e da avaliação densitométrica de cada banda protéica.

**ARTIGO "IN PRESS"**

**ANALYSIS OF FIVE STREPTOKINASE FORMULATIONS  
USING EUGLOBULIN LYSIS TEST AND PLASMINOGEN  
ACTIVATION ASSAY**

**L.T. Couto; J.L. Donato and G. de Nucci.**



**ANALYSIS OF FIVE STREPTOKINASE FORMULATIONS USING  
EUGLOBULIN LYSIS TEST AND PLASMINOGEN ACTIVATION  
ASSAY**

**L.T. Couto; J.L. Donato and G. de Nucci.**

Department of Pharmacology – Faculty of Medical Sciences – UNICAMP,

Campinas, SP - 13084-970

**RUNNING TITLE: *IN VITRO* STREPTOKINASE ACTIVITY**

**Key words:** Streptokinase • Plasminogen • Plasmin • substrate S-2251™ •

Correspondence: G. de Nucci

Department of Pharmacology

Faculty of Medical Sciences

UNICAMP

Campinas, SP

13084-970

Fax: 55 (19) 32427439

E-mail: [denucci@dginet.com.br](mailto:denucci@dginet.com.br)

## abstract

Streptokinase, a 47 kDa protein isolated and secreted by most group A, C and G from  $\beta$ -hemolytic streptococci, interacts and activates serum protein human plasminogen to form an active complex capable of converting other plasminogen molecules to plasmin. Our objective was to evaluate five commercially available streptokinase formulations in Brazil comparing the efficiency on *in vitro* tests using the euglobulin clot formation and plasminogen activation.

Euglobulin lysis time was evaluated using the 96-well microtiter plate. Initially, human thrombin (10 IU/ml) and streptokinase were placed in individual wells and clot formation was initiated by the addition of the plasma euglobulin. The turbidity was measured at 340 nm every 30s. Plasminogen activation was assayed using the plasmin specific substrate S-2251<sup>TM</sup>. Streptase<sup>TM</sup> was used as the reference formulation and showed the strongest fibrinolytic activity in the euglobulin lysis test. Formulations Unitinase<sup>TM</sup> e Solustrep<sup>TM</sup> were the weakest protein showing about 50% of the reference formulation. All streptokinases tested activated plasminogen but significant differences were also observed. Streptase<sup>TM</sup> ( $15.13 \pm 1.00$  kUnits/L/L) and Streptonase<sup>TM</sup> ( $18.94 \pm 0.92$  kUnits/L) were the most active formulations while Unitinase<sup>TM</sup> ( $6.19 \pm 0.48$  kUnits/L) and Strek<sup>TM</sup> ( $6.57 \pm 0.65$  kUnits/L) were the weakest. Solustrep<sup>TM</sup> ( $10.66 \pm 0.54$  kUnits/L) presented an intermediate activity. The variations among the different formulations for both euglobulin lysis test and chromogenic substrate hydrolysis presented a close correlation with the SDS-PAGE densitometric results. We conclude that streptokinase formulations have significant variation on their *in vitro* activity. Whether these differences have some clinical implication need to be investigated.

## INTRODUCTION

In 1933, Tillet and Garner [1] first described the exogenous plasminogen activator isolated and secreted by most groups A, C and G from  $\beta$ -hemolytic streptococci. This activator was named "streptokinase" by Christensen and MacLeod [2]. Streptokinase (Sk), a 47 kDa protein, interacts with the serum protein plasminogen (Pg) to form a streptokinase-plasminogen complex capable of converting other plasminogen molecules to plasmin. SK does not require fibrin for efficient Pg activation in the blood [3]. It is a catalytically inert, bacterial protein that has no structural homologues [4, 5]. SK can form an activator complex with plasmin, which contains a functional active site, or with Pg (lys-plasminogen – Pg) in which it nonproteolytically induces formation of a functional active site [5, 6].

The reported success of the complex formed by SK, as a therapeutic agent seems to be attributed to its unique mechanism of fibrin dependent Pg activation. When given to humans, the SK activator complex rapidly generates plasmin in the circulating blood at sites distant from fibrin clots. This mechanism depletes Pg substrate and waste plasmin's clot-dissolving (or fibrinolytic) potential [7-9]. SK is a leading agent in the treatment of acute myocardial infarction. Worldwide roughly 400,000-500,000 patients receive thrombolytic therapy per year. Many authors [10-15] based on several randomized multicenter clinical trials, recommend 1,500,000 UI being the appropriate dosage for the treatment of an acute myocardial infarction. From the clinical perspective it is unknown which influence significant deviations from the recommended dose may have.

Five Streptokinase preparations of different manufacturers were analyzed to evaluate their stated activity, content and purity. Streptase™ was used as a reference material. The activity of the samples was determined using the Euglobulin lysis time (ELT) and the chromogenic assay (CA). The content and purity of the samples was analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

The objectives of our work had been to evaluate the activity, content and purity of five streptokinase preparations commercialized in Brazil from different manufacturers.

The study revealed significant differences among the commercially available Streptokinase preparations. The SDS-PAGE demonstrated differences in purity of the commercialized products, as indicated by the bands corresponding to Streptokinase and albumin, the latter being used as a stabilizer. The Streptokinase/albumin ratio was very different among the different preparations even among those preparations that claimed having similar albumin amount.

## **MATERIALS AND METHODS**

The activity of the samples was determined in a Euglobulin lysis time (ELT) and chromogenic assay (CA). The content and purity of the samples was analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

### **Samples - Streptokinase stock solutions**

Five Streptokinase (1,500,000 UI) preparations of different manufacturers were used (Table 1). Streptase was used as the reference material. Five (5) mL of cold Milli-Q water was added in each flask to dissolve the streptokinase (1,500,000 UI). During analysis all the solutions were maintained immersed on ice. Not analyzed samples were kept frozen at -70°C until use.

### **Preparation of Human Plasma and Euglobulin Fraction**

Blood samples were obtained from 2 healthy volunteers in a resting condition by venepuncture of the antecubital vein with a minimum stasis. Samples were collected with 0.1 Vol. of 3.8% sodium citrate and plasma was prepared by centrifugation (2,000 x g) for 15 min at 4°C. Plasma samples were pooled and kept at -70°C until use.

The plasma euglobulin fraction was prepared by 10 times dilution of citrated plasma and acidification at pH 5.0 by the addition of 1% acetic acid. After standing for 1 h at 4°C the diluted plasma was centrifuged (2,000 x g) for 15 min at 4°C. The precipitate was dissolved with 0.1 M Tris HCl buffer, pH 7.4.

### **Euglobulin Clot Lysis Assay**

To determine the euglobulin lysis time we used a 96-well microtiter plate assay [16-18]. Control samples were prepared by adding 20 µL of human thrombin (10 IU/mL) and 30µl of 0.1M Tris-buffer pH 7.4 in individual wells. Test samples were prepared by adding 10µl of thrombin, 10 µl of buffer and 20 µl of streptokinase solution. Clot formation was initiated after the addition of 150 µl of the plasma euglobulin fraction. The turbidity in the wells was measured as a

function of the absorbance at 340 nm every 30 seconds for 20 min using a SPECTRAMax Microplate Spectrophotometer and the software SOFTmax PRO. Each streptokinase dilution was assayed in triplicate. To evaluate the effect of the different streptokinases on ELT, we used the software GraphPad Prisma 3.0 to plot the Log of Streptokinase IU against Log of the area under the curve (AUC). Linear regression was applied and the efficiency of each streptokinase formulation was compared to the reference Streptase™.

To evaluate the SK activity after storing the stock solution, the fibrinolytic activity was also evaluated after 24 hr at 4°C.

### **Chromogenic assay**

Plasminogen activation by streptokinase was assayed using the synthetic substrate S-2251™ (Chromogenix-Instrumentation Laboratory, Milano, Italy). S-2251™ is a chromogenic substrate for both plasmin and streptokinase-activated plasminogen. The method for the determination of activity is based on the difference in absorbance (optical density) between the pNA formed and the original substrate. The rate of pNA formation is measured at 405 nm and this photometric signal is directly proportional to the plasmin activity, which reflects the amount of functional plasminogen originally present in the sample.

The reaction was performed using 96 well plates. Control samples were prepared by adding 20 µl of 0.1 M Tris HCl buffer pH 7.4, 30 µL of substrate S2251™ (0.6 mM) and 100 µl of plasminogen solution (0.1 CU/mL). In the test samples the reaction was performed after addition of 20 µL of streptokinase solution tested at different concentrations (150 to 600 IU/mL), 30 µL of S2251™ and 100 µL of plasminogen solution. The plate was immediately placed in the plate reader previously heated at 37°C. The absorbance of the wells was measured at 405 nm every 30 seconds during 30 min. Plates were stirred during 3 secs before reading the absorbance using a SPECTRAMax Microplate Spectrophotometer and the software SOFTmax PRO. Each streptokinase dilution was assayed multiple times (minimum of 3 times).

One unit (U) was defined as the amount of enzyme activity that converts one mol of substrate per minute per Liter. Since the enzymatic activity is normally calculated using a cuvette with 1 cm of optical path, we adapted the formula to the 96-well plate taking in account a total reaction volume of 150  $\mu\text{L}$  and an optical path of 0.4 cm. At these conditions the extinction coefficient of pNA is 3840  $\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

### **Polyacrylamide Gel electrophoresis (PAGE)**

Samples were prepared for SDS-PAGE analysis diluting 50  $\mu\text{L}$  of each streptokinase stock solution in 950  $\mu\text{L}$  of Milli-Q water. Finally, 100  $\mu\text{L}$  of the diluted streptokinase solution was mixed with 100  $\mu\text{L}$  of 2x Laemmli buffer. Samples were heated at 95°C for 4 minutes to complete the reaction with the SDS and  $\beta$ -mercaptoetanol and 20  $\mu\text{L}$  of each sample was loaded in the stacking gel. PAGE was performed using a discontinuous system [19]. Samples were initially loaded and stacked in a 4% polyacrilamyde gel (stacking gel). Proteins were resolved in a 10% polyacrylamide gel (resolving gel). Sodium dodecyl sulphate (SDS) was used in combination with  $\beta$ -mercaptoetanol to denature and make all proteins negatively charged. Electrophoresis was conducted at 20 mA per gel (100-200 V) until the bromophenol blue reaches the bottom of the gel. Proteins were stained with Coomassie brilliant blue solution (0.025% Coomassie blue in 10% acetic acid) for at least 1 hour, then distained for 2 hours with 10% acetic acid. Mobility was plotted against the molecular weight of standard proteins (SigmaMarker Wide Range, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) using a semi-log scale and the molecular weight of the unknown samples was estimated by interpolation.

Densitometric analysis of the protein bands was performed using the software Scion Image for Windows (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA). To generate a density profile plot a rectangular selection area was drawn across the lanes.

### **Protein quantification**

Total protein concentration was determined using the QuantiPro™ BCA Assay Kit (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Bovine serum albumin was used as the standard protein [20].



## RESULTS

### **Euglobulin Clot Lysis Assay**

Clot formation was observed immediately after starting the readings. Turbidity increased until clot lysis was performed by activated plasmin. The resulting graph was a hyperbole and the AUC increased as the streptokinase concentration decreased. Since the lines obtained were not perfectly parallels, we performed the comparison using hundred points covering the total line length. The relative streptokinase activity was represented as the mean  $\pm$  SD of these hundred points.

Streptase™ was showed the strongest fibrinolytic activity in the euglobulin lysis test. Unitinase™ and Solustrep™ were the weakest protein showing about 50% of Streptase™ formulation (Table 2). Streptokinase activity was dramatically decreased after 24h at 4°C (Table 2).

### **Plasminogen Activation**

The incubation of streptokinase with plasminogen resulted in plasmin formation as indicated by the hydrolysis of the chromogenic substrate S-2251™. All streptokinases tested were able to activate plasminogen. However the efficiency of plasminogen activation was different among the streptokinase formulation as indicated in the Table 3. Streptase™ and Streptonase™ were the most active formulations while Unitinase™ and Strek™ were the weakest. Solustrep™ presented an intermediate activity (Table 3).

### **Gel electrophoresis (PAGE)**

The electrophoresis analysis showed two major bands. The upper band corresponded to human albumin (~67 kDa) and was the most prominent protein. The lower band was identified as the streptokinase protein confirmed by its position on the gel corresponding to a protein with 47 kDa, approximately (Figure 1). Streptase™, Solustrep™ and streptonase™ showed higher amount of

contaminating proteins in a wide molecular weight range. Unitinase™ and Strek™ were resolved as a double band.

SDS-PAGE and densitometric analysis of protein bands confirmed a significant amount variation of both human albumin and streptokinase added to each formulation (Figure 2). The total amount of albumin in each flask is indicated in the following formulations: Unitinase™ (195 mg), Solustrep™ (200 mg) and streptonase™ (200 mg). After protein quantitation in three independent determinations the variability observed for total protein amount in each flask was in agreement with the densitometric results: Unitinase™ ( $87.5 \pm 8.5$  mg), Streptase™ ( $207.1 \pm 9.8$  mg), Solustrep™ ( $374.0 \pm 32.1$  mg), streptonase™ ( $433.3 \pm 47.2$  mg) and Strek™ ( $107.8 \pm 5.1$  mg).

The protein amount specific for streptokinase is not indicated in any medicine label. The variations among the different formulations for both euglobulin lysis test and chromogenic substrate hydrolysis presented a close correlation with the densitometric results.

## CONCLUSIONS

Both ELT and chromogenic substrate assay presented similar results showing that both assays can be routinely used to evaluate SK activity. The chromogenic substrate assay has the advantage to be fast and very reproducible. In the ELT, the preparation of euglobulin fraction is laborious and this material has also the disadvantage to alter the clot activity after few hours.

The study revealed significant differences among the commercially available Streptokinase preparations. Only Streptonase™ presented similar activity on both ELT and chromogenic substrate assays when compared to Streptase™. All others SK presented significant reduction on the fibrinolytic activity. There are also significant differences regarding the protein content as presented in the SDS-PAGE and densitometric analysis.

Whether those differences may have clinical consequences deserve further evaluation by both medical professionals and regulatory authorities.

This work has been presented as a poster in the XXXV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental.

## TABLES

Table 1. Identification of the streptokinase formulations studied.

<b>Name</b>	<b>Streptokinase supplier</b>	<b>Lot #</b>
Streptase™	Hoechst Marion Roussel S/A	2482601F
Unitinase™	Meizler Comércio Internacional S/A	717102
Solustrep™	Laboratório Químico Farmacêutico Bergamo Ltda	DK0456
Streptonase™	Blausiegel Ind. E Com. Ltda	KH07K150
Strek™	Libra Produtos Laboratoriais Ltda.	717102

The streptokinase preparations were commercially available and were identified by the commercial name, manufacturer and specific lot number. All formulations contained the same amount of fibrinolytic activity (1,500,000 UI).

Table 2. Streptokinase activity (%) relative to Streptase™ and stability after 24h at 4°C.

<b>Streptokinase</b>	<b>Streptokinase activity (%) Relative to Streptase™</b>	<b>Decrease of streptokinase activity after 24h at 4°C (%)</b>
<b>STREPTASE™</b>	100	62.0 ± 4.7
<b>UNITINASE™</b>	46.8 ± 2.4	59.0 ± 3.3
<b>SOLUSTREP™</b>	52.2 ± 10.6	49.9 ± 6.7
<b>STREPTONASE™</b>	83.3 ± 15.8	63.3 ± 9.5
<b>STREK™</b>	71.6 ± 15.6	70.2 ± 3.0

To determine the euglobulin lysis time we used a 96-well microtiter plate assay. The turbidity in the wells was measured as a function of the absorbance at 340 nm every 30 seconds for 20min using a 96 well plate reader. Linear regression was applied and the efficiency of each streptokinase formulation was compared to the reference Streptase™. To evaluate the streptokinase activity after storing the stock solution, the fibrinolytic activity was also evaluated after 24 hr at 4°C. Streptokinase activity was dramatically decreased after 24h at 4°C. Results are presented as the mean ± SEM of three experiments performed in duplicate.

Table 3. Plasminogen activation induced by streptokinase.

<b>Streptokinase</b>	<b>KUnits/L (kU)</b>	<b>Ratio to the reference Streptase™</b>	<b>n</b>
STREPTASE™	15.13 ± 1.00	1.00	14
UNITINASE™	6.19 ± 0.48	0.41	12
SOLUSTREP™	10.66 ± 0.54	0.70	15
STREPTONASE™	18.94 ± 0.92	1.25	16
STREK™	6.57 ± 0.65	0.43	14

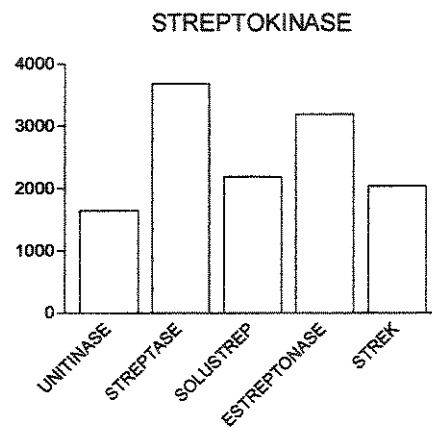
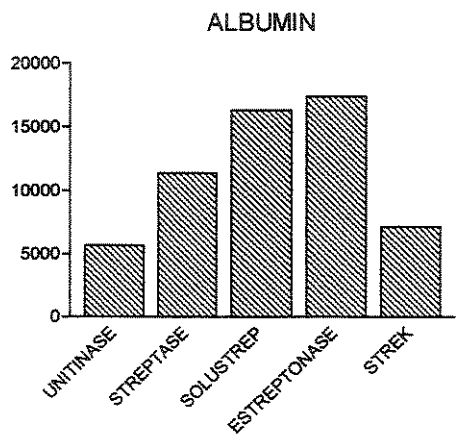
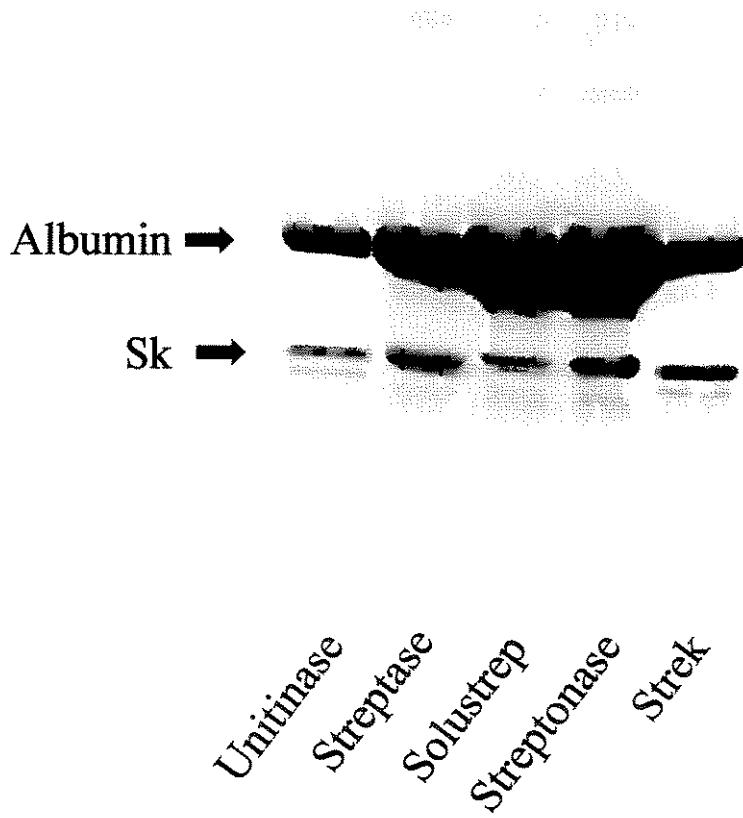
Plasminogen activation by streptokinase was assayed using the synthetic substrate S-2251™ (Chromogenix-Instrumentation Laboratory, Milano, Italy). S-2251™ is a chromogenic substrate for both plasmin and streptokinase-activated plasminogen. The method for the determination of activity is based on the difference in absorbance (optical density) between the pNA formed and the original substrate. This activity was determined adapting the reaction to the 96 well plate. One unit (U) was defined as the amount of enzyme activity that converts one mol of substrate per minute. Each of the streptokinase formulation tested was compared to the reference Streptase™. Results are presented as the mean ± SEM. The number of determination is shown in the right column.

## LEGENDS

Figure 1. SDS-PAGE analysis of protein content in five different streptokinase formulations. A) PAGE was performed using a 10% polyacrylamide gel in a discontinuous system at 20 mA per gel (100-200 V) until the bromophenol blue reaches the bottom. Proteins were stained with Coomassie brilliant blue. This result is representative of four individual experiments. B) Densitometry analysis of the protein bands measuring the areas of the density peaks. Streptokinase formulations are indicated in the bottom of the figures.

FIGURES

B





## REFERENCES

- 1 Tillet, W. S. and L., G. R. (1933). The fibrinolytic activity of hemolytic streptococci. *The Journal of Experimental Medicine*, 58: 485-502.
- 2 Christensen, L. R. and MacLeod, C. M. (1945). A proteolytic enzyme of serum: characterization, activation and reaction with inhibitors. *The Journal of General Physiology*, 28: 559-583.
- 3 Marder, V. J. and Sherry, S. (1988). Thrombolytic therapy: current status (1). *The New England Journal of Medicine*, 318: 1512-1520.
- 4 Reddy, K. N. and Markus, G. (1972). Mechanism of activation of human plasminogen by streptokinase. Presence of active center in streptokinase-plasminogen complex. *Journal of Biological Chemistry*, 247: 1683-1691.
- 5 Reddy, K. N. (1988). Streptokinase--biochemistry and clinical application. *Enzyme*, 40: 79-89.
- 6 Urano, S., Metzger, A. R. and Castellino, F. J. (1989). Plasmin-mediated fibrinolysis by variant recombinant tissue plasminogen activators *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86: 2568-2571.
- 7 Torr, S. R., Nachowiak, D. A., Fujii, S. and Sobel, B. E. (1992). "Plasminogen steal" and clot lysis. *Journal of the American College of Cardiology*, 19: 1085-1090.
- 8 Reed, G. L., Houg, A. K., Liu, L., Parhami-Seren, B., Matsueda, L. H., Wang, S. and Hedstrom, L. (1999). A catalytic switch and the conversion of streptokinase to a fibrin-targeted plasminogen activator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 8879-8883.

- 9 Collen, D. and Lijnen, H. R. (1995). Molecular basis of fibrinolysis, as relevant for thrombolytic therapy. *Thrombosis and Haemostasis*, 74: 167-171.
- 10 Wardlaw, J. M., Zoppo, G., Yamaguchi, T. and Berge, E. (2003). Thrombolysis for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Systematic Review*: CD000213.
- 11 Jerjes-Sanchez, C., Ramirez-Rivera, A., Arriaga-Nava, R., Iglesias-Gonzalez, S., Gutierrez, P., Ibarra-Perez, C., Martinez, A., Valencia, S., Rosado-Buzzo, A., Pierzo, J. A. and Rosas, E. (2001). High dose and short-term streptokinase infusion in patients with pulmonary embolism: prospective with seven-year follow-up trial. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 12: 237-247.
- 12 Clase, C. M., Crowther, M. A., Ingram, A. J. and Cina, C. S. (2001). Thrombolysis for restoration of patency to haemodialysis central venous catheters: a systematic review. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 11: 127-136.
- 13 Forster, A. and Wells, P. (2001). Tissue plasminogen activator for the treatment of deep venous thrombosis of the lower extremity: a systematic review. *Chest*, 119: 572-579.
- 14 Wells, P. S. and Forster, A. J. (2001). Thrombolysis in deep vein thrombosis: is there still an indication? *Thrombosis and Haemostasis*, 86: 499-508.
- 15 Cannon, C. P. (2000). Exploring the issues of appropriate dosing in the treatment of acute myocardial infarction: potential benefits of bolus fibrinolytic agents. *American Heart Journal*, 140: S154-160.
- 16 Carlson, R. H., Garnick, R. L., Jones, A. J. and Meunier, A. M. (1988). The determination of recombinant human tissue-type plasminogen activator activity by turbidimetry using a microcentrifugal analyzer. *Analytical Biochemistry*, 168: 428-435.

- 17 Beebe, D. P., Gaffney, P. J. and van Schie, D. M. (1992). Potency assays for Anistreplase: comparison of the fibrin plate assay and a 96-well plate assay. *Biologicals*, 20: 129-133.
- 18 Marsh, N. A. (1978). Measurement of fibrinolytic capacity by the euglobulin lysis time method—a problem of "units". *Thrombosis Research*, 12: 197-200.
- 19 Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- 20 Brown, R.E. (1989). Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances *Analytical Biochemistry*. 180, 136-139.

Esse estudo revelou diferenças significantes entre as cinco formulações comerciais de estreptoquinase, as quais são de uso exclusivamente hospitalar no Brasil. De modo geral, os resultados com o teste da atividade fibrinolítica (TLE) e aqueles obtidos pela medida da atividade enzimática sobre o substrato sintético mostraram-se similares. Em ambos os casos, apenas duas formulações, Streptase™ e Streptonase™, apresentaram níveis similares de atividade enquanto as outras três apresentaram atividade bastante reduzida.

Foi observada também uma variação acentuada no conteúdo de proteínas totais, o que compreende a mistura de grandes quantidades de albumina e quantidades específicas de estreptoquinase. A análise eletroforética em SDS-PAGE acompanhada da densitometria das bandas de cada proteína revelou que tanto a quantidade de albumina quanto a de estreptoquinase variaram entre as formulações. Notamos que houve uma correlação entre a quantidade de estreptoquinase no gel e a atividade fibrinolítica relativa entre as diferentes formulações. Desta forma, podemos levantar a hipótese de que a variação na atividade fibrinolítica, entre as diferentes formulações de estreptoquinase, se deve principalmente à diferença na quantidade total de estreptoquinase adicionada em cada preparo. Isso não elimina a possibilidade de haver variações entre as atividades específicas de cada proteína. A atividade total, avaliada pelos métodos empregados neste trabalho, sofre influências tanto da variação na quantidade de proteína como da atividade específica presente em cada formulação.

Avaliando-se os dois métodos empregados nas avaliações da atividade de cada estreptoquinase, verificamos que o método do substrato sintético tem algumas vantagens sobre o TLE. Primeiro, o preparo das soluções é bastante simples no caso do ensaio com S-2251™, tornando o método rápido e de fácil execução. No entanto, o TLE tem a desvantagem de demandar tempo considerável no preparo da fração de euglobulina. Além de ser longo, o preparo da euglobulina é um processo constituído de várias etapas críticas, como o ajuste do

pH do plasma diluído, temperatura de acondicionamento desta solução e manuseio de plasma humano. As soluções de euglobulina tem estabilidade limitada e degradação dos parâmetros coagulantes e fibrinolíticos são observados após poucas horas do seu preparo. Além disso, esse método esta sujeito a variações individuais nas propriedades coagulantes e fibrinolíticas do plasma de diferentes indivíduos. A vantagem que podemos destacar do método TLE é que este representa condições de reações mais próximas do que ocorre no organismo, sendo, portanto mais representativo no aspecto fisiológico. O fato de haver uma alta correlação entre os dois métodos mostra que apesar de utilizar um substrato não fisiológico, os resultados obtidos com o uso do S-2251™ podem ser extrapolados para se saber o comportamento de cada estreptoquinase em condições fisiológicas. Desta forma, ambas as técnicas podem ser utilizadas na análise de rotina para avaliar a atividade de SK.

Portanto, nossa conclusão final é de que as formulações comerciais de estreptoquinase apresentam uma variação significativa em suas atividades *in vitro*. Para se ter certeza de que as diferenças observadas *in vitro* ocorrem também *in vivo*, estudos específicos devem ser conduzidos por profissionais especializados da área médica e acompanhados por autoridades reguladoras.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BACAL, F.; MOCELIN, A. O.; BOCCHI, E. A. Mecanismo próinflamatório: novos conhecimentos da fisiopatologia. **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo**, 3:386-92, 2002.

BACHMAN, F. Fibrinolysis. In: BLOOM; A. L.; FORBES; C. D.; THOMAS; D. P., and TUDDENHAM; E. G. D. **Haemostasis and thrombosis**. Churchill Livingstone, London: United Kingdom, 1994. p.549-625.

BAJZAR, L.; MORSER, J.; NESHEIM, M. TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex. **J Biol Chem**, 271(28): 16603-08, 1996.

BAJZAR, L. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and an antifibrinolytic pathway. **Arterioscler Thromb Vasc Bio**, 20(12): 2511-18, 2000.

BANGERT, K.; JOHNSEN, A. H.; CHRISTENSEN, U.; THORSEN, S. Different N-terminal forms of alpha 2-plasmin inhibitor in human plasma. **Biochem J**, 291: 623-5, 1993.

BATLOUNI, M. *et al.* II Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia para Diagnóstico e Tratamento da Insuficiência Cardíaca. **Arq Bras Cardiol**, 72(1):11-130, 1999.

BAUER, K. A. Selective inhibition of coagulation factors: advances in antithrombotic therapy. **Semin Thromb Hemost**, 28 Suppl 2: 15-24, 2002.

BELL, R. W. Therapeutic Agents – Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. **Review in cardiovascular Medicine**, 3(2): 34-44, 2002.

BONETTI, P. O.; LERMAN, L. O.; LERMAN, A. Endothelial dysfunction. A marker of atherosclerotic risk *Arterioscler. Thromb Vasc Biol*, 23:168-175, 2003.

BRASIL. Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde - SIM/DATASUS – 2000.

BROCKWAY, W. J.; CASTELLINO, F. J. A characterization of native streptokinase and altered streptokinase isolated from a human plasminogen activator complex. **Biochemistry**, 13(10): 2063-70, 1974.

BROMMER, E. J. P.; SCHICHT, I.; WIJNGAARDS, G.; VERHEIJEN, J. H.; RIJKEN, D. C. Fibrinolytic activators and inhibitors in terminal renal insufficiency and in anephric patients. **Thromb Haemostas**, 52: 311-14, 1984.

CAMPO, J. M. Fibrinolytic Therapy - Past, Present, and Future. In: 2° VIRTUAL CONGRESS OF CARDIOLOGY, 1999, Hershey, PA, E.U.A

CANNON, C. P. Exploring the issues of appropriate dosing in the treatment of acute myocardial infarction: potential benefits of bolus fibrinolytic agents. **American Heart Journal**, 140: 154-160, 2000.

CARLSON, R. H.; GARNICK, R. L.; JONES, A. J.; MEUNIER, A. M. The determination of recombinant human tissue-type plasminogen activator activity by turbidimetry using a microcentrifugal analyzer. **Analytical Biochemistry**, 168: 428-35, 1988.

CASTELLINO, F. J.; SODETZ, J. M.; BROCKWAY, W. J.; SIEFRING, G. E. Jr. Streptokinase. **Methods Enzymol**, 45:244-57, 1976.

CHAGAS A. C. P.; PEREIRA, C. A. J. Tratamento da disfunção endotelial na insuficiência cardíaca. **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo**, 1:127-33. 2004.

CHESNEY, C. M.; HARPER, E.; COLMAN, R. W. Critical role of the carbohydrate side chains of collagen in platelet aggregation. **Clin Invest**, 51(10): 2693-701, 1972.

COLMAN, R.W.; RAO, A. K.; RUBIN, R. N. Factor XI deficiency and hemostasis. **Am J Hematol**, 45(1): 73-8, 1994.

CHRISTENSEN, L. R; Mac LEOD, C. M. A proteolytic enzyme of serum: characterization, activation and reaction with inhibitors. **J Gen Physiol**, 28: 559-83, 1945.

COMMISSIO, EUROPEAN PHARMACOPOEIA. **European Pharmacopoeia, Third Edition**. Council of Europe, Strasbourg. 1998. p. 1543-45.

DAHLBÄCK, B. The protein C anticoagulant system: inherited defects as basis for venous thrombosis. **Thromb Res**, 77(1): 1-43, 1995.

DAVIDSON, D. J.; HIGGINS, D. L.; CASTELLINO, F. J. Plasminogen activator activities of equimolar complexes of streptokinase with variant recombinant plasminogens. **Biochemistry**, 29(14): 3585-90, 1990.

DIBELLA, E. E.; MAURER, M. C.; SCHERAGA, H. A. Expression and folding of recombinant bovine prethrombin-2 and its activation to thrombin. **J Biol Chem**, 270(1): 163-9, 1995.



DOBROVOLSKY, A. B.; TITAEVA, E. V. The fibrinolysis system: regulation of activity and physiologic functions of its main components. **Biochemistry**, 67: 99-108, 2002.

EATON, D. L.; MALLOY, B. E.; TSAI, S.P.; HENZEL, W.; DRAYNA, D. Isolation, molecular cloning, and partial characterization of a novel carboxypeptidase B from human plasma. **J Biol Chem**, 269: 21833-38, 1991.

ERICKSON, L. A.; FICI, G. J.; LUND, J. E.; BOYLE, T. P.; POLITES, H. G.; MAROTTI, K. R. *et al.* Development of venous occlusions in mice transgenic for the plasminogen activator inhibitor-1 gene. **Nature**, 346: 74-6, 1990.

FERRATI, J. J.; MCSHAN, W. M.; AJDIC, D. J.; SAVIC, D. J.; SAVIC, G.; LYON, K. *et al.* Complete genome sequence of an M1 strain of streptococcus pyogenes. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.**, 98: 4658-63, 2001.

FOX, A. A. Have we reached the limit with thrombolytic therapy? **Cardiovascular Drugs Therapy**, 13: 211 – 16, 1999.

FRANGOS, S. G.; CHEN, A. H.; SUMPIO, B. Vascular Drugs in the New Millennium. **Journal of the American College of Surgeons (JACS)**, 191: 1, 2000.

GUYTON, M. D.; ARTHUR, C.; HALL; JOHN, E. **Tratado de Fisiologia Médica**. RJ-RJ: Ed. Guanabara Koogan, 1996. p. 997-9.

GRUNDY, S. M. The role of cholesterol management in coronary disease risk reduction in elderly patients. **Endocrinol Metab Clin North Am**, 27(3): 655-75, 1998.

HOLMDAHL, L.; ERIKSSON, E.; RISBERG, B. Measurement of fibrinolytic components in human tissue. **Scand J Clin Lab Invest**, 57(5): 445-51, 1981.

JACKSON, K. W.; TANG, J. Complete AMINO ACID sequence of streptokinase and its homology with serine proteases. **Biochemistry**, 21: 6620-25, 1982.

JANSSEN, M. C. H. D-dimer determination to assess regression of deep venous thrombosis. **Thromb. Haemostas**, 78: 799-802, 1997.

JOHNSON, A. J.; McCARTY, W. R. The lysis of artificially induced intravascular clot in man by intravenous infusions of streptokinase. **J Clin Invest**, 38: 1627-43, 1959.

JUHAN-VAGUE, I.; ALESS, M. C. PAI-1, obesity, insulin resistance and risk of cardiovascular events. **Thromb Haemost**, 78: 656-60, 1997.

KEYT B. A.; PAONI N. F.; REFINO C. J.; BERLEAU L.; NGUYEN H.; CHOW A. *et al.*; A faster-acting and more potent form of tissue plasminogen activator. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 91(9): 1994.

KRISHNAMURTI, C.; ALVING, B. M. Plasminogen activator inhibitor type 1: biochemistry and evidence for modulation of fibrinolysis *in vivo*. **Semin Thromb Hemost**, 18(1): 67-80. 1992.

KRUIHOF, E. K.; TRAN-THANG, C.; BACHMANN, F. Studies on the release of a plasminogen activator inhibitor by human platelets. **Thromb Haemost**, 55(2): 201-5, 1986.

KUNICKI, T. J.; NURDEN, A. T., PIDARD, D.; RUSSELL, N. R.; CAEN, J. P. Characterization of human platelet glycoprotein antigens giving rise to individual immunoprecipitates in crossed-immunoelectrophoresis.

**Blood**, 58(6): 1190-7, 1981.

LAM, S. C.; PLOW, E. F.; GINSBERG, M. H. Platelet membrane glycoprotein IIb heavy chain forms a complex with glycoprotein IIIa that binds Arg-Gly-Asp peptides. **The American Society of Hematology**, 73(6): 1513-18, 1989.

LEE, P. P.; WOHL, R. C.; BOREISHA, I. G.; ROBBINS, K. C. Kinetic analysis of covalent hybrid plasminogen activators: effect of CNBr-degraded fibrinogen on kinetic parameters of Glu1-plasminogen activation. **Biochemistry**, 27(19): 7506-13, 1988.

LOCH, T.; BILINSKI, T.; ZAKRZEWSKI, K. Studies on streptokinase. The conformation. **Acta Biochim Pol**, 15(1): 129-36 1968.

MAKSIMENKO, A. V. Molecular interactions during fibrinolysis. Search for new plasminogen activators. **Mol Biol (Mosk)**, 29 (1): 38-60, 1995.

MALKE, H.; ROE, B.; FERRATI, J. J. Nucleotide sequence of the streptokinase gene from streptococcus equisimilis H46A. **GENE**, 34: 357-62, 1985.

MANN, K. G.; VAN'T VEER C.; CAWThERN K.; BUTENAS S. The role of the tissue factor pathway in initiation of coagulation. **Blood Coagul Fibrinolysis**, 9: 3-7, 1998.

MAO, S. S.; COOPER, C. M.; WOOD, T.; SHAFER, J. A.; GARDELL, S. J. Characterization of plasmin-mediated activation of plasma procarboxypeptidase B. Modulation by glycosaminoglycans. **J Biol Chem**, 274(49): 35046-52, 1999.

MARKUS, G.; EVERS, J. L.; HOBICA, G. H. Activator activities of the transient forms of the human plasminogen-streptokinase complex during its proteolytic conversion to the stable activator complex. **J Biol Chem**, 251(21): 6495-504, 1976.

MATOS, M. F. D.; SILVA, N. A. S. E.; PIMENTA, A. J. M.; CUNHA, A. J. L. A. Prevalencia dos fatores de risco para doença cardiovascular em funcionários do Centro de Pesquisa da Petrobras. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 82(1): 1 - 8, 2004.

McCLINTOCK, D. K.; ENGLERT, M. E.; DZIOBKOWSKI, C.; SNEDEKER, E. H.; BELL, P. H. Two distinct pathways of the streptokinase-mediated activation of highly purified human plasminogen. **Biochemistry**, 13(26): 5334-44, 1974.

McEVER, R.P. Properties of GMP-140, an inducible granule membrane protein of platelets and endothelium. **Blood Cells**, 16(1): 73-80, 1990.

MORGAN, F. J.; HENSCHEN, A. The structure of streptokinase. I. Cyanogen bromide fragmentation, amino acid composition and partial amino acid sequences. **Biochim Biophys Acta**, 181(1): 93-104, 1969.

NAZARI, J.; DAVISON, R.; KAPLAN, K.; FINTEL, D. Adverse reactions to thrombolytic agents: implications for coronary reperfusion following myocardial infarction. **Med Toxicol**, 2: 274-86, 1987.

NORMAN, B.; WALLEN, P.; RANBY, M. Fibrinolysis mediated by tissue plasminogen activator. Disclosure of a kinetic transition. **Eur J Biochem**, 149: 193-200, 1985.

PENNICA, D.; HOLMES, W. E.; KOHR, W. J.; HARKINS, R. N.; VEHAR, G. A.; WARD, C.A. *et al.* Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. **Nature**, 301(5897): 214-21, 1983.

PETCH, M. C. Dangers of thrombolysis. **BMJ**, 300 (6723):483-4, 1990.

POLGAR, J.; REED, G. L. A critical role for N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) in platelet granule secretion. **Blood**, 15;94(4): 1313-8, 1999.

RATNOFF, O. D. Studies on a proteolytic enzyme in human plasma, I: the probable identity of the enzymes activated by chloroform and by filtrates of cultures of beta hemolytic streptococci. **J Exp Med**, 87: 199-209, 1948.

REDDY, K. N.; MARKUS, G. Mechanism of activation of human plasminogen by streptokinase. Presence of active center in streptokinase-plasminogen complex. **Biol Chem**, 247(6): 1683-91, 1972.

RIJKEN, D. C.; JUHAN-VAGUE, I.; DECOCK, F.; COLLEN, D. Measurement of human tissue-type plasminogen activator by a two-site immunoradiometric assay. **J Lab Clin Med**, 101: 274-84, 1983.

RIJKEN, D. C.; SAKHAROV, D. V. Basic principles in thrombolysis: regulatory role of plasminogen. **Thrombos Res**, 101: S41-S49, 2001.

ROEMISCH, J.; GRAY, E.; HOFFMANN, J. N.; WIEDERMANN, C. J. Antithrombin: a new look at the actions of a serine protease inhibitor. **Blood Coagul Fibrinolysis**, 13(8): 657-70, 2002.

ROSCHLAU, W. H. E. Drugs affecting hemostasis. In: KALANT, H.; ROSCHLAU, W. H. E. **Principles of medical pharmacology**. New York: Oxford University Press, 1988. p. 526-40.

RUGGE, Z. M.; WARE, J. Von Willebrand factor. **Faseb J**, 7(2), 1993.

RUGGERI, Z. M.; BADER, R.; DE MARCO, L. Glanzmann thrombasthenia: deficient binding of von Willebrand factor to thrombin-stimulated platelets. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 79(19): 6038-41, 1983.

RUOSLAHTI E.; SUZUKI, S.; HAYMAN, E. G.; CR, I. L. L., PIERSCHBACHER, M. D. Purification and characterization of vitronectin. **Methods Enzymol**, 144: 430-7, 1987.

SCHNADELBACH, D. The third edition of the European Pharmacopoeia and the German Pharmacopoeia. **Pharm Unserer Zeit**, 26 (2): 76-80, 1997.

SCHOUSBOE, I.; HALKIER, T. Zinc ions promote the binding of factor XII/factor XIIa to acidic phospholipids but have no effect on the binding of high  $M_r$  kininogen. **Eur J Biochem**, 197: 309-314, 1991.

SELA, S.; SHURTZ-SWIRSKI, R.; AWAD, J.; SHAPIRO, G.; NASSER, L.; SHASHA, S. M. *et al.* The involvement of peripheral polymorphonuclear leukocytes in the oxidative stress and inflammation among cigarette smokers. **Israel Med Ass J**, 4:1015-19, 2002.

SISCOVICK, D. S.; SCHWARTZ, S. M.; ROSENDAAL, F.R.; PSATY, B. M. Thrombosis in the young: effects of atherosclerotic risk factors on the risk of myocardial infarction associated with prothrombotic factors. **Thromb Haemostas**, 78(7): 12, 1997.

SMITH, J.B.; MILLS, D. C. B. Drugs affecting coagulation, Fibrinolysis, and platelet aggregation. In: Brody, T. M.; Lerner, J.; Minneman, K. P. **Human pharmacology: molecular to clinical**, 3<sup>a</sup> ed. Louis: Mosby, 1998. p. 297-310.

STACK, S.; GONZALEZ-GRONOW, M.; PIZZO, S. V. Regulation of plasminogen activation by components of the extracellular matrix. **Biochemistry**, 29(20): 4966-70, 1990.

STRÖMQVIST, M.; SCHATTEMAN, K.; LEURS, J.; VERKERK, R.; ANDERSSON, J. O.; JOHANSSON, T. *et al.* Immunological assay for the determination of procarboxypeptidase U antigen levels in human plasma. **Thromb Haemost**, 85: 12-7, 2001.

SUMMARIA, L.; ARZADON, L.; BERNABE, P.; ROBBINS, K. C. The interaction of streptokinase with human, cat, dog, and rabbit plasminogens. The fragmentation of streptokinase in the equimolar plasminogen-streptokinase complexes. **J Biol Chem**, 249(15): 4760-9, 1974.

TABOR, B. L.; LEWIS, J. F.; IKEGAMI, M.; JOBE, A. H. Platelet-activating factor antagonists decrease lung protein leak in preterm ventilated rabbits. **Am J Obstet Gynecol** 167(3): 810-4, 1992.

TAKADA, A.; TAKADA, Y. Potentiation of the activation of Glu-plasminogen by streptokinase and urokinase in the presence of fibrinogen degradation products. **Thromb Res**, 25(3): 229-35, 1982.

TAN, A. K.; EATON, D. L. Activation and characterization of procarboxypeptidase B from human plasma. **Biochemistry**, 34 (17): 5811-16, 1995.

TAYLOR, F. B., Jr.; BOTTS, J. Purification and characterization of streptokinase with studies of streptokinase activation of plasminogen. **Biochemistry**, 7(1): 232-42, 1968.

THE GUSTO INVESTIGATORS. Na international randomized trial and comparing thrombolytic strategies for acute miocardial infarction. **N Engl J Méd**, 329: 673-82, 1993.

TILLET, W. S.; GARNER R. L. The fibrinolytic activity of hemolytic streptococci. **J Exp Med**, 58: 485-502, 1933.

TIMMONS, S.; KLOCZEWIAK, M.; HAWIGER, J. ADP-dependent common receptor mechanism for binding of von Willebrand factor and fibrinogen to human platelets. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 81(15): 4935-9, 1984.

TURITTO, V. T.; WEISS, H. J.; ZIMMERMAN, T. S.; SUSSMAN, I. I. Factor VIII/von Willebrand factor in subendothelium mediates platelet adhesion. **Blood**, 65(4): 823-31, 1985.

URANO, S.; METZGER, A. R.; CASTELLINO, F. J. Plasmin-mediated fibrinolysis by variant recombinant tissue plasminogen activators. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 86: 2568-71, 1989.

VERSTRAETE, M. Exit of platelet glycoprotein-IIb/IIIa-receptor inhibitors?. **Lancet**, 357: 1535, 2001.

WALTER, F. (a); SIEGEL, M.; MALKE, H. Nucleotide sequence of the streptokinase gene from streptococcus pyogenes type 1 strain. **Nucleic Acids Res**, 17: 1261, 1989.

WALTER, F. (b); SIEGEL, M.; MALKE, H. Nucleotide sequence of the streptokinase gene from a group-G Streptococcus. **Nucleic Acids Res**, 17: 1262, 1989.



WARDLAW, J. M., ZOPPO, G., YAMAGUCHI, T. AND BERGE, E. Thrombolysis for acute ischaemic stroke. **Cochrane Database Systematic Review**, (3): CD000213, 2003.

WEITZ, J. I. A novel approach to thrombin inhibition. **Thromb Res**, 109(1): 17-22, 2002.

WILNER, G. D.; NOSSEL, H. L.; LEROY, E. C. Aggregation of platelets by collagen. **J Clin Invest**, 47(12): 2616-21, 1968.

WOHL, R. C.; SUMMARIA, L.; ARZADON, L.; ROBBINS, K. C. Steady state kinetics of activation of human and bovine plasminogens by streptokinase and its equimolar complexes with various activated forms of human plasminogen. **Biol Chem**, 253(5): 1402-7, 1978.

ZACHARSK, L. R.; BROWN, F. E.; MEMOLI, V. A.; KISIEL, W.; KUDRYK, B. J.; ROUSSEAU, S. M. Pathways of coagulation activation in situ in rheumatoid synovial tissue. **Clin Immunol Immunopathol**, 63 (2): 155-62, 1992.

## **PUBLICAÇÃO EM CONGRESSO**

**L.T. Couto; J.L. Donato and G. de Nucci.** Análise de cinco formulações comerciais de estreptoquinase. XXXV Congresso Brasileiro de Farmacologia (SBFTE). Período: 21 a 24 de setembro de 2003.

## **PARTICIPAÇÃO DE CONCURSO**

**L.T. Couto; J.L. Donato and G. de Nucci.** Análise de cinco formulações comerciais de estreptoquinase. Prêmio Zerbini de cardiologia. Período: 15 a 23 de novembro de 2003.

Processo de avaliação do referido paper "ANÁLISE DE CINCO FORMULAÇÕES DE ESTREPTOQUINASE USANDO O TESTE DE LISE DA EUGLOBULINA E ANÁLISE DE ATIVAÇÃO DO PLASMINOGÊNIO" para publicação no Brazilian Journal of Medical and Biological Research

----- Original Message -----

From: Brazilian Journal of Medical and Biological Research  
To: Jose Luiz Donato  
Sent: Friday, May 14, 2004 9:54 AM  
Subject: Re: MS5442

Prezado Dr. JL Donato,

Recebemos e agradecemos seu e-mail encaminhando o texto revisado do manuscrito MS 5442, assim como respostas aos revisores. Daremos prosseguimento ao processo junto ao Editor Seccional.

Atenciosamente,

Ricardo Wesley Martins

Brazilian Journal of Medical and Biological Research  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP  
Av. Bandeirantes 3900  
14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brasil  
fax: 55+16+633-3825  
e-mail: [bjournal@fmrp.usp.br](mailto:bjournal@fmrp.usp.br)  
Versão On Line - <http://www.scielo.br/bjmbr>

*San Juan de la Cruz ensina que, em nossa jornada espiritual, não devemos procurar visões, ou sair atrás de declarações de outros que percorreram esse caminho. Nosso único apoio deve ser a fé – porque a fé é algo límpido, transparente, que nasce dentro de nós, e não pode ser confundida. Um escritor estava conversando com um padre e perguntou-lhe o que era a experiência de Deus. – Não sei – respondeu o padre. – Tudo que tive até agora foi a experiência da minha fé em Deus. E isto é o mais importante.*

(Paulo Coelho – MAKŤUB)

*Eu agradeço a todos que colaboraram para a realização deste trabalho. Aos colegas da Galeno Unit Resarch e do Departamento de Farmacologia da Unicamp.*

*Em especial:*

- ☆ *Ao Professor, desde a graduação, Dr. Ronilson Moreno pela atenção;*
- ☆ *Prof. Dr. Gilberto de Nucci pela oportunidade;*
- ☆ *Prof. Dr. Edson Antunes e Dra. Sisi Marcondes pela ajuda e atenção;*
- ☆ *Prof. Dr. Stephen Hyslop pela ajuda e atenção e por ceder gentilmente a utilização do SpectraMax em seu laboratório;*
- ☆ *Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo pela ajuda e atenção;*
- ☆ *Prof. Dr. Otávio Rizzi Coelho pela ajuda e atenção;*
- ☆ *A FUNPEC pelo apoio financeiro.*

*Eu dedico este trabalho a toda minha família... ao meu pai Getúlio; minha mãe Shirley;  
meus irmãos Túlio, André e Aline; minha cunhada Elisângela; a todos os meus  
tios(as); as minhas amigas Kellen, Raquel e Ana...*

*...e com muito carinho ao meu amor – Sergio Lilla.*