



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA ATIVIDADE PRÓ-COAGULANTE DE
PROTEASES DE FLUIDOS LATICÍFEROS

CAROLINA DE ARAÚJO VIANA

FORTALEZA-CE

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA ATIVIDADE PRÓ-COAGULANTE DE
PROTEASES DE FLUIDOS LATICÍFEROS**

CAROLINA DE ARAÚJO VIANA

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos

FORTALEZA-CE

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- V667c Viana, Carolina de Araújo.
Caracterização bioquímica da atividade pró-coagulante de proteases de fluidos laticíferos /
Carolina de Araújo Viana. – 2011.
119 f. : il., color.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento
de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza,
2011.
Orientação: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos.
1. Coagulação Sanguínea. 2. Sepse. 3. Bioquímica. I. Título.

CDD 574.192

Esta dissertação foi apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontrar-se-á à disposição na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição ou utilização de qualquer trecho deste trabalho é permitida desde que seja feito de acordo com as normas da ética científica.

Carolina de Araújo Viana

Dissertação aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Márcio Viana Ramos
Deptº de Bioquímica e Biologia Molecular - UFC
Orientador

Profª Dra. Norma Maria Barros Benevides
Deptº de Bioquímica e Biologia Molecular - UFC
Examinadora

Prof. Dr. Cleverton Diniz Teixeira de Freitas
Centro de Ciências Biológicas - UFPI
Examinador

Profª. Dra. Ana Cristina de Oliveira M. Moreira
Centro de Ciências da Saúde - UNIFOR
Examinadora

Dedico este trabalho aos
meus pais e meu marido
pelo amor e apoio
incondicional e ao meu filho,
minha fonte de alegria e
inspiração.

FINANCIAMENTO

Este trabalho foi realizado com o suporte das seguintes instituições:

- Universidade Federal do Ceará, através do Laboratório de Bioquímica e Biologia de Proteínas Vegetais, coordenado pelo Professor Dr. Márcio Viana Ramos, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular;
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP);
- Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO);
- *International Foundation for Science (IFS).*

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por me ceder o dom da vida, por me conceder o privilégio de estudar e de ter saúde para poder realizar este trabalho. Por me dar forças para vencer as minhas dificuldades, sabedoria para enfrentar os momentos difíceis e esperança.

Ao professor Dr. **Márcio Viana Ramos**, pela orientação deste trabalho. Por contribuir diretamente para meu crescimento pessoal e profissional. Pela confiança em mim depositada, pelas cobranças, conselhos e incentivos incessantes. Pela sua paciência frente as minhas dificuldades e por ser um exemplo de competência e honestidade.

À professora Dra. **Norma Maria Barros Benevides**, por ter aceitado o convite para participar da banca examinadora, pelos excelentes ensinamentos em bioquímica, pela sua valiosa contribuição ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) da UFC como professora, pesquisadora e coordenadora. Por ser uma pessoa sempre gentil e agradável.

À Professora Dra. **Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira**, por ter aceitado o convite para participar da banca examinadora, por todas as críticas e sugestões que foram muito pertinentes e justas, e contribuíram bastante para o melhoramento deste trabalho.

Ao Professor Dr. **Cleverson Diniz Teixeira de Freitas**, por ter aceitado o convite para participar da banca examinadora e pela sua valiosa contribuição, apoio e ensinamentos para a realização deste trabalho.

Ao Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE) por ter autorizado a coleta de sangue dos seus doadores, um apoio indispensável e fundamental para a realização deste trabalho.

A todos os professores do DBBM, pelos valiosos ensinamentos em bioquímica. Também aos funcionários e técnicos, pelos auxílios e gentilezas durante a realização deste trabalho.

A todos os professores do curso de Ciências Biológicas, pelos conhecimentos cedidos e pelos ensinamentos que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

Aos amigos do Laboratório de Biologia e Bioquímica de Proteínas Vegetais, **Eliane Araújo, Raquel Sombra, Danielle Aragão, Diego de Souza, Mayara Patrícia, Tereza Cristina, Maria Lídia, Fabiano Teixeira, Jefferson Oliveira, Luís Carlos, Renato, Beatriz e Bárbara** pela ótima convivência no laboratório, companheirismo, apoio e pelos grandes momentos de aprendizado e alegria.

Aos meus amigos que fizeram parte do curso de Graduação em Ciências Biológicas, pela cumplicidade e companheirismo do dia-a-dia. Principalmente, **Camila Barbosa, Jacilane Ximenes, Raquel Sombra, Thaís Moura, Danielle Aragão e Diva Tavares.**

À minha amiga **Ayrles Silva** do Laboratório de Microbiologia e Imunologia (UFRPE), por toda a ajuda dada nos experimentos, conselhos, ensinamentos e pela companhia tão agradável.

Aos meus pais **Marilac Viana e Adriano Legendre**, que não mediram esforços para ajudar em minha formação. Por todo o amor, carinho e apoio incondicional durante toda a trajetória de minha vida. Por serem meus exemplos de força, determinação, honestidade, humildade e responsabilidade.

Ao meu irmão **Adriano Viana**, por toda a ajuda e apoio, pelos momentos de alegria e companhia diária.

Ao meu amado marido, **Anderson Cataldo**, por ter sempre estado ao meu lado ao longo desses anos, por todo seu apoio, incentivo, carinho e dedicação, por

todo o amor à mim dedicado e pelo companheirismo para superar os obstáculos do dia-a-dia.

Ao meu filho **Anderson Viana**, por me fazer tão feliz, por ser minha fonte de inspiração, de força e estímulo para crescer como pessoa e profissional.

A todos, muito obrigada!

“Vendo Jesus aquela multidão, subiu a um monte e, tendo-se sentado, aproximaram-se dEle os seus discípulos, e Ele se pôs a ensiná-los, dizendo:

Bem aventurados os pobres de espírito, porque deles é o reino dos céus.

Bem aventurados os mansos, porque possuirão a terra.

Bem aventurados os que choram, porque serão consolados.

Bem aventurados os que têm fome e sede de justiça, porque serão saciados.

Bem aventurados os misericordiosos, porque alcançarão misericórdia.

Bem aventurados os puros de coração, porque verão a Deus.

Bem aventurados os pacíficos, porque serão chamados filhos de Deus.

Bem aventurados os que sofrem perseguição por amor à justiça, porque deles é o reino dos céus.”

(Mateus, 5:1-10).

RESUMO

Caracterização bioquímica da atividade pró-coagulante de proteases de fluidos laticíferos

As proteases de látex têm atraído atenção devido à habilidade de exibir atividades semelhantes à trombina e à plasmina. Neste estudo, as proteínas do látex das plantas *Calotropis procera* (CpPL), *Cryptostegia grandiflora* (CgPL) e *Plumeria rubra* (PrPL) foram avaliadas em termos destas atividades. Para tanto, as amostras foram investigadas quanto as suas atividades fibrinogenolíticas e fibrinolíticas, em plasma humano e por incubação com fibrinogênio humano através da medida do tempo de coagulação, ensaios eletroforéticos, espectrofotométricos, ou de difusão em gel de agarose. O efeito de CpPL *in vivo*, sobre o tempo de coagulação no plasma de camundongos saudáveis ou sépticos, que foram experimentalmente infectados com a bactéria *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium, também foi estudado. Grupos de cinco camundongos foram tratados com CpPL (30 mg/Kg), *S. enterica* (10^7 UFC/mL) ou CpPL 24 h antes da inoculação bacteriana. Depois do sacrifício dos animais, as amostras de sangue foram examinadas quanto ao tempo de coagulação, conteúdo de plaquetas e perfil protéico. As frações protéicas de *C. procera* exibindo atividade proteolítica foram capazes de hidrolisar o fibrinogênio de forma similar à trombina, enquanto que as frações protéicas de *Cr. grandiflora* exibindo atividade proteolítica foram capazes de hidrolisar o fibrinogênio de forma similar à plasmina. As amostras exibiram atividade fibrinogenolítica de forma dose e tempo dependente, mas não foram capazes de dissolver totalmente o coágulo de fibrina. As atividades fibrinogenolíticas foram eliminadas pela inibição das proteases dos látices com E-64, um inibidor de protease cisteínica. Pepstatina, PMSF e EDTA não se mostraram inibitórios. O tempo de formação do coágulo no plasma de camundongos sépticos e o conteúdo de plaquetas foram consistentemente reduzidos quando comparados aos animais saudáveis. CpPL exibiu efeitos antagonistas. Foi capaz de reverter, estatisticamente, o efeito da sepse no tempo de formação do coágulo associado à preservação do conteúdo de plaquetas. Contudo, CpPL exibiu efeito oposto em camundongos não sépticos, induzindo rápida formação do coágulo, comparado aos animais saudáveis, porém sem alterar o conteúdo de plaquetas. Os resultados relatados neste trabalho confirmam a atividade fibrinogenolítica associada a proteases cisteínicas de látex e mostram uma efeito protetor *in vivo* muito intrigante de CpPL no conteúdo de plaquetas em animais sépticos, com aparentes efeitos benéficos contra a coagulação intravascular disseminada, um evento crucial associado à sepse letal. Este efeito, porém, não foi observado quando CpPL foi dado aos animais saudáveis.

Palavras-Chave: Coagulação sanguínea, látex, proteases, sepse.

ABSTRACT

Biochemical characterization of procoagulant activity of proteases fluid latex

Latex proteases have grown in attention because of their ability to exhibit both thrombin and plasmin-like effects. In this study, the plant latex proteins *Calotropis procera* (CpLP), *Cryptostegia grandiflora* (CgLP) and *Plumeria rubra* (PrLP) were investigated in terms of these activities. For both samples were investigated for their fibrinogenolytic and fibrinolytic activity in human plasma and by incubation with human fibrinogen by measuring the clotting time, electrophoretic or spectrophotometric assays and diffusion in agarose gel. In vivo effect of CpLP on clot formation of plasma of healthy and septic mice that have been experimentally infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium was also studied. Groups of five mice were treated with CpLP (30 mg/Kg), *S. enterica* (10^7 CFU/mL) or CpLP 24 h prior bacteria. After sacrificing animals, blood samples were examined for coagulation time, platelet content and protein profile. The protein fractions of *C. procera* exhibiting proteolytic activity were capable to hydrolyze fibrinogen similar to thrombin, while the protein fractions of *Cr. grandiflora* exhibiting proteolytic activity were capable to hydrolyze fibrinogen similar to plasmin. The samples exhibited fibrinogenolytic activity in a dose and time manner, but were not able to dissolve the fibrin clot. Procoagulant activity was eliminated by inhibition of latex proteases with cysteine proteinase inhibitor E-64. Pepstatin, PMSF and EDTA were not inhibitory. Time of clot formation of plasma in septic mice and platelet content were consistently reduced as compared to healthy animals. CpLP exhibited antagonistic effects. It statistically reversed the effects of sepsis on clot-time formation associated to preservation on platelet content. However, CpLP exhibited opposite effect on non-septic mice, inducing faster clot formation, compared to healthy animals but without changing platelet content. Results reported in this work confirm fibrinogenolytic activity associated to cysteine proteases of latex and show a very intriguing in vivo protective activity of CpLP on platelet content on septic animals with apparent benefit effect against disseminated vascular coagulation, a pivotal event associated to lethal sepsis. This effect was however not observed when CpLP was given to healthy animals.

Key-words: Blood coagulation, latex, proteases, sepsis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do extravasamento do látex devido à injúria foliar.....	2
Figura 2	Representação esquemática e anatomia de laticíferos não-articulados e articulados.....	4
Figura 3	Aspectos gerais das espécies vegetais estudadas.....	12
Figura 4	Hidrólise do fibrinogênio pela trombina e digestão da fibrina pela plasmina.....	17
Figura 5	Representação esquemática do processo de coagulação.....	22
Figura 6	Representação esquemática do sistema fibrinolítico.....	24
Figura 7	Esquema de obtenção da fração protéica do látex (PL).....	38
Figura 8	Perfil protéico do látex de <i>C. procera</i> , <i>Cr. grandiflora</i> e <i>P. rubra</i>	52
Figura 9	Perfil cromatográfico e eletroforético das proteínas do látex de <i>C. procera</i>	54
Figura 10	Perfil cromatográfico e eletroforético das proteínas do látex de <i>Cr. grandiflora</i>	55
Figura 11	Atividade proteolítica das proteínas do látex de <i>C. procera</i> , <i>Cr. grandiflora</i> e <i>P. rubra</i> e das sub-frações de <i>C. procera</i> e <i>Cr. grandiflora</i>	57
Figura 12	Atividade coagulante das proteínas do látex de <i>C. procera</i> , <i>Cr. grandiflora</i> e <i>P. rubra</i> (A) e das sub-frações de <i>C. procera</i> (B) e <i>Cr. grandiflora</i> (C).....	58
Figura 13	Ensaio em placa de fibrinogênio–agarose para determinar atividade fibrinogenolítica das proteínas do látex de <i>C. procera</i> , <i>Cr. grandiflora</i> e <i>P. rubra</i> e das sub-frações de <i>C. procera</i> e <i>Cr. grandiflora</i>	60
Figura 14	Análise espectrofotométrica da formação do coágulo de fibrina e sua hidrólise pelas proteínas do látex de <i>C. procera</i> , <i>Cr. grandiflora</i> e <i>P. rubra</i> (A) e pelas sub-frações de <i>C. procera</i> (B) e <i>Cr. grandiflora</i> (C).....	62

Figura 15	Ensaio fibrinogenolítico dose-dependente das proteínas do látex de <i>C. procera</i> , <i>Cr. grandiflora</i> e <i>P. rubra</i> e das sub-frações de <i>C. procera</i> e <i>Cr. grandiflora</i>	64
Figura 16	Ensaio fibrinogenolítico tempo-dependente das proteínas do látex de <i>C. procera</i> , <i>Cr. grandiflora</i> e <i>P. rubra</i> e das sub-frações de <i>C. procera</i> e <i>Cr. grandiflora</i>	65
Figura 17	Inibição da atividade fibrinogenolítica das frações protéicas de <i>C. procera</i> e <i>Cr. grandiflora</i> visualizada por eletroforese.....	66
Figura 18	Inibição da atividade fibrinogenolítica das sub-frações ativas de <i>C. procera</i> e <i>Cr. grandiflora</i> visualizada por espectrofotometria.....	68
Figura 19	Hidrólise do coágulo de fibrina pelas proteínas do látex de <i>C. procera</i> , papaína (A), <i>Cr. grandiflora</i> e <i>P. rubra</i> (B).....	69
Figura 20	Hidrólise do coágulo de fibrina pelas sub-frações de <i>C. procera</i> (A) e <i>Cr. grandiflora</i> (B).....	70
Figura 21	Hidrólise do coágulo plasmático pelas proteínas do látex de <i>C. procera</i> , papaína (A), <i>Cr. grandiflora</i> e <i>P. rubra</i> (B).....	71
Figura 22	Hidrólise do coágulo plasmático pelas sub-frações de <i>C. procera</i> (A) e <i>Cr. grandiflora</i> (B).....	72
Figura 23	Integridade de hemácias quando incubadas com as sub-frações CpPL-PIII, CgPL-PI e Papaína.....	74
Figura 24	Efeito das proteínas do látex de <i>C. procera</i> sobre o tempo de coagulação, quantificação de plaquetas e perfil protéico do plasma obtido de camundongos saudáveis ou infectados com <i>S. Typhimurium</i> (10^7 UFC/mL).....	76

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

ANOVA	Análise de Variância
Arg	arginina
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
C-terminal	Carboxi-terminal
CpPL	Proteínas do Látex de <i>Calotropis procera</i>
CpPL-PI	Proteínas do Látex de <i>Calotropis procera</i> - Pico I
CpPL-PII	Proteínas do Látex de <i>Calotropis procera</i> - Pico II
CpPL-PIII	Proteínas do Látex de <i>Calotropis procera</i> - Pico III
CgPL	Proteínas do Látex de <i>Cryptostegia grandiflora</i>
CgPL-PI	Proteínas do Látex de <i>Cryptostegia grandiflora</i> - Pico I
CgPL-PII	Proteínas do Látex de <i>Cryptostegia grandiflora</i> - Pico II
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
EPM	Erro Padrão da Média
E-64	Trans-epoxisuccinil-L-leucil-amido(4-guanidino)-butano
kDa	KiloDalton
NaOH	Hidróxido de Sódio
N-terminal	Amino-terminal
PBS	Tampão fosfato de sódio
PrPL	Proteínas do Látex de <i>Plumeria rubra</i>
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-flúor
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TCA	Ácido Tricloro Acético
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
Tris	Tris-hidroxi-amino-metano
UA	Unidade de Atividade
UA/ μ gP	Unidade de Atividade por micrograma de proteína
UI	Unidade internacional
UFC	Unidades formadoras de colônia
Val	Valina

SUMÁRIO

I	INTRODUÇÃO	1
1.1	Látex.....	1
1.2	Composição bioquímica do látex.....	3
1.3	Proteínas presentes em fluidos laticíferos.....	5
1.4	Plantas laticíferas	7
1.5	Descrição e caracterização das espécies vegetais.....	8
1.5.1	<i>Calotropis procera</i> (Ait.) R.Br.....	8
1.5.2	<i>Cryptostegia grandiflora</i> R.Br.....	9
1.5.3	<i>Plumeria rubra</i> L.....	10
1.6	Envolvimento de proteases laticíferas no processo de coagulação sanguínea.....	13
1.7	Hemostasia.....	13
1.8	Principais proteínas que participam do processo de coagulação e fibrinólise.....	14
1.8.1	Fibrinogênio.....	14
1.8.2	Trombina.....	15
1.8.3	Plasmina.....	16
1.9	Coagulação sanguínea.....	16
1.9.1	Via intrínseca.....	18
1.9.2	Via extrínseca.....	19
1.9.3	Via final comum.....	20
1.10	Fibrinólise.....	21
1.11	Função das plaquetas na coagulação.....	23
1.12	Relação entre coagulação e inflamação.....	25
1.12.1	Sepse.....	26
II	JUSTIFICATIVA	29
III	OBJETIVOS	32
IV	MATERIAIS E MÉTODOS	34
	MATERIAIS.....	34
4.1	Reagentes.....	34
4.2	Materiais biológicos.....	34

4.2.1	Sangue humano.....	34
4.2.2	Material vegetal.....	35
4.2.3	Animais.....	35
4.2.4	Agente infeccioso.....	36
	MÉTODOS.....	37
4.3	Coleta e fracionamento do látex.....	37
4.4	Fracionamento das proteínas do látex de <i>C. procera</i> e <i>Cr. grandiflora</i> por cromatografia.....	39
4.4.1	Fracionamento das proteínas do látex de <i>C. procera</i> em coluna de CM-Sepharose.....	39
4.4.2	Fracionamento das proteínas do látex de <i>Cr. grandiflora</i> em coluna de DEAE-Sepharose.....	39
4.5	Ensaio bioquímicos.....	40
4.5.1	Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS).....	40
4.5.2	Atividade proteolítica total utilizando azocaseína como substrato.....	41
4.5.3	Atividade coagulante.....	42
4.5.4	Atividade fibrinogenolítica.....	42
4.5.4.1	Ensaio de polimerização do fibrinogênio em gel de agarose...	43
4.5.4.2	Reação de hidrólise do fibrinogênio examinada por PAGE-SDS.....	43
4.5.4.3	Reação de formação e hidrólise do coágulo de fibrina examinada por espectrofotometria.....	44
4.5.4.4	Ensaio de inibição da atividade fibrinogenolítica.....	44
4.5.5	Atividade fibrinolítica.....	45
4.5.5.1	Avaliação da hidrólise do coágulo de fibrina.....	45
4.5.5.2	Avaliação da hidrólise do coágulo plasmático.....	46
4.6	Ensaio biológicos.....	46
4.6.1	Avaliação da integridade de hemácias.....	46
4.6.2	Indução experimental da sepse <i>in vivo</i>	47
4.6.2.1	Avaliação do efeito das proteínas do látex de <i>C. procera</i> sobre o tempo de coagulação plasmática de animais saudáveis ou com sepse induzida por <i>S. Typhimurium</i>	47

4.6.2.2	Avaliação do efeito das proteínas do látex de <i>C. procera</i> sobre o número de plaquetas de animais saudáveis ou com sepse induzida por <i>S. Typhimurium</i>	49
4.6.2.3	Análise do perfil protéico do plasma de animais saudáveis ou com sepse induzida por <i>S. Typhimurium</i> tratados com <i>C. procera</i>	49
4.7	Análise estatística.....	50
V	RESULTADOS	51
VI	DISCUSSÃO	78
VII	CONCLUSÃO	87
VIII	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

I - INTRODUÇÃO

1.1 Látex

Látex, em termos gerais, pode ser descrito como um líquido, geralmente de aspecto leitoso, exsudado de plantas quando estas sofrem algum tipo de injúria, seja por dano mecânico ou por herbivoria (KEKWICK, 2001). Após sofrer uma lesão, a planta libera o látex protegendo a área injuriada contra patógenos. O látex também possui uma propriedade colante, podendo aprisionar alguns insetos (MOURSY, 1997). Embora o látex, na maioria das vezes, apresente aspecto leitoso, este também pode apresentar uma coloração amarelada ou alaranjada como em plantas pertencentes à família Papaveraceae, marrom-amarelado em plantas do gênero *Cannabis*, ou pode ser límpido como em *Nerium oleander* (KEKWICK, 2001).

Nas plantas, o látex está presente nos laticíferos, que são células ou fileiras de células especializadas. Estudos anatômicos dos laticíferos demonstraram que estes são preenchidos pelo látex desde suas porções mais jovens, e que o próprio protoplasto da célula laticífera compõe esta substância. Estas células quando maduras aparentemente permanecem vivas e com a secreção em seu interior, que somente será liberada para o meio extracelular se a planta for injuriada. Ao seccionar um órgão, imediatamente inicia o extravasamento de látex dos laticíferos interconectados que, em pouco tempo, coagula e sela o órgão injuriado (Figura 1) (DEMARCO *et al.*, 2006).

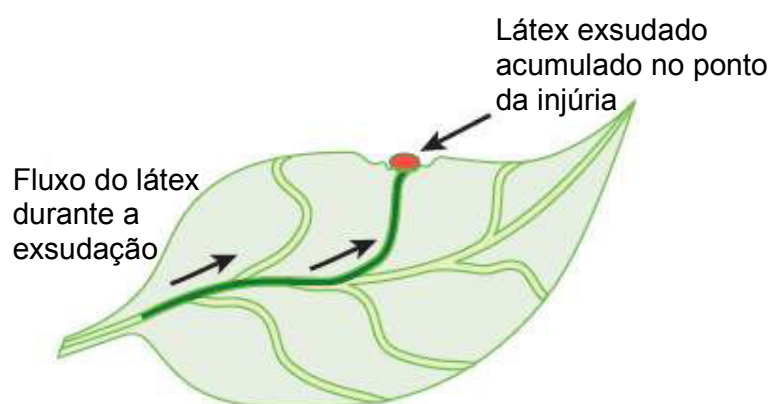


Figura 1 - Representação esquemática do extravasamento do látex devido à injúria foliar. Adaptado de Agrawal e Konno (2009).

Os laticíferos podem ser classificados, de acordo com os seus aspectos anatômicos em articulados e não articulados. Os articulados consistem de cadeias longitudinais de muitas células interconectadas nas quais as paredes celulares, que separam as células individuais, permanecem intactas, enquanto os laticíferos não articulados surgem de uma simples célula alongada que cresce nos espaços intercelulares, eventualmente se ramificando nos tecidos das plantas de um modo similar às hifas de fungos (Figura 2) (KEKWICK, 2001).

Os canais laticíferos podem estar presentes em todas as partes da planta ou, apenas, em tecidos ou órgãos restritos. O látex pode ser extraído a partir do caule (*Hevea brasiliensis*), tubérculos (*Manihot glaziovii*), folhas (*Calotropis procera*), galhos (*Plumeria rubra*) ou do fruto (*Achras sapota*, *Carica papaya*). A extração de látex de *Hevea brasiliensis* ocorre através de incisões realizadas em seu tronco, mas o processo de coleta não é igual para todas as plantas. Por exemplo, o látex de *Calotropis procera* é coletado a partir de extremidades foliares, enquanto que em *Plumeria rubra* este fluido é abundante apenas nas extremidades dos seus galhos, não sendo possível coletar látex a partir de sua porção lenhosa (FREITAS *et al.*, 2007; 2010).

1.2 Composição bioquímica do látex

O látex é um sistema coloidal, ou seja, uma suspensão de partículas de borracha (fase dispersa) em um meio aquoso, chamado soro (meio dispersivo) (WISNIEWSKI, 1983). A fase borracha é constituída por 96% de hidrocarboneto, 1% de proteína e 3% de lipídios e alguns traços de magnésio, potássio e cobre. A fase

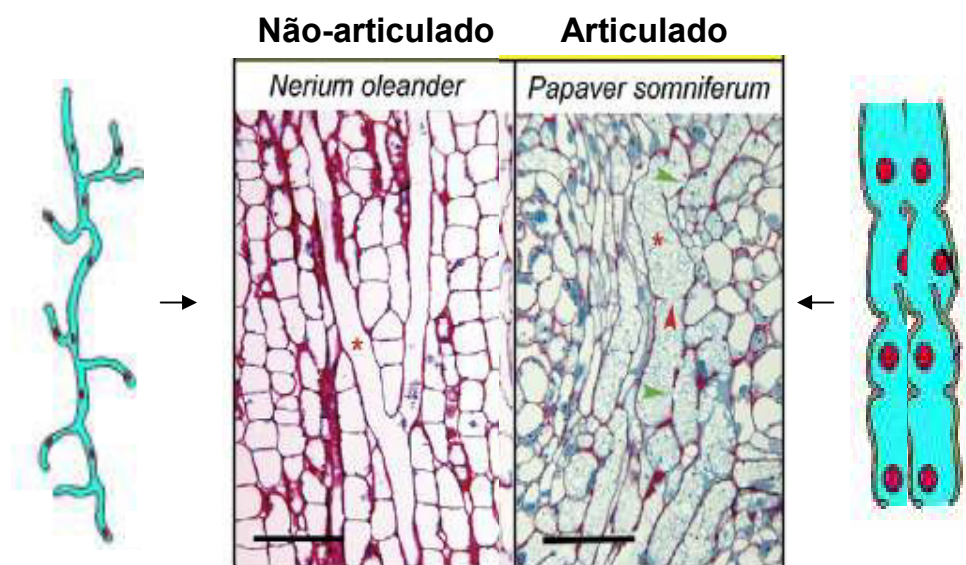


Figura 2 - Representação esquemática e anatomia de laticíferos não-articulados e articulados. Mostrada através de cortes longitudinais do caule de *Nerium oleander* (não-articulado) e *Papaver somniferum* (articulado). O canal laticífero está indicado pelo asterisco vermelho. As barras representam 60 µm. Adaptado de HAGEL *et al.*, 2008.

soro, ou fase aquosa, contém diferentes classes de compostos, incluindo carboidratos, proteínas e bases nitrogenadas (ARCHER *et al.*, 1969; MORCELLE *et al.*, 2004; SEMEGEN, 1978; TATA, 1980). Também já foram encontrados nestes fluidos metabólitos secundários como poliisopreno, alcalóides, cardenólídeos, compostos fenólicos, terpenos, taninos e flavonóides (AGRAWAL; KONNO, 2009). Por ser o látex o exsudato citoplasmático das células laticíferas, o soro também é constituído de componentes celulares como núcleos, mitocôndrias e ribossomos (LYNN; CLEVETTE-RADFORD, 1986).

1.3 Proteínas presentes em fluidos laticíferos

Nos fluidos laticíferos têm sido encontrados diversos tipos de proteínas, destacando-se uma diversidade de proteínas com atividades enzimáticas, que podem, inclusive, estar relacionadas à defesa das plantas. Várias proteínas como quitinases e glucanases (FREITAS *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 1999; SOBROTO *et al.*, 1996), proteases (PRIOLO *et al.*, 2000; KYNDT *et al.*, 2007; MOUSSAOUI *et al.*, 2001), lectinas (JEKEL *et al.*, 1991) e inibidores de proteases (MONTI *et al.*, 2004) têm sido encontradas em fluidos laticíferos de diferentes espécies.

O látex possui uma grande diversidade de proteínas, sendo especialmente rico em enzimas com atividades proteolíticas. De maneira geral, as proteases podem ser classificadas de acordo com o aminoácido presente em seu sítio ativo, em serínicas, cisteínicas, aspárticas e metalo-proteases (BARRETT, 1986). Entre estes tipos de proteases, têm sido encontradas, mais freqüentemente, em fluidos laticíferos proteases serínicas e, principalmente, cisteínicas (ANTÃO; MALCATA,

2005; KYNDT *et al.*, 2007; PRIOLO *et al.*, 2000; KUNDU *et al.*, 2000; MOUSSAOUI *et al.*, 2001).

Como exemplo de um látex rico em proteases cisteínicas pode ser citado o látex de *Carica papaya*, no qual foram isoladas quatro destas proteases: a papaína (EC 3.4.22.2), quimopapaína (EC 3.4.22.6), caricaína (EC 3.4.22.30) e papaia protease IV (EC 3.4.22.5) (MOUSSAOUI *et al.*, 2001). Muitas outras proteases cisteínicas foram isoladas de fluidos laticíferos de diferentes espécies, como: a proceraina extraída de *Calotropis procera* (DUBEY; JAGANNADHAM, 2003), as três endopeptidases de *Araujia hortorum* denominadas araujaína h I, II, e III (PRIOLO *et al.*, 2000; OBREGON *et al.*, 2001), ervatamina A, B e C purificadas de *Ervatamia coronaria* (NALLAMSETTY *et al.*, 2002; KUNDU *et al.*, 2000) e a eineíma obtida de *Ervatamia heyneana* (PATEL; JAGANNADHAM, 2003). Foram purificadas, ainda, a asclepaína I do látex de *Asclepia curassavica* (LIGGIERI *et al.*, 2004), a morrenaína b I obtida do látex de *Morrenia brachistephana* (CAVALLI *et al.*, 2003) e a funastraína de *Funastrum clausum* (MORCELLE *et al.*, 2004). O látex de *Calotropis gigantea* contém quatro proteases cisteínicas, a calotropina FI, FII, DI e DII (ABRAHAM; JOSHI, 1979).

Também há registros de atividade proteolítica do tipo serínica em fluidos laticíferos, no entanto, com menos freqüência que as proteases cisteínicas. No látex de *Taraxacum officinali* foi purificada uma protease serínica chamada de taraxilisina (ANTÃO; MALCATA, 2005). Este tipo de protease também foi encontrada no látex de *Euphorbia supina* (ARIMA *et al.*, 2000) e *Artocarpus heterophyllus* (PRASAD; VIRUPAKSHA, 1990).

1.4 Plantas laticíferas

Dentre a grande variedade de plantas que compõem o Reino Vegetal, cerca de 12.500 espécies, pertencentes a 22 famílias, são consideradas plantas laticíferas (HAGEL *et al.*, 2008). Porém as plantas não são as únicas espécies produtoras de látex, algumas espécies de fungos dos gêneros *Lactarium* e *Peziza* também têm esta capacidade (KEKWICK, 2001).

Entre as famílias de plantas produtoras de látex destacam-se a Euphorbiaceae (LYNN; CLEVETTE-RADFORD, 1987) e Apocynaceae (BROCKBANK; LYNN, 1979), embora outras famílias como Moraceae, Compositae, Anarcadiaceae e Sapotaceae também produzam esta substância (DELTA, 1982).

Plantas comuns como Jasmim (*Plumeria rubra*), Hortência (*Calotropis procera*), Unha-de-onça (*Cryptostegia grandiflora*), Aveloz (*Euphorbia tirucalli*) e Sapoti (*Achras sapota*) são plantas laticíferas. Entretanto, sem qualquer dúvida, a planta laticífera mais conhecida em todo o mundo é a Seringueira (*Hevea brasiliensis*), espécie da região amazônica também conhecida como “árvore da borracha”. A borracha, matéria-prima extraída da seringueira, é oriunda de seu fluido laticífero e revolucionou a indústria no século XIX. A partir desta foi gerado uma considerável gama de produtos industrializados dos quais se destacam o pneu para automotivos e as luvas descartáveis utilizadas por profissionais da área de saúde e outros (SUSSMAN *et al.*, 2002). A importância comercial desta planta é o principal motivo de seu látex ser o mais estudado entre os já conhecidos.

1.5 Descrição e caracterização das espécies vegetais

1.5.1 *Calotropis procera* (Ait.) R.Br.

Uma planta cujo gênero pertence à subfamília Asclepiadoideae da família Apocynaceae, composta por plantas laticíferas. Seu nome científico é originário do grego (“Kalos” = belo, “tropis” = barco) e do latim (“procerus” = alto, esbelto) (KISSMANN; GROTH, 1999).

C. procera tem sua origem na Índia e África Tropical, mas foi levada como planta ornamental para outras partes do mundo. Essa espécie pode ser encontrada em quase todas as regiões tropicais da América, incluindo o Brasil, onde foi introduzida também como planta ornamental, em Recife, no início do século XIX. É encontrada com muita facilidade em terrenos baldios, beiras de estrada e dunas. Um fato interessante é que esta planta se desenvolve apenas em áreas ensolaradas (LORENZI; MATOS, 2002).

Esta espécie possui muitos nomes populares, que variam de acordo com a região em que é encontrada: algodão-de seda e seda (PE), flor-de-seda, ciúme e hortência (CE), paninha-de-seda (SP), leiteiro (SP, MG), queimadura e jacaúna (NE).

Esta planta é um arbusto, perene, com pouca ramificação, e que pode alcançar 3,5 m de altura. Suas folhas são grandes, subcoriáceas; seus frutos são cápsulas infladas, globosas, grandes, com sementes cobertas por painas brancas sedosas; suas flores são de cor roxa, dispostas em inflorescências fasciculadas terminais. A sua disseminação se dá apenas pelo vento (KISSMANN; GROTH, 1999; LORENZI; MATOS, 2002).

O látex de *C. procera* tem sido utilizado popularmente como anti-helmintico, fungicida, anti-sifilítico, purgativo, expectorante, no tratamento de lepra, da asma brônquica e de doenças de pele e na coagulação do leite para a produção de queijo (KIRTIKAR; BASU, 1935; WATT; BREYER-BRANWIJK, 1962; LARHSINI *et al.*, 1997).

Muitos autores têm demonstrado várias propriedades do látex de *C. procera* como hemólise das células sanguíneas e atividade anti-plasmodial, cicatrizante, antitumoral, antipirética, analgésica, inflamatória e antiinflamatória, antibacteriana, larvicida, inseticida, preventiva contra choque séptico, dentre outras (SHARMA *et al.*, 2001, KUMAR; BASU, 1994; OLIVEIRA *et al.*, 2010; RASIK *et al.*, 1999; DEWAN *et al.*, 2000a; DEWAN *et al.*, 2000b; SANGRAULA *et al.*, 2002; ARYA; KUMAR, 2005; CHOEDON *et al.*, 2006; ALENCAR *et al.*, 2006; LARHSINE *et al.*, 1999; RAMOS *et al.*, 2006; RAMOS *et al.*, 2010; LIMA-FILHO *et al.*, 2010).

1.5.2 *Cryptostegia grandiflora* R.Br.

É uma planta trepadeira que também pertence à subfamília Asclepiadoideae da família Apocynaceae. É comumente chamada de alamada-roxa, boca-de-leão, unha-de-onça e viúva alegre. É uma planta arbustiva, semi-herbácea, com folhas simples e opostas, com nervura central bem marcada e esbranquiçada. As inflorescências são terminais com flores roxas, formadas principalmente na primavera e no verão (LORENZI; SOUZA, 1999).

Esta planta é endêmica de Madagascar (África), no entanto, é hoje amplamente distribuída em áreas tropicais. Ela foi transportada para diferentes partes do mundo principalmente com a função de planta ornamental ou para

utilização do seu látex na produção de borracha (KLACKENBERG, 2001). Esta espécie pode causar danos nas áreas em que foi introduzida, pois se desenvolve sobre as copas de árvores nativas, impedindo a passagem de luz e matando-as por sombreamento excessivo. Na Austrália, esta planta tem se tornado um grande problema, sendo necessário um alto investimento para o controle de sua proliferação (GRICE *et al.*, 2000).

O seu látex pode ser utilizado para a produção de borracha, no entanto dificuldades na extração limitam a quantidade obtida desta substância. Por isso, pesquisas foram desenvolvidas para melhor compreensão da estrutura laticífera desta espécie (BLASER, 1945).

Poucos estudos foram encontrados sobre atividades biológicas relacionadas diretamente ao látex, como atividade pró-inflamatória, larvicida, anti-oxidativa e proteolítica (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009; RAMOS *et al.*, 2009b; FREITAS *et al.*, 2010). No entanto, extratos de diversas partes da planta apresentaram atividade bactericida (MUKHERJEE *et al.*, 1999). Estudos têm atribuído um efeito tóxico a esta espécie, pois cavalos chegam a morrer após a ingestão da mesma (COOK *et al.*, 1990).

1.5.3 *Plumeria rubra* L.

Plumeria rubra L. é uma planta laticífera que pertence à família *Apocynaceae*. Conhecida popularmente como jasmim, jasmim-manga, frangipani ou árvore-pagode, esta planta é originária da América Central e encontra-se amplamente distribuída pelas regiões de clima tropical do mundo, inclusive no Brasil (BROWN,

2010). Devido à beleza e perfume de suas flores, Jasmim é facilmente encontrada como planta ornamental em praças e jardins de muitas regiões metropolitanas.

O nome do gênero, *Plumeria*, é uma homenagem ao botânico que a descreveu, Charles Plumier. Trata-se de uma árvore, com ramificações bifurcadas, espessas de aspecto suculento, de 6 a 8 m de altura. Com folhas decíduas, aglomeradas no ápice dos ramos. Possui inflorescência terminal, com numerosas flores sucessivas, perfumadas na espécie típica, vermelhas ou róseas com o centro amarelo (BROWN, 2010). Quanto ao seu cultivo, apresenta fácil multiplicação por estacas (LORENZI; SOUZA, 1999).

Estudos fitoquímicos desta planta demonstraram que ela possui muitos iridóides, um metabólito secundário monoterpênico. Estes iridóides demonstraram possuir atividade algicida, antibacteriana, antifúngica e citotóxica (KUIGOUA *et al.*, 2010; KARNODO *et al.*, 1990). Popularmente, esta planta é utilizada para combater a sífilis, como purgativo e no combate à febre (KARNODO *et al.*, 1990). No que se refere à atividade enzimática, o látex de *P. rubra* é uma fonte de atividade lipolítica (CAMBON *et al.*, 2006).

Apesar desses relatos, *P. rubra* é pouco estudada quando considerados seus aspectos bioquímicos. De acordo com pesquisa bibliográfica realizada, poucos estudos relacionados ao látex foram encontrados, como a presença de atividade anti-oxidante e proteolítica (FREITAS *et al.*, 2010).

A figura 3 mostra os aspectos gerais das plantas *C. procera*, *Cr. grandiflora* e *P. rubra*.



Figura 3 - Aspectos gerais das espécies vegetais estudadas. (A) *Calotropis procera*, (B) *Cryptostegia grandiflora* e (C) *Plumeria rubra*.

1.6 Envolvimento de proteases laticíferas no processo de coagulação sanguínea

O látex de plantas pertencentes à família Apocynaceae tem sido comumente utilizado na terapia de ferimentos recentes, pela medicina popular, com o objetivo de interromper o sangramento e promover a cicatrização. Os estudos relatam que esta atividade farmacológica é preferencialmente desempenhada por proteases cisteínicas (KUMAR, 1999; THANKAMMA, 2003; MUEEN *et al.*, 2005; MUTHU *et al.*, 2006).

Os eventos que envolvem a formação do coágulo de fibrina e sua hidrólise, em estágios posteriores, durante a coagulação sanguínea, são fundamentais para a hemostasia e cicatrização. Proteases que interferem na coagulação sanguínea e na hidrólise da fibrina foram isoladas e caracterizadas de várias plantas laticíferas (RAJESH *et al.*, 2005; RAJESH *et al.*, 2007; SHIVAPRASAD *et al.*, 2009a; SHIVAPRASAD *et al.*, 2009b; SHIVAPRASAD *et al.*, 2010). A ficina, uma protease cisteínica de *Ficus carica* e uma protease serínica de *Synadenium grantii* demonstraram a capacidade de interferir no processo de coagulação e fibrinólise (RICHTER, 2002; RAJESH *et al.*, 2006).

1.7 Hemostasia

Hemostasia é um processo dinâmico no qual a coagulação do sangue é iniciada e encerrada de forma rápida e regulada (NATHAN *et al.*, 2003). Os mecanismos hemostáticos ocorrem para prevenir a hemorragia e compreendem dois processos principais: a coagulação e a fibrinólise.

A coagulação sanguínea, o interrupimento da perda de sangue de um vaso danificado, é uma resposta imune a um dano em um vaso sanguíneo (KREM; DI CERA, 2002). Neste processo ocorre a interação entre plaquetas e fatores de coagulação, resultando na formação de um tampão hemostático protetor, cuja função é estancar o sangue no local da lesão vascular. Para restabelecer o padrão normal de fluxo sanguíneo, o sistema fibrinolítico evoluiu no sentido de recanalizar vasos ocluídos através do processo de cicatrização, ou fibrinólise, responsável por restaurar a perfusão através de vasos injuriados nos quais foi formado o coágulo protetor (LOSCALZO, 2003).

A formação do coágulo no sítio de lesão endotelial representa um processo crítico para a manutenção da integridade vascular. Os mecanismos envolvidos nesse processo, constituintes do sistema hemostático, devem ser regulados para simultaneamente, contrapor-se à perda excessiva de sangue e evitar a formação de trombos intravasculares, decorrentes de formação excessiva de fibrina (FRANCO, 2001).

1.8 Principais proteínas que participam do processo de coagulação e fibrinólise

1.8.1 Fibrinogênio

O fibrinogênio é uma glicoproteína trimérica de 340 kDa sintetizada no fígado presente em altas concentrações no plasma (1,5 a 3 g/L). O complexo protéico consiste em dois conjuntos de três cadeias polipeptídicas nomeadas $A\alpha$, $B\beta$ e γ , unidas por pontes dissulfeto. As 6 cadeias polipeptídicas unem-se pelas suas

sequências N-terminais convergendo num glóbulo central, o domínio “E”. As sequências C-terminais das cadeias B β e γ se estendem, externamente, para formar dois domínios distais “D” (Figura 4) (MOSESSON, 2005).

O fibrinogênio é o substrato final na formação do coágulo sanguíneo. Após hidrólise pela trombina, são liberados os fibrinopeptídeos A e B que expõem os seus sítios de polimerização. Os monômeros de fibrina polimerizam-se pela ligação dos sítios de polimerização expostos aos sítios de ligação complementares no domínio D, formando as protofibrilas. Finalmente, a trombina catalisa a ativação do fator XIII em XIIIa e estabiliza o coágulo de fibrina ligando as moléculas de fibrina através de ligações peptídicas entre as cadeias γ (MOSESSON, 2005; LORD, 2007).

1.8.2 Trombina

A trombina é uma enzima chave na coagulação sanguínea. É uma protease serínica pertencente à família quimotripsina, liberada por proteólise da protrombina (estado inativo da trombina, produzida no fígado). É uma protease de 39 kDa homóloga à tripsina, quimotripsina, elastase, dentre outras, porém ao contrário da tripsina, que hidrolisa ligações peptídicas após resíduos de arginina e lisina, a trombina hidrolisa especificamente as ligações Arg-Gly próximas à sequência N-terminal das cadeias A α e B β do fibrinogênio, liberando os fibrinopeptídeos A (FPA - A α 1-16) e B (FPB - B β 1-15) (Figura 4) (SCHERAGA, 2004; JENNEWEIN *et al.*, 2011).

1.8.3 Plasmina

A plasmina é uma protease serínica de aproximadamente 70 kDa, sintetizada através da hidrólise do plasminogênio, a forma inativa da plasmina, produzido no fígado. A hidrólise do plasminogênio pode ser ativada através do ativador do plasminogênio tipo tecidual (tPA) ou tipo uroquinase (uPA). Os dois ativadores têm alta especificidade de ligação com seu substrato (plasminogênio) e promovem a hidrólise de uma única ligação peptídica (Arg⁵⁶⁰-Val⁵⁶¹). A plasmina ativada hidrolisa o coágulo de fibrina em diferentes sítios de clivagem, liberando fragmentos X, Y, D-dímeros, D, E, B β 15-42 e fragmentos menores principalmente derivados da cadeia α (Figura 4) (FRANCO, 2001; JENNEWEIN *et al.*, 2011).

1.9 Coagulação sanguínea

A formação do coágulo envolve complexas interações entre proteases plasmáticas e seus cofatores, que culminam na gênese da enzima trombina, que, por proteólise, converte o fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel. A rede insolúvel de fibrina, unida ao tampão plaquetário promovem um mecanismo hemostático eficiente em interromper o sangramento. Progressos significativos ocorreram nas últimas décadas, concernentes à compreensão da fisiologia desse sistema e dos mecanismos que o regulam, cujos conhecimentos tiveram fundamental importância para a melhor compreensão da fisiologia da hemostasia e do papel das reações hemostáticas em doenças hemorrágicas e trombóticas (JENNY; MANN, 1998; COLMAN *et al.*, 2001a).

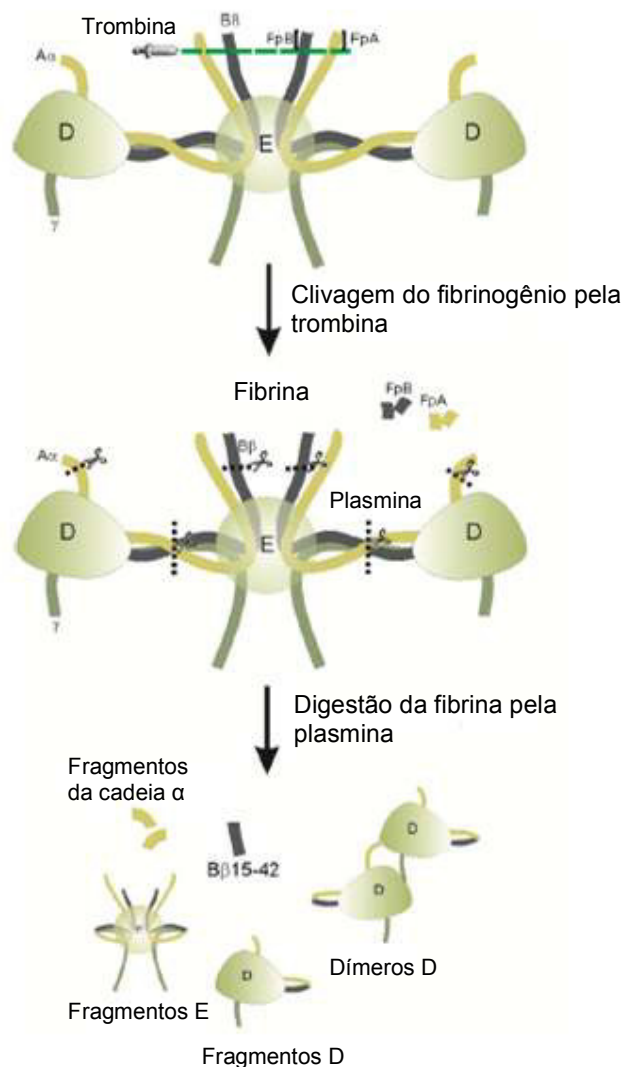


Figura 4 - Hidrólise do fibrinogênio pela trombina e digestão da fibrina pela plasmina.

O esquema mostra o mecanismo de ação e os produtos de hidrólise resultantes da clivagem do fibrinogênio pela trombina e da fibrina pela plasmina. Adaptado de Jennewein *et al.* (2011).

Na década de 60 foi proposta a hipótese da “cascata” para explicar a fisiologia da coagulação do sangue (MACFARLANE, 1964; DAVIE; RATNOFF, 1964). Nesse modelo, a coagulação ocorre por meio de ativação proteolítica seqüencial dos fatores de coagulação, que são proenzimas que se tornam ativas por proteólise e são nomeadas por algarismos romanos de acordo com a ordem na qual foram descobertas (Figura 5). A ativação dos fatores resulta na formação da trombina que, então, converte a molécula de fibrinogênio em fibrina. O modelo divide a coagulação em uma via extrínseca, envolvendo componentes do sangue, mas também elementos que usualmente não estão presentes no espaço intravascular, como o fator tecidual (FT) e uma via intrínseca, iniciada por componentes presentes no espaço intravascular, que convergem no ponto de ativação do fator X, “via final comum” (LUCHTMAN-JONES; BROZE, 1995).

1.9.1 Via intrínseca

A via intrínseca é constituída por uma cascata de reações proteolíticas a partir de fatores que estão presentes no sangue. Quando em contato com uma superfície de carga negativa, como o vidro ou a membrana de uma plaqueta ativada, a proteína plasmática FXII (fator de Hageman) torna-se ativa, gerando FXIIa (o sufixo “a” indica que esta é a forma ativa de FXII). Uma molécula chamada cininogênio de alto peso molecular (CAPM), um produto de plaquetas, ajuda a ancorar FXIIa à superfície carregada, servindo como um cofator (BORON; BOULPAEP, 2005).

Depois de acumulado, FXIIa converte pré-caliceína em caliceína. Por sua vez, a caliceína acelera a conversão de FXII para FXIIa, um exemplo de feedback positivo. Além de ampliar sua produção própria, formando caliceína, FXIIa

(juntamente com CAPM) cliva FXI, formando FXIa. Por sua vez, FXIa (também ligado à superfície carregada pelo CAPM) cliva FIX em FIXa. FIXa, juntamente com FXa e trombina, clivam FVIII formando FVIIIa, um cofator da reação seguinte. Finalmente, FIXa e FVIIIa, na presença de íons cálcio e fosfolípidios carregados negativamente (os principais constituintes das membranas celulares) formam um complexo trimolecular denominado tenase. O complexo tenase então converte FX em FXa (BORON; BOULPAEP, 2005).

Em uma série paralela de interações, FXa se liga ao cofator FVa, que por si só realiza feedback positivo desta reação, gerando um complexo com atividade enzimática conhecida como protrombinase. Este complexo converte a protrombina a sua forma enzimática, trombina. A trombina age sobre o fibrinogênio para gerar o monômero de fibrina, que rapidamente se polimeriza para formar o coágulo de fibrina (HOFFMAN *et al.*, 2005).

1.9.2 Via extrínseca

A via extrínseca inclui também cofatores protéicos e enzimas. Esta via é iniciada pela formação de um complexo entre o fator tecidual (FT) na superfície das células e FVIIa que está localizado fora do sistema vascular. O FT é uma glicoproteína de membrana de 45 kDa, que funciona como receptor para o FVII. O FT não é normalmente expresso em células em contato direto com o sangue (tais como células endoteliais e leucócitos), mas apresenta expressão constitutiva em fibroblastos subjacentes ao endotélio vascular (WILCOX *et al.*, 1989). O FT é também encontrado em queratinócitos, células epiteliais do trato respiratório e trato gastrointestinal, cérebro, células musculares cardíacas e glomérulos renais. Células

endoteliais e monócitos, que, normalmente, não expressam o fator tecidual, podem expressá-lo na vigência de lesão endotelial e na presença de estímulos específicos, tais como endotoxinas e citocinas (TNF- α e interleucina-1) (VAN *et al.*, 1990; FRANCO *et al.*, 2000; COLMAN *et al.*, 2001b).

Quando uma lesão no endotélio permite que FVII entre em contato com FT, o FT ativa, de forma não proteolítica, FVII em FVIIa. O mecanismo da conversão inicial do zimogênio FVII para FVIIa ainda está em discussão, mas é mais provável que esta ação aconteça devido à uma ativação autocatalítica, e não por um efeito do FT (HOFFMAN; MONROE, 2005). Esta ligação de FVIIa a FT forma um complexo enzimático que ativa FX, gerando FXa. O complexo FVIIa/FT, semelhante em função ao complexo tenase, converte FX em sua forma ativa (FXa), que se liga ao cofator FV, e é ligado na superfície da membrana na presença de íons cálcio para gerar o complexo protrombinase. O complexo protrombinase converte protrombina em trombina, que por sua vez converte o fibrinogênio em fibrina gerando o coágulo de fibrina (HOFFMAN *et al.*, 2005).

1.9.3 Via final comum

A via comum começa com a ativação de FX na via intrínseca, na via extrínseca, ou em ambas. FXa, proveniente tanto da via intrínseca como da extrínseca, é a primeira protease da via comum. FXa, na presença de FV, íons cálcio e fosfolipídios, converte a protrombina em sua forma ativa, a trombina (HARMENING, 2002). A principal ação da trombina é catalisar a proteólise de fibrinogênio, uma proteína solúvel no plasma, em monômeros de fibrina, que ainda permanecem solúveis. Os monômeros de fibrina, em seguida, polimerizam para

formar um gel de polímeros de fibrina que prendem as hemácias. A trombina também ativa FXIII, que é convertido em FXIIIa e medeia a ligação covalente cruzada de polímeros de fibrina para formar uma malha, chamada fibrina estável, que é menos solúvel do que os polímeros de fibrina (BORON; BOULPAEP, 2005). A trombina pode catalisar a formação de nova trombina a partir da protrombina e pode catalisar a formação dos cofatores FVa e FVIIIa, resultando em uma amplificação eficaz da coagulação (HARMENING, 2002).

1.10 Fibrinólise

Fibrinólise pode ser definida como a degradação da fibrina, mediada pela plasmina. O sistema fibrinolítico é composto por diversas proteínas (proteases serínicas e inibidores), que regulam a geração de plasmina, uma enzima ativa, produzida a partir de uma proenzima inativa (plasminogênio), que tem por função degradar a fibrina e ativar metaloproteases de matriz extracelular (COLLEN, 1999).

São conhecidos dois ativadores fisiológicos do plasminogênio: o ativador do plasminogênio do tipo tecidual (t-PA, "*tissue-type plasminogen activator*") e o ativador do plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA, "*urokinase-type plasminogen activator*") (Figura 6). Os dois, como dito anteriormente, têm alta especificidade de ligação com seu substrato (plasminogênio) e promovem a hidrólise de uma única ligação peptídica (Arg⁵⁶⁰-Val⁵⁶¹), que resulta na formação de uma protease serínica ativa, a plasmina (FRANCO, 2001; JENNEWEIN *et al.*, 2011).

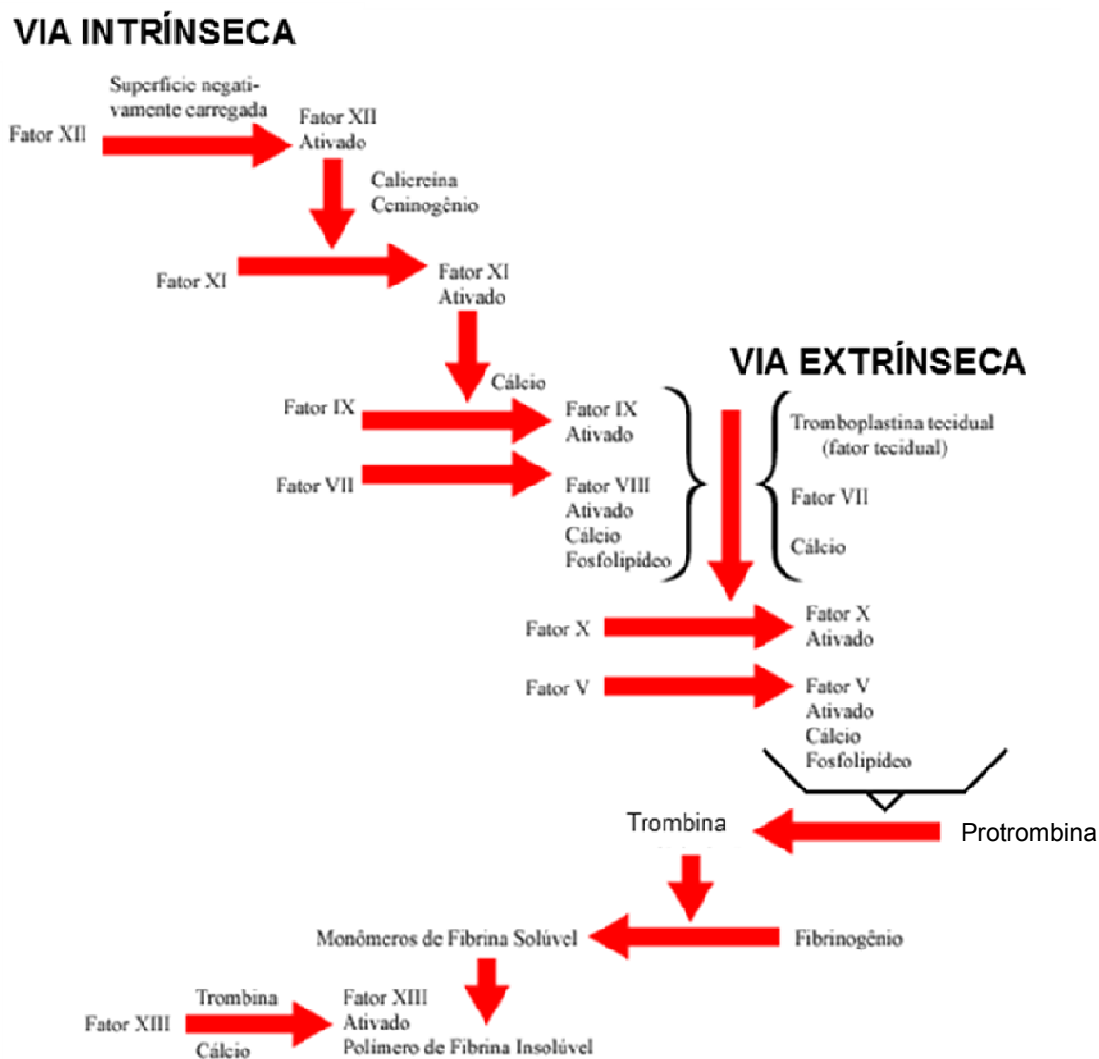


Figura 5 - Representação esquemática do processo de coagulação. Esquema proposto por Macfarlane (1964), Davie e Ratnoff (1964).

Embora a plasmina degrade não somente a fibrina, mas, também, o fibrinogênio, o fator V e o fator VIII, em condições fisiológicas, a fibrinólise ocorre como um processo altamente específico para a fibrina, portanto de ativação localizada e restrita, e não sistêmica, cumprindo, assim, sua função de remover o excesso de fibrina do tecido intravascular de modo equilibrado (FRANCO, 2001; JENNEWEIN *et al.*, 2011).

Os inibidores da fibrinólise são membros da superfamília de proteínas designadas serpinas (inibidores de proteases séricas). A inibição do sistema fibrinolítico ocorre em nível dos ativadores do plasminogênio mediante ação de inibidores específicos (PAIs, "*plasminogen activator inhibitors*"), cujo principal representante é o PAI-1, e diretamente sobre a plasmina, função inibitória exercida pela α_2 -antiplasmina (Figura 6) (FRANCO, 2001).

1.11 Função das plaquetas na coagulação

Como discutido anteriormente, a hemostasia primária é acionada em resposta à lesão da parede vascular e exposição do sangue ao tecido subendotelial. Várias interações coordenadas entre os componentes do tecido, as proteínas do plasma e os receptores de plaquetas levam à vedação inicial da parede do vaso danificado (DAHBACK, 2005; SADLER, 2005).

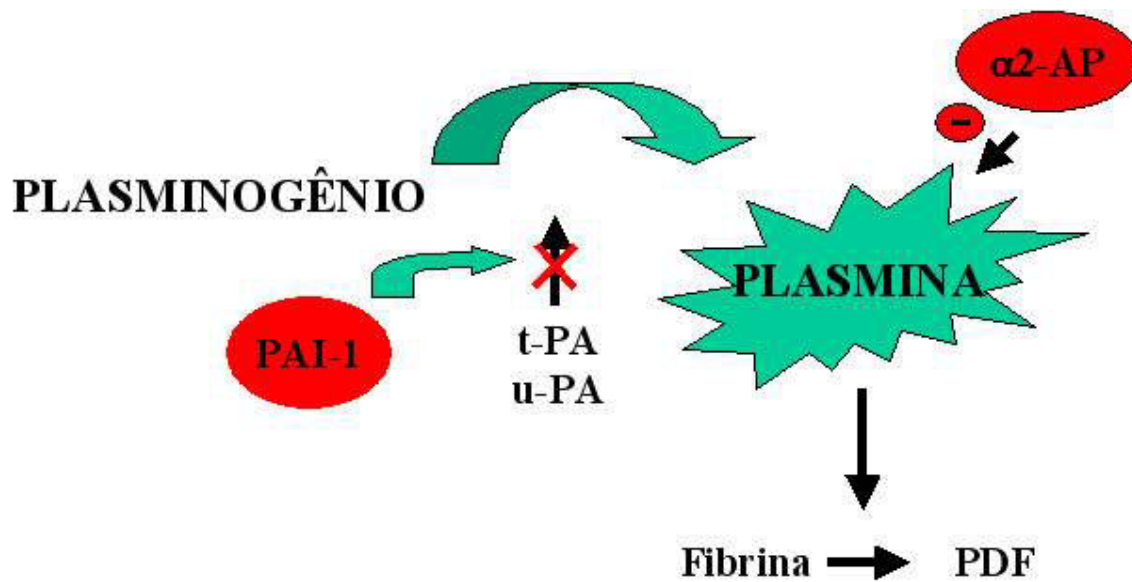


Figura 6 - Representação esquemática do sistema fibrinolítico. A figura esquematiza a ativação e inibição da síntese da plasmina, a partir da sua proenzima (plasminogênio) e sua ação sobre a fibrina. (PAI-1) inibidor de ativadores de plasminogênio, (t-PA) ativador de plasminogênio tipo tecidual, (u-PA) ativador de plasminogênio tipo uroquinase, (α_2 -AP) α_2 -antiplasmina e (PDF) produtos de degradação de fibrina. Fonte: (FRANCO, 2001).

As plaquetas são células especializadas do sangue que desempenham um papel central nos processos fisiológicos de hemostasia. A formação do tampão plaquetário primário é temporal e espacialmente coordenado com a ativação do sistema de coagulação do sangue. Através do processo de adesão e agregação, mediada pelo fator de Von Willebrand (FVW) e fibrinogênio, as plaquetas formam uma oclusão da área injuriada, ou "coágulo" (DAHBACK, 2005; SADLER, 2005).

Após os danos à parede vascular, as plaquetas sofrem uma série de eventos tais como a adesão, agregação, liberação do conteúdo do grânulo e alterações morfológicas que levam à formação do tampão plaquetário. A adesividade plaquetária primária é dependente da interação entre plaquetas e FVW, uma grande proteína plasmática multimérica composta por vários monômeros com ligações dissulfeto. O FVW sofre processamento proteolítico no plasma, mediado por uma metaloprotease denominada ADAMTS 13, gerando multímeros de todos os tamanhos e com eficiências funcionais diferentes. Os multímeros maiores são mais eficientes na adesão de plaquetas. O FVW medeia a adesividade plaquetária, servindo como uma ponte entre o tecido e as plaquetas, ligando ambos ao colágeno exposto em locais de lesão vascular e à glicoproteína de membrana plaquetária Ib-VIX (DAHBACK, 2005; SADLER, 2005).

1.12 Relação entre coagulação e inflamação

A inflamação é uma resposta complexa à infecção ou lesão com o objetivo de limitar o dano a uma área restrita, eliminar os estímulos nocivos e restaurar a homeostase. No entanto, este processo está fortemente associado com a ativação da cascata de coagulação. Uma grande variedade de condições inflamatórias, como

a sepse (LEVI, 2010), a artrite reumatóide (FLICK *et al.*, 2007), a doença de Alzheimer (PAUL *et al.*, 2007) e a esclerose múltipla (ADAMS *et al.*, 2007), não são somente atribuídas a uma resposta inflamatória descontrolada, mas também à perturbação da coagulação. Assim, quando a coagulação está comprometida, pode contribuir para a patogênese de várias doenças inflamatórias através da deposição de fibrina e insuficiência microvascular, bem como através do reforço da resposta inflamatória (LEVI *et al.*, 2004).

A contribuição da fibrina e do fibrinogênio na inflamação tem sido reconhecida, enquanto o papel dos produtos de degradação da fibrina ainda está sob investigação. No entanto, em pacientes com choque séptico com disfunção orgânica, os níveis de fibrinogênio e produtos de degradação, como D-dímeros, peptídeos B β 15-42 e fibrina solúvel estão aumentados no soro (IBA *et al.*, 2005). Vários fatores de coagulação, incluindo fibrina, fibrinogênio e também produtos de degradação da fibrina, modulam a resposta inflamatória, afetando a migração de leucócitos e produção de citocinas. Fragmentos de fibrina são principalmente pró-inflamatórios, porém, B β 15-42 em particular possui um potente efeito antiinflamatório (JENNEWEIN *et al.*, 2011).

1.12.1 Sepses

A sepsis é basicamente descrita como uma condição clínica resultante da evolução de um foco infeccioso descontrolado que posteriormente progride para uma resposta inflamatória sistêmica envolvendo a liberação de vários mediadores inflamatórios, causando intensa inflamação e lesão tecidual (O'BRIEN JR *et al.*, 2007).

Esta condição adversa pode ser induzida por bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas, fungos ou vírus (ANGUS *et al.*, 2001). A sepse provoca vários distúrbios fisiológicos incluindo estresse oxidativo, queda da pressão arterial e na sua fase crítica exacerba os níveis de creatinina e uréia no sangue, indicando insuficiência renal (FUJISHIMA; AIKAWA, 1995; SCHUSTER, 1989). A sepse letal também induz distúrbios hematológicos decorrentes de um desequilíbrio de citocinas pró-inflamatórias, o que leva ao processo de coagulação intravascular disseminada (CID), culminando com a deposição de fibrina na microvasculatura. CID é reconhecida como o último passo que precede a morte de pacientes sépticos (LEE *et al.*, 1993). Essa condição resulta em uma redução profunda do conteúdo de leucócitos e plaquetas (SCHUSTER, 1989).

Recentemente, Lima-Filho e colaboradores (LIMA-FILHO *et al.*, 2010) relataram um efeito protetor das proteínas do látex de *Calotropis procera* (CpPL) em camundongos submetidos a uma condição de sepse letal por infecção experimental com as bactérias Gram-negativas *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Typhimurium. Quando administrado 24 horas antes do inóculo bacteriano, CpPL impediu a morte dos animais, que permaneceram estáveis por até 28 dias, enquanto que os ratos sépticos morreram com 6 dias.

Atualmente, a sepse letal é a causa líder de morte de pacientes internados em unidades de terapia intensiva de Hospitais em todo o mundo (OSUCHOWSKI *et al.*, 2006). O tratamento da sepse permanece um desafio, mesmo com o arsenal de antibióticos modernos e tecnologias de cuidados intensivos. Desta forma, uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na patogenia da sepse podem proporcionar avanços significativos no campo da imunoterapia. O estudo de terapias

interventoras dos mecanismos imunes oferecem uma maior esperança de cura para pacientes sépticos (MUENZER *et al.*, 2010; KUMAR; SHARMA, 2008).

II - JUSTIFICATIVA

Na sociedade em que vivemos é comum o uso de plantas medicinais no tratamento terapêutico popular e científico. Recorrer à natureza como forma de sanar enfermidades é de longa data, visto que os recursos modernos nem sempre estiveram disponíveis para a população ou ainda estão em processo de desenvolvimento científico (BRITO, 1996).

Há milhões de anos, as plantas são utilizadas pelos homens devido a importância que estas possuem para o seu bem estar. Antigas civilizações do mundo Oriental, como as culturas chinesa e hindu, são tradicionais no uso de ervas. A fitoterapia também é uma importante aliada para o tratamento de doenças, em muitos países em desenvolvimento, visto que a população carente tem dificuldades para obter medicamentos convencionais, logo o uso de plantas medicinais pode ser uma alternativa para reduzir os custos (GARLET; IRGANG, 2001).

O conhecimento adquirido e acumulado por populações, que usam as plantas no tratamento de enfermidades, representa a base da fitoterapia moderna e o ponto de partida para pesquisas e produção de novos medicamentos pelas indústrias farmacêuticas. É consenso que investigar plantas comumente utilizadas por populações tradicionais aumenta as possibilidades de obter resultados positivos quanto ao efeito das drogas (BRITO, 1996). Contudo, a partir do momento em que a fitoterapia tem sido utilizada no tratamento de enfermidades, a eficácia e a

segurança devem ser obrigatórias, bem como a realização de testes para atividades farmacológicas, toxicológicas e clínicas (CALIXTO, 2000).

A busca por novos metabólitos que intervenham ou modulem rotas metabólicas específicas é de grande importância, principalmente quando se tratam de produtos de origem natural, como por exemplo, as proteínas do látex das plantas exploradas neste estudo.

O látex é uma fonte rica de enzimas proteolíticas, por isso atualmente tem havido um crescente interesse pelo estudo deste fluido vegetal, que tem sido cada vez mais reconhecido e revisado demonstrando envolvimento direto em atividades fisiológicas e farmacológicas (KUMAR; BASU, 1994; SANGRAULA *et al.*, 2002; RAJESH *et al.*, 2005; RAMOS *et al.*, 2005; RAMOS *et al.*, 2007; RAMOS *et al.*, 2009a; LIMA-FILHO *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Várias plantas laticíferas são utilizadas pela medicina popular com o intuito de interromper o sangramento e promover a cicatrização de feridas (KUMAR, 1999). Estudos confirmam que esta ação farmacológica é atribuída à presença de enzimas proteolíticas no látex, principalmente proteases cisteínicas (DOMSALLA; MELZIG, 2008; KUMAR, 1999; THANKAMMA, 2003; MUEEN *et al.*, 2005; MUTHU *et al.*, 2006).

A formação do coágulo no sítio de lesão endotelial representa um processo crítico para a manutenção da integridade vascular. Os mecanismos envolvidos nesse processo, constituintes do sistema hemostático, devem ser regulados para simultaneamente, contrapor-se à perda excessiva de sangue e evitar a formação de trombos intravasculares, decorrentes de formação excessiva de fibrina (FRANCO, 2001). Portanto, o presente estudo visou avaliar o efeito de proteínas presentes no látex de *C. procera*, *Cr. grandiflora* e *P. rubra*, todas pertencentes à família Apocynaceae, na coagulação sanguínea.

As plantas em estudo são amplamente distribuídas nos grandes centros urbanos. Suas distribuições geográficas estendem-se por toda a América tropical. A facilidade com que estas plantas são encontradas em jardins residenciais e praças de Fortaleza e seus arredores facilitou a obtenção dos fluidos laticíferos para este estudo.

A planta *Calotropis procera* é popularmente conhecida por suas propriedades medicinais. Várias atividades farmacológicas relacionadas às proteínas do látex desta planta já foram extensamente estudadas, dentre as quais podem-se destacar a atividade anti e pró-inflamatória, atividade anti-tumoral, inibição de peritonite induzida por carragenana pela modulação de NO no soro e prevenção de choque séptico (ALENCAR *et al.*, 2004; ALENCAR *et al.*, 2006; ARYA; KUMAR, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2010; RAMOS *et al.*, 2009a; LIMA-FILHO *et al.*, 2010).

Em estudo recente foi relatado que as proteínas do látex de *C. procera* exibem efeito protetor sobre camundongos sépticos, prevenindo contra sepse sem apresentar atividade direta sobre as bactérias (LIMA-FILHO *et al.*, 2010). Neste mesmo trabalho foi observado que as proteínas do látex de *C. procera* foram capazes de reverter o quadro de plaquetopenia de animais sépticos. Visto que as plaquetas estão diretamente envolvidas no processo de coagulação sanguínea (LI *et al.*, 2010) estas condições levaram, também, a realização de posteriores análises para a compreensão dos mecanismos pelos quais as proteínas do látex de *C. procera* agem no tratamento da sepse.

III - OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar a atividade pró-coagulante e fibrinolítica das proteases presentes no látex das plantas *Calotropis procera*, *Cryptostegia grandiflora* e *Plumeria rubra in vitro* utilizando sangue humano, e avaliar o efeito das proteases de *Calotropis procera in vivo* no tratamento de camundongos sépticos e saudáveis, avaliando desta forma o envolvimento destas proteases na homeostase sanguínea. Para tanto, os seguintes objetivos específicos foram traçados:

- Coletar e fracionar o látex de *C. procera*, *Cr. grandiflora* e *P. rubra* através de etapas de centrifugação e diálise com o objetivo de obter suas frações protéicas (PL);
- Fracionar as proteínas do látex de *C. procera* e *Cr. grandiflora* por cromatografia, no intuito de purificar as proteínas responsáveis pelas atividades pró-coagulante e fibrinolítica *in vitro*;
- Caracterizar as amostras quanto à atividade proteolítica total em ensaios colorimétricos;
- Avaliar a atividade pró-coagulante *in vitro* das frações e sub-frações obtidas sobre plasma humano citratado;

- Avaliar a atividade de hidrólise do fibrinogênio pelas frações e sub-frações, para determinar um provável sítio de ação destas proteases, por ensaios de difusão em gel de ágar e por espectrofotometria;
- Caracterizar o padrão de hidrólise do fibrinogênio pelas frações e sub-frações, de forma dose e tempo-dependente por PAGE-SDS;
- Determinar qual classe de proteases está envolvida nas atividades determinadas através de pré-incubação das frações e sub-frações com inibidores de proteases específicos;
- Avaliar a capacidade das frações e sub-frações de hidrolisar o coágulo de fibrina, evento descrito como fibrinólise e associado à hemostase, por PAGE-SDS;
- Verificar se as frações e sub-frações interferem na integridade de hemácias a partir de esfregaços sanguíneos;
- Avaliar o efeito das proteínas do látex de *C. procer* *in vivo*, sobre o tempo de coagulação sanguínea de camundongos saudáveis ou sépticos, além da avaliação do número de plaquetas, por exames hematológicos padronizados e alteração do perfil protéico de proteínas plasmáticas, por PAGE-SDS.

IV - MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

4.1 Reagentes

Fibrinogênio humano, trombina (E.C. 3.4.21.5), tripsina (E.C. 3.4.21.4), papaína (E.C. 3.4.22.2), trans-epoxisuccinil-leucil-amido-3-metil-butano (E-64), ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA), fenil-metil-sulfonil-fluor (PMSF), pepstatina, azocaseína, uréia e agarose foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. (São Paulo, Brasil). Ditiotreitól (DTT) e marcadores de massa molecular foram obtidos da GE Healthcare Brasil. Os demais reagentes foram de grau analítico e obtidos de diferentes fornecedores.

4.2 Materiais biológicos

4.2.1 Sangue humano

Amostras de sangue humano saudável foram obtidas a partir do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará, cujos exames hematológicos deram resultado não reagente para os seguintes parâmetros: sorologia para chagas; pesquisa de anticorpos anti-HBC (IgG + IgM); pesquisa de anticorpos anti-HCV; pesquisa de

antígeno 's' hepatite B; pesquisa de AG HIV P24 e anticorpos anti-HIV1, anti-HIV1 grupo O e anti-HIV2; pesquisa de anticorpos HTLV I/II e sorologia para sífilis.

O sangue foi coletado em tubos padronizados contendo citrato trisódico 0,11 M numa razão de 9:1 (v/v). Após a coleta, esse material foi centrifugado a 500 x g, por 15 min a 20 °C, obtendo-se, desta forma, o plasma. Este procedimento foi repetido imediatamente antes dos ensaios com o objetivo de usar amostras frescas.

4.2.2 Material Vegetal

Para a realização deste estudo, foi coletado o látex de *Calotropis procera* (Ait) R. Br., *Cryptostegia grandiflora* R. Br. e *Plumeria rubra* L., plantas pertencentes à família Asclepiadaceae e amplamente distribuídas na cidade de Fortaleza e região metropolitana. As plantas foram identificadas pelo Professor Edson de Paula Nunes, taxonomista do Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará e foram depositadas sob exsicatas de número N. 32663, N. 040409 e N. 15018, respectivamente.

4.2.3 Animais

Camundongos (*Mus musculus*) machos da linhagem *Swiss* (28-32 g) foram adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (Biocen - UFC) e mantidos no Biotério Experimental do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, sob condições controladas de luz (fotoperíodo - 12 h de luz), temperatura (25 °C), umidade (60-70%) e livre acesso à água e ração (Purina, Paulínia, SP, Brasil).

Durante o curso experimental, todos os animais foram sacrificados através da inalação de halotano (*over-dose*). Este reagente também foi utilizado para anestésiar os animais que tiveram seu fluido sanguíneo coletado através da via do plexo retro-orbital. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais da Universidade Federal do Ceará (CEPA).

4.2.4 Agente infeccioso

Salmonella enterica subespécie *enterica* sorotipo Typhimurium foi isolada de um caso clínico humano na Fundação Ezequiel Dias (FUNED, Belo Horizonte, MG) e cedida pelo Dr. Jacques Robert Nicoli (Universidade Federal Minas Gerais). As bactérias foram mantidas a -18 °C em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) contendo 50% de glicerol.

Uma suspensão de *S. Typhimurium* foi incubada em caldo BHI a 37 °C por 24 h em estufa bacteriológica, para sua re-ativação. Posteriormente, esta suspensão foi plaqueada em ágar BHI ou MacConkey e novamente incubada a 37 °C por 24 h. As colônias isoladas foram suspensas em PBS estéril e ajustadas para conter 10⁷ UFC/mL. O ajuste da cultura foi realizado utilizando a técnica de comparação com a Escala de McFarland, e a quantificação do inóculo bacteriano foi confirmada através de contagens de células viáveis em placas.

MÉTODOS

4.3 Coleta e fracionamento do látex

O látex das plantas em estudo foi coletado, através de incisões no ápice caulinar, em tubos do tipo falcon contendo água destilada, numa proporção de 1:2 (v/v). A coleta do látex em água minimiza o efeito natural da coagulação que ocorre nesse fluido, logo após sua exsudação, evitando o aprisionamento de substâncias solúveis. Este procedimento não compromete a saúde da planta, pois os ápices caulinares se regeneram e a planta retoma o seu desenvolvimento normal.

Após a coleta, o látex foi centrifugado a 5.000 x *g* por 10 min a 10 °C e o precipitado obtido, constituído principalmente de borracha, foi descartado. O sobrenadante foi, então, submetido à diálise contra água destilada (1:10 v/v) a 8 °C durante 60 h, com trocas da água a cada 4 h, utilizando uma membrana de diálise com capacidade de retenção de moléculas com massa molecular superior a 8 kDa. Em seguida, o líquido retido no interior da membrana foi novamente centrifugado, sob as mesmas condições anteriores, e o sobrenadante foi liofilizado, obtendo-se um material rico em proteínas e destituído de borracha. Este procedimento foi rotineiro para obtenção amostra em quantidade suficiente para a realização dos experimentos. As frações protéicas, obtidas por meio deste protocolo, foram denominadas de proteínas do látex (PL), foram analisadas por PAGE-SDS e utilizadas nos experimentos deste estudo. A seqüência de eventos realizada para a obtenção das proteínas do látex está sumarizada na Figura 7.

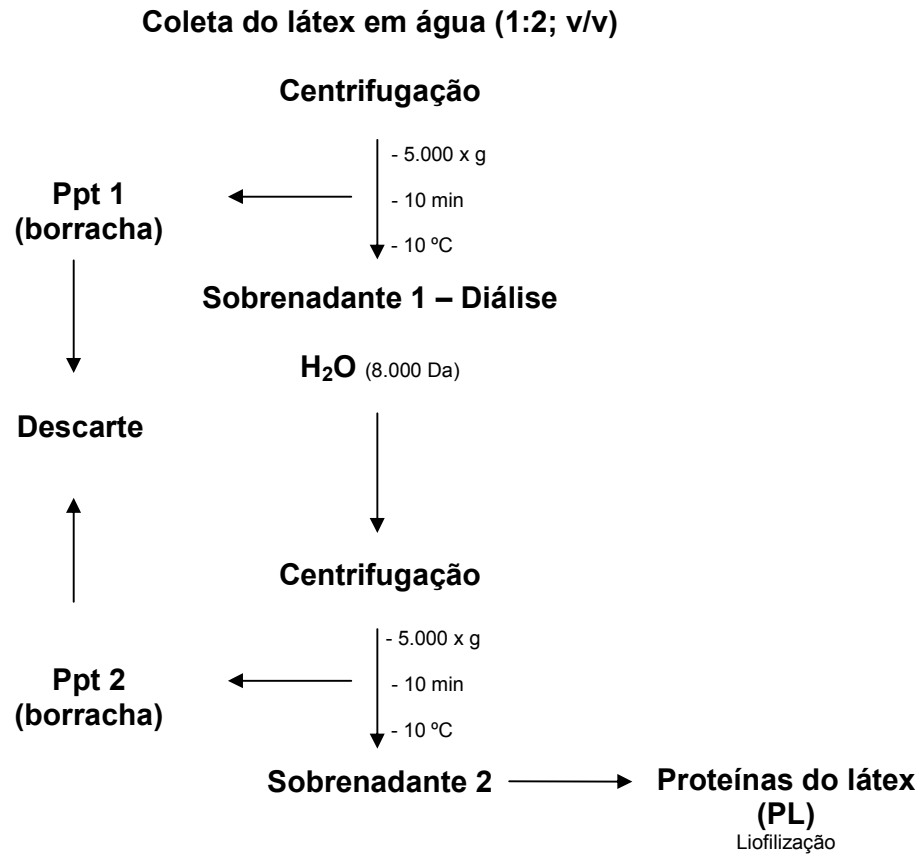


Figura 7 - Esquema de obtenção da fração protéica do látex (PL).

4.4 Fracionamento das proteínas do látex de *C. procera* e *Cr. grandiflora* por cromatografia

Em vista de identificar as frações responsáveis pelas atividades detectadas nos ensaios enzimáticos, descritos posteriormente, as sub-frações de *C. procera*, obtidas a partir do protocolo desenvolvido por Ramos *et al.* (2006) e as sub-frações de *Cr. grandiflora*, obtidas a partir do protocolo desenvolvido por Cavalheiro (2010), foram também utilizadas neste estudo.

4.4.1 Fracionamento das proteínas do látex de *C. procera* em coluna de CM-Sepharose

As proteínas do látex de *C. procera* (CpPL) foram submetidas à cromatografia de troca iônica em coluna de CM-Sepharose Fast Flow (14 x 2,5 cm) previamente equilibrada com tampão acetato 50 mM (pH 5,0). Para tanto, 80 mg da fração CpPL foram dissolvidos em 8 mL do tampão de equilíbrio. O material foi centrifugado a 10.000 x g; 10 °C, durante 10 min e o sobrenadante foi aplicado à coluna. Frações de 5 mL/tubo foram coletadas a um fluxo de 0,5 mL/min e o teor protéico determinado em 280 nm.

4.4.2 Fracionamento das proteínas do látex de *Cr. grandiflora* em coluna de DEAE-Sepharose

As proteínas do látex de *Cr. grandiflora* (CgPL) foram submetidas à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose Fast Flow previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0). A fração CgPL (50 mg/5

mL) foi dissolvida no tampão de equilíbrio e posteriormente centrifugada a 10.000 x g; 10 °C, durante 10 min, cujo sobrenadante foi aplicado à coluna. Após aplicação da amostra, as proteínas não-ligantes foram inicialmente eluídas com a mesma solução de equilíbrio. As proteínas retidas foram eluídas após aplicação de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) com NaCl 1 M. Frações de 2 mL/tubo foram coletadas a um fluxo de 0,5 mL/min e o teor protéico mensurado a 280 nm.

4.5 Ensaio Bioquímicos

4.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)

As frações e sub-frações foram avaliadas por eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (*main* gel 12,5% e *stacking* gel 5%) sob condições desnaturantes, de acordo com a técnica descrita por Laemmli (1970), adaptada para o uso de géis de separação em placas.

As amostras liofilizadas foram dissolvidas em tampão de amostra (Tris - HCl 0,0625 M (pH 6,8) contendo 1% de SDS), submetidas à centrifugação por 5 min a 25 °C em uma centrífuga de bancada, e aos sobrenadantes obtidos foram adicionados traços de azul de bromofenol e cristais de sacarose. Em seguida, as amostras foram aplicadas no interior dos poços do gel de concentração. A corrida eletroforética foi realizada à temperatura ambiente, a uma voltagem inicial de 100 V e 15 mA por placa, utilizando Tris 0,025 M (pH 8,3) contendo glicina 0,192 M e 0,1% de SDS como tampão de corrida. As bandas protéicas foram visualizadas após coloração dos géis com solução de *Coomassie Brilliant Blue R-350* 0,1% em água: ácido

acético: metanol (6:1:3 v/v/v) durante 4 h seguido da remoção do corante não ligado às proteínas com a mesma solução na ausência do corante.

4.5.2 Atividade proteolítica total utilizando azocaseína como substrato

A atividade proteolítica foi realizada de acordo com o método de Xavier-Filho (1989), onde a atividade proteolítica total das frações e sub-frações foi determinada sobre a azocaseína, um substrato inespecífico para proteases. As frações e sub-frações foram usadas na concentração de 1 mg/mL e papaína foi utilizada como controle positivo, na concentração de 0,1 mg/mL, diluídas em tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) (tampão tris). Foram retiradas diferentes alíquotas de cada solução, de 5 a 100 µL, as quais foi adicionado tampão tris e 40 µL de DTT (3 mM) de forma que o volume final fosse 500 µL, para iniciar a reação enzimática.

Os ensaios proteolíticos foram feitos na presença de ditioneitol 3 mM, o DTT, um ativador de proteases que age reduzindo as pontes dissulfeto das proteases cisteínicas. Este permaneceu em contato com a amostra por 10 min antes da adição dos outros reagentes. Em seguida, foram adicionados 200 µL de azocaseína 1% a esta solução que foi posteriormente incubada a 37 °C por 1 h. A reação foi finalizada com a adição de 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) 20%. As amostras foram, então, centrifugadas a 10.000 x g por 10 min a 25 °C e os sobrenadantes separados foram alcalinizados com 500 µL de NaOH 2 N.

Neste ensaio, o grupo controle foi conduzido com os mesmos reagentes, contudo as amostras somente foram adicionadas à reação após a adição de TCA. Esse procedimento garante que não há reação proteolítica no controle negativo. As leituras espectrofotométricas dos produtos da reação foram realizadas a 440 nm.

Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que incrementa a absorvância de 440 nm em 0,01. Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos em Unidade de Atividade (UA) ou Unidades de Atividade por micrograma de proteína (UA/ μ gP).

4.5.3 Atividade coagulante

A atividade coagulante foi determinada de acordo com o procedimento descrito por Condrea *et al.* (1983). Sangue humano fresco, coletado em Citrato Trisódico 0,11 M (9:1, v/v), foi centrifugado a 500 x g por 15 min a 20 °C e do sobrenadante obteve-se o plasma. Diferentes concentrações das frações e sub-frações, de 5 a 80 μ g, preparadas em 30 μ L de tampão tris pré-aquecido a 37 °C, na presença de DTT 3 mM, foram primeiramente incubadas com 300 μ L de plasma citratado por 1 min a 37 °C. A formação do coágulo foi induzida pela adição de 30 μ L de CaCl₂ 0,25 M. O tempo necessário para a formação de coágulo visível foi registrado a partir do momento da adição de CaCl₂. Papaína e tripsina foram ensaiadas nas mesmas condições como controles positivos. O controle negativo foi ensaiado sem a adição da fonte enzimática. Os testes foram realizados em triplicata.

4.5.4 Atividade fibrinogenolítica

Para determinar um provável sítio de ação das proteínas do látex na cascata de coagulação, a atividade fibrinogenolítica das frações e sub-frações e proteases purificadas (papaína, trombina e tripsina) foi investigada através de ensaios de

polimerização do fibrinogênio por difusão em ágar e análise da formação e hidrólise do coágulo de fibrina por espectrofotometria e PAGE-SDS.

4.5.4.1 Ensaio de polimerização do fibrinogênio em gel de agarose

O ensaio foi realizado através da modificação do método de Joo *et al.* (2002). Foram adicionados 3 mL de agarose 1,2% aquecida a 50 °C a 3 mL de fibrinogênio humano 0,4% (v/v) dissolvido em tampão tris também a 50 °C. A mistura fibrinogênio-agarose foi transferida a uma placa de Petri para solidificar, por 1 h em temperatura ambiente. Poços de cerca de 3 mm de diâmetro foram feitos sobre o gel formado nos quais foram aplicados 50 µL de tampão tris contendo 50 µg das frações e sub-frações. A reação se desenvolveu em temperatura ambiente por 24 h. Após este período de incubação, o diâmetro de turbidez dos halos, formados em torno dos poços devido à hidrólise do fibrinogênio, foi medido. Foi utilizado como controle positivo 50 µg de trombina dissolvida em tampão tris e este tampão isoladamente serviu como controle negativo.

4.5.4.2 Reação de hidrólise do fibrinogênio examinada por PAGE-SDS

A hidrólise do fibrinogênio pelas frações e sub-frações foi realizada de forma dose e tempo dependente de acordo com o método de Ouyang e Teng (1976). No ensaio dose-dependente, 200 µg de fibrinogênio humano foram incubados, separadamente, com diferentes concentrações das frações e sub-frações, variando de 5 a 80 µg, por 30 min a 37 °C finalizando um volume de reação de 180 µL, na presença de tampão tris e DTT 3 mM. Para avaliar a influência do tempo na

hidrólise, a mesma solução contendo fibrinogênio foi incubada com 60 µg das frações e sub-frações, separadamente, por diferentes intervalos de tempo, entre 0 a 30 min, a 37 °C. Papaína foi utilizada como controle positivo para proteases cisteínicas em ambos os ensaios. As reações foram finalizadas acrescentando 20 µl de tampão desnaturante contendo 4% de β-mercaptoetanol, uréia 1 M e 4% de SDS e foram submetidas a PAGE-SDS (7,5%). O padrão de hidrólise do fibrinogênio foi visualizado por coloração com *Coomassie Brilliant Blue R-350* 0,1%.

4.5.4.3 Reação de formação e hidrólise do coágulo de fibrina examinada por espectrofotometria

O ensaio foi realizado de acordo com o método de Shivaprasad *et al.* (2009b). A formação do coágulo de fibrina e sua hidrólise pelas frações e sub-frações foram conduzidas pela medida da absorbância à 540 nm em espectrofotômetro. Foram preparados 500 µL de uma solução de fibrinogênio humano (5 mg/mL) em tampão tris pré-aquecido à 37 °C. A formação do coágulo de fibrina foi iniciada pela adição de 50 µL das frações e sub-frações (1 mg/mL). O aumento da turbidez devido a formação de fibrina e o decréscimo da turbidez devido à sua hidrólise foi registrado pela medida da absorbância à 540 nm por diferentes intervalos de tempo, 0 a 30 min. Trombina e papaína foram usadas como controle positivo.

4.5.4.4 Ensaio de inibição da atividade fibrinogenolítica

Com o intuito de identificar a classe de proteases responsável pela atividade fibrinogenolítica detectada, as frações e sub-frações foram avaliadas na presença de quatro inibidores de proteases. Os ensaios foram realizados de acordo com o

método de Rajesh *et al.* (2005). As amostras foram pré-incubadas com 10 µL de específicos inibidores de proteases tais como trans-epoxisuccinil-L-leucilamido(4-guanidino)-butano (E-64) 0,18 mM - protease cisteínica; fenilmetilsulfonilfluor (PMSF) 5 mM - protease serínica; pepstatina 10 µM - protease aspártica e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 10 mM - metalo-protease, separadamente por 15 min. Por fim os ensaios foram realizados como descrito anteriormente para hidrólise do fibrinogênio examinada por PAGE-SDS e análise espectrofotométrica da formação e hidrólise do coágulo de fibrina.

4.5.5 Atividade fibrinolítica

Para determinar se as frações e sub-frações apresentam a capacidade de hidrolisar o coágulo de fibrina, induzido por trombina e o coágulo plasmático, induzido por CaCl₂, a atividade fibrinolítica foi investigada por PAGE-SDS.

4.5.5.1 Avaliação da hidrólise do coágulo de fibrina

O ensaio foi realizado de acordo com o método de Pizzo *et al.* (1972) com pequenas modificações. Uma solução contendo 150 µL de fibrinogênio (1 mg/mL) foi incubada com 5 µL de CaCl₂ 0,5 M e 10 µL de trombina (1 mg/mL). Depois de 20 min, o coágulo de fibrina formado foi transferido para um novo tubo do tipo Eppendorf® e foi incubado com diferentes concentrações das frações e sub-frações, medindo entre 10 a 80 µg, separadamente, por 150 min em presença de tampão tris e DTT 3 mM, finalizando um volume de 40 µL. A reação foi finalizada pela adição de 20 µL de tampão desnaturante contendo uréia 1 M, 4% de SDS e 4% de β-

mercaptoethanol. Os fibrinopeptídeos foram submetidos à PAGE-SDS 7,5% e o padrão de hidrólise foi visualizado por coloração com *Coomassie Brilliant Blue R-350* 0,1%.

4.5.5.2 Avaliação da hidrólise do coágulo plasmático

O ensaio foi realizado de acordo com o método de Rajesh *et al.* (2005). Sangue tratado com EDTA 5 mM, numa proporção de 9:1 (v/v), foi centrifugado por 15 min a 500 x g a 20 °C para separar o plasma. O plasma (100 µL) foi então misturado com o mesmo volume de CaCl₂ 100 mM para se obter um leve coágulo de fibrina. O coágulo foi lavado em tampão fosfato de sódio PBS (5 a 6 vezes) e foi incubado com diferentes concentrações (de 10 a 80 µg) das frações e sub-frações num volume final de 40 µL a 37 °C por 1 h na presença de tampão tris e DTT 3 mM. A reação foi finalizada pela adição de 20 µL de tampão desnaturante, contendo SDS 4%, β-mercaptoethanol 4% e uréia 1 M, foi fervida por 3 min e centrifugada a 10.000 x g por 5 min a 25 °C. Uma alíquota (20 µL) do sobrenadante foi submetida a PAGE-SDS 7,5% para analisar o padrão de hidrólise do coágulo plasmático que foi visualizado por coloração com *Coomassie Brilliant Blue R-350* 0,1%.

4.6 Ensaio biológicos

4.6.1 Avaliação da integridade de hemácias

Para avaliar se as sub-frações CpPL-PIII e CgPL-PI, cujas atividades pró-coagulantes foram mais evidentes, poderiam causar alguma alteração na integridade

de hemácias provenientes de doadores saudáveis, o seguinte experimento foi conduzido. Para cada 300 µL de sangue fresco foram adicionados 80 µg das sub-frações, finalizando um volume de reação de 330 µL, na presença de tampão tris. Após o período de 1 min de incubação a 37 °C, foram adicionados 30 µL de CaCl₂ 0,25 M. Esfregaços destes conteúdos sanguíneos foram imediatamente corados com hematoxilina-eosina e a integridade das hemácias foi avaliada em microscópio óptico (aumento visual 100x). Papaína foi utilizada como controle positivo e o tampão tris isoladamente serviu como controle negativo.

4.6.2 Indução experimental da sepse *in vivo*

O modelo experimental de sepse induzida por inoculação intraperitoneal (i.p.) de *S. Typhimurium*, descrito por Lehner *et al.* (2001), foi utilizado por Lima-Filho *et al.* (2010), para investigar o efeito protetor das proteínas do látex de *C. procerca* (CpPL) sobre a resposta inflamatória sistêmica de camundongos e reproduzido neste trabalho com o intuito de avaliar o efeito protetor desempenhado por estas proteínas sobre a coagulação sanguínea.

4.6.2.1 Avaliação do efeito das proteínas do látex de *C. procerca* sobre o tempo de coagulação plasmática de animais saudáveis ou com sepse induzida por *S. Typhimurium*

O ensaio foi realizado pela reprodução do método de Lima-Filho e colaboradores (LIMA-FILHO *et al.*, 2010). Foram delineados quatro grupos experimentais para a avaliação do efeito pró-coagulante de *C. procerca* em animais

sépticos e saudáveis. Os grupos foram formados por cinco camundongos (*Mus musculus*) machos da linhagem *Swiss* pesando $30 \text{ g} \pm 2,5 \text{ g}$. O grupo controle recebeu somente $200 \mu\text{L}$ de solução salina estéril, por via intraperitoneal (i.p.). O grupo *Salmonella* (controle positivo) foi inoculado com $200 \mu\text{L}$ de suspensão bacteriana, imediatamente após seu preparo, ajustadas para conter 10^7 UFC/mL por via intraperitoneal (i.p.). O grupo *Salmonella* + CpPL recebeu $200 \mu\text{L}$ da fração protéica do látex de *C. procera* diluída em solução salina estéril, na concentração de 30 mg/kg , por via intraperitoneal (i.p.) 24 h antes do inóculo bacteriano. No grupo CpPL foram administrados somente $200 \mu\text{L}$ da fração protéica do látex de *C. procera* diluída em solução salina estéril, na concentração de 30 mg/kg , por via intraperitoneal (i.p.).

Após 24 h, os animais foram anestesiados com halotano e tiveram um mL do seu conteúdo sanguíneo coletado, com o auxílio de tubos capilares heparinizados, por via plexo orbital em tubos do tipo Eppendorf® contendo $20 \mu\text{L}$ de Citrato de Sódio $0,11 \text{ M}$. Após a coleta, os animais foram sacrificados através da inalação de halotano (*over-dose*).

O fluido sanguíneo foi centrifugado por 15 min a $500 \times g$ e $20 \text{ }^\circ\text{C}$ obtendo-se o plasma no sobrenadante. Para cada $300 \mu\text{L}$ de plasma, foram adicionados $30 \mu\text{L}$ de CaCl_2 $0,25 \text{ M}$. As soluções foram incubadas, separadamente, a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. O tempo necessário para a formação de coágulo visível, a partir do momento da adição de CaCl_2 , foi registrado. Os testes foram realizados em quintuplicata.

4.6.2.2 Avaliação do efeito das proteínas do látex de *C. procera* sobre o número de plaquetas de animais saudáveis ou com sepse induzida por *S. Typhimurium*

Para avaliar se o efeito das proteínas do látex de *C. procera* na coagulação sanguínea está relacionado com o consumo de plaquetas, o seguinte experimento foi conduzido. Os animais, tratados como descrito anteriormente, tiveram 100 µL do seu fluido sanguíneo coletados, com o auxílio de tubos capilares heparinizados, por via plexo orbital em tubos do tipo Eppendorf® contendo 20 µL de Heparina sódica (5.000 UI), destinados à contagem de plaquetas realizada no analisador celular semi-automático Sysmex KX-21N (Roche, USA). Após a coleta, os animais foram sacrificados através da inalação de halotano (*over-dose*).

4.6.2.3 Análise do perfil protéico do plasma de animais saudáveis ou com sepse induzida por *S. Typhimurium* tratados com *C. procera*

Os animais, tratados como descrito anteriormente, tiveram 100 µL do seu fluido sanguíneo coletados com o auxílio de tubos capilares heparinizados, por via plexo orbital em tubos do tipo Eppendorf® contendo 20 µL de Heparina sódica (5.000 UI). Após a coleta os animais foram sacrificados através da inalação de halotano (*over-dose*).

O fluido sanguíneo foi centrifugado por 15 min a 500 x g a 20 °C e 20 µL de plasma, proveniente de cada grupo experimental, foram submetidos a PAGE-SDS 7,5% para analisar o padrão de hidrólise das proteínas plasmáticas que foram visualizadas através da solução do corante de *Coomassie Brilliant Blue R-350* 0,1%.

4.7 Análise estatística

As diferenças estatísticas entre os grupos foram obtidas a partir da análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Student Newman-Keuls para múltiplas comparações, de acordo com a necessidade, onde valores de p inferiores a 0,05 foram considerados significantes. Para estas análises foi utilizado o programa estatístico *GraphPad Prism Software* versão 4.0 (San Diego, CA). Para os demais experimentos foram calculadas as médias \pm erro padrão da média (E.P.M.) utilizando as ferramentas do *Software Excel* versão 2007.

V - RESULTADOS

Os fluidos laticíferos obtidos das plantas em estudo foram submetidos a procedimentos realizados de forma que resultassem em uma fração livre de borracha e rica em proteínas solúveis, através de um protocolo eficiente de fracionamento, baseado em etapas de centrifugação e diálise. As frações obtidas foram denominadas PL (Proteínas do Látex) e foram analisadas por PAGE-SDS.

A análise do perfil protéico de *C. procera* (CpPL), *Cr. grandiflora* (CgPL) e *P. rubra* (PrPL) foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida, a qual pode ser visualizada na figura 8. Nesta análise foi evidenciada a presença de proteínas nestes fluidos laticíferos. Na fração CpPL podem ser visualizadas pelo menos duas bandas protéicas com massas moleculares aparentes entre 14,4 e 20,1 kDa e quatro bandas protéicas com massas moleculares aparentes entre 20,1 e 30,0 kDa. Na fração CgPL podem ser visualizadas pelo menos quatro bandas com massas moleculares aparentes entre 45 e 14,4 kDa. Em PrPL podem ser visualizadas várias bandas protéicas com massas moleculares aparentes entre 66,0 e 14,4 kDa.

As frações CpPL e CgPL foram fracionadas por cromatografia de troca iônica em coluna de CM-Sepharose e DEAE-Sepharose, respectivamente, no intuito de purificar as proteínas responsáveis pelas atividades enzimáticas investigadas e as sub-frações obtidas foram posteriormente analisadas quanto ao seu perfil protéico por PAGE-SDS.

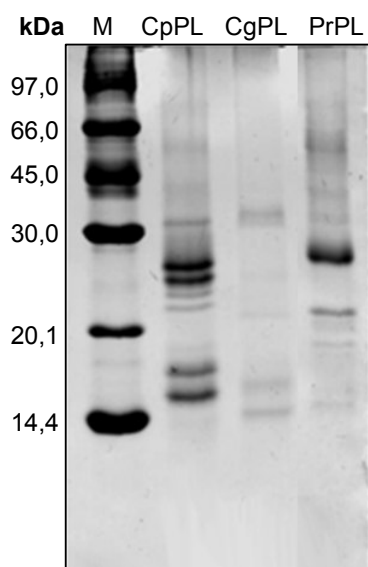


Figura 8 - Perfil protéico do látex de *C. procera*, *Cr. grandiflora* e *P. rubra*. Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%). (M) Marcadores de massa molecular (Fosforilase B, 97,0 kDa; Albumina sérica bovina, 66,0 kDa; Ovoalbumina, 45,0 kDa; Anidrase carbônica, 30,0 kDa; Inibidor de tripsina, 20,1 kDa; Alfa-Lactoalbumina, 14,4 kDa). Foram aplicados 20 μ L das frações PL no interior de cada poço, a partir de soluções de 1 mg/mL.

O perfil cromatográfico obtido a partir do fracionamento de CpPL mostrou a presença de 3 picos bem definidos. A fração de proteínas de CpPL que não interagiu com a coluna foi denominada CpPL-PI. As frações protéicas retidas foram obtidas quando a amostra foi submetida à eluição seqüencial com o tampão de equilíbrio na presença de NaCl 200 mM e NaCl 300 mM, sendo denominadas CpPL-PII e CpPL-PIII, respectivamente (Figura 9-A).

De acordo com a análise do perfil protéico das sub-frações de CpPL por eletroforese unidimensional, observou-se que a sub-fração CpPL-PI apresentou bandas protéicas, predominantemente, na faixa de 66 kDa e entre 30 e 45 kDa. CpPL-PII e CpPL-PIII, por sua vez, apresentaram bandas protéicas com diferentes massas moleculares aparentes, variando entre 45, 30 e 14,4 kDa, sendo CpPL-PII a única sub-fração a apresentar a banda protéica próxima a 20,1 kDa detectada na fração CpPL (Figura 9-B).

O perfil cromatográfico obtido a partir do fracionamento de CgPL mostrou a presença de um pico não retido dividido em duas partes, denominadas CgPL-PI1 e CgPL-PI2, e um pico retido, também dividido em duas partes, denominadas CgPL-PII1 e CgPL-PII2, que foi eluído após adição de tampão de equilíbrio na presença de NaCl 1 M. Por conta do baixo rendimento de cada pico cromatográfico, os picos CgPL-PI1 e CgPL-PI2 foram reunidos em um só, denominado de CgPL-PI, bem como os picos CgPL-PII1 e CgPL-PII2, resultando no CgPL-PII (Figura 10-A).

Quando as sub-frações de *Cr. grandiflora* foram analisadas quanto ao seu perfil protéico por eletroforese, CgPL-PI apresentou perfil semelhante à CgPL com bandas protéicas, predominantemente, na faixa de 97 kDa e entre 45 e 30 kDa. CgPL-PII apresentou perfil distinto, com bandas protéicas mais evidentes na faixa de 14,4 kDa (Figura 10-B).

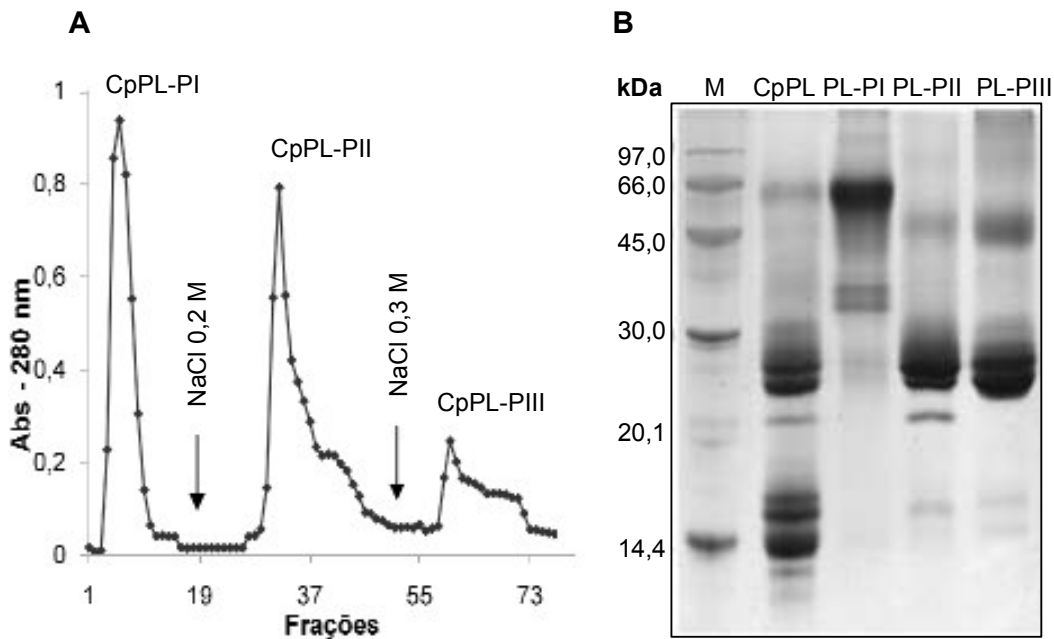


Figura 9 - Perfil cromatográfico e eletroforético das proteínas do látex de *C. procera*. **A** - Cromatografia de troca iônica das proteínas do látex de *C. procera* em coluna de CM-Sephacrose Fast Flow em pH 5,0. **B** - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% da fração protéica de *C. procera* (CpPL) e suas três sub-frações (PL-PI, PL-PII e PL-PIII). (M) Marcadores de massa molecular. Foram aplicados 20 μ L das frações no interior de cada poço, a partir de soluções de 1 mg/mL.

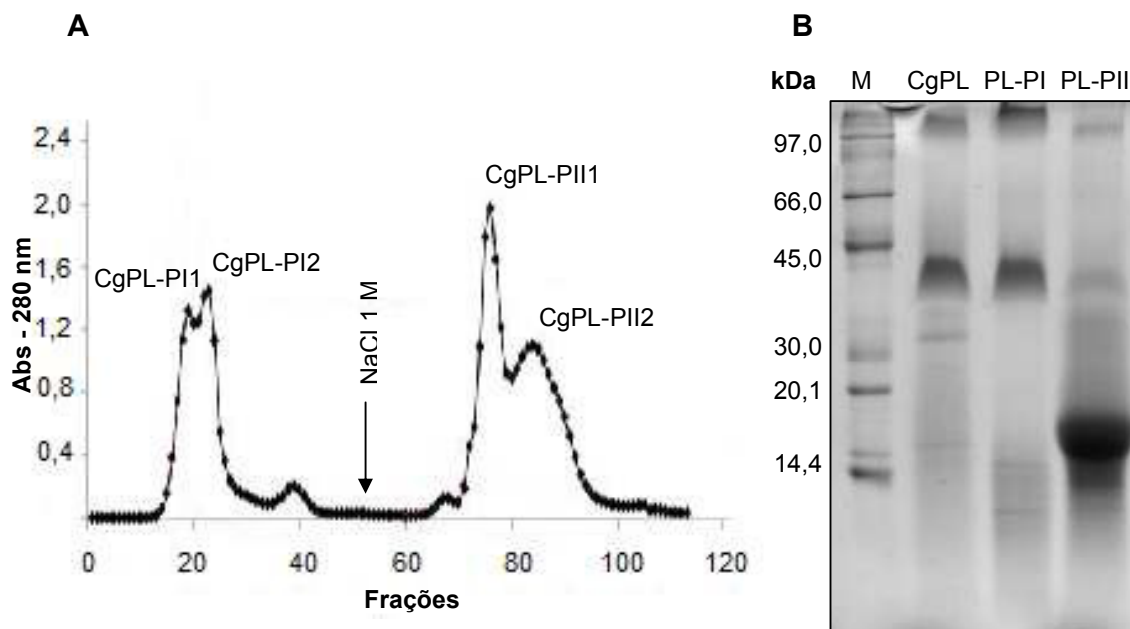


Figura 10 - Perfil cromatográfico e eletroforético das proteínas do látex de *Cr. grandiflora*. **A** - Cromatografia de troca iônica da fração protéica de *Cr. grandiflora* em coluna de DEAE-Sepharose Fast Flow em pH 5,0. **B** - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% da fração protéica de *Cr. grandiflora* (CgPL) e suas sub-frações (PL-PI e PL-II). (M) Marcadores de massa molecular. Foram aplicados 20 μ L das frações no interior de cada poço, a partir de soluções de 1 mg/mL.

As frações CpPL, CgPL, PrPL e as sub-frações obtidas por cromatografia foram avaliadas quanto à atividade proteolítica usando azocaseína, um substrato inespecífico para proteases. A atividade proteolítica das frações PL já foi caracterizada anteriormente (FREITAS *et al.*, 2007; FREITAS *et al.*, 2010). As frações CpPL e CgPL apresentaram forte atividade proteolítica, sendo capazes de hidrolisar a azocaseína de forma dose-dependente, indicando que são fontes ricas em enzimas hidrolíticas. PrPL exibiu baixa atividade proteolítica quando comparada à papaína, uma protease cisteínica purificada do látex de *Carica papaya* usada como controle positivo em todos os ensaios *in vitro* (Figura 11-A). Não foi detectada atividade na sub-fração CpPL-PI, mas esta foi compartilhada entre CpPL-PII e CpPL-PIII (Figura 11-B). A atividade proteolítica de *Cr. grandiflora* concentrou-se na sub-fração CgPL-PI, sendo a atividade de CgPL-PII considerada residual (Figura 11-B).

Detectada a presença de atividade proteolítica nas frações protéicas em estudo, as amostras foram avaliadas quanto às suas atividades pró-coagulantes, utilizando plasma humano citratado, usando papaína e tripsina como controles positivos (para proteases cisteínicas e serínicas, respectivamente). Todas as frações protéicas que apresentaram forte atividade proteolítica, CpPL e suas sub-frações CpPL-PII e CpPL-PIII, CgPL e sua sub-fração CgPL-PI (denominadas a partir de agora de frações proteolíticas), foram capazes de acelerar a formação do coágulo de forma dose-dependente, reduzindo o tempo de coagulação de 300 para 100 segundos, aproximadamente (Figura 12). PrPL, CpPL-PI e CgPL-PII não apresentaram atividade pró-coagulante. Este resultado sugere que a atividade proteolítica presente nestas frações de alguma forma acelera os processos enzimáticos que ocorrem na cascata de coagulação sanguínea.

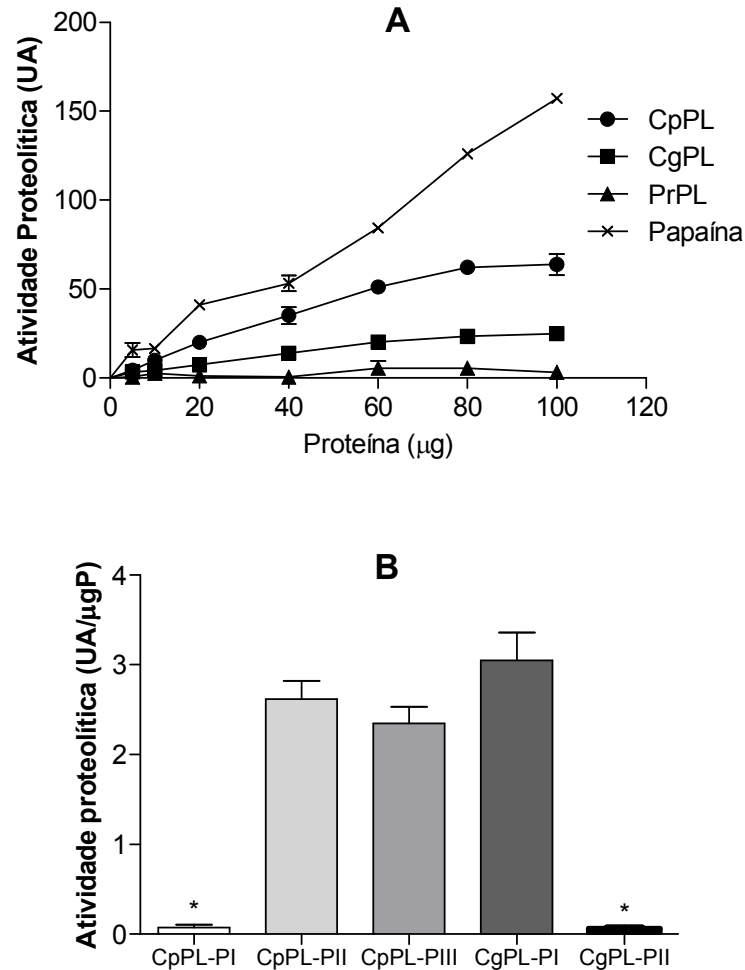


Figura 11 - Atividade proteolítica das proteínas do látex de *C. procera*, *Cr. grandiflora* e *P. rubra* e das sub-frações de *C. procera* e *Cr. grandiflora*. **A - Amostras foram incubadas com 0,2 mL de azocaseína 1%, em diferentes concentrações, medindo de 5 a 100 µg, num volume final de 1 mL contendo tampão tris por 1 h à 37 °C. **B** - Azocaseína foi incubada com 60 µg das sub-frações protéicas do látex de *C. procera* (CpPL-PI, CpPL-PII e CpPL-PIII) e *Cr. grandiflora* (CgPL-PI e CgPL-PII) nas mesmas condições. * p < 0,05 indica diferença estatística quando comparado com outros grupos (n = 3, ANOVA teste -Student Newman-Keuls).**

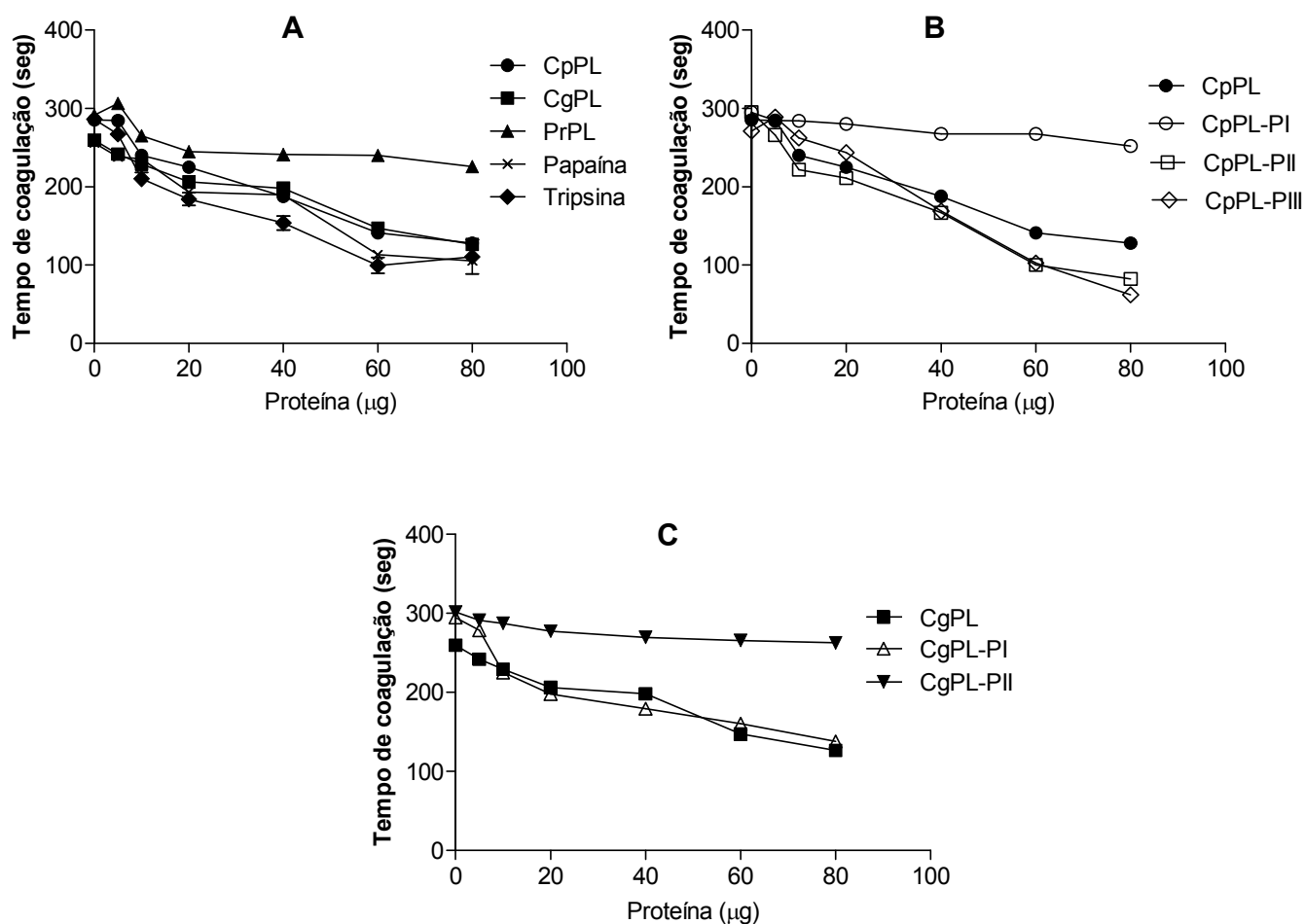


Figura 12 - Atividade coagulante das proteínas do látex de *C. procera*, *Cr. grandiflora* e *P. rubra* (A) e das sub-frações de *C. procera* (B) e *Cr. grandiflora* (C). Foram incubados 300 µL de plasma humano com diferentes concentrações das amostras, papaína e tripsina (usadas como controle positivo para proteases cisteínicas e serínicas, respectivamente), medindo de 5 a 80 µg, diluídas em 30 µL de tampão tris por 1 min à 37 °C. Foi adicionado 30 µL de CaCl₂ (0,25 M) à mistura pré-incubada. O tempo necessário para a formação do coágulo foi registrado. Os valores representam a média ± EPM (n = 3, ANOVA teste - Student Newman-Keuls).

Para maiores esclarecimentos acerca dos mecanismos de ação que induzem a formação do coágulo pelas referidas frações, estas foram avaliadas quanto à capacidade de hidrolisar o fibrinogênio humano, para formar o coágulo de fibrina. A atividade fibrinogenolítica foi determinada através de ensaios de polimerização do fibrinogênio em gel de agarose, hidrólise do fibrinogênio visualizada por PAGE-SDS e por espectrofotometria.

No ensaio de polimerização do fibrinogênio em gel de agarose, as frações CpPL e CgPL foram capazes de processar o fibrinogênio presente no meio, formando halos claros de precipitação em torno dos poços, de aproximadamente 1,2 cm e 0,9 cm, respectivamente, após 24 h (Figura 13).

De forma similar, o referido experimento também foi conduzido com as sub-frações de *C. procera* e *Cr. grandiflora*, sendo avaliado no curso do tempo. CpPL-PII e CpPL-PIII exibiram um halo de turbidez final de 1,3 cm e 1,2 cm, respectivamente, e a sub-fração CgPL-PI exibiu um halo final de 1,2 cm. PrPL e as sub-frações CpPL-PI e CgPL-PII, como esperado, não formaram halos de turbidez em torno dos poços (Figura 13). As frações proteolíticas apresentaram atividade fibrinogenolítica tempo-dependente. Os resultados indicam que as frações proteolíticas apresentam forte ação fibrinogenolítica quando comparados à papaína, que formou um halo de turbidez de 1,3 cm e quando comparados à trombina, que formou um halo de turbidez de 0,8 cm. Este resultado sugere, portanto, que a atividade pró-coagulante das frações proteolíticas, envolve diretamente a hidrólise do fibrinogênio levando a formação do coágulo de fibrina (atividade como trombina). Áreas límpidas foram observadas entre os halos de turbidez e os poços, sugerindo que as frações proteolíticas além de hidrolisar o fibrinogênio presente no meio, também foram capazes de hidrolisar os polímeros de fibrina, indicando atividade como plasmina.

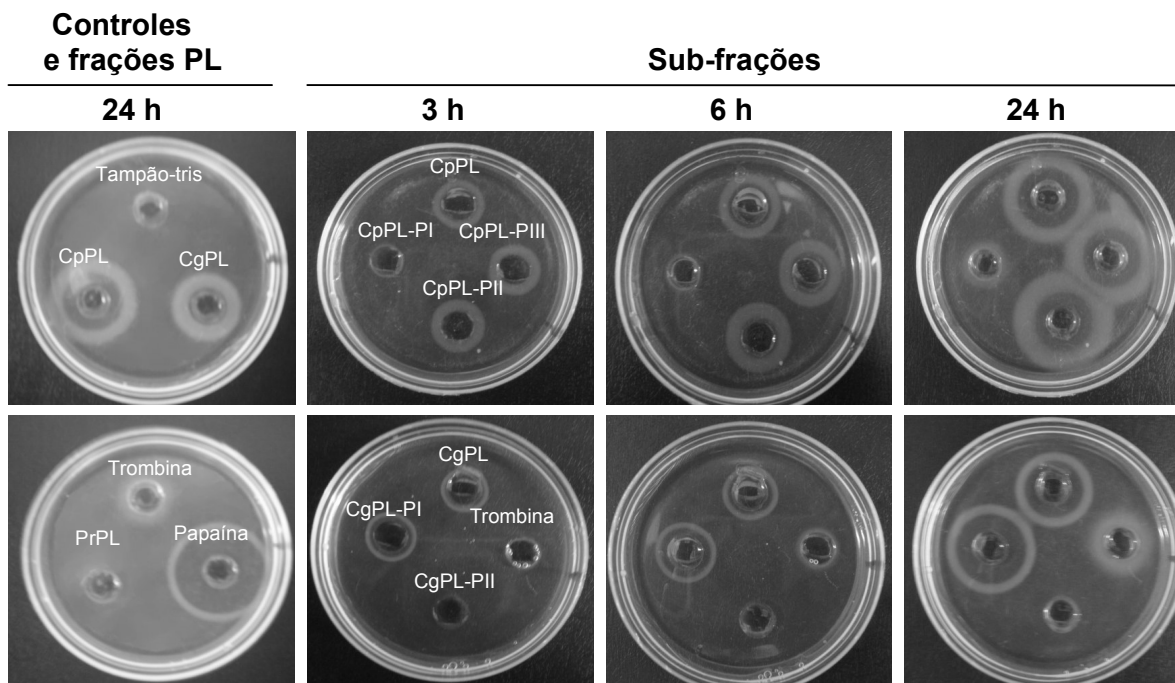


Figura 13 - Ensaio em placa de fibrinogênio–agarose para determinar atividade fibrinogenolítica das proteínas do látex de *C. procerá*, *Cr. grandiflora* e *P. rubra* e das sub-frações de *C. procerá* e *Cr. grandiflora*. As amostras (50 µg) foram preparadas em 50 µL de tampão tris. A polimerização do fibrinogênio foi observada pelo aparecimento de um halo de turbidez em torno dos poços. Trombina (500 µg) e papaína (5 µg) foram usadas como controle positivo. Fotografias foram tiradas 3, 6 e 24 h após incubação a 25 °C. As placas contém 6 mL de fibrinogênio 0,4% em agarose 1,2%.

A atividade fibrinogenolítica das frações proteolíticas foi confirmada pela avaliação da formação do coágulo de fibrina, induzida pelas frações proteolíticas, mensurada pelas mudanças de turbidez da solução medida espectrofotometricamente a 540 nm. O aumento da turbidez, proporcional ao aumento da absorbância, corresponde à formação do coágulo de fibrina, enquanto que a redução da turbidez, proporcional à redução da absorbância, está relacionado com a sua hidrólise (atividade como plasmina). Todas as frações proteolíticas foram capazes de aumentar a turbidez da solução no curso do tempo, levando a formação do coágulo de fibrina, porém apenas CgPL-PI e papaína foram capazes de reduzir a turbidez do meio, após a formação máxima do coágulo a 18 minutos e 8 minutos respectivamente, sugerindo a presença de atividade como plasmina para estas frações (Figura 14). Corroborando com os resultados anteriores PrPL, CpPL-PI e CgPL-P11 não apresentaram atividade fibrinogenolítica.

A proteólise do fibrinogênio, dose e tempo-dependente, pelas frações proteolíticas também foi confirmada por eletroforese unidimensional.

O perfil protéico do fibrinogênio exibe 3 subunidades bem definidas, denominadas $A\alpha$, $B\beta$ e γ . Enzimas que agem como a trombina, clivam as cadeias $A\alpha$ e $B\beta$ a partir do resíduo N-terminal, liberando os fibrinopeptídeos A e B (KOMORI *et al.*, 1985). Em contrapartida, enzimas que agem como plasmina clivam todas as cadeias $A\alpha$, $B\beta$ e γ , a partir do resíduo C-terminal e são conhecidas por prolongar ou prevenir a formação do coágulo (EVANS, 1981; CIVELLO *et al.*, 1983).

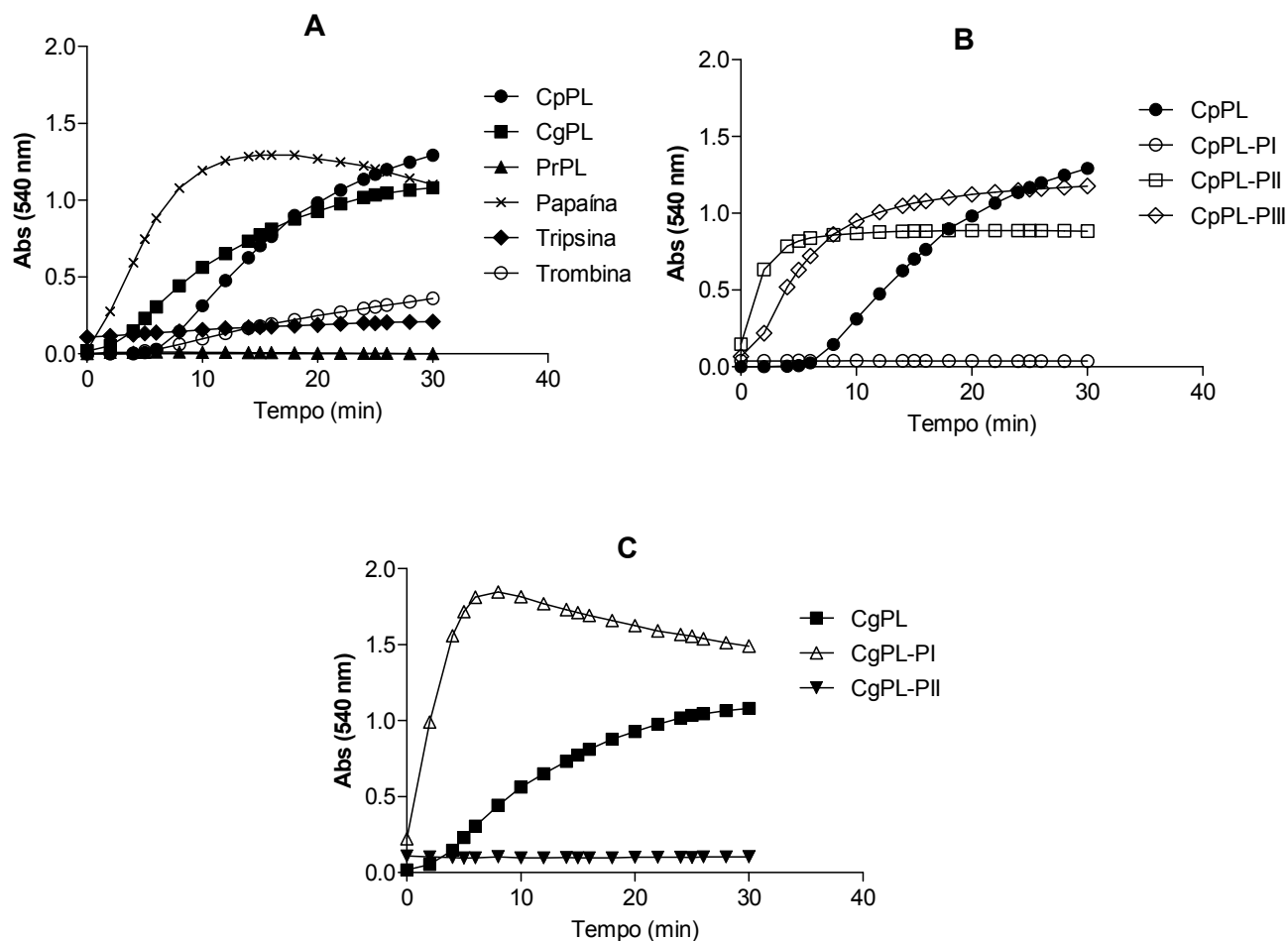


Figura 14 - Análise espectrofotométrica da formação do coágulo de fibrina e sua hidrólise pelas proteínas do látex de *C. procera*, *Cr. grandiflora* e *P. rubra* (A) e pelas sub-frações de *C. procera* (B) e *Cr. grandiflora* (C). Foram adicionados 50 μ L das amostras (1 mg/mL) a 0,5 mL de fibrinogênio humano (5 mg/mL). O aparecimento da turbidez devido à formação do coágulo de fibrina e o desaparecimento da turbidez devido a sua hidrólise foram registrados pela medida da absorbância a 540 nm. Trombina (1 mg/mL) foi utilizada como controle positivo. Os dados representam o melhor de cinco experimentos individuais.

A papaína digeriu o fibrinogênio completamente em todas as condições experimentais enquanto que as frações proteolíticas foram ativas em altas doses (Figuras 15 e 16). Como esperado CpPL-PI, CgPL-PII e PrPL não alteram as bandas de fibrinogênio.

No ensaio dose dependente, CpPL foi capaz de hidrolisar todas as cadeias do fibrinogênio, sendo a subunidade A α clivada preferencialmente (a partir de 10 μ g) e as subunidades B β e γ somente em altas concentrações (a partir de 40 e 60 μ g, respectivamente). CpPL-PII foi capaz de hidrolisar a subunidade A α na menor concentração (5 μ g) e a subunidade B β a partir de 40 μ g, a subunidade γ se mostrou resistente. CpPL-PIII foi capaz de hidrolisar todas as subunidades do fibrinogênio, a subunidade A α a 5 μ g, a subunidade B β a 10 μ g e a subunidade γ a 40 μ g. CgPL hidrolisou todas as subunidades a partir da menor concentração (5 μ g), bem como CgPL-PI, semelhantemente à papaína, sugerindo agir como plasmina (Figura 15).

No ensaio tempo-dependente, CpPL foi capaz de hidrolisar as subunidades A α e B β logo aos dois minutos de reação, porém a subunidade γ se mostrou resistente à proteólise. CpPL-PII e CpPL-PIII hidrolisaram fracamente as subunidades B β e γ , e a subunidade A α se mostrou resistente. CgPL hidrolisou todas as subunidades do fibrinogênio a partir de 2 minutos de reação, bem como CgPL-PI, semelhantemente à papaína, sugerindo atividade como plasmina (Figura 16).

Para determinar a natureza das proteases responsáveis pela atividade fibrinogenolítica, foram realizados estudos de inibição com inibidores de proteases específicos. A atividade fibrinogenolítica, presente nas frações CpPL, CgPL e na papaína, foi completamente inibida por E-64, um inibidor de proteases cisteínicas, e não foi inibida pelos outros inibidores de proteases (Figura 17).

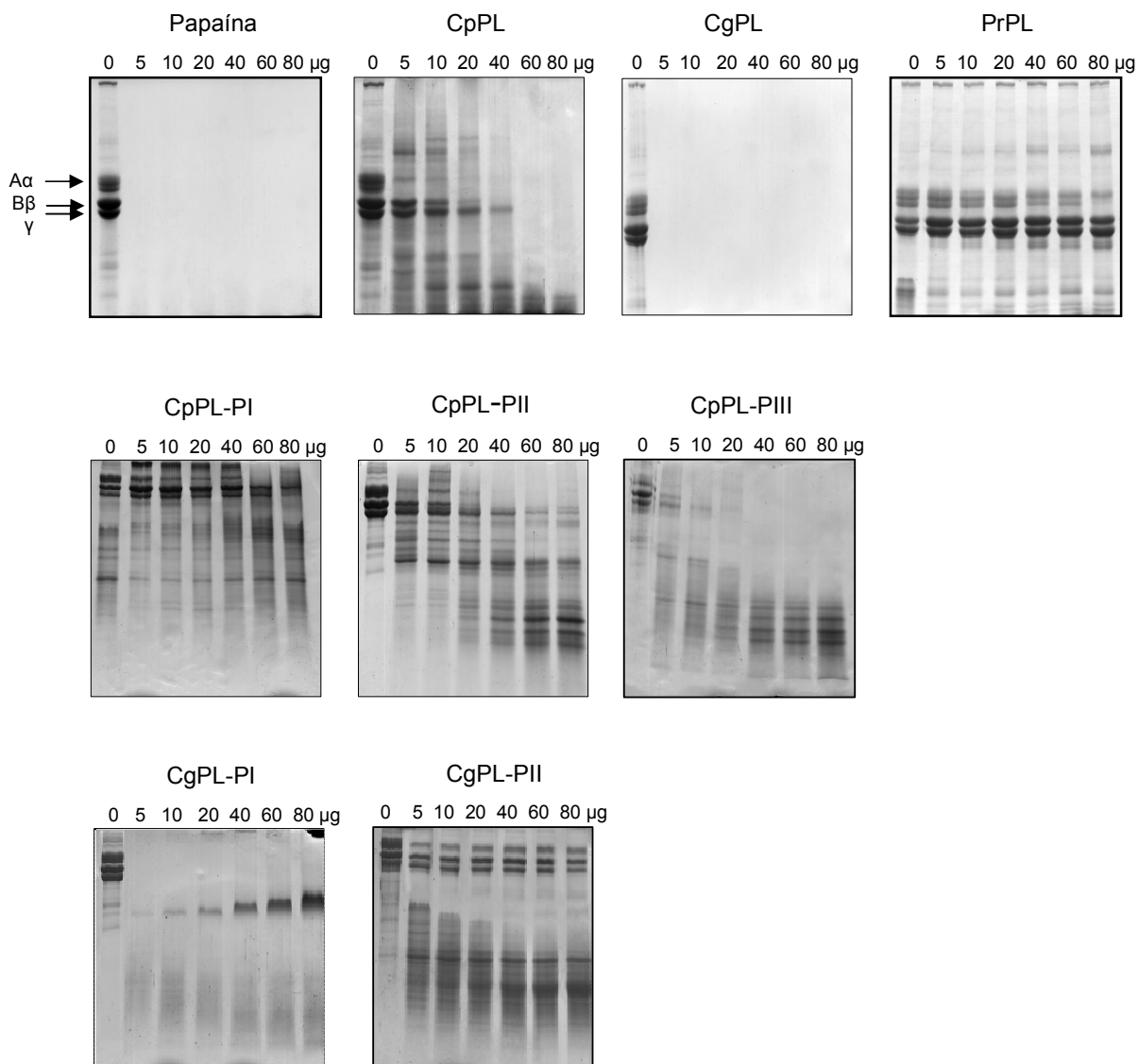


Figura 15 - Ensaio fibrinogenolítico dose-dependente das proteínas do látex de *C. procera*, *Cr. grandiflora* e *P. rubra* e das sub-frações de *C. procera* e *Cr. grandiflora*. Foram incubados 200 μg de fibrinogênio humano com diferentes concentrações das amostras, variando de 5 a 80 μg, por 30 min à 37 °C, volume final de 200 μL, dissolvidos em tampão tris, na presença de DTT (3 mM). (0) Fibrinogênio. Papaína foi usada como controle positivo. A hidrólise do fibrinogênio foi submetida à PAGE-SDS (7,5%) e os fibrinopeptídeos foram corados com *Coomassie Brilliant Blue* R-350 0,1%. As setas indicam as subunidades do fibrinogênio (SHIVAPRASAD *et al.*, 2009a).

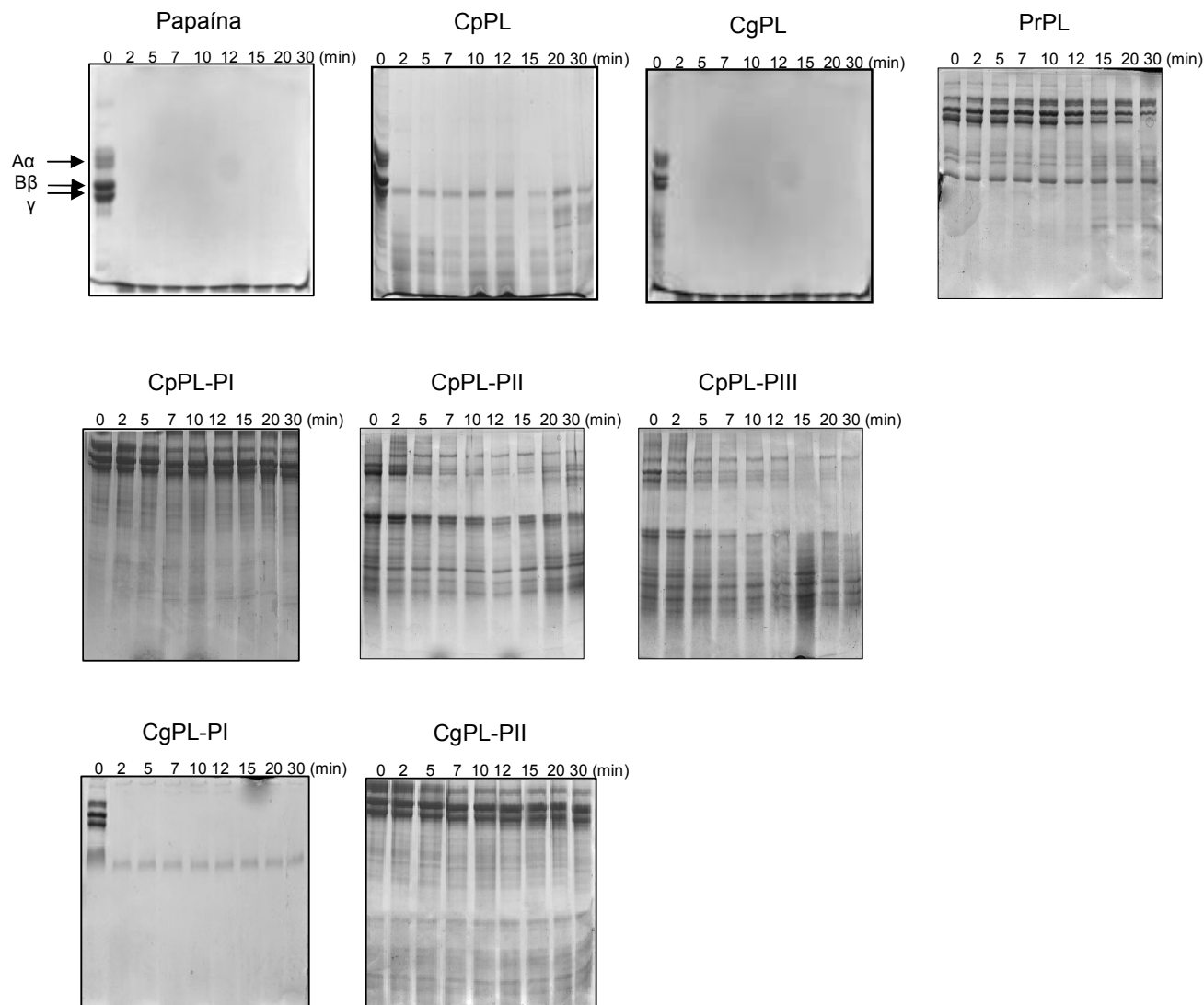


Figura 16 - Ensaio fibrinogenolítico tempo-dependente das proteínas do látex de *C. procera*, *Cr. grandiflora* e *P. rubra* e das sub-frações de *C. procera* e *Cr. grandiflora*. Foram incubados 200 μg de fibrinogênio humano com 60 μg das amostras por diferentes intervalos de tempo, 0 a 30 min, à 37 °C, volume final de 200 μL , dissolvidos em tampão tris, na presença de DTT (3 mM). Papaína foi usada como controle positivo. A hidrólise do fibrinogênio foi submetida à PAGE-SDS (7,5%) e os fibrinopeptídeos foram corados com *Coomassie Brilliant Blue* R-350 0,1%. As setas indicam as subunidades do fibrinogênio (SHIVAPRASAD *et al.*, 2009a).

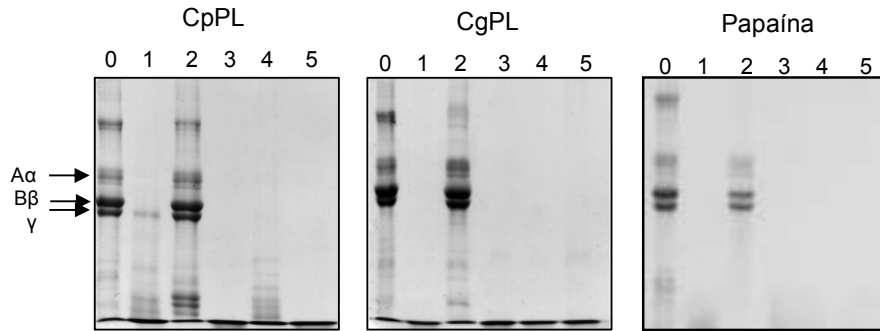


Figura 17 - Inibição da atividade fibrinogenolítica das frações protéicas de *C. procera* e *Cr. grandiflora* visualizada por eletroforese. As amostras, 60 μg de CpPL e CgPL, e 6 μg de papaína, foram pré-incubadas com e sem inibidores de proteases específicos por 15 min à 25 °C dissolvidos em tampão tris, na presença de DTT (3 mM). A reação foi iniciada pela adição de 200 μg de fibrinogênio. Depois de 30 min à 37 °C a reação foi finalizada pela adição de tampão desnaturante. (0) Fibrinogênio, (1) Fbrinogênio + Proteínas do Látex (FPL), (2) FPL + E-64, (3) FPL + PMSF, (4) FPL + EDTA e (5) FPL + Pepstatina. A hidrólise do fibrinogênio foi submetida a PAGE-SDS (7,5%) e os fibrinopeptídeos foram corados com *Coomassie Brilliant Blue* R-350 0,1%. As setas indicam as subunidades do fibrinogênio (SHIVAPRASAD *et al.*, 2009a).

A formação do coágulo, visualizada em espectrofotômetro a 540 nm, pelas sub-frações CpPL-II, CpPL-PIII e CgPL-PI também foi fortemente inibida por E-64 (Figura 18). Estes dados sugerem que as proteases cisteínicas, contidas nas frações proteolíticas, estão diretamente envolvidas na atividade fibrinogenolítica, mediada pela clivagem específica do fibrinogênio.

Em altas doses (60-80 µg), as frações proteolíticas foram capazes de hidrolisar a subunidade γ do fibrinogênio. Várias proteases que hidrolisam esta subunidade também são capazes de hidrolisar o coágulo de fibrina (RAJESH *et al.*, 2005). Portanto, foi avaliada a capacidade das frações protéicas de hidrolisar o coágulo de fibrina, induzido pela clivagem do fibrinogênio puro pela trombina, e o coágulo plasmático, induzido por CaCl_2 , ou seja, se estas frações apresentam atividade fibrinolítica.

Quando o fibrinogênio é clivado pela trombina, são liberados peptídeos menores específicos, as cadeias α , β e o dímero γ - γ (KOMORI *et al.*, 1985). No ensaio de hidrólise do coágulo de fibrina, a papaína e as frações proteolíticas foram capazes de hidrolisar o dímero γ - γ e a cadeia α , porém a cadeia β se mostrou resistente à proteólise (Figuras 19 e 20). Como visto nas figuras 21 e 22, as frações proteolíticas e papaína parcialmente digeriram o coágulo do plasma humano de forma dose-dependente. Contudo, as amostras testadas não foram capazes de digerir a cadeia α da fibrina. Este resultado sugere que as frações proteolíticas poderiam exibir atividade fibrinolítica, porém não foi claramente observada neste experimento. O tempo de hidrólise pode representar um fator importante para esta atividade.

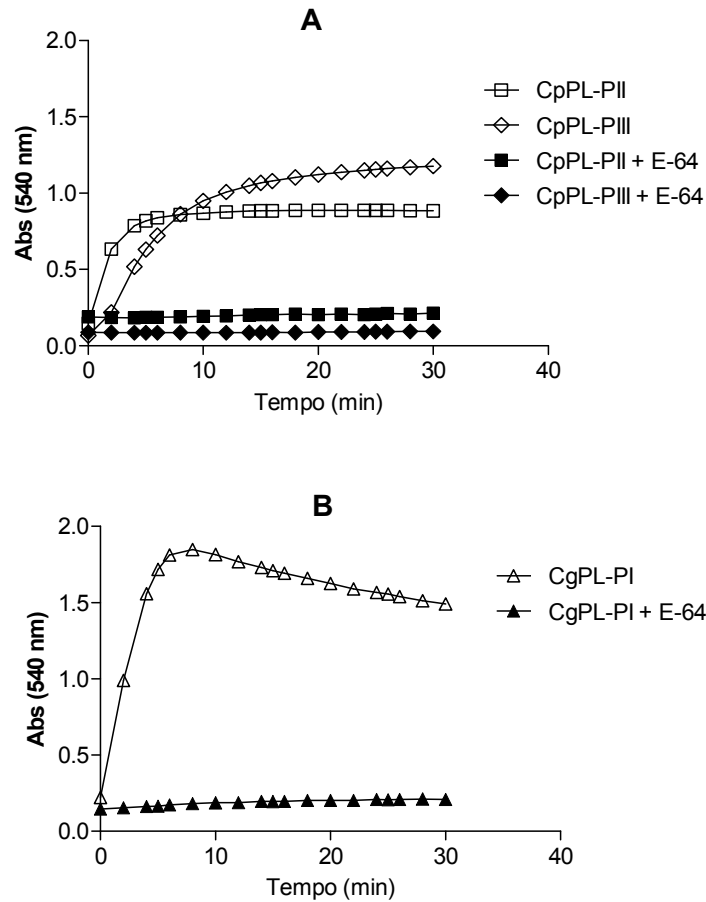


Figura 18 - Inibição da atividade fibrinogênolítica das sub-frações ativas de *C. procera* e *Cr. grandiflora* visualizada por espectrofotometria. Análise espectrofotométrica da inibição da formação do coágulo de fibrina e sua hidrólise por inibidores de proteases. As amostras (50 μ g) foram pré-incubadas com e sem um específico inibidor de protease cisteínica (E-64), por 15 min à 25 °C, dissolvidos em tampão tris, na presença de DTT (3 mM). A reação foi iniciada pela adição de 0,5 mL de fibrinogênio (5 mg/mL). A inibição da hidrólise do fibrinogênio foi registrada pela medida da absorbância à 540 nm. **A** - Sub-frações de *C. procera*. **B** - Sub-fração de *Cr. grandiflora*. Os dados representam o melhor de cinco experimentos individuais.

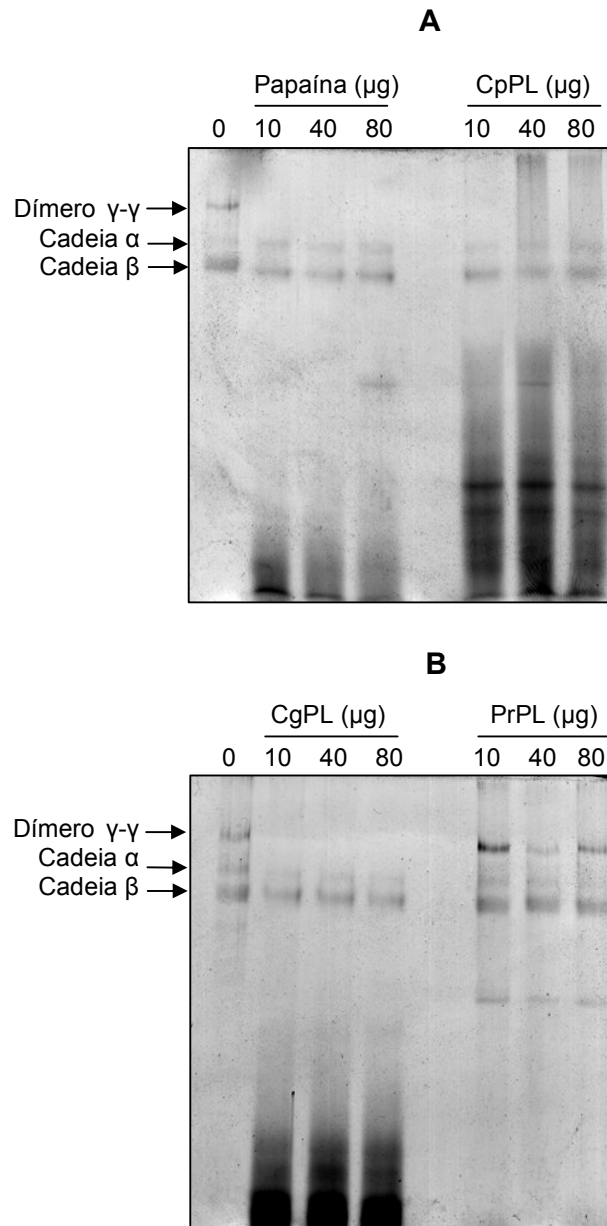


Figura 19 - Hidrólise do coágulo de fibrina pelas proteínas do látex de *C. procera*, papaína (A), *Cr. grandiflora* e *P. rubra* (B). O coágulo de fibrina, induzido por trombina, foi incubado com diferentes concentrações, 10 a 80 μg , das amostras, e papaína (usada como controle positivo) dissolvidos em tampão tris, na presença de DTT (3 mM), finalizando um volume de 40 μL , por 150 min à 37 °C. (0) Coágulo de fibrina. Os fibrinopeptídeos foram submetidos à PAGE-SDS 7,5% e o padrão de clivagem foi visualizado a partir da solução do corante *Coomassie Brilliant Blue R-350* 0,1%. As setas indicam as subunidades do coágulo de fibrina (SHIVAPRASAD *et al.*, 2009b).

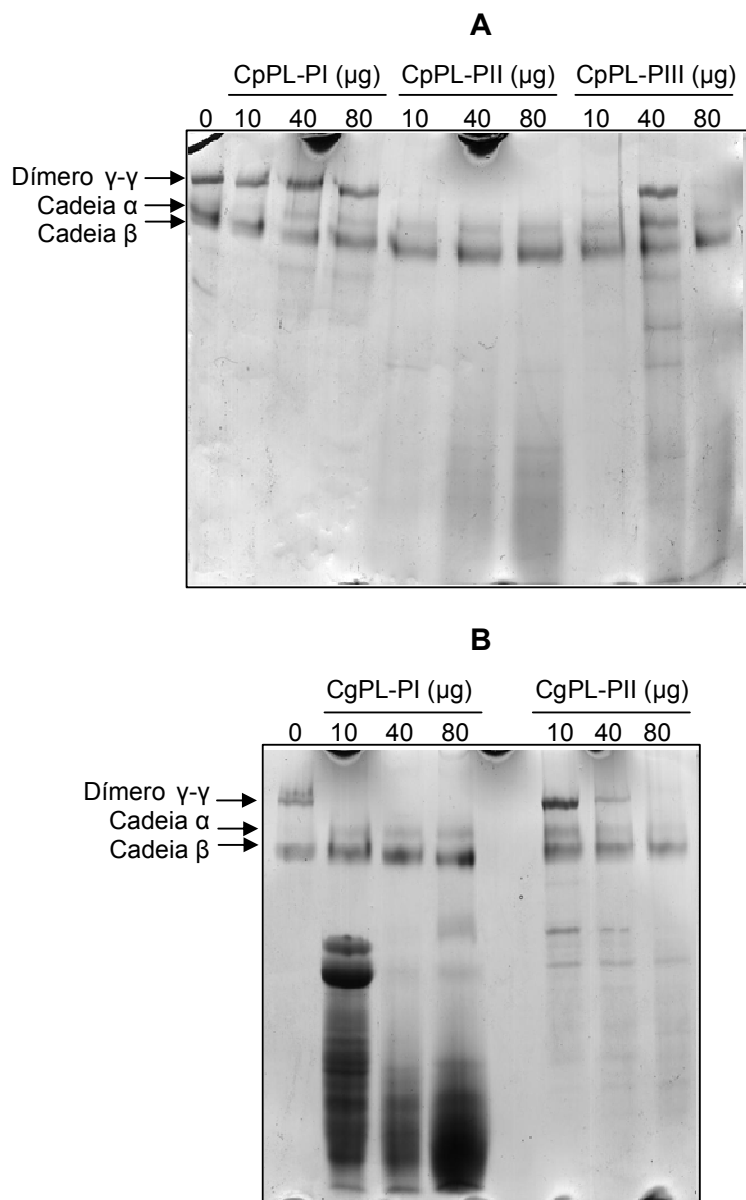


Figura 20 - Hidrólise do coágulo de fibrina pelas sub-frações de *C. procera* (A) e *Cr. grandiflora* (B). O coágulo de fibrina, induzido por trombina, foi incubado com diferentes concentrações, 10 a 80 μg , das amostras, e papaína (usada como controle positivo) dissolvidos em tampão tris, na presença de DTT (3 mM), finalizando um volume de 40 μL , por 150 min à 37 °C. (0) Coágulo de fibrina. Os fibrinopeptídeos foram submetidos à PAGE-SDS 7,5% e o padrão de clivagem foi visualizado a partir da solução do corante *Coomassie Brilliant Blue R-350* 0,1%. As setas indicam as subunidades do coágulo de fibrina (SHIVAPRASAD *et al.*, 2009b).

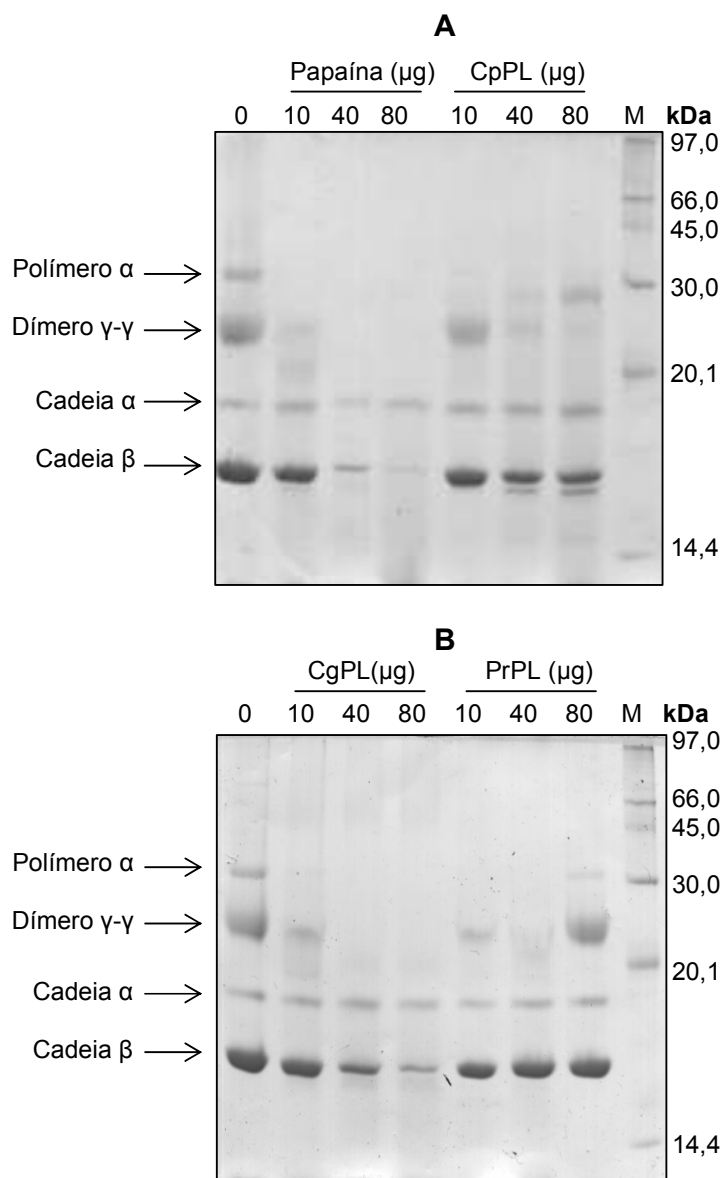


Figura 21 - Hidrólise do coágulo plasmático pelas proteínas do látex de *C. procera*, papaína (A), *Cr. grandiflora* e *P. rubra* (B). O coágulo plasmático, induzido por CaCl_2 0,25 M, foi incubado com diferentes concentrações, 10 a 80 µg, das amostras, e papaína (usada como controle positivo) dissolvidos em tampão tris na presença de DTT (3 mM), finalizando um volume de 40 µL, por 60 min à 37 °C. (0) Coágulo plasmático, (M) Marcadores de massa molecular. Os fibrinopeptídeos foram submetidos à PAGE-SDS 7,5% e o padrão de clivagem foi visualizado a partir da solução do corante *Coomassie Brilliant Blue R-350* 0,1%. As setas indicam as subunidades do coágulo de fibrina no plasma (RAJESH *et al.*, 2005).

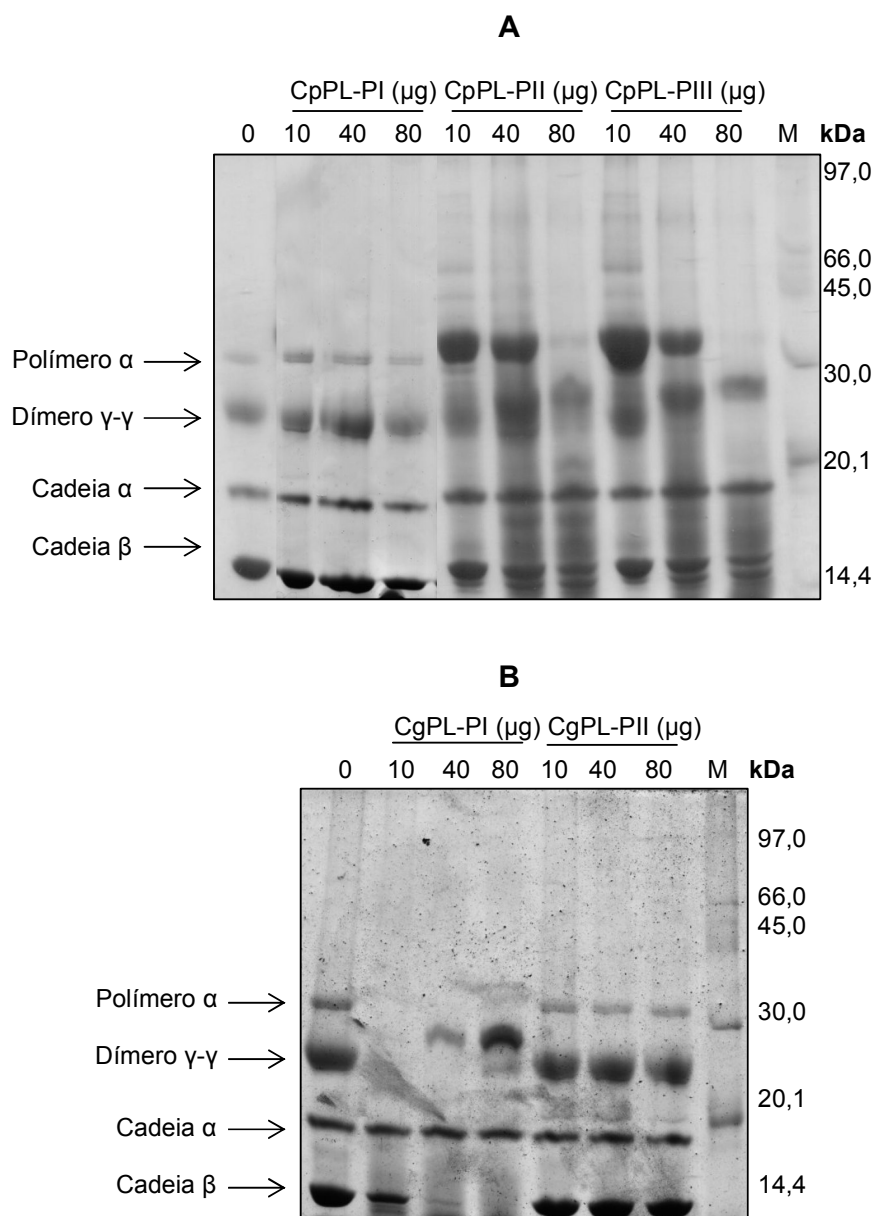


Figura 22 - Hidrólise do coágulo plasmático pelas sub-frações de *C. procera* (A) e *Cr. grandiflora* (B). O coágulo plasmático induzido por CaCl_2 0,25 M foi incubado com diferentes concentrações, 10 a 80 µg, das amostras e dissolvidos em tampão tris na presença de DTT (3 mM), finalizando um volume de 40 µL, por 60 min à 37 °C. (0) Coágulo plasmático, (M) Marcadores de massa molecular. Os fibrinopeptídeos foram submetidos à PAGE-SDS 7,5% e o padrão de clivagem foi visualizado a partir da solução do corante *Coomassie Brilliant Blue R-350* 0,1%. As setas indicam as subunidades do coágulo de fibrina no plasma (RAJESH *et al.*, 2005).

Para avaliar se as frações proteolíticas afetam a integridade de hemácias, foram feitos esfregaços sanguíneos, onde o sangue foi previamente incubado com CpPL-PIII, CgPL-PI (frações que apresentaram atividades fibrinogenolíticas mais evidentes) e papaína. Foi observado que nenhuma amostra causou dano à integridade das hemácias ou alteração no formato destas células (Figura 23).

O ensaio de atividade coagulante, bem como a contagem de plaquetas e análise por eletroforese do perfil protéico plasmático foram realizados em camundongos saudáveis ou submetidos à sepse para avaliar o efeito de CpPL no quadro patológico desenvolvido por esta infecção, visto que estas proteínas exibem efeito protetor *in vivo* contra sepse (LIMA-FILHO *et al.*, 2010). Como esperado, o tempo de coagulação e o conteúdo de plaquetas em camundongos sépticos foi fortemente reduzido quando comparado com camundongos saudáveis tratados somente com solução salina (Figura 24-A). Ambos os dados estão de acordo com a literatura, que descreve a redução de plaquetas no sangue de animais sépticos como resultado da intensa atividade da cascata de coagulação e, desta forma, levando ao excessivo consumo de fatores de pró-coagulação liberados de plaquetas (NIELSEN, 1998). Quando recebem CpPL, camundongos sépticos não morrem, como primeiramente descrito por Lima-Filho *et al.* (2010).

Seguindo um protocolo semelhante de infecção e tratamento utilizado por Lima-Filho *et al.* (2010), foi observado no presente estudo que o tempo de coagulação foi prolongado em camundongos sépticos pré-tratados com CpPL, comparados com camundongos sépticos não tratados, porém o coágulo ainda se formou mais rapidamente comparado aos camundongos saudáveis. O conteúdo de plaquetas também foi preservado em camundongos sépticos pré-tratados com CpPL, comparados com camundongos sépticos não tratados (Figura 24-A e B).

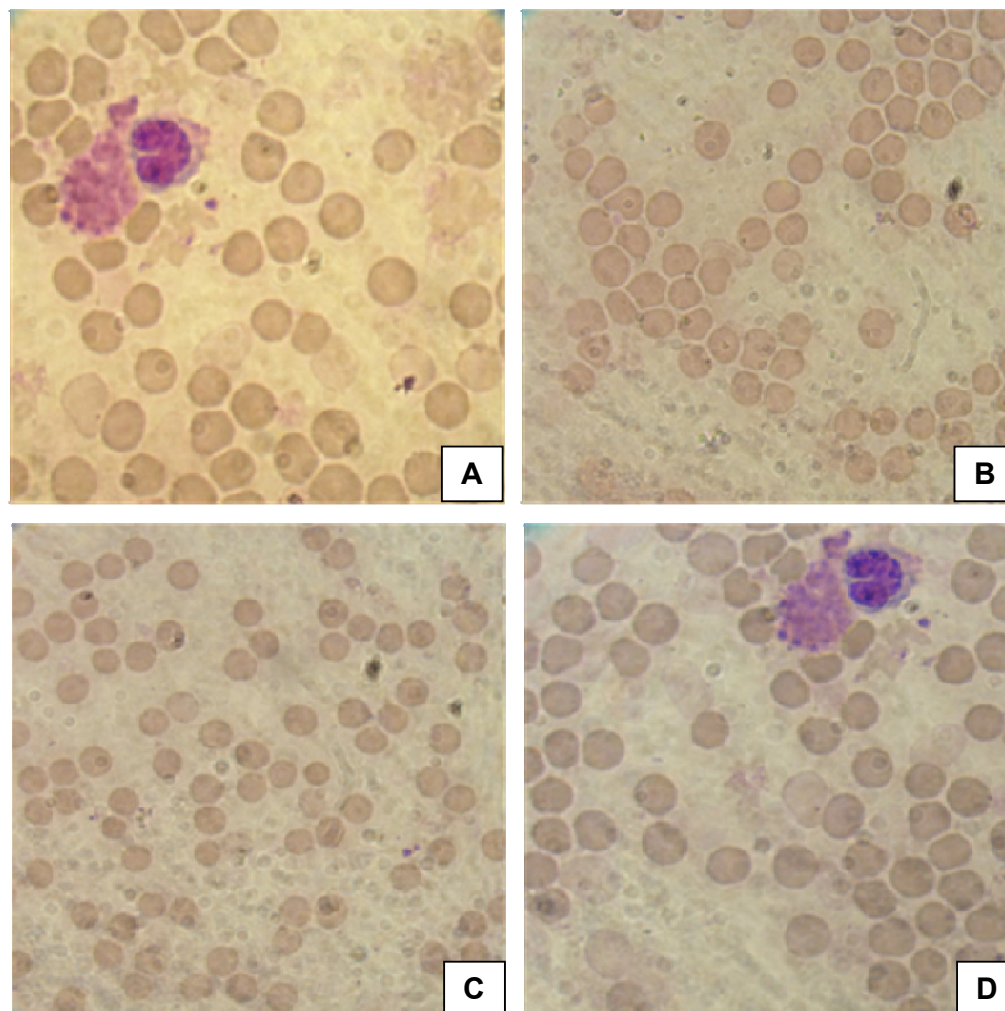


Figura 23 - Integridade de hemácias quando incubadas com as sub-frações CpPL-PIII, CgPL-PI e Papaína. Foram adicionados 80 μg das amostras (CpPL-PIII e CgPL-PI) e 8 μg de papaína, preparadas em 30 μL de tampão tris na presença de DTT 3 mM, a 300 μL de sangue humano fresco, permanecendo incubados por 1 min a 37 °C. Por fim, 30 μL de CaCl_2 0,25 M foram adicionados a esta solução. Papaína foi usada como controle positivo. Os esfregaços foram corados com hematoxilina-eosina e visualizados em microscópio óptico (Aumento 100x). **A** - Tampão tris. **B** - Papaína. **C** - CpPL-PIII. **D** - CgPL-PI.

Curiosamente, camundongos saudáveis que receberam somente CpPL exibiram um tempo de formação de coágulo reduzido, semelhante aos camundongos sépticos não tratados e diferente dos camundongos sépticos pré-tratados com CpPL (Figura 24-A). CpPL é muito eficiente na proteção de plaquetas em camundongos sépticos. Tal efeito parece ser plaqueta-independente, já que o conteúdo de plaquetas entre camundongos saudáveis e tratados com CpPL não difere (Figura 24-B). Ainda, a análise por eletroforese de proteínas séricas de animais saudáveis e sépticos tratados ou não com CpPL não apresentou diferenças significativas entre os perfis de proteínas (Figura 24-C). Portanto, a atividade direta de CpPL na corrente sanguínea deverá ser analisada.

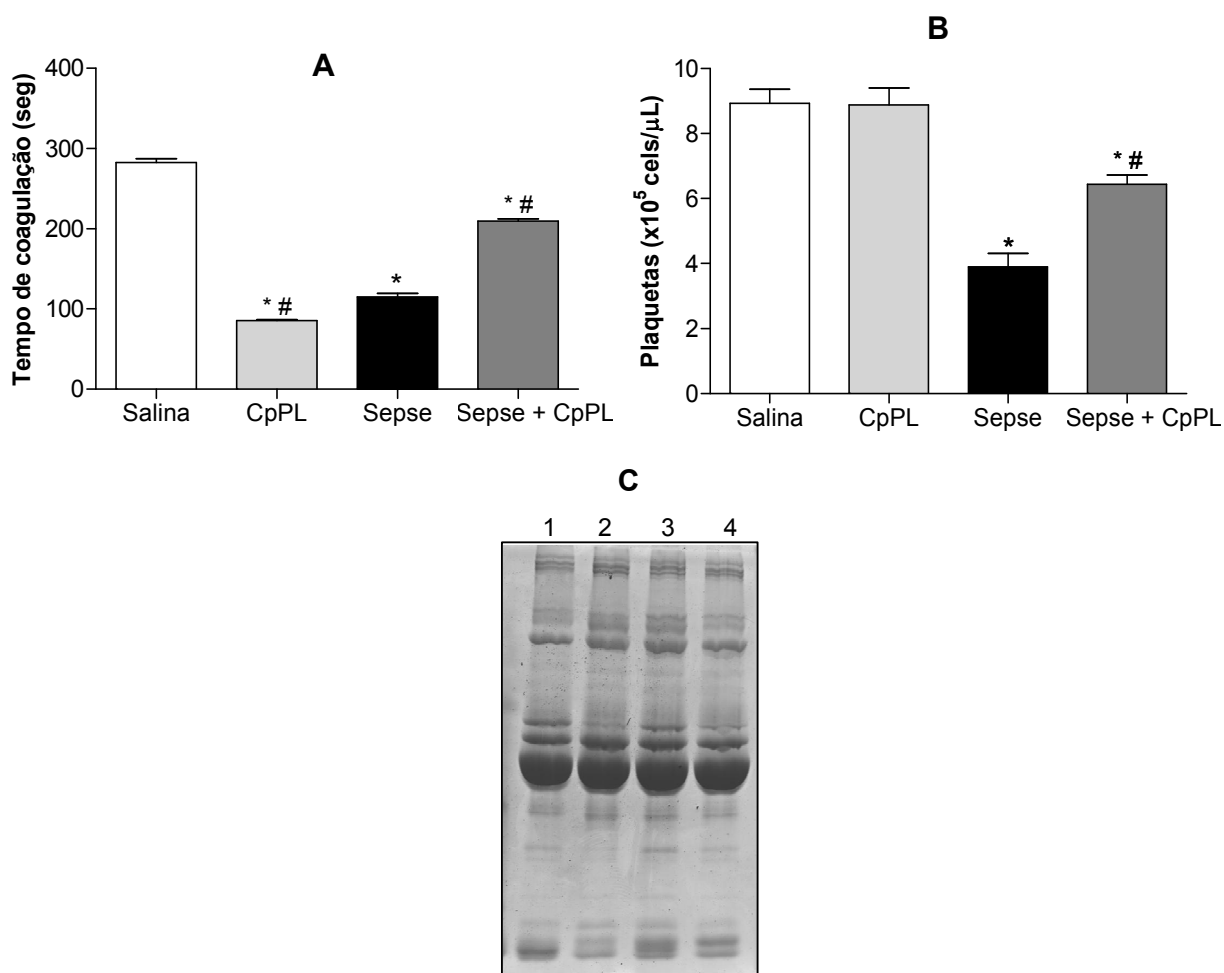


Figura 24 - Efeito das proteínas do látex de *C. procerus* sobre o tempo de coagulação, quantificação de plaquetas e perfil protéico do plasma obtido de camundongos saudáveis ou infectados com *S. Typhimurium* (10^7 UFC/mL). Animais foram tratados com CpPL (30 mg/kg, i.p.) 24 h antes da inoculação bacteriana (i.p.). Animais que receberam somente salina (i.p.) ou CpPL (30 mg/kg; i.p.) foram usados como controle. As avaliações foram realizadas 24 h após inoculação bacteriana ou 24 h após o tratamento com CpPL. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com animais do grupo salina e # $p < 0,05$ comparado com animais do grupo sepsis ($n = 5$, ANOVA teste -Student Newman-Keuls). **A** - Para a atividade coagulante foram adicionados 30 μ L de CaCl_2 (0,25 M) a 300 μ L de plasma em cada grupo, separadamente, e o tempo necessário para a formação do coágulo foi registrado. **B** - Contagem de plaquetas realizadas no analisador celular semi-automático Sysmex KX-21N

(Roche, USA). Os valores representam a média \pm EPM (n = 5). **C** - Perfil protéico de cada grupo experimental. (1) grupo salina, (2) grupo CpPL, (3) grupo sepse e (4) grupo sepse + CpPL.

VI – DISCUSSÃO

No presente estudo foram descritos alguns aspectos do envolvimento das proteínas do látex de *C. procera*, *Cr. grandiflora* e *P. rubra* na homeostase sanguínea.

Os ensaios bioquímicos realizados com o látex das plantas neste estudo desenvolveram-se principalmente com a sua fração protéica, que foi eficientemente separada da borracha, componente majoritário do látex, e de outras partículas e/ou metabólitos secundários. As frações CpPL e CgPL exibiram forte atividade proteolítica, quando comparadas à papaína (controle de protease cisteínica), hidrolisando a azocaseína, um substrato inespecífico para proteases, de forma dose-dependente, porém a fração PrPL hidrolisou fracamente este substrato. Estes resultados corroboram com os descritos na literatura (FREITAS *et al.*, 2007; FREITAS *et al.*, 2010). Verificou-se que a atividade proteolítica de *C. procera* concentra-se especificamente nas suas sub-frações CpPL-PII e CpPL-PIII e a atividade proteolítica de *Cr. grandiflora* concentra-se na sua sub-fração CgPL-PI. As frações detentoras de atividade proteolítica foram denominadas de frações proteolíticas. Isto confirma que o látex destas plantas possui uma fonte rica de enzimas proteolíticas.

A coagulação é o principal processo responsável por cessar o sangramento por um vaso sanguíneo injuriado, promovendo desta forma a hemostasia, ativada por uma série de enzimas proteolíticas. O efeito pró-coagulante de proteases do

látex não é novidade, e tem sido recentemente descrito (SHIVAPRASAD *et al.*, 2009a). A ficina, uma protease cisteínica derivada de *Ficus carica*, ativa o fator humano X e induz a coagulação sanguínea (RICHTER *et al.*, 2002). Similarmente, as proteases do látex de *Calotropis gigantea*, *Synadenium grantii* e *Wrightia tinctoria* foram reportadas como indutoras de coágulo (RAJESH *et al.*, 2007). Isto enfatiza o direto envolvimento das proteases do látex de plantas na hemostasia.

Corroborando com a literatura, todos os ensaios experimentais *in vitro*, realizados neste estudo, mostram que as frações proteolíticas reduzem o tempo de formação do coágulo, sugerindo que a atividade proteolítica é a responsável por este efeito, e que a específica clivagem do fibrinogênio poderia ser um provável sítio de ação destas proteases na cascata de coagulação.

A cascata de coagulação do sangue é uma via muito bem regulada que envolve vários fatores de coagulação, com e sem atividade proteolítica. Várias proteases, que interferem na hemostasia, foram isoladas e bem caracterizadas a partir de venenos de serpentes. Entre essas proteases, enzimas fibrinogenolíticas são predominantes, sejam estas ativadoras ou inibidoras da coagulação sanguínea. A maioria dos fibrinogenases isoladas de venenos de serpentes cliva a subunidade A α ou B β do fibrinogênio ou ambas. Até agora, apenas uma protease isolada do veneno da serpente *Cerestase cerestase* foi capaz de hidrolisar a subunidade γ do fibrinogênio (SWENSON; MARKALAND, 2005).

Contudo, enzimas que agem como trombina hidrolisam as cadeias A α e B β do fibrinogênio, a partir do resíduo N-terminal, levando a formação do coágulo de fibrina por liberar os fibrinopeptídeos A (FPA, A α 1-16) e B (B β 1-15) (KOMORI *et al.*, 1985). Em contraste, enzimas que hidrolisam todas as cadeias do fibrinogênio (A α , B β e γ) a partir do resíduo C-terminal, são conhecidas por prolongar ou prevenir a formação

do coágulo, agindo de forma semelhante à plasmina (EVANS, 1981; CIVELLO *et al.*, 1983).

A fração CpPL e suas sub-frações CpPL-PII e CpPL-PIII, hidrolisaram preferencialmente a subunidade A α do fibrinogênio, e com o aumento da concentração protéica as subunidades B β e γ foram hidrolisadas. Este efeito observado deve-se ao fato da subunidade A α do fibrinogênio não possuir carboidratos, detectáveis, em sua estrutura sendo, portanto mais facilmente digerida e constituindo-se o alvo de hidrólise pelas proteínas do látex. Em contraste, por possuir carboidratos em sua estrutura, a subunidade B β é hidrolisada somente quando concentrações mais elevadas de proteases são utilizadas. Já a subunidade γ , por possui maior teor de carboidratos do que a subunidade β , é a subunidade mais resistente a proteólise, porém por tempos prolongados de incubação ou em altas doses esta também pode se tornar susceptível às proteínas do látex (RAJESH *et al.*, 2005).

Visto que a fração CpPL e suas sub-frações CpPL-PII e CpPL-PIII hidrolisaram as subunidades A α e B β do fibrinogênio preferencialmente e somente hidrolisaram a subunidade γ em altas concentrações, sugere-se que estas proteases desempenhem ação similar à trombina. Entretanto, a fração CgPL, sua sub-fração CgPL-PI e papaína foram capazes de hidrolisar todas as cadeias do fibrinogênio na menor dose e tempo estudados, uma propriedade única da plasmina, uma protease serínica presente no sangue e responsável por hidrolisar o coágulo de fibrina, sugerindo que estas proteases desempenhem ação semelhante à desta enzima. Como dito anteriormente, enzimas que hidrolisam todas as subunidades do fibrinogênio são conhecidas por prolongar ou prevenir a coagulação. Apesar da fração CgPL, sua sub-fração CgPL-PI e papaína terem hidrolisado todas as

subunidades do fibrinogênio, de forma não específica, não foi observado a ação anti-coagulante destas amostras quando avaliados seus efeitos sobre o tempo de coagulação, pelo contrário, estas amostras foram capazes de induzir rápida formação do coágulo, semelhante às outras frações proteolíticas.

As proteases serínicas de mamíferos estão diretamente envolvidas nas vias extrínsecas e intrínsecas da coagulação sanguínea (DAVIE *et al.*, 1979). Similarmente, as proteases de venenos de cobras que interferem na cascata de coagulação sanguínea, também são do tipo serínicas (SWENSON; MARKLAND, 2005). Poucos trabalhos descritos na literatura descrevem o envolvimento de proteases cisteínicas, aspárticas ou metaloproteases na cascata de coagulação. Entretanto, alguns artigos sugerem o envolvimento de proteases cisteínicas na hemostasia, isoladas tanto de látex como de fontes microbianas (IMAMURA *et al.*, 2001a; IMAMURA *et al.*, 2001b; RICHTER, 2002; RAJESH *et al.*, 2005; RAJESH *et al.*, 2007; SHIVAPRASAD *et al.*, 2009a; SHIVAPRASAD *et al.*, 2009b; SHIVAPRASAD *et al.*, 2010). A maioria das proteases presentes no látex de plantas pertence à classe de proteases cisteínicas, e poucas pertencem à classe de proteases serínicas (BOLAY, 1979).

Os estudos de inibição realizados confirmam que as proteases envolvidas no processo de formação do coágulo, são do tipo cisteínicas, já que as atividades foram fortemente inibidas quando as amostras foram incubadas com E-64, um específico inibidor de proteases cisteínicas. Este fato está de acordo com o observado na literatura, pois verifica-se que a atividade proteolítica, desempenhada por proteases cisteínicas foi encontrada com maior frequência nos estudos dos fluidos laticíferos de diferentes espécies (PRIOLO, 2000; KUNDU *et al.*, 2000; MOUSSAOUI *et al.*, 2001; KYNDT *et al.*, 2007; FREITAS *et al.*, 2007; FREITAS *et al.*, 2010).

A hemostasia envolve dois importantes sistemas proteolíticos, a coagulação e a fibrinólise (LIJNEN, 2002). A coagulação envolve a participação de uma série de proteases serínicas, resultando na formação do coágulo de fibrina (BERKNER, 2001). Quando o fibrinogênio é clivado pela trombina, para formar o coágulo de fibrina, são liberados peptídeos menores específicos, as cadeias α , β e, por ativação do fator XIIIa pela trombina, o dímero γ - γ . A fibrinólise é um processo oposto à coagulação, no qual o coágulo formado é hidrolisado pela ação da plasmina (WALKER *et al.*, 1985).

Visto que proteases que digerem a subunidade γ do fibrinogênio também podem apresentar a capacidade de hidrolisar o coágulo de fibrina (RAJESH *et al.*, 2005), neste trabalho também foi avaliado se as proteínas do látex das plantas em estudo seriam capazes de participar de todo o processo hemostático, ou seja, se seriam capazes de promover a formação do coágulo (atividade fibrinogenolítica) e de hidrolisar o coágulo depois de formado (atividade fibrinolítica). As frações proteolíticas foram capazes de hidrolisar o dímero γ e a cadeia α do coágulo de fibrina de forma dose dependente, não sendo capazes de hidrolisar a cadeia β , nas condições testadas. As frações proteolíticas também foram capazes de hidrolisar parcialmente o coágulo plasmático, porém a cadeia α se mostrou resistente à proteólise, ao contrário de papaína que foi eficiente na hidrólise de todas as subunidades do coágulo plasmático. Curiosamente, apesar da fração CgPL e sua sub-fração CgPL-PI terem hidrolisado todas as subunidades do fibrinogênio sem especificidade e na menor dose e tempo testados, sugerindo atividade como plasmina, estas não foram capazes de hidrolisar totalmente o coágulo de fibrina. Portanto, experimentos posteriores, com doses mais altas ou prolongados períodos

de incubação do coágulo de fibrina com as amostras, devem ser testados para confirmar a atividade fibrinolítica.

As hemácias podem ser modificadas por uma variedade de tratamentos químicos e fisiológicos. As diferenças na topologia de sua membrana resultam das mudanças nas forças que se originam na própria membrana. Os mecanismos que envolvem as modificações do formato destas células têm sido explicados satisfatoriamente, e a maioria envolve a interação de compostos exógenos na bicamada lipídica (GEDDE; HUESTIS, 1997). Devido a estas observações, as frações CpPL-PIII e CgPL-PI, comparadas à papaína, foram avaliadas acerca do seu efeito sobre a integridade de hemácias. Foi verificado que estas frações não causaram danos, ou alterações no formato de hemácias de acordo com a metodologia estudada.

A planta *Calotropis procera* é popularmente conhecida como uma planta medicinal. De fato, várias atividades farmacológicas relacionadas às proteínas do látex desta planta já foram extensamente estudadas, dentre as quais podem-se destacar a atividade anti e pró-inflamatória, atividade anti-tumoral, inibição de peritonite induzida por carragenana pela modulação de NO no soro e prevenção de choque séptico (ALENCAR *et al.*, 2004; ALENCAR *et al.*, 2006; ARYA; KUMAR, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2010; RAMOS *et al.*, 2009a; LIMA-FILHO *et al.*, 2010).

Recentemente foi relatado que CpPL exibe efeito protetor sobre camundongos que foram experimentalmente infectados com uma dose letal de bactérias Gram-negativa, *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Typhimurium, prevenindo contra o choque séptico sem interferir diretamente nas bactérias (LIMA-FILHO *et al.*, 2010). Neste mesmo trabalho foi observado que CpPL é capaz de reverter o quadro de plaquetopenia de animais sépticos, assemelhando-

se à animais saudáveis. Uma vez que as plaquetas estão diretamente envolvidas no processo de coagulação sanguínea (LI *et al.*, 2011) estas condições levaram a realização de posteriores análises para a compreensão dos mecanismos que levam à atividade desempenhada por CpPL.

No presente estudo foram descritos alguns aspectos do envolvimento de CpPL na homeostase sanguínea de animais sépticos e saudáveis. Tendo em mente que a sepse provoca desequilíbrios fisiológicos, incluindo expressões de citocinas, falha da migração de leucócitos e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, dentre outros distúrbios, dos quais a coagulação intravascular disseminada e a trombocitopenia, conhecidamente as complicações finais da sepse, desempenham papel crítico na morte dos pacientes (LI *et al.*, 2011).

Existem dados consistentes na literatura que relatam o envolvimento dos mediadores da coagulação na inflamação (JENNEWEIN *et al.*, 2011). No presente estudo, CpPL foi administrado nos animais por via intraperitoneal, com o objetivo de reproduzir os estudos de sepse relatados por Lima-Filho *et al.* (2010). Sabe-se que CpPL, quando administrado por via endovenosa em ratos, possui efeito antiinflamatório, porém quando administrado por via intraperitoneal CpPL pode induzir peritonites, agindo portanto como um agente pró-inflamatório (ALENCAR *et al.*, 2006). Tal condição pode explicar a ativação da cascata de coagulação, como resultado de uma condição pró-inflamatória promovendo, desta forma, a ativação das plaquetas para liberar mediadores da coagulação e reduzir o tempo de formação de coágulos, como observado em animais que foram tratados somente com CpPL.

A depleção de células é observada sob condições drásticas como a sepse, que obviamente é fisiologicamente diferente do estado fisiológico estabelecido por CpPL, após sua administração em animais saudáveis. Uma vez que CpPL não

alterou o perfil de plaquetas em animais saudáveis, mas estatisticamente reduziu a depleção plaquetária provocada pela sepse, torna-se evidente que CpPL exhibe próprios mecanismos de ação, distintos em ambos os estados fisiológicos (séptico versus saudável). Ainda, a análise por eletroforese de proteínas séricas de animais saudáveis e sépticos tratados ou não com CpPL não apresentou diferenças significativas entre os perfis protéicos. Portanto, a atividade direta de CpPL na corrente sanguínea não deve ser descartada.

O papel das proteases cisteínicas de látex no processo de coagulação sanguínea não é claramente compreendido. Segundo Jennewein *et al.* (2011), os fatores de coagulação, incluindo fibrinogênio, fibrina e os produtos de degradação da fibrina, bem como agentes que regulam ou interferem na cascata de coagulação, são capazes de modular a resposta inflamatória por alterar a migração de leucócitos e a produção de citocinas. Os fragmentos de fibrina desempenham atividades pró-inflamatórias, com exceção do fibrinopeptídeo B β 15-42, que possui potente atividade antiinflamatória.

É interessante destacar que, enquanto papaína prontamente digere o fibrinogênio, as frações proteolíticas o digerem apenas parcialmente em doses mais baixas. O fragmento A α parece ser o alvo da proteólise enquanto que os fragmentos B β e γ são digeridos somente em doses elevadas. Todas estas observações dão fortes evidências para um efeito independente de plaquetas de CpPL na sepse.

O tratamento de processos inflamatórios e infecciosos é rotineiro em hospitais e postos de saúde no Brasil e no mundo. Neste aspecto, o uso de medicamentos a base de produtos naturais que tratem destas enfermidades se faz bastante necessário, visto que a dependência de antibióticos e outros medicamentos que modulam a resposta inflamatória, tais como esteróides, anticoagulantes,

antagonistas de citocinas, entre outros, levam à contínua evolução da resistência das bactérias a estas drogas (WANG *et al.*, 2009).

A terapêutica com proteínas constitui uma classe promissora da terapia, e seu particular potencial é devido ao fato que estas moléculas podem ser altamente específicas, podendo ser potencialmente utilizadas em baixas doses e com poucos efeitos colaterais. Estas moléculas também representam uma nova gama de possibilidades no tratamento de doenças, por exemplo, influenciando o sistema imunológico. As proteínas são administradas basicamente por via subcutânea ou endovenosa em uma solução ou suspensão, visto que estas poderiam ser alvo de digestão por via oral, uma desvantagem que pode ser facilmente contornada a partir do desenvolvimento de novas tecnologias (MOELLER; JORGENSEN, 2008).

Os resultados obtidos neste estudo abrem novas perspectivas a cerca das atividades farmacológicas desempenhadas por *C. procera* e *Cr. grandiflora* sobre a homeostase sanguínea, visto que confirmam a atividade fibrinogenolítica associada a proteases cisteínicas do látex e mostram um efeito protetor *in vivo* muito intrigante de *C. procera* no conteúdo de plaquetas em animais sépticos, com aparentes efeitos benéficos contra a coagulação intravascular disseminada, um evento crucial associado à sepse letal.

VII - CONCLUSÃO

As frações proteolíticas (CpPL e suas sub-frações CpPL-PII e CpPL-PIII e CgPL e sua sub-fração CgPL-PI) são fontes ricas de proteínas nas quais as proteases cisteínicas estão profundamente envolvidas no efeito pró-coagulante, mediado pela específica clivagem do fibrinogênio, e são detentoras de grande potencial fibrinolítico. PrPL, CpPL-PI e CgPL-PII provavelmente por exibirem baixas atividades proteolíticas, não compartilharam com as frações proteolíticas as atividades relatadas neste estudo.

As proteases presentes nas frações proteolíticas de *C. procera* mimetizam o efeito da trombina sobre o fibrinogênio por hidrolisar preferencialmente as suas subunidades A α e B β . Em contrapartida, as proteases presentes nas frações proteolíticas de *Cr. grandiflora* parecem agir semelhantemente à plasmina, visto que não exibiram preferência por nenhuma subunidade do fibrinogênio, hidrolisando todas igualmente, porém curiosamente estas proteases não prolongaram a formação do coágulo, como é bem conhecido para enzimas que mimetizam a plasmina, pelo contrário, exibiram forte efeito pró-coagulante sobre o plasma citratado.

A despeito da complexidade fisiológica desempenhada pela sepse, que provoca profundos desequilíbrios na homeostase, CpPL apresentou melhora substancial em ratos sépticos, com a preservação de plaquetas e redução do risco de coagulação intravascular disseminada. Visto que as plaquetas são conhecidas por desempenhar múltiplos efeitos, diretos e indiretos, na inflamação, o efeito

exibido por CpPL na sepse, embora desconhecido, parece ser independente da interação direta com plaquetas.

Os mecanismos pelos quais CpPL protege os animais sépticos e evita trombocitopenia permanecem altamente especulativos. No entanto, a capacidade de CpPL em intervir na inflamação, preservando o conteúdo de plaquetas, pode ser útil como estratégia alternativa para o tratamento de distúrbios inflamatórios exacerbados, como observado na sepse.

Os resultados demonstrados neste estudo são de fundamental importância para o entendimento dos conceitos básicos acerca de como proteínas presentes no látex de plantas podem auxiliar no tratamento de ferimentos e processos inflamatórios.

VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, K.L.; JOSHI, P.N. (1979) Studies on proteinases from *Calotropis gigantea* latex: purification and properties of two proteinases containing carbohydrates. **Biochem Biophys Acta**; 568:111-119.

ADAMS, R.A.; BAUER, J.; FLICK, M.J.; SIKORSKI, S.L.; NURIEL, T. *et al.* (2007) The fibrin-derived $\gamma^{377-395}$ peptide inhibits microglia activation and suppresses relapsing paralysis in central nervous system autoimmune disease. **J Exp Med**; 204(3):571-582.

AGRAWAL, A.A.; KONNO, K. (2009) Latex: a model for understanding mechanisms, ecology and evolution plant defense against herbivory. **Annu Rev Ecol Evol Syst**; 40:311-331.

ALBUQUERQUE, T.M.; ALENCAR, N.M.N.; FIGUEIREDO, J.G.; FIGUEIREDO, I.S.T.; TEIXEIRA, C.M.; BITENCOURT, F.S.; SECCO, D.D.; ARAUJO, E.S.; LEO, A.M.C.A.; RAMOS, M.V. (2009) Vascular permeability, neutrophil migration and edematogenic effects induced by the latex of *Cryptostegia grandiflora*. **Toxicon**; 53:15-23.

ALENCAR, N.M.N.; FIGUEREDO, I.S.T.; VALE, M.R.; BITENCOURT, F.S.; OLIVEIRA, J.S.; RIBEIRO, R.A.; RAMOS, M.V. (2004) Anti-inflammatory effect of the latex from *Calotropis procera* in three different experimental models: peritonitis, paw edema and hemorrhagic cystitis. **Planta Med**; 70:1144-1149.

ALENCAR, N.M.N.; OLIVEIRA, J.S.; MESQUITA, R.O.; LIMA, M.W.; VALE, M.R.; ETCHELLS, J.P.; FREITAS, C.D.T.; RAMOS, M.V. (2006) Pro- and antiinflammatory activities of the latex from *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. are triggered by compounds fractionated by dialysis. **Inflamm Res**; 55:559-564.

ANGUS, D.C.; LINDE-ZWIRBLE, W.T.; LIDICKER, J.; CLERMONT, G.; CARCILLO, J.; PINSKY, M.R. (2001) Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care sepsis. **Crit Care Med**; 29:1303-1310.

ANTÃO, C.M.; MALCATA, F.X. (2005) Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. **Plant Physiology and Biochemistry**; 43:637-650.

ARCHER, B.L.; AUDLEY, B.G.; MCSWEENEY, G.P.; HONG, T.C.J. (1969) Studies on composition of latex serum and "bottom fraction" particles. **Journal of Rubber Research of Institute of Malaysia**; 21(4):560-569.

ARIMA, K.; UCHIKOBA, T.; YONEZAWA, H.; SHIMADA, M. (2000) Cucumisin-like protease from the latex of *Euphorbia supine*. **Phytochemistry**; 53:639-644.

ARYA, S.; KUMAR, V.L. (2005) Anti-inflammatory efficacy of extracts of latex of *Calotropis procera* against different mediators of inflammation. **Mediators Inflamm**; 4:228-232.

BARRETT, A.T. (1986) The cystatins: a new class of peptidase inhibitors. **Trends in Biochemistry Science**; 12:151-211.

BERKNER, K.L. (2001) Blood clotting: General pathway. **Encyclopedia of Life Sciences**. Nature publishing group.

BLASER, H.W. (1945) Anatomy of *Cryptostegia grandiflora* with Special Reference to the Latex System. **American Journal of Botany**; 32(3):135-141

BOLAY, E., (1979). Feigenund wurgefeigen. **Pharmazie in Unserer Zeit**; 4:97-112.

BORON, W.F.; BOULPAEP, E.L. (2005). Medical physiology (Updated ed.). Philadelphia: Elsevier

BRITO, A.R.M.S. (1996) How to study the pharmacology of medicinal plants in underdeveloped countries. **Journal of Ethnopharmacology**; 54:131-138.

BROCKBANK, W.J.; LYNN, K.R. (1979) Purification and preliminary characterization of two asclepains from the latex of *Asclepias syriaca* L. (milkweed). **Biochim Biophys Acta**; 578:13-22.

BROWN, S.H. Tropical flowering tree list. Disponível em: <<http://lee.ifas.ufl.edu/Hort/GardenPubsAZ/FactSheet/PlumeriaRubraFrangipani.pdf>> Acesso em: 25/11/2010.

CALIXTO, J.B. (2000) Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**; 33:179-189.

CAMBON, E.; GOUZOU, F.; PINA, M.; BAREA, B.; BAROUH, N.; LAGO, R.; RUALES, J.; TSAI, S.; VILLENEUVE, P. (2006). Comparison of the lipase activity in hydrolysis and acyl transfer reactions of two latex plant extracts from Babaco (*Vasconcellea X Heilbornii* Cv.) and *Plumeria rubra*: Effect of the aqueous microenvironment. **J Agric Food Chem**; 54:2726-2731.

CAVALHEIRO, M.G. (2010) Caracterização bioquímica parcial do látex de *Cryptostegia grandiflora* R. Br. e ação contra o vetor da dengue. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

CAVALLI, S.E.V.; ARRIBERI, M.C.; CORTADI, A.; CAFFINI, N.O.; PRIOLO, N.S. (2003) Morrenaim b I, a papain-like endopeptidase from the latex of *Morrenia brachystephana* Griseb. (Asclepiadaceae). **Journal Protein Chemistry**; 22(1):15-23.

CHOEDON, T., MATHAN, G., ARYA, S., KUMAR, V.L., KUMAR, V. (2006) Anticancer and cytotoxic properties of the *Calotropis procera* in a transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol**; 12(16):2517-2522.

CIVELLO, D.J.; MORAN, J.B.; GREEN, C.R. (1983). Substrate specificity of a hemorrhagic proteinase from timber rattlesnake venom. **Biochemistry**; 22:755-762.

COLLEN, D. (1999) The plasminogen (fibrinolytic) system. **Thromb Haemost**; 82:259-270.

COLMAN, R.W.; CLOWES, A.W.; GEORGE, J.N.; HIRSH, J.; MARDER, V.J. (2001a) Overview of hemostasis. *In*: COLMAN, R.W.; HIRSH, J.; MARDER, V.J.; CLOWES, A.W.; GEORGE, J.N. eds. **Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice**, 4th ed, Lippincott; Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 3-16.

COLMAN, R.W.; HIRSH, J.; MARDER, V.J.; CLOWES, A.W. (2001b) Overview of coagulation, fibrinolysis, and their regulation. *In*: COLMAN, R.W.; HIRSH, J.; MARDER, V.J.; CLOWES, A.W.; GEORGE, J.N. eds. **Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice**, 4th ed, Lippincott; Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 17-20.

CONDREA, E.; YANG, C.C.; ROSENBERG, P. (1983) Anticoagulant activity and plasma phosphatidylserine hydrolysis by snake venom phospholipase A₂. **Thrombosis and haemostasis**; 49(2):151.

COOK, D.R.; CAMPBELL, G.W.; MELDRUM, A.R. (1990) *Cryptostegia grandiflora* (rubber vine) poisoning in horses. **Aust. Vet. J.**; 67(9):344.

DAHBACK, B. (2005). Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: Genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. **Journal of Internal Medicine**; 257:209-223.

DAVIE, E.W.; FUJIKAWA, K.; KURACHI, K.; KISIEL, W. (1979). The role of serine proteases in the blood coagulation cascade. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol**; 48:277-318.

DAVIE, E.W.; RATNOFF, O.D. (1964) Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**; 145:1310-1312.

DELTA UNIVERSAL. (1982) 4^a ed. Rio de Janeiro: Editora Delta. 1394 p.

DEMARCO, D.; KINOSHITA, L.S.; CASTRO, M.M. (2006) Laticíferos articulados anastomosados - novos registros para Apocynaceae. **Rev. Bras. de Bot**; 29(1):133-144

DEWAN, S.; SANGRAULA, H.; KUMAR, V.L. (2000a) Preliminary studies on the analgesic activity of latex of *Calotropis procera*. **J Ethnopharmacology**; 73:307-311.

DEWAN, S.; KUMAR, S.; KUMAR, V.L. (2000b) Antipyretic effect of latex of *Calotropis procera*. **Ind J Pharmacol**; 32(3):247-252.

DOMSALLA, A.; MELZIG, M. (2008) Occurrence and properties of proteases in Plant Latices. **Planta Med**; 74:699-711.

DUBEY, V.K.; JAGANNADHAM, M.V. (2003) Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. **Phytochemistry**; 62:1057-1071.

EVANS, H.J. (1981). Cleavage of the A α chain of fibrinogen and the α polymer of fibrin by the venom of spitting cobra (*Naja nigricollis*). **Biochim. Biophys. Acta**; 660:219-226.

FLICK, M.J.; LAJEUNESSE, C.M.; TALMAGE, K.E.; WITTE, D.P.; PALUMBO, J.S. *et al.* (2007) Fibrin(ogen) exacerbates inflammatory joint disease through a mechanism linked to the integrin $\alpha_M\beta_2$ binding motif. **J Clin Invest**; 117:3224-3235.

FRANCO, R.F.; DE JONGE, E.; DEKKERS, P.E.P.; TIMMERMAN, J.J.; SPEK, C.A.; VAN DEVENTER, S.J.H.; VAN DEURSEN, P.; VAN KERKHOFF, L.; VAN GEMEN, B.; TEM CATE, H.; VAN DER POLL; REITSMA, P.H. (2000) The in vivo kinetics of tissue factor mRNA expression during human endotoxemia: relationship with activation of coagulation. **Blood**; 96:554-559.

FRANCO, R. F. (2001) Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina, Ribeirão Preto**; 34:229-237.

FREITAS, C.D.T.; OLIVEIRA, J.S.; MIRANDA, M.R.A.; MACEDO, M.N.R.; SALES, M.P.; VILLAS-BOAS, L.A.; RAMOS, M.V. (2007) Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. **Plant Physiology and Biochemistry**; 45:781-789.

FREITAS, C.D.T.; SOUZA, D.P.; ARAÚJO, E.S.; CAVALHEIRO, M.G; OLIVEIRA L.S.; RAMOS, M.V. (2010) Anti-oxidative and proteolytic activities and protein profile of laticifer cells of *Cryptostegia grandiflora*, *Plumeria rubra* and *Euphorbia tirucalli*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**; 22:11-22.

FUJISHIMA, S.; AIKAWA, N. (1995) Neutrophil-mediated tissue injury and its modulation. **Intensive Care Med**; 33:440-444.

GARLET, T.M.B.; IRGANG, B.E. (2001) Plantas Mediciniais utilizadas na medicina popular por mulheres trabalhadoras rurais de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev. Brasileira de Plantas Mediciniais**; 4(1):9-18.

GEDDE, M.M.; HUESTIS, W.H. (1997) Membrane potential and human erythrocyte shape. **Biophysical Journal**; 72:1220-1233.

GRICE, A.C.; RADFORD, I.J.; ABBOTT, B.N. (2000) Regional and landscape-scale patterns of shrub invasion in tropical savannas. **Biological Invasions**; 2:187-205.

HAGEL, J.M.; YEUNG, E.C.; FACCHINI, P.J. (2008) Got milk? The secret life of laticifers. **Trends in Plant Sci**; 13:631-639.

HARMENING, D.M. (2002). Clinical hematology and fundamentals of hemostasis. Philadelphia: F. A. Davis

HOFFMAN, M.; MONROE, D. (2005). Rethinking the coagulation cascade. **Current Hematology Reports**; 4:391-396.

HOFFMAN, R.; BENZ, J.; EDWARD, J.; SHATTIL, S.J.; FURIE, B.; COHEN, H.J.; *et al.* (2005). Hematology: Basic principles and practice. Philadelphia: Elsevier

IBA, T.; KIDOKORO, A.; FUKUNAGA, M.; SUGIYAMA, K.; SAWADA, T. *et al.* (2005) Association between the severity of sepsis and the changes in hemostatic molecular markers and vascular endothelial damage markers. **Shock**; 23:25-29.

IMAMURA, T.; BANBULA, A.; PEREIRA, P.J.; TRAVIS, J.; POTEPA, J. (2001a). Activation of human prothrombin by arginine-specific cysteine proteinases (Gingipains R) from *Porphyromonas gingivalis*. **The Journal of Biological Chemistry**; 276(22):18984-18991.

IMAMURA, T.; TANASE, S.; HAMAMOTO, T.; POTEPA, J.; TRAVIS, J. (2001b). Activation of blood coagulation factor IX by gingipains R, arginine-specific cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis*. **The Biochemical Journal**; 15(2):325-331.

JEKEL, P.A.; HARTMANN, B.H.; BEINTEMA, J.J.(1991) The primary structure of hevamine, an enzyme with lysosyme/chitinase activity from *Hevea brasiliensis* latex. **Eur. J. Biochem**; 200:123-130.

JENNEWEIN, C.; TRAN, N.; PAULUS, P.; ELLINGHAUS, P.; EBLE, J.A.; ZACHAROWSKI, K. (2011) Novel aspects of fibrin(ogen) fragments in the course of inflammation. **Mol Med**; [Epub ahead of print]

JENNY, N.S.; MANN, K.G. (1998) Coagulation cascade: an overview. *In*: LOSCALZO, J.; SCHAFER, A.I. eds. **Thrombosis and hemorrhage**; 2nd ed, Williams & Wilkins, Baltimore, p. 3-27.

JOO, H.S.; PARK, G.C.; CHO, W.R.; TAK, E.; PAIK, S.R.; CHANG, C.S. (2002). Purification and characterization of a prothrombin-activating protease from *Nephila clavata*. **Toxicon**; 40(3):289-296.

KARNODO, L.B.S.; TSAURI, S.; PADMAWINATA, K.; PEZZUTO, J.M.; KSINGHORN, D. (1990). Cytotoxic constituents of the bark of *Plumeria rubra* collected in Indonesia. **Journal of Natural Products**; 53(6):1447-1455.

KEKWICK, R.G.O. (2001) Latex and Laticifers. **Encyclopedia of Life Science**; Nature Publishing Group, 1-6.

KIRTIKAR, K.R.; BASU, B.D. (1935) Indial medical plants. Allahabad: Lolit Mohan Basu. 1606 p.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. (1999) Plantas infestantes e nocivas. 2 ed. São Paulo: Editora BASF, 978 p.

KLACKENBERG, J. (2001) Revision of the genus *Cryptostegia* R. Br. (Apocynaceae, Periplocoideae). **Andansonia**; 23(2):205-218.

KOMORI, Y.; SUGIHARA, H.; TU, A.T. (1985). Specificity of hemorrhagic proteinase from *Crotalus atrox* (Western diamond back rattle snake) venom. **Biochim. Biophys. Acta**; 829:127-130.

KREM, M.M.; DI CERA, E. (2002) Evolution of enzyme cascades from embryonic development to blood coagulation. **Trends Biochem Sci**; 27:67-74.

KUIGOUA, G.M.; KOUAM, S.F.; NGADJUI, B.T.; SCHULZ, B.; GREEN, I.R.; CHOUDHARY, M.I.; KROHN, K. (2010) Minor secondary metabolic products from the stem bark of *Plumeria rubra* Linn. displaying antimicrobial activities. **Planta Med**; 76(6):620-625

KUMAR, A. (1999) Ayurvedic medicines: some potential plants for medicine from India. A meeting of the International Forum on traditional medicines. Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama, Japan.

KUMAR, H.S.; BASU, N. (1994) Anti-inflammatory activity of the latex *Calotropis procera*. **Journal Ethnopharmacology**; 44:123-125.

KUMAR, V.; SHARMA, A. (2008) Innate immunity in sepsis pathogenesis and its modulation: new immunomodulatory targets revealed. **Journal of Chemotherapy**; 20(6):672-83.

KUNDU, S.; SUNDD, M.; JAGANNADHAM, M.V. (2000) Purification and Characterization of a Stable Cysteine Protease Ervatamin B, with Two Disulfide Bridges, from the Latex of *Ervatamia coronaria*. **J. Agric. Food Chem**; 48:171-179.

KYNDT, T.; DAMME, E.J.M.V.; BEEUMEN, J.V.; GHEYSEN, G. (2007) Purification and characterization of the cysteine proteinases in the latex of *Vasconcellea spp.* **The Febs Journal**; 274:451-462.

LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**; 227:680-685.

LARHSINE, M.; OUMOULID, L.; LAZREK, H.B.; WATALEB, C.S.; BOUSAID, M.; BEKKOUCHE, K. MARKOUK, M.; JANA, M. (1999) Screening of antibacterial and antiparasitic activities of six Moroccan medicinal plants. **Therapie**; 54:763-765.

LARHSINI, M.; BOUSAID, M.; LAZREK, H.B.; JANA, M. (1997) Evaluation of antifungal and molluscicidal properties of extract of *Calotropis procera*. **Fitoterapia**; 68:371-373.

LEE, K. H.; HUI, K. P.; TAN, W. C (1993) Thrombocytopenia in sepsis: a predictor of mortality in the intensive care unit. **Singapore Medical Journal**; 34(3):245-246.

LEHNER, M. D.; ITTNER, J.; BUNDSCHUH, D. S.; VAN ROOIJEN, N.; WENDEL, A.; HARTUNG, T. (2001) Improved innate immunity of endotoxin-tolerant mice increases resistance to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection despite attenuated cytokine response. **Infect Immun**; 69:463-471.

LEVI, M. (2010) The coagulant response in sepsis and inflammation. **Haemostaseologie**; 30:10-16.

LEVI, M.; VAN DER POLL, T.; BULLER, H.R. (2004) Bidirectional relation between inflammation and coagulation. **Circulation**; 109:2698-2704.

LI, Z.; YANG, F.; DUNN, S.; GROSS, A.K.; SMYTH, S.S. (2011) Platelets as immune mediators: Their role in host defense responses and sepsis. **Thromb Res**.

LIGGIERI, C.; ARRIBERI, M.C.; TREJO, S.A.; CANALS, F.; AVILES, F.X.; PRIOLO, N.S. (2004) Purification and biochemical characterization of Asclepain c I from the latex of *Asclepias curassavica* L. **Journal the Protein**; 23(6):403-411.

LIJNEN, H.R. (2002). Matrix metalloproteinases and cellular fibrinolytic activity. **Biochemistry**; 67:92-98.

LIMA-FILHO, J.V.; PATRIOTA, J.M.; SILVA, A.F.B.; FILHO, N.T.; OLIVEIRA, R.S.B.; ALENCAR, N.M.N.; RAMOS, M.V. (2010) Proteins from latex of *Calotropis procera* prevent septic shock due to lethal infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of Ethnopharmacology**; 129:327-334.

LORD, S.T. (2007) Fibrinogen and fibrin: scaffold proteins in hemostasis. **Curr Opin Hematol**; 14:236-241.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. (2002) Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. São Paulo: Instituto Planatarum 512 p.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. (1999) Plantas Ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 2. ed. São Paulo: Instituto Planatarum 250 p.

LOSCALZO, J.S.A.I. (2003). Thrombosis and hemorrhage. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

LUCHTMAN-JONES, L.; BROZE, J. (1995). The current status of coagulation. **Annals of Medicine**; 27(1):47-52.

LYNN, K.R.; CLEVETTE-RADFORD, N.A. (1986) Hevamins: serine-centred proteases from the latex of *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry**; 25(10):2279-2282.

LYNN, K.R.; CLEVETTE-RADFORD, N.A.(1987) Biochemical properties of latices from the Euphorbiaceae. **Phytochemistry**; 26:939-944.

MACFARLANE, R.G. (1964) An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. **Nature**; 202:498-499.

MOELLER, E. H.; JORGENSEN, L. (2008) Alternative routes of administration for systemic delivery of protein pharmaceuticals. **Drug Discovery Today: Technologies**; 5(2-3):89-94

MONTI, R.; CONTIEIRO, J.; GOULART, A.J. (2004) Isolation of natural inhibitors of papain obtained from *Carica papaya* latex. **Brazilian Archives of Biology and Technology**; 47(5):747-754.

MORCELLE, S.F.; CAFFINI, N.O.; PRIOLO, N. (2004) Proteolytic properties of *Funastrum clausum* latex. **Fitoterapia**; 75:480-493.

MOSESSON, M.W. (2005) Fibrinogen and fibrin structure and functions. **J Thromb Haemost**; 3:1894-1904.

MOURSY, L.E. (1997) Insecticidal activity of *Calotropis procera* extracts of the flesh fly. *Sarcophaga haemorrhoidalis* fallen. **J Egypt Soc Parasitol**; 27:505-514.

MOUSSAOUI, A.E.; NIJS, M.; POUL, C.; WINTJENS, R.; VINCENTELLI, J.; AZARKAN, M.; LOOZE, Y. (2001) Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defence mechanism. **Cell Mol Life Sci**; 58(4):556-570.

MUEEN, A.K.K.; RANA, A.C. *et al* (2005) *Calotropis* species (Asclepiadaceae)-A comprehensive review. **Pharmacognosy Mag**; 1:48-52

MUENZER, J.T.; DAVIS, C.G.; CHANG, K.; SCHMIDT, R.E.; DUNNE, W.M.; COOPERSMITH, C.M.; HOTCHKISS, R.S. (2010) Characterization and Modulation of the Immunosuppressive Phase of Sepsis. **Infect Immun**; 78(4):1582-1592.

MUKHERJEE, K.P.; GUNASEKHARAN, R.; SUBBURAJU, T.; DHANBAL, S.P.; DURAISWAMY, B.P.; SURESH B. V. (1999) Studies on the antibacterial potential of *Cryptostegia grandiflora* R. BR. (Asclepiadaceae) extract. **Phytotherapy Research**; 3(1):70-72.

MUTHU, C.; AYYANAR, M.; RAJA, N. *et al* (2006) Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. **J Ethnobiol Ethnomed**; 2:43.

NALLAMSETTY, S.; KUNDU, S.; JAGANNADHAM, M.V. (2002) Purification and biochemical characterization of a highly Active cysteine protease ervatamin A from the latex of *Ervatamia coronaria*. **Journal of Protein Chemistry**; 22(1):1-13.

NATHAN, D.G.; ORKIN, S.H.; GINSBURG, D.; LOOK, T. A. (2003). Nathan and Oski's hematology of infancy and childhood 6th ed. Philadelphia: Saunders.

NIELSEN, J.D. (1998) The effect of antithrombin on the systemic inflammatory response in disseminated intravascular coagulation. **Blood Coagul Fibrinolysis**; 9(3):11-15.

OBREGON, W.D.; ARRIBERE, M.C.; MORCELLE, D.V.S.; LIGGIERI, C.; CAFFINI, N.O.; PRIOS, N.S. (2001) Two new cysteine endopeptidases obtained from the latex of *Araujia hortorum* fruits. **Journal of Protein Chemistry**; 20:317-325.

O'BRIEN, J.J.M.; ALI, N.A.; ABEREGG, S.K.; ABRAHAM, E. (2007) Sepsis. **The American J Med**; 120(12):1012-1022.

OLIVEIRA, J.S.; COSTA-LOTUFO, L.V.; BEZERRA, D.P.; ALENCAR, N.M.N.; MARINHO-FILHO, J.D.B.; FIGUEIREDO, I.S.T.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; ALVES, A.P.N.N.; RAMOS, M.V. (2010) . In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**; 382:139-149.

OSUCHOWSKI, M.F.; WELCH, K.; SIDDIQUI, J.; REMICK, D.G. (2006) Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the sirs/cars continuum in sepsis and predict mortality. **J Immunol**; 177:1967-1974.

OUYANG, C.; TENG, C.M., (1976). Fibrinolytic enzymes of *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. **Biochimica et biophysica acta**; 420:298-308.

PATEL, K.D.; JAGANNADHAM, M.V. (2003) A High Cysteine Containing Thiol Proteinase from the Latex of *Ervatamia heyneana*: Purification and Comparison with Ervatamin B and C from *Ervatamia coronaria*. **Journal Agricultural Food Chemistry**; 51:6326-6334.

PAUL, J.; STRICKLAND, S.; MELCHOR, J.P. (2007) Fibrin deposition accelerates neurovascular damage and neuroinflammation in mouse models of Alzheimer's disease. **J Exp Med**; 204:1999-2008.

PEREIRA, L.S.; GOMES, V.M.; FERNANDES K.V.S.; SALES, M.P.; XAVIER-FILHO, J. (1999) Insecticidal and antifungic proteins of the latex from *Manihot glaziovii* Muell. Arg. **Revista Brasileira de Botânica**; 22(1):1-9.

PIZZO, S.V.; SCHWARTZ, M.L.; HILL, R.L.; MCKEE, P.A. (1972) The effect of plasmin on the subunit structure of human fibrinogen. **J. Biol. Chem**; 247:636-645.

PRASAD, K.M.R.; VIRUPAKSHA T.K. (1990) Purification and characterization of a protease from jackfruit latex. **Phytochemistry**; 29:1763-1766.

PRIOLO, N.; VALLE, S.M.; ARRIBÉRE, M.C.; LOPES, L.; CAFFINE, M.; (2000) Isolation and Characterization of a Cysteine Protease from the Latex of *Araujia hortorum* Fruits. **Journal of Protein Chemistry**; 19(1):39-49.

RAJESH, R.; RAGHAVENDRAGOWDA, C.D.; NATARAJU, A.; DHANANJAYA, B.L.; KEMPARAJU, K.; VISHWANATH, B.S. (2005). Procoagulant activity of *Calotropis gigantea* latex associated with fibrin(ogen)olytic activity. **Toxicon**; 46:84-92.

RAJESH, R.; NATARAJU, A.; RAGHAVENDRAGOWDA, C.D. *et al* (2006) Purification and characterization of a 34-kDa, heat stable glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot. **Biochimie**; 88:1313-1322.

RAJESH, R.; SHIVAPRASAD, H.V.; RAGHAVENDRAGOWDA, C.D.; NATARAJU, A.; DHANANJAYA, B.L.; VISHWANATH, B.S. (2007). Comparative study on plant latex proteases and their involvement in hemostasis: a special emphasis on clot inducing and dissolving properties. **Planta Medica**; 73(10):1061-1067.

RAMOS, M.V.; BANDEIRA, G.P.; FREITAS, C.D.T.; NOGUEIRA, N.A.P.; ALENCAR, N.M.N.; SOUSA, P.A.S.; CARVALHO, A.F.U. (2006) Latex constituents from *Calotropis procera* (R. Br.) display toxicity upon egg hatching and larvae of *Aedes aegypti* (Linn.). **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**; 100(5):503-510.

RAMOS, M.V.; AGUIAR, V.C.; MACEDO, N.M.R.; OLIVEIRA, J.S.; OLIVEIRA, R.S.B.; ALENCAR, N.M.N. (2007) Immunological and allergenic responses induced by latex fractions of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Journal of Ethnopharmacology**; 111:115-122.

RAMOS, M.V.; OLIVEIRA, J.S.; FIGUEIREDO, J.G.; FIGUEIREDO, I.S.T.; KUMAR, V.L.; BITENCURT, F.S.; CUNHA, F.Q.; OLIVEIRA, R.S.B.; BOMFIM, L.R.; LIMA-FILHO, J.V.; ALENCAR, N.M.N. (2009a) Involvement of NO in the inhibitory effect of *Calotropis procera* latex protein fractions on leukocyte rolling, adhesion and infiltration in rat peritonitis model. **Journal of Ethnopharmacology**; 125:1-10.

RAMOS, M.V.; PEREIRA, D.A.; SOUZA, D.P.; ARAÚJO, E.S.; FREITAS, C.D.T.; CAVALHEIRO, M.G.; MATOS, M.P.V.; CARVALHO, A.F.U. (2009b) Potential of laticifer fluids for inhibiting *Aedes aegypti* larval development: Evidence for the involvement of proteolytic activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**; 104(6):815-812.

RAMOS, M.V.; GRANGEIRO, T.B.; FREIRE, E.A.; SALES, M.P.; SOUZA, D.P.; ARAÚJO, E.S.; FREITAS, C.D.T. (2010) The defensive role of latex in plants: detrimental effects on insects. **Anthropod-plant interactions**; 4:57-67.

RASIK, A.M.; RAGHUBIR, R.; GUPTA, A.; SHUKLA, A.; DUBEY, M.P.; SRIVASTAVA, S.; JAIN, H.K.; KULSHRESTHA, D.K. (1999) Healing potential of *Calotropis procera* on dermal wounds in Guinea pigs. **Journal of Ethnopharmacol**; 68:261-266.

RICHTER, G.; HANS, P.S.; FRIEDRICH, D. *et al* (2002) Activation and inactivation of human factor X by proteases derived from *Ficus carica*. **Br J Haematol**; 119:1042-1051.

SADLER, J.E. (2005). New concepts in Von Willebrand disease. **Annual Reviews in Medicine**; 56:173-191.

SANGRAULA, H.; DEWANS, S.; KUMAR, V.L. (2002) Evaluation of Antiinflammatory activity of the latex of *Calotropis procera* in different models of inflammation. **Inflammopharmacol**; 9:257-264.

SCHERAGA, H.A. (2004) The thrombin-fibrinogen interaction. **Biophysical Chemistry**; 112:117-130

SEMEGEN, S.T. (1978) Natural rubber. *In*: MORTON, M. Rubber technology. 2nd. ed. Florida: **R. E. Krieger**; 152-177.

SHARMA, P.; DEVI, J.; SHARMA, J. (2001) In vitro hemolysis of human erythrocytes by plant extracts with antiplasmodial activity. **Journal Ethnopharmacology**; 74:239-243.

SHIVAPRASAD, H.V.; RAJESH, R.; NANDA, B.L.; DHARMAPPA, K.K.; VISHWANATH, B.S. (2009a) Thrombin like activity of *Asclepias curassavica* L. latex: Action of cysteine proteases. **Journal of Ethnopharmacology**; 123:106-109

SHIVAPRASAD, H.V.; RIYAZ, M.; KUMAR, V.R.; DHARMAPPA, K.K.; TARANNUM, S.; SIDDESHA, J.M.; RAJESH, R.; VISHWANATH, B.S. (2009b) Cysteine proteases from the Asclepiadaceae plants latex exhibited thrombin and plasmin like activities. **J Thromb Thrombolysis**; 28(3):304-308.

SHIVAPRASAD, H.V.; RAJESH, R.; FREY, B. M.; FREY, F.J.; VISHWANATH, B.S. (2010) 'Pergularain e I' – a plant cysteine protease with thrombin-like activity from *Pergularia extensa* latex. **Thrombosis Research**; 125:100-105

SCHUSTER, H.P. (1989) Infection as a cause of multiple organ failure. Definition, pathophysiology and diagnostic parameters. **Anasth Intensivther Notfallmed**; 24(4):206-211.

SOBROTO, T; KONINGSVELD, G.A.; SCHREUDER, H.A.; SOEDJANAATMADJA, U.M.; BEINTEMA, J.J. (1996) Chitinase and β -1,3-glucanase in the lutoid-body fraction of *Hevea* latex. **Phytochemistry**; 43(1):29-37.

SUSSMAN, G.L.; BEEZHOLDB, D.H.; LISSC, G. (2002) Latex allergy: historical perspective. **Methods**; 27(1):3-9.

SWENSON, S.; MARKLAND, F.S. JR., (2005). Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. **Toxicon**; 45:1021-1039.

TATA, S.J. (1980) Distribution of proteins between the fractions of *Hevea* latex separated by ultracentrifugation. **Journal of Rubber Research of Institute of Malaysia**; 28(2):77-85.

THANKAMMA (2003) *L. hevea* latex as wound healer and pain killer. **Curr Sci**; 84:971-972

VAN, D.S.J.H; BULLER, H.R.; TEN, C.J.W.; AARDEN, L.A.; HACK, C.E.; STURK, A. (1990) Experimental endotoxemia in humans: Analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic and complement pathways. **Blood**; 76:2520-2527.

WALKER, I.D.; DAVIDSON J.F.; THOMSON J.M. (1985) Blood coagulation and hemostasis, **Churchill Livingstone**; 208-263.

WANG, H.; XU, T.; LEWIN, M. R. (2009) Future possibilities for the treatment of septic shock with herbal components. **The American Journal of Emergency Medicine**; 27(1):107-112.

WATT, J.M.; BREYER-BRANDWIJK, M.G. (1962) The medicinal and poisonous plants of Southern and Eastern Africa. 2nd ed. Edinburgh: E&S Livingtone. 127 p.

WILCOX, J.N.; SMITH, K.M.; SCHWARTZ, S.M.; SCHWARTZ, S.M.; GORDON, D. (1989) Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. **Proc Natl Acad Sci USA**; 86:2839-2843.

WISNIEWSKI, A. (1983) *Látex e borracha*. Belém: Faculdade de Ciências Agrárias do Pará;171 p.

XAVIER-FILHO, J.; CAMPOS, F.A.P. (1989) Proteinase inhibitors. *In*: CHEEK, P.R. *Toxicants of plant origin*. **Boca Raton: CRC Press**; 3:1-27.