GABRIEL PINNA FELICIANO

**INOVAÇÃO NO PROCESSO DE FRACIONAMENTO DE
PLASMA HUMANO ATRAVÉS DO USO DE CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA DE PSEUDOAFINIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Anita Mitico Tanaka-Azevedo.

Co-Orientadora: Dra. Elisabeth Cheng.

Versão original

São Paulo
2016

RESUMO

FELICIANO, G. P. **Inovação no processo de fracionamento de plasma humano através do uso de cromatografia líquida de pseudoafinidade.** 2016. 88 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Neste trabalho mostramos que o método de purificação proposto, empregando coluna de troca aniônica e uma lavagem com CaCl_2 (cromatografia com eluição por pseudoafinidade) entre lavagens com NaCl (troca aniônica convencional) pode ser usado para a purificação de fatores de coagulação com sucesso. Esta estratégia permite obter os concentrados dos fatores de coagulação dependentes de vitamina K e do fator VIII de coagulação (FVIII) em apenas uma etapa cromatográfica. Testamos quatro resinas de troca aniônica (ANX Sepharose FF e Q Sepharose FF, coluna monolítica QA e membrana Sartobind Q) e três tampões (citrato, 2-(N-morfolino) etanosulfonato (MES) e bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metano (Bis-Tris)). A coluna ANX Sepharose FF e o tampão citrato apresentaram o melhor perfil de separação das proteínas. Elaboramos um protocolo no qual as proteínas dependentes de vitamina K eluem com CaCl_2 25 mM e o FVIII com NaCl 500mM. A recuperação de atividade de FII e FIX foi praticamente total e da Proteína C foi de 55%. A recuperação de FVIII foi de aproximadamente 60% e o fator de purificação de 220 vezes. Na fração contendo as proteínas dependentes de vitamina K, foram identificadas por espectrometria de massas a presença de Fibrinogênio, complemento C4 e C4b Binding Protein. A análise em gel de poliacrilamida mostrou que a presença destas proteínas não era dependente da concentração de CaCl_2 . Este resultado, o fato de estas proteínas serem de alta massa molecular (> 200 kDa) e estarem presentes no plasma em altas concentrações, especialmente o fibrinogênio (3 g/L), indicam que a sua presença na fração das proteínas dependentes de vitamina K se deve à difusão lenta através da resina e não à variação da concentração de CaCl_2 . Mais de 99% das proteínas do plasma não são adsorvidas na coluna, incluindo albumina e IgG, podendo ser purificadas em etapas posteriores.

Palavras-chave: FVIII. FIX. Proteínas dependentes de vitamina K. Cromatografia líquida. Pseudoafinidade. Troca aniônica.

ABSTRACT

FELICIANO, G. P. **Innovation in human plasma fractionation process using liquid pseudo-affinity chromatography.** 2016. 88 p. Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

In this study we showed that the proposed purification method, employing an anion exchange column and a wash with CaCl_2 (pseudoaffinity chromatography) and washes with NaCl (traditional anion exchange chromatography) can be successfully used for the purification of coagulation factors. This strategy allows us to obtain concentrates of vitamin K dependent and factor VIII (FVIII) coagulation factors in a single chromatographic step. We tested four anion exchange resins (ANX Sepharose FF, Q Sepharose FF, QA monolithic column and Sartobind Q membrane) and three buffers (citrate, 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) and bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methane (Bis-Tris). The ANX Sepharose FF column and the citrate buffer showed better protein separation profile. We designed a protocol in which vitamin K dependent proteins elute with 25 mM CaCl_2 and FVIII elute with 500 mM NaCl chloride. Factor II (FII) and factor IX (FIX) activity recovery was almost total and Protein C was 55%. FVIII activity recovery was approximately 60% and purification factor of 220 times. In the fraction containing vitamin K dependent proteins, it was identified through mass spectrometry analysis presence of Fibrinogen, complement C4 and C4b Binding Protein. Analysis by SDS-PAGE showed that the presence of these proteins wasn't calcium chloride concentration dependent. This result and the fact that they are high molecular mass proteins (>200 kDa) and are present in plasma at high concentrations, especially Fibrinogen (3 g/mL), indicate that their presence on vitamin K dependent proteins fraction was due to slowly diffusion through the resin and not by calcium chloride elution. More than 99% of the plasma proteins are not adsorbed in the column, including albumin and IgG and can be purified in following chromatographic steps.

Keywords: FVIII. FIX. Vitamin K dependent proteins. Liquid Chromatography. Pseudo-affinity. Anion-exchange.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hemoderivados

Os hemoderivados são produzidos a partir do fracionamento do sangue com a separação das células sanguíneas e plasma. O plasma humano contém proteínas que são uma importante classe de medicamentos, utilizados na prevenção e tratamento de diversos distúrbios desde traumas, infecções, doenças, desordens imunológicas e deficiências congênitas (BURNOUNF, 2007).

Atualmente mais de 20 tipos diferentes de proteínas plasmáticas são utilizadas no tratamento de doenças letais ou problemas associados a sangramentos e distúrbios trombóticos, sendo as principais a albumina, imunoglobulinas e fatores da coagulação. O processo de isolamento das proteínas utilizadas na terapêutica é conhecido como fracionamento de plasma. Cerca de 35 milhões de litros de plasma são fracionados anualmente no mundo todo. A maior parte dos produtos obtidos do fracionamento de plasma é consumida pelos países desenvolvidos, sendo que uma pequena parte é utilizada pelos países em desenvolvimento (BURNOUNF, 2007; BURNOUNF; SEGHAATCHIAN, 2014).

O Brasil neste contexto importa uma série de produtos hemoderivados, entre eles os fatores VIII (FVIII) e fator IX (FIX) da coagulação, complexo protrombínico (CP), albumina e imunoglobulinas (FARRUGIA et al., 2009).

A quantidade de sangue coletado no país, proveniente de doação, chega ao redor de quatro milhões de bolsas por ano, cerca de 500 mil litros de plasma poderiam ser enviados para a produção de hemoderivados (FARRUGIA et al., 2009). Estes dados mostram a importância da produção de hemoderivados no âmbito nacional e internacional, em especial os fatores da coagulação por serem medicamentos de alto valor agregado.

1.2 Mecanismos da coagulação sanguínea

A coagulação sanguínea é um mecanismo de defesa complexo capaz de manter a integridade do sistema circulatório após injúrias aos vasos sanguíneos. O modelo de funcionamento foi proposto na década de 60 em forma de cascata onde cada fator ativa o próximo até formação de trombina (FURIE; FURIE, 1988; HOFFMAN; MONROE, 2007).

O modelo mais aceito atualmente é o modelo celular. Este leva em conta a participação das células na cascata de coagulação e é dividido em três etapas: iniciação, amplificação e progapação (Figura 1).

A etapa de iniciação depende do FT (Figura 1A). Este não é expresso em células circulantes, o que previne a iniciação da coagulação quando o endotélio está saudável. Os monócitos são algumas das células circulantes que expressam o FT, no entanto acredita-se que este FT se encontra em uma forma inativa (SMITH, 2009).

Após a ocorrência de dano tecidual o FT atua como receptor e cofator do FVII ativando-o, o FVIIa se liga ao FT exposto formando um complexo FVIIa/FT (complexo tenase extrínseco). Este complexo catalisa a ativação de FX e FIX (HOFFMAN; MONROE, 2007). O FXa gerado ativa pequenas quantidades de fator V (FV), o fator V ativo (FVa) então se liga ao FXa gerado formando o complexo protrombinase, que subsequentemente cliva moléculas de protrombina em trombina. Qualquer FXa que se dissocie da superfície da membrana é inativado por antitrombina (AT) e TFPI (Tissue factor pathway inhibitor) o FIXa gerado pode se dissociar da membrana e se mover para a superfície de plaquetas ou outras células. A pouca quantidade de trombina gerada é incapaz de gerar fibrina, uma vez que o FXa dissociado foi inativado (SMITH, 2009).

Na etapa de amplificação (Figura 1B) as plaquetas que se ligam ao colágeno ou pela ação do fator de von Willebrand (FvW) são ativadas parcialmente (HOFFMAN; MONROE, 2007). A pequena quantidade de trombina gerada na fase de iniciação ativa as plaquetas que se encontram no local da injúria. A ligação da trombina com os receptores de membrana plaquetários causam grandes mudanças na superfície, resultando em uma membrana com atividade pró-coagulante, mudanças na forma e

liberação de grânulos. Estes grânulos possuem substâncias com atividade pró-coagulantes e de ativação de plaquetas, que recrutam novas plaquetas para o local. A trombina gerada ainda cliva o fator XI (FXI) em fator XI ativado (FXIa), ativa o FV na superfície plaquetária e quebra a ligação entre o FvW e FVIII. Por fim ativa o FVIII liberado em FVIIIa (SMITH, 2009).

Na propagação (Figura 1C), a expressão de ligantes na superfície plaquetária resulta em interações entre plaquetas que gera o fenômeno da agregação plaquetária. O FIXa formado na iniciação se liga ao FVIIIa gerado na amplificação na superfície das plaquetas, assim se forma o complexo tenase intrínseco (FIXa-FVIIIa) que rapidamente começa a formar FXa na superfície das plaquetas. Este FXa que se forma na superfície plaquetária se liga ao FVa formado na amplificação e este complexo então transforma a protrombina em trombina. Uma grande quantidade de trombina é formada nesta fase e quando grandes porções de trombina clivam o fibrinogênio e formam-se monômeros de fibrina em altas concentrações. A trombina também é responsável por ativar o fator XIII, este se liga de forma cruzada a fibrina à fibronectina e esta ao colágeno, esses monômeros de fibrina solúvel então se polimerizam espontaneamente em redes de fibrina insolúvel que em conjunto com as plaquetas agregadas formam o coágulo (SMITH, 2009).

Figura 1 – Modelo celular da coagulação sanguínea.

(A) Iniciação. (B) Amplificação. (C) Propagação. (SMITH, 2009).

O sistema fibrinolítico atua quando o coágulo precisa ser dissolvido. Seu efetor é a plasmina que cliva a fibrina em partes solúveis. A plasmina reconhece resíduos de arginina e lisina, clivando a fibrina em fragmentos menores, que resultam na dissolução do coágulo. O processo de fibrinólise é essencial na cura de danos tecidual e na

remoção de coágulos intravasculares que poderiam gerar trombooses (HOFFMAN; MONROE, 2007).

1.2.1 Complexo protrombínico

Pertence à família das proteínas dependentes de vitamina K os fatores de coagulação II (protrombina), VII, IX, X, com atividade pró-coagulante e Proteína C, Proteína S e Proteína Z, que apresentam atividade anticoagulante. Estas proteínas formam o complexo protrombínico e possuem grande importância biotecnológica, uma vez que praticamente todos tem aplicação clínica (Tabela 1) (HANSSON; STENFLO, 2005; SIERKO et al., 2014).

O complexo protrombínico concentrado também pode ser utilizado no tratamento de reposição de qualquer um dos fatores presentes no complexo, sendo a aplicação principal o tratamento da hemofilia B (JOSIC; HOFFER; BUCHACHER, 2003). Tanto no tratamento da hemofilia A quanto na hemofilia B é possível utilizar o complexo protrombínico parcialmente ativado, quando a utilização de concentrados de FVIII ou FIX perde sua eficácia devido à formação de inibidores (anticorpos) contra estas proteínas (GASO-SOKAC et al., 2011).

Tabela 1 – Aplicação das proteínas dependentes de vitamina K em seu uso terapêutico.

Proteína dependente de vitamina K	Aplicação
Fator IX	Hemofilia B ^a
Fator II ativado (trombina)	Cola de fibrina ^a
Fator VII ativado	Hemofilia A e B com inibidores ^a
Proteína C	Tratamento de reposição ^b
Complexo protrombínico	Tratamento de reposição ^c
Complexo protrombínico parcialmente ativado	Hemofilia A e B com inibidores ^c

^a(GASO-SOKAC et al., 2011)

^b(BURNOUNF, 2007)

^c(JOSIC; HOFFER; BUCHACHER, 2003)

As proteínas dependentes de vitamina K tem tamanho entre 50 kDa e 72 kDa (GREENBERG; DAVIE, 1995) e pI entre 4,5 e 5,0 (HOFFER; SCHWINN; JOSIĆ, 1999; TRIPISCIANO et al., 2012). Na extremidade N-terminal, possuem uma região com 9 a

12 resíduos de ácido γ - carboxiglutâmico, denominado domínio GLA, seguido por domínio semelhante ao fator de crescimento epidérmico (EGF-like) e um domínio catalítico na extremidade C-terminal (Figura 2). A protrombina possui dois domínios denominados “kringles” ao invés de domínios EGF-like. A Proteína S atua como cofator da Proteína C ativada para a inativação de FVa e FVIIIa. Ao invés do sítio catalítico, a Proteína S possui dois domínios semelhantes à laminina G (laminin G-like) em sequência (HANSSON; STENFLO, 2005). A Proteína Z, embora possua um sítio de serina protease, não tem função catalítica, ela atua como cofator do inibidor de protease dependente de proteína Z para inibir o FXa (SIERKO et al., 2014).

Figura 2 – Estrutura das proteínas dependentes de vitamina K que fazem parte do complexo protrombínico humano. (HANSSON; STENFLO, 2005).

FVII: Fator VII. FIX: Fator IX. FX: Fator X. PT: Protrombina (FII). PC: Proteína C. PZ: Proteína Z e PS: Proteína S.

Em todos os domínios podem ser encontrados sítios de Ca^{2+} , mas são os sítios do domínio Gla que, após a ligação deste metal, induzem a aproximação das proteínas

às membranas. A formação de complexos entre as carboxilas dos ácidos γ -glutâmicos com os íons Ca^{2+} expõe as cadeias laterais de resíduos hidrofóbicos, favorecendo a interação com os fosfolípídeos presentes na superfície das membranas onde são formados os complexos catalíticos, que levam à ativação sequencial dos fatores de coagulação. A ligação de um cálcio ao primeiro domínio EGF-like é requerido para o alinhamento correto do domínio Gla e entre os domínios EGF-like (HANSSON; STENFLO, 2005; SUNNERHAGEN et al., 1996).

1.2.2 FVIII

O FVIII é uma glicoproteína essencial para o processo de coagulação. Circula na corrente sanguínea complexado com o fator de von Willebrand, que atua como transportador (MORI et al., 2008) e impede a degradação de FVIII pela ação de serina-proteases, entre elas a Proteína Ca e o FXa (TAKEYAMA et al., 2009).

O FVIII é constituído por 2332 aminoácidos e possui massa molecular de 300 kDa, codificado por um dos maiores genes conhecidos localizado no cromossomo X e composto por 26 exons e 186 kb. Sua concentração plasmática é de 150 ng/mL (NAIR; SHETTY; GHOSH, 2014; TAKEYAMA et al., 2009). O FVIII é sintetizado na forma de uma molécula de cadeia única com seis domínios (A1-A2-B-A3-C1-C2), entre os domínios A existem espaçadores (α_1 , α_2 , α_3), que contêm regiões ricas em resíduos de Asp e Glu. Após sua síntese, a molécula passa por mudanças pós-traducionais, incluindo glicosilações e sulfatações nos resíduos de Tyr nos espaçadores dos domínios A (Figura 3). Após a liberação na circulação sanguínea, a molécula sofre uma clivagem entre os domínios B e A3 originando duas cadeias, a pesada (A1- α_1 -A2- α_2 -B) e a leve (α_3 -A3-C1-C2), ligadas não covalentemente pelo íon Ca^{2+} , através dos domínios A1 e A3. Sua ativação é feita através da clivagem pela trombina em um trímero constituído pelas subunidades A1, A2 e A3-C1-C2. Na circulação o fator VIII é estabilizado pela ligação com o fator de von Willebrand, que se liga através do domínio A3 (Figura 4) (LENTING; CHRISTOPHE; GUÉGUEN, 2010; TAKEYAMA et al., 2009).

1.3 Fracionamento de plasma pelo método de Cohn

Atualmente quase a totalidade das plantas de purificação de hemoderivados utilizam o método de Cohn modificado, que consiste de precipitações sucessivas com aumento da concentração de etanol, em diferentes unidades de pH e em câmara fria, seguido de etapas cromatográficas utilizadas para obtenção de produtos com alto grau de pureza (Figura 5). Este processo torna o fracionamento do plasma um processo altamente custoso, devido principalmente à necessidade de plantas de fabricação com câmaras frias para o descongelamento entre 4-6 °C de grande volume de plasma antes das etapas cromatográficas.

Figura 3 – Estrutura do fator VIII da coagulação humano. (LENTING; CHRISTOPHE; GUÉGUEN, 2010).

Estrutura de fator VIII e seus domínios A1-A2-B-A3-C1-C2 com os espaçadores a1, a2, a3.

A primeira fração separada é o crioprecipitado (Fração A), capaz de fornecer concentrados de FVIII, fator de von Willebrand e fibrinogênio. O sobrenadante do crioprecipitado é chamado de fração criopobre (Fração B).

Após a separação do crioprecipitado, por centrifugação ou filtração, a captura dos fatores de coagulação, tanto do FVIII, que estava no crioprecipitado, como das proteínas do complexo protrombínico, que permaneceram na fração criopobre (Fração C), é realizada em coluna de troca aniônica. Estes fatores de coagulação ligam-se fortemente a estas colunas, podendo ser recuperadas com altos rendimentos.

Dando sequência ao fracionamento, podem ser produzidas a partir do criopobre diversas proteínas, entre elas a albumina e o IgG (BURNOUNF, 2007).

Figura 4 – Ativação e inativação do fator VIII da coagulação humano. (LENTING; CHRISTOPHE; GUÉGUEN, 2010).

Esquema da ativação e inativação do fator VIII.

1.4 Cromatografia

Na cromatografia de troca iônica, a fase estacionária é altamente carregada e solutos contendo carga oposta são seletivamente adsorvidos. Os solutos adsorvidos podem ser então eluídos por deslocamentos com outros íons, com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária. Alternativamente as proteínas podem ser desligadas da coluna através da variação do pH, pois a protonação e desprotonação dos grupos ionizáveis depende do pH. A designação troca iônica forte ou fraca das resinas referem-se à extensão na qual o estado de ionização dos grupos funcionais variam com o pH (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Os trocadores iônicos fortes não apresentam variação da capacidade com variações de

pH, enquanto trocadores iônicos fracos podem ganhar ou perder prótons com alteração do pH, variando sua capacidade. Esses termos não se referem à intensidade com que os grupos funcionais se ligam às proteínas (GE HEALTHCARE, 2004). Na prática, os trocadores fortes e fracos podem apresentar diferença na seletividade, que modifica o perfil de separação das proteínas da amostra analisada.

Figura 5 – Exemplo de planta de fracionamento de plasma com uso do método de Cohn e cromatografia líquida.

O fracionamento inicia-se pela separação do crioprecipitado (A), com obtenção de FVIII, FvW e Fibrinogênio. A partir do criopobre (B) são separadas a alfa-1-antitripsina, albumina, IgG e complexo protrombínico (C). As flechas azuis mostram as etapas de purificação em colunas de troca aniônica para captura do FVIII e do complexo protrombínico (BURNOUF, 2007).

No processo de fracionamento de plasma, colunas de troca aniônica são amplamente utilizadas, devido à sua alta capacidade, bons rendimentos e baixo custo,

em comparação com outras técnicas cromatográficas. A Q Sepharose FF é uma resina troca aniônica forte ao passo que as resinas DEAE e ANX Sepharose FF são de troca iônica fraca. A resina ANX possui menor concentração de agarose na matriz (4%) do que as resinas DEAE e Q (6%), o que na prática significa uma diferença no tamanho da malha no interior da resina. Por apresentar poros maiores, aumentaria o acesso das proteínas de alta massa molecular aos grupos carregados da resina, favorecendo a purificação do complexo FVIII/FvW. Além das resinas convencionais formadas por “beads”, existem outros tipos de matrizes, como as fibras ocas, as membranas e os monolitos, que apresentam algumas vantagens sobre os beads. Estes empregam fluxo radial ao invés de axial, que possibilitam o uso de fluxos bem maiores da fase móvel, devido à menor resistência. Além disso, o acesso aos grupos trocadores não depende de difusão, o que favorece a purificação de proteínas de alta massa molecular, como o fator FVIII. A desvantagem é que tem um menor número de grupos trocadores ligados à resina, o que diminui a capacidade de ligação de moléculas da amostra analisada (BRGLES et al., 2011).

A cromatografia de afinidade convencional envolve a imobilização de um ligante para o qual a proteína de interesse apresenta afinidade (BURNOUNF; RADOSEVICH, 2001). A cromatografia de troca iônica com eluição por pseudoafinidade difere da cromatografia de afinidade, pois não há o ligante imobilizado na matriz para o qual a proteína de interesse apresenta afinidade, esta matriz pode ser uma resina convencional de troca iônica ou interação hidrofóbica (YAN, 1996).

Ao se ligarem ao íon Ca^{2+} as proteínas dependentes de vitamina K sofrem uma mudança conformacional, que acarretará em uma diminuição das cargas negativas expostas, modificando sua afinidade pela resina, desligando-as da coluna com menor força iônica. Com base neste conceito, encontram-se descritos na literatura a purificação dos fatores de coagulação II (rFII), IX (rFIX), Proteína C (rPC) e Proteína S (rPS) recombinantes a partir de seus meios de cultura (FISCHER; MITTERER; DORNER, 1995; YAN, 1996; RIBEIRO et al., 2013).

Sabendo-se: 1) As proteínas dependentes de vitamina K e o FVIII tem alta afinidade por resinas de troca aniônica e por esta razão são empregadas na etapa de captura destas proteínas (Figuras 5 e 6). As proteínas dependentes de vitamina K

sofrem uma mudança conformacional na presença de Ca^{2+} , que modificam sua afinidade à coluna de troca aniônica, apresentamos neste trabalho os resultados empregando uma nova estratégia de purificação em resina de troca aniônica em que eluição das proteínas é realizada através de gradiente de NaCl (troca aniônica convencional) e de gradiente de cálcio (pseudoafinidade) (Figura 7).

Figura 6 – Captura do FVIII por crioprecipitação.

Esquema simplificado das etapas de captura do FVIII e das proteínas dependentes de vitamina K nos processos de fracionamento de plasma empregando o método de Cohn.

Figura 7– Processo de captura cromatográfico.

Nova estratégia de purificação empregando eluições com gradiente de sal (cromatografia convencional) e gradiente de cálcio (cromatografia de pseudoafinidade). Proteínas não adsorvidas são recolhidas no “flowthrough”, incluindo albumina e IgG. Empregando gradiente de CaCl_2 a fração contendo o complexo protrombínico é eluída. Finalmente, empregando gradiente de NaCl, a fração contendo o FVIII é eluída.

6 CONCLUSÕES

- A coluna monolítica e membrana não podem ser usadas para esta purificação porque entopem com a aplicação de plasma.
- A coluna ANX Sepharose FF foi escolhida para o estudo do tampão porque apresentou melhor separação dos fatores de coagulação dependentes de vitamina K e FVIII do que a coluna Q Sepharose FF.
- Os tampões MES e Bis-Tris não foram eficientes para eluir o FIX da coluna, enquanto o citrato foi, nas mesmas condições experimentais.
- As proteínas contaminantes (C4bBP, Complemento C4 e Fibrinogênio) na fração CaCl_2 25 mM não são eluídas pela pseudoafinidade com íons Ca^{2+} .
- O método de purificação estudado, empregando coluna ANX Sepharose FF, alternando eluições com NaCl e CaCl_2 , mostrou-se eficiente para a obtenção das frações de FVIII e de proteínas dependentes de vitamina K.

REFERÊNCIAS*

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, May 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> >.

BRIGLES, M.; CLIFTON, J.; WALSH, R.; HUANG, F.; RUCEVIC, M.; CAO, L.; HIXSON, D.; MULLER, E.; JOSIC, D. Selectivity of monolithic supports under overloading conditions and their use for separation of human plasma and isolation of low abundance proteins. **J. Chromatogr. A.**, v. 1218, n. 17, p. 2389-2395, Apr 2011. ISSN 1873-3778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21186030> >.

BURNOUF, T. Modern plasma fractionation. **Transfus. Med. Rev.**, v. 21, n. 2, p. 101-117, Apr 2007. ISSN 0887-7963. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17397761> >.

BURNOUF, T.; RADOSEVICH, M. Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins for therapeutic use. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 49, n. 1-3, p. 575-586, Oct 2001. ISSN 0165-022X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11694303> >.

BURNOUF, T.; SEGATCHIAN, J. "Go no Go" in plasma fractionation in the world's emerging economies: Still a question asked 70 years after the COHN process was developed! **Transf. and Apher. in Sci.**, v. 51, p. 6, 2014.

CHENG, E.; JINZENJI, D.; LORTHIOIS, A. P.; DE CARVALHO, R. R.; TANAKA-AZEVEDO, A. M.; RAW, I.; MARTINS, E. A. Purification of coagulation factor VIII using chromatographic methods. Direct chromatography of plasma in anion exchange resins. **Biotechnol. Lett.**, v. 32, n. 9, p. 1207-1214, Sep 2010. ISSN 1573-6776. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20431912> >.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 452 p.

FARRUGIA, A.; EVERS, T.; FALCOU, P. F.; BURNOUF, T.; AMORIM, L.; THOMAS, S. Plasma fractionation issues. **Biologicals**, v. 37, n. 2, p. 88-93, Apr 2009. ISSN 1095-8320. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19289290> >.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

FISCHER, B.; MITTERER, A.; DORNER, F. Purification of recombinant human coagulation factors II and IX and protein S expressed in recombinant Vaccinia virus-infected Vero cells. **J. Biotechnol.**, v. 38, n. 2, p. 129-136, Jan 1995. ISSN 0168-1656. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7765805> >.

FRANCO, R. F. **Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise.** In: SIMPÓSIO: HEMOSTASIA E TROMBOSE. Ribeirão Preto, SP:FMRB, 2001. res. 34 p. 229-237.

FURIE, B.; FURIE, B. C. The molecular basis of blood coagulation. **Cell**, v. 53, n. 4, p. 505-518, May 1988. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3286010> >.

GASO-SOKAC, D.; KOVAC, S.; CLIFTON, J.; JOSIC, D. Therapeutic plasma proteins--application of proteomics in process optimization, validation, and analysis of the final product. **Electrophoresis**, v. 32, n. 10, p. 1104-1117, May 2011. ISSN 1522-2683. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21544836> >.

GREENBERG, D. L.; DAVIE, E. W. **The online metabolic and molecular bases of inherited disease: Introduction to hemostasis and vitamin K dependent coagulation factors.** New York: Medical, M.-H. Scriver's OMMDIB 1995.

HANSSON, K.; STENFLO, J. Post-translational modifications in proteins involved in blood coagulation. **J. Thromb. Haemost.**, v. 3, n. 12, p. 2633-2648, Dec 2005. ISSN 1538-7933. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16129023> >.

HEALTHCARE, GE. **Protein Separation's Handbook Collection: Ion exchange chromatography.** Sweden, 2004. 170 p.

HOFFER, L.; SCHWINN, H.; JOSIĆ, D. Production of highly purified clotting factor IX by a combination of different chromatographic methods. **J. Chromatogr. A.**, v. 844, n. 1-2, p. 119-128, Jun 1999. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10399328> >.

HOFFMAN, M.; MONROE, D. M. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. **Hematol. Oncol. Clin. North. Am.**, v. 21, n. 1, p. 1-11, Feb 2007. ISSN 0889-8588. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17258114> >.

IWASHITA, C. **Novas estratégias de purificação dos fatores de coagulação fator VIII e Proteína C a partir de plasma humano empregando cromatografia líquida.** 2012. 142 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

JOSIC, D.; HOFFER, L.; BUCHACHER, A. Preparation of vitamin K-dependent proteins, such as clotting factors II, VII, IX and X and clotting inhibitor protein C. **J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed Life Sci.**, v. 790, n. 1-2, p. 183-197, Jun 2003. ISSN 1570-0232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12767331> >.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug 1970. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063> >.

LENTING, P. J.; CHRISTOPHE, O. D.; GUÉGUEN, P. The disappearing act of factor VIII. **Haemophilia**, v. 16, n. 102, p. 6-15, May 2010. ISSN 1365-2516. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18771423> >.

MORI, F.; NARDINI, I.; ROSSI, P.; NARDINI, C.; FARINA, C. Progress in large-scale purification of factor VIII/von Willebrand factor concentrates using ion-exchange chromatography. **Vox. Sang.**, v. 95, n. 4, p. 298-307, Nov 2008. ISSN 1423-0410. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19138259> >.

NAIR, P. S.; SHETTY, S.; GHOSH, K. Factor VIII Antigen, Activity, and Mutations in Hemophilia A. **Clin. Appl. Thromb. Hemost.**, Dec 2014. ISSN 1938-2723. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25550078> >.

NAKAO, V. W.; VERINAUD, C. I.; FELICIANO, G. P.; LUIZ, A. C.; RAW, I.; MARTINS, E. A. L.; CHENG, E. Purification of prothrombin complex proteins from human plasma in anion exchange resin using pseudoaffinity chromatography. **BMC Proceedings**, v. 8, p. 23, 2014.

RIBEIRO, D. A.; PASSOS, D. F.; FERRAZ, H. C.; CASTILHO, L. R. Anion-exchange purification of recombinant factor IX from cell culture supernatant using different chromatography supports. **J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed Life Sci.**, v. 938, p. 111-118, Nov 2013. ISSN 1873-376X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24076525> >.

RODRIGUES, E. S.; VERINAUD, C. I.; OLIVEIRA, D. S.; RAW, I. LOPES, A. P.; MARTINS, E. A.; CHENG, E. Purification of coagulation factor VIII by immobilized metal affinity chromatography. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, Jul 2014. ISSN 1470-8744. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25082654> >.

SCHALLER, J.; GERBER, S.; KAEMPFER, U.; LEJON, S; TRACHSEL, C. **Human Blood Plasma Proteins: Structure and Function**. Marshall: Wiley publisher. 2008. 526 p.

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Anal. Chem.**, v. 68, n. 5, p. 850-858, Mar 1996. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8779443> >.

SIERKO, E.; WOJTUKIEWICZ, M. Z.; ZIMNOCH, L.; TOKAJUK, P.; OSTROWSKA-CICHOCKA, K.; KISIEL, W. Protein Z/protein Z-dependent protease inhibitor system in loco in human gastric cancer. **Ann. Hematol.**, v. 93, n. 5, p. 779-784, May 2014. ISSN 1432-0584. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24158387> >.

SMITH, S. A. The cell-based model of coagulation. **J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio)**, v. 19, n. 1, p. 3-10, Feb 2009. ISSN 1476-4431. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19691581> >.

SUNNERHAGEN, M.; DRAKENBERG, T.; FORSEN, S.; STENFLO, J. Effect of Ca²⁺ on the structure of vitamin K-dependent coagulation factors. **Haemostasis**, v. 26 Suppl 1, p. 45-53, 1996. ISSN 0301-0147. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8904173> >.

TAKEYAMA, M.; NOGAMI, K.; OKUDA, M.; SHIMA, M. von Willebrand factor protects the Ca²⁺-dependent structure of the factor VIII light chain. **Br. J. Haematol.**, v. 146, n. 5, p. 531-537, Sep 2009. ISSN 1365-2141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19594746> >.

TRIPISCIANO, C.; LEISTNER, A.; LINSBERGER, I.; LEISTNER, A.; FALKENHAGEN, D.; WEBER, V. Effect of anticoagulation with citrate versus heparin on the adsorption of coagulation factors to blood purification resins with different charge. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 2, p. 484-488, Feb 2012. ISSN 1526-4602. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22229537> >.

YAN, S. B. Review of conformation-specific affinity purification methods for plasma vitamin K-dependent proteins. **J. Mol. Recognit.**, v. 9, n. 3, p. 211-218, 1996 May-Jun 1996. ISSN 0952-3499. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8938593> >.