



Universidade Federal de Pernambuco

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Nível Mestrado

**HEPARINIZAÇÃO DE MEMBRANAS POLISSACARÍDICAS PRODUZIDAS POR
Zoogloea sp. E SEU USO NA PURIFICAÇÃO DA ANTITROMBINA**

Amanda Teixeira de Melo

Recife

2012

Amanda Teixeira de Melo

Heparinização de membranas polissacarídicas produzidas por *Zoogloea sp.* e seu uso na purificação da antitrombina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Biotecnologia

Linha de pesquisa: Biomateriais

Orientador: Profº Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior.

Recife

2012

**Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788**

M528h

Melo, Amanda Teixeira de

Heparinização de membranas polissacarídicas produzidas por *Zoogloea sp.* e seu uso na purificação da antitrombina / Amanda Teixeira de Melo. – Recife: O Autor, 2012.

53 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2012.

Inclui bibliografia

- 1. Polissacarídeos 2. Bactérias anaeróbicas 3. Fermentação I. Carvalho Júnior, Luiz Bezerra (orientador) II. Título.**

572.566

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-145

FOLHA DE APROVAÇÃO

Amanda Teixeira de Melo

Heparinização de membranas polissacarídicas produzidas por *Zoogloea sp* e seu uso na purificação da antitrombina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

Orientador

Profº Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior
Universidade Federal de Pernambuco
Lab. De Immunopatologia Keizo Asami

Examinador

Profº Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão
Universidade Federal de Pernambuco

Examinador

Profº Dr. Givanildo Bezerra de Oliveira
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Recife, 27 de fevereiro de 2012

Dedico este trabalho à minha
incrível família.

Agradecimentos

- Ao professor Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, meu orientador, por me abrir as portas para o maravilhoso mundo da ciência.
- Ao Dr. Lamartine Aguiar, por querer aperfeiçoar as propriedades da membrana produzida por *Zoogloea sp.* que contribuiu para que esse trabalho existisse.
- À Roziana Jordão, minha primeira orientadora, quem me ensinou que a ciência é muito divertida mesmo quando os resultados experimentais não são aqueles que esperamos.
- Ao professor Dr. Benício de Barros Neto, (*In memoriam*) o breve período que passei em sua companhia foram inspiradores, aulas impecáveis e incrível paciência em nossas reuniões fizeram que amasse trabalhar com desenho experimental.
- Ao meu grupo de trabalho, IMOBIO/LIKA, que criaram um ambiente de trabalho excelente para desenvolver a ciência, com um ótimo grupo de discussão proporcionando uma rica troca de informações me permitindo crescer profissionalmente. Muito obrigada a Mariana Cabrera, Luiza Rayanna de Lima, Sinara Almeida, Renata Vieira, Marília Sales, Rosemary Moura, Ricardo Souza, Camila Galvão, Larissa Barros, Lúcia Patrícia, Aurenice Dutra, Jackeline Maciel, Matheus Figueira, Caio Dias.
- Às amigas de graduação quem nem o tempo e distância conseguem separar Elisângela de Jesus, Bruna Mazulo, Raíssa Wanderley, Taciana Higino, Klécia Melo e Luíza Rayanna de Lima.
- Aos técnicos e aos outros setores do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami pelo apoio imprescindível para que essa dissertação ficasse pronta no tempo certo.
- Aos professores e colegas do mestrado quanto de doutorado do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

"A ciência se compõe de erros que, por sua vez, são os passos até a verdade."

Júlio Verne

Resumo

Este trabalho teve como objetivo imobilizar heparina ao suporte de exopolissacarídeo celulósico (SEC), proveniente da fermentação do melaço da cana-de-açúcar pela bactéria *Zoogloea sp.*, e por técnicas separação purificar a antitrombina do plasma. O suporte foi funcionalizado através da oxidação parcial com periodato de sódio (NaIO_4) seguindo pela adição de polietilenoimina (PEI), que permitiu a ligação covalente com a heparina, posteriormente, a membrana foi reduzida com borohidreto de sódio (BH_4). Para obter as melhores condições experimentais de imobilização utilizou-se o desenho experimental fracionário ($\frac{1}{2} 2^{K-3}$) e um delineamento experimental do tipo DCCR (delineamento composto central rotacional) onde se analisou 8 variáveis independentes e suas interações: concentração e tempo de reação dos seguintes reagentes; NaIO_4 , PEI e BH_4 , como também tempo de imobilização e agitação que o sistema se manteve. O percentual de heparina fixada ao suporte e a atividade anticoagulante da heparina imobilizada foi estabelecida pelo ensaio de corante de Azul de Metileno e tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPa), respectivamente. O planejamento experimental aplicado foi satisfatório para determinar as condições ótimas de imobilização e a atividade antitrombótica do material. Enquanto a separação da antitrombina do plasma humano utilizou membranas heparinizadas com uma densidade de heparina variando entre $41,08 - 254,7 \mu\text{g cm}^{-2}$ como suporte de separação por afinidade e obteve-se uma quantidade de antitrombina purificada $473,249 \mu\text{g ml}^{-1}$ quando incubado o plasma concentrado e $47,80 \mu\text{g ml}^{-1}$ para plasma diluídos em salina, nos eluatos de 0,5 a 2,0 NaCl, foi quantificada pelo método de Lowry. Finalmente a presença da antitrombina foi confirmada pela SDS-PAGE e corando com prata.

Palavra-chave: exopolissacarídeo celulósico, desenho experimental, heparinização, cromatografia de afinidade, antitrombina.

Abstract

This study aimed to coat heparin on a cellulosic exopolysaccharide support (CES) produced from the fermentation of sugarcane molasses by *Zoogloea* sp using chromatographic techniques to purify the plasma antithrombin. The support was functionalized through a partially oxidation of the CES with sodium periodate (NaIO₄) followed by polyethyleneimine (PEI) that would allow covalent heparin and finally the membrane was reduced with sodium borohydrate (BH₄). To investigate the best experimental conditions of immobilization, a two-level fractional experimental design ($\frac{1}{2} 2^{K-3}$) and the response surface method based on the rotatable central composite design (RCCD) were used. It analyzed eight independent factors: concentration and reaction time NaIO₄, PEI and BH₄ as well as heparin immobilization time and stirring rate. The percentage of heparin immobilization and its anticoagulant activity were established employed methylene blue dye binding assay and the activated partial thromboplastin time (APTT), respectively. The experimental design was applied satisfactory to determine the optimal conditions of immobilization and good anticoagulant activity of the material verified by clotting assay in whole blood. The purification of antithrombin used heparinized membrane by support from affinity chromatography allow purify (473.249ugml⁻¹) of protein from eluate of 0.5 and 2.0 M NaCl, that was quantify by Lowry method. Finally the antithrombin presence was confirmed of SDS-PAGE analysis and stained with silver.

Key-words: cellulosic exopolysaccharide, experimental design, heparinization, affinity chromatography, antithrombin.

Lista de Ilustrações

	Página
Figura 1.1	7
Heparina formada pelos dissacarídeos; Ácido Glicurônico (A) e N-Acetil Glucosamina (B), e a região pentassacarídica (C) que ligará a antitrombina, por meio dos seus grupos funcionais sulfatados, hidroxilas e carboxílicos. Essa região é conhecida como DEFGH.	
Figura 1.2	8
A esquerda está a estrutura da antitrombina, em destaque a região de ligação à heparina, mostrada pelas sequencias; R129, R46, R47, R13, K11, K114, K125, localizadas em três sítios distintos da antitrombina hélice D, o loop que estende C- e N-terminal da proteína e a hélice A. Esta sequencia ligará ao pentassacarídeo (DEFGH) da heparina, mostrada na figura da direita.	
Figura 1.3	9
Mudanças conformacionais da antitrombina (serpina) pela presença do co-fator, heparina. Onde uma vez a heparina complexada a antitrombina induz ao Loop centro reativo (magenta) a se tornar mais acessível à ligação com a protease.	
Figura 1.4	10
Estrutura tridimensional da antitrombina, mostrando sua diferença conformacionais entre as formas nativa e latente.	
Figura 1.5	12
Membrana produzida pela Zoogloea sp. Em meio de melaço de cana-de-açúcar, de características celulósicas, por isso denominada de exopolissacarídeo celulósico.	
Figura 1.6	15
Esquema químico do processo de preparo da membrana de exopolissacarídeo celulósico e a imobilização com a heparina. Os reagentes utilizados para o preparo foram; periodato de sódio (NaIO_4), polietilenoimina (PEI) e borohidreto de sódio (BH_4). A	

direita da figura representa o processo de ativação do grupo carboxílico da heparina com carbodiimida (EDAC) e N-hidroxilsuccimida (NHS).

Figura 2.1	Gráfico PCA (quantidade de heparina imobilização em função de aTTP. Na direita estão os ensaios realizados pelo planejamento e a esquerda os efeitos das oitos variáveis em resposta as condições experimentais.	34
Figura 2.2	Gráficos de respostas de superfície em (a) concentração de periodato e de PEI, em (b) concentração de periodato e tempo de imobilização e em (c) concentração de PEI e tempo de imobilização.	37
Figura 3.1	Teste de coagulação de sangue total em membranas celulósicas (controle) e membranas heparinizada; antes de lavagem com tampão PBS pH 7,2 (direita) e depois de 5 lavagens.	49
Figura 3.2	SDS-PAGE (12,5% de acrilamida) para purificação de antitrombina plasmática com membranas heparinizada. Coluna 1-4 amostras foi diluída 10x com salina e Colunas 5-8 amostras não diluída. As bandas correspondentes a antitrombina (~58kDa).	50

Lista de Tabelas

		Página
Tabela 1.1	Tipos e estrutura dos Glicosaminoglicanos como também sua distribuição tecidual	6
Tabela 1.2	Lista de Grupos funcionais da heparina que podem ser utilizados para imobilização de um suporte	14
Tabela 2.1	Fatores de heparinização e desenho experimental fatorial fracionado $2^{(8-3)}$ usado para funcionalizar a membrana celulósica. ‘	33
Tabela 2.2	Valores das variáveis NaIO_4 , PEI e tempo de imobilização a diferentes níveis ($-\alpha$, -1, 0, 1 e α)	35
Tabela 2.3	Respostas medida e predita do delineamento de superfícies do composto central	36
Tabela 2.4	Análise de variância (ANOVA) em modelo quadrático	36

Lista de abreviaturas e siglas

Arg	Arginina
EDAC	1-etil-3-(dimetilaminopropil) carbodiimida
GAG	Glicosaminoglicanos
GlcA	Ácido Glicurônico
GlcNAc	N-Acetil Glicosamina
HBPM	Heparina de Baixo Peso Molecular
HNF	Heparina Não Fracionada
IdoA	Ácido Idurônico
LCR	Loop centro reativo
Lys	Lisina
NaBH ₄	Borohidreto de sódio
NaIO ₄	Periodato de sódio
NHS	N-hidroxisuccinimida
PBS	Tampão salina fosfato
PCA	Análise do composto central
PEI	Polietilenoimina
PSE	Polissacarídeo Extracelular
SEC	Suporte de exopolissacarídeo celulósico
Serpina	Inibidor de Serino Protease
TTPa	Tempo de tromboplastina parcialmente ativada

ÍNDICE

<u>1. INTRODUÇÃO</u>	<u>1</u>
<u>2. REVISÃO DA LITERATURA</u>	<u>4</u>
1.1 HEPARINA	5
2.2 ANTITROMBINA	8
2.3 EXOPOLISSACARÍDEO CELULÓSICO PRODUZIDO PELA ZOOGLOEA SP.	11
2.4 SÍTIOS DE IMOBILIZAÇÃO À HEPARINA	12
<u>3. JUSTIFICATIVA</u>	<u>16</u>
<u>4. OBJETIVOS</u>	<u>18</u>
2.5 GERAL	19
4.2. ESPECÍFICOS	19
<u>5. REFERÊNCIAS</u>	<u>20</u>
<u>6. ARTIGO 1</u>	<u>26</u>
ABSTRACT	28
1. INTRODUCTION	28
2. MATERIALS AND METHODS	30
2.1. MATERIALS	30
2.2. HEPARIN ACTIVATION	30
2.3. MEMBRANE TREATMENT WITH HEPARIN AND IMMOBILIZATION	30
2.4. <i>IN VITRO</i> ANTICOAGULANT ASSAY	30
¹ 2.5. HEPARIN QUANTIFICATION ASSAY	31

2.6. DESIGN OF EXPERIMENTS (DoE)	31
3. RESULTS	32
3.1.1. SCREENING OF VARIABLES	32
3.2. OPTIMIZATION	35
4. DISCUSSION	38
5. CONCLUSION	39
6. ACKNOWLEDGEMENTS	40
7. REFERENCES	40

7. ARTIGO 2	43
--------------------	-----------

ABSTRACT	45
1. INTRODUCTION	45
2. MATERIAL AND METHODS	47
2.1. MATERIALS	47
2.2. HEPARIN ACTIVATION	47
2.3. MEMBRANE TREATMENT AND IMMOBILIZATION WITH HEPARIN	47
2.4. IN VITRO ANTICOAGULANT ASSAY AND WHOLE BLOOD INCUBATION	47
2.5. HEPARIN QUANTIFICATION ASSAY	48
2.6 PLASMA SAMPLE	48
3. RESULTS AND DISCUSSION	48
4. CONCLUSION	50
5. ACKNOWLEDGEMENTS	50
6. REFERENCES	51

8. PERSPECTIVAS	53
------------------------	-----------

1.INTRODUÇÃO

A maioria das proteínas envolvidas nas vias de coagulação é constituída de enzimas proteolíticas, majoritariamente pertencentes à classe das serinoproteases denominada EC 3.4.21. Das 120 enzimas que fazem parte deste grupo, encontramos as envolvidas na cascata de coagulação; trombina, fator Xa, plasmina, fator VIIa, fator IXa, fator XIa, calicreína, fator XIIa, ativador de plasminogênio e proteína C. (BLOMBACK e ANTOVIC; 2010)

A família dos inibidores das serinoproteases, serpinas, estão amplamente distribuídas entre os seres vivos, desde bactérias termófilas (IRVING et al., 2002) a mamíferos (SILVERMAN et al., 2001). Um membro delas é a antitrombina, capaz de inibir a maior parte das serinoproteases da coagulação (OSLON e BJORKI; 1994) e mais recentemente descoberto seu papel antiangiogênico ao regredir a massa tumoral em experimentos em modelo de células cancerosas pulmonares, esse fato é devido a mudança conformacional apresentada quando se encontra no seu estado latente (O'REILLY, 2007).

A antitrombina humana é uma glicoproteína plasmática de cadeia única, com massa molecular de 58kDa. Essa proteína é sintetizada no fígado e em condições normais está presente no plasma em uma concentração cerca de 150µg/mL, com meia vida de 3 dias. Sua estrutura primária é composta por 432 resíduos de aminoácidos, dos quais seis são cisteínas que formam pontes dissulfeto. A molécula contém quatro sítios de glicosilação, podendo ser glicosilada em todos os seus sítios (antitrombina α – 90% do total de moléculas) ou em apenas três desses sítios (antitrombina β – 10% do total de moléculas) (CARRELL et al., 1995). Esta última não é N-glicosilada no sítio Asn 135, no qual está situado próximo ao sítio de ligação à heparina, permitindo uma maior afinidade a heparina (BRENNAN et al., 1987).

Heparina, polissacarídeo sulfatado, um conhecido glicosaminoglicano (GAG), composto por cadeias alternadas de resíduos glicosamina e ácido urônico. Esse polissacarídeo ácido tem a capacidade de impedir a coagulação atuando como co-fator da ação antitrombótica. Em mamíferos é sintetizada pelos mastócitos, mas encontrada em diversos órgãos, como fígado, coração, pulmões, rins e intestino (CARRELL et al., 1995). A heparina comercial é uma mistura de GAGs extraídas principalmente da mucosa intestinal de bovinos e suínos, sendo um importante fármaco anticoagulante. A massa molecular de suas cadeias varia de 5 kDa a 30 kDa (MIDDELDORP, 2008).

Promissor exopolissacarídeo tipo celulose tem sido investigado pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), oriunda da fermentação do melaço pela bactéria *Zoogloea sp.* na Estação Experimental de Cana de Açúcar de Carpina. Seus principais monossacarídeos são glicose (87,6%) e xilose (8,6%) (PATERSON-BEEDLE et al., 2000). A hidrólise enzimática deste polissacarídeo com celulase confirmou a presença de resíduos de β -(1-4) glucopiranosil, mostrando semelhança com a celulose de origem vegetal. Com este exopolissacarídeo pode-se sintetizar membranas com flexibilidade e resistência à ruptura (CASTRO et al., 2004) com ampla aplicação cirúrgica, devido à sua boa biocompatibilidade e baixa toxicidade (COELHO et al., 2002)

A proposta deste projeto consiste em revestir membranas do exopolissacarídeo celulósico produzido pela *Zoogloea sp.* com heparina com vistas à purificação de antitrombina do plasma humano por separação por afinidade.

2.REVISÃO DA LITERATURA

1.1 HEPARINA

Dentro da família dos glicosaminoglicanos (GAG) (**Tabela 1.1**) encontramos a heparina, um polissacarídeo linear com características aniônicas, de estrutura química heterogênea, composta de vários grupos funcionais substituíveis; O-sulfatos, N-sulfato e N-acetil, e com pesos moleculares variáveis (**Figura 1.1**) (MULLOY e GRAY, 2010). A heparina tem uma estrutura muito similar ao heparan sulfato sendo ambos constituídos por unidades repetidas de ácido urônico e glicosamina, havendo a possibilidade de cinco modificações nesses dissacarídicos podendo apresentar $2^5 = 32$ combinações com milhões de possibilidades estruturais (BISHOP et al., 2007).

A cadeia polissacarídica da heparina biologicamente ativa pode ser tão pequena quanto um pentassacarídeo 1.7 kDa ou exceder 50 kDa. No caso das heparinas não fracionada (HNF), muito utilizada na medicina, cuja produção é devido a não despolimerização da cadeia polissacarídica; os valores dos pesos moleculares podem compreender entre 11 – 20 kDa. Já a parcial despolimerização da cadeia origina um novo produto a heparina de baixo peso molecular (HBPM) como o peso molecular entre 3 – 7 kDa (MULLOY et al., 2000).

A biossíntese da heparina também é semelhante a do heparan sulfato, ocorre no complexo de golgi, onde 4 monossacarídeos ligam-se ao núcleo da proteína, proteioglicano, subsequente a cadeia é alongada pela adição do ácido glicurônico (GlcA) e N-acetil-glicosamina (GlcNAc). A adição do dissacarídeo é realizada por duas enzimas glicosil-transferase (EXT1 e EXT2), formando um heterodímero estável dentro do complexo de Golgi. A cadeia nascente sofre modificações concomitante e independentes por uma série de enzimas (N-deacetilase-N-sulfotransferase; epimerase; 2-O 3-O e 6-O sulfotransferases) resultando diversas modificações no sacarídeo ao mesmo tempo (SASISEKHARAN e VENKATARAMAN, 2000). A sequência polissacarídica com diferentes modificações são segregadas em regiões altamente sulfatadas conhecidas como domínio S, domínios esses que afetam a atividade de proteínas, como sua interação com superfície celular; as regiões pouco sulfatadas e a não sulfatadas ou domínio N, que compreende regiões muito acetiladas. No

caso da heparina consiste na sua maioria de regiões de domínio S interrompidas previamente por domínio N (CARLSSOON et al., 2008).

Tabela 1.1. Estruturas dos Glicosaminoglicanos e sua distribuição tecidual (MULLOY e GRAY, 2010 Adaptado)

Glicosaminoglicanos	Distribuição	Estrutura de dissacarídeo repetido
Ácido hialurônico	Cartilagem, líquido sinovial, pele, tecido de sustentação	$-4)-\beta\text{-D-GlcA-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-GlcNAc-(1-}$
Condroitinsulfato	Cartilagem, osso, pele, córnea, artérias,	$-4)-\beta\text{-D-GlcA-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-GalNAc4(OSO}_3^-)-(1-$
Dermatan sulfato	Pele, vasos sanguíneos, coração	$-4)-\alpha\text{-L-IdoA-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-GalNAc4(OSO}_3^-)-(1-$
Heparan sulfato	Membranas basais, pulmão, artérias,	$-4)-\beta\text{-D-GlcA-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-D-GlcNAc-(1-}$
Heparina	Pulmão, fígado, pele, grânulos de mastócito	$-4)-\alpha\text{-L-IdoA2(OSO}_3^-)-1\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-D-GlcNSO}_3\text{-,6(OSO}_3^-)-(1-$
Queratan sulfato	Cartilagem, córnea, disco vertebral	$-3)-\beta\text{-D-Gal-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-GlcNAc6(OSO}_3^-)-(1-$

Nota: As formas estruturais dos dissacarídeos estão representadas somente pelo padrão principal de repetição.

A presença de uma sequência de ligação a antitrombina na heparina, sequência pentassacarídica, (DEFGH), localizada no domínio S (**Figura 1.1 C**), potencializa a ação da antitrombina de inibir a cascata de coagulação. A heparina liga-se a antitrombina em três distintas regiões, N-terminal da proteína, região N-terminal da hélice A e toda hélice D, essas

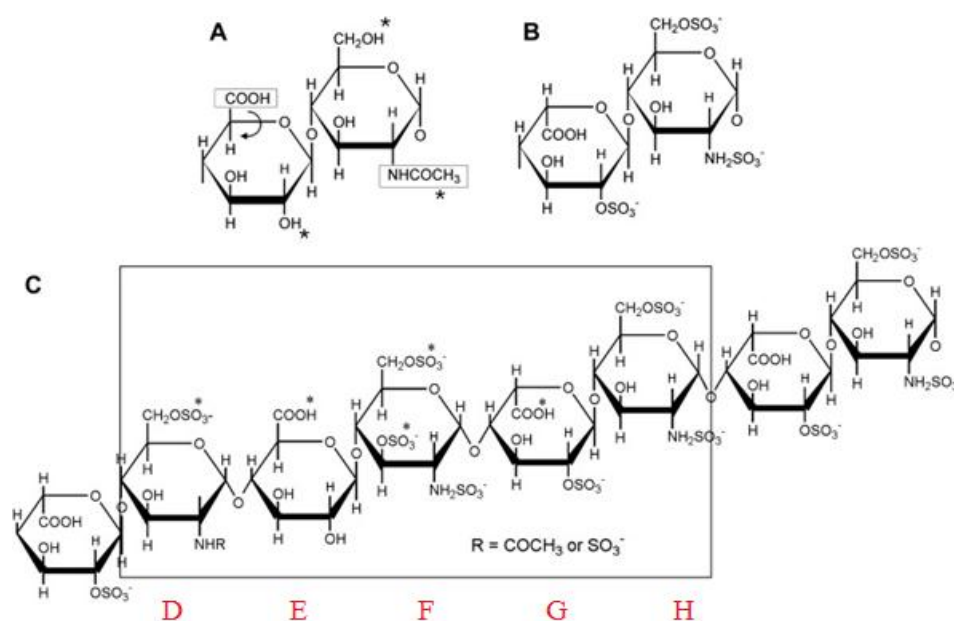
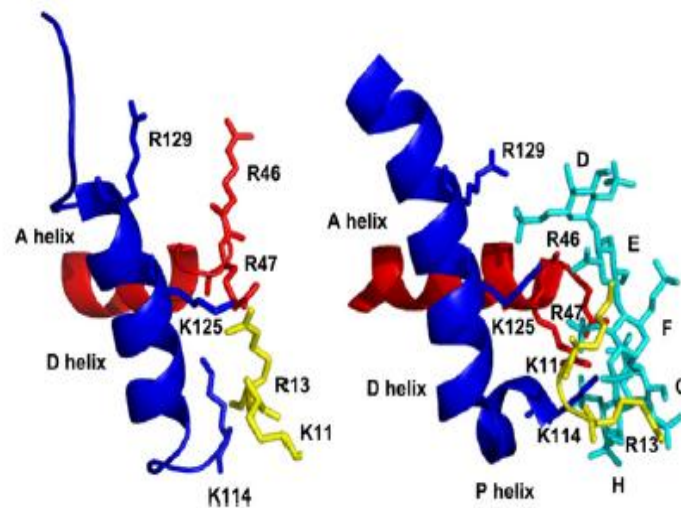


Figura 1.2. A esquerda está a estrutura da antitrombina, em destaque a região de ligação à heparina, mostrada pelas sequencias; Arg13, Arg46, Arg47, Arg129, Lis11, Lis114, Lis125, localizadas em três sítios distintos da antitrombina hélice D, o loop que estende C- e N-terminal da proteína e a hélice A. Esta sequencia ligará ao pentassacarídeo (DEFGH) da heparina, mostrada na figura da direita. (OLSON et al., 2010)



2.2 ANTITROMBINA

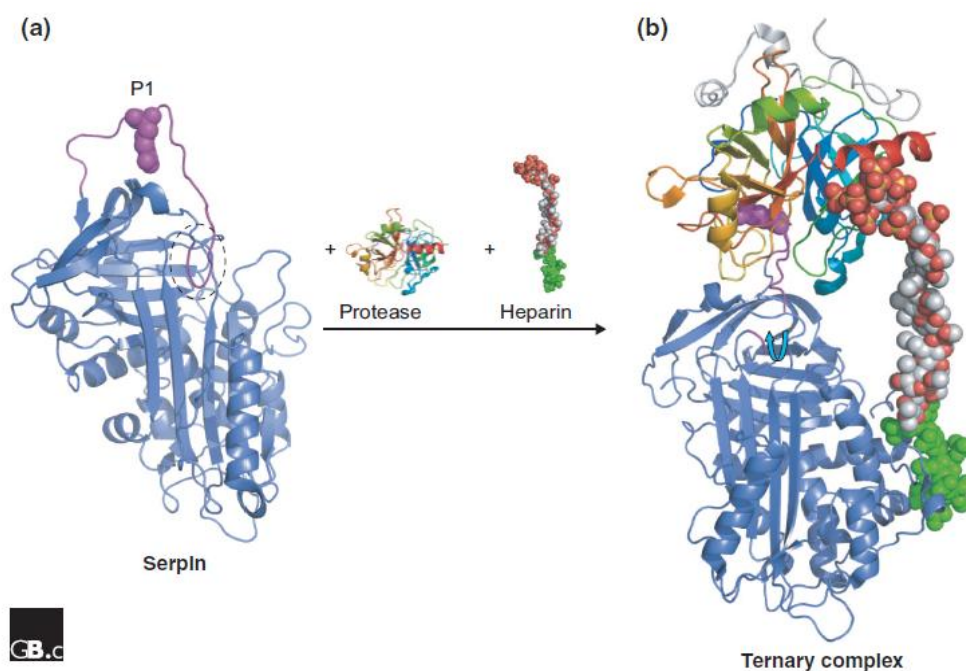
Inibidores de proteases, Serpina (acrônimo para *Serine Proteinase Inhibitor*), são uma superfamília baseado na presença de um domínio comum consistente em três folha β (A-C) de, 8 a 9 α hélice (hA-hI) e um loop centro reativo (LCR). São moléculas relativamente grandes (330-500 resíduos de aminoácidos), muitos membros dessa família pertencem a dos inibidores das serinoproteases, da qual a antitrombina faz parte junto à anti-tripsina. Até o momento foram identificadas mais de 1000 serpinas, dentre elas 36 são proteínas humanas. (GETTINS, 2002; LAW et al., 2006).

Antitrombina é uma proteína multifuncional composta de 432 resíduos de aminoácidos e apresenta duas isoformas do tipo α e do tipo β ; a primeira é glicosilada em 4 resíduos de asparagina possui peso molecular 58 kDa, enquanto a segunda tem três sítios de glicosilação com exceção do resíduo Asn135 de peso molecular aproximadamente 56 kDa.

A antitrombina encontra-se no plasma, aderida à superfície de células ou em parede de vasos sanguíneos. Ela tem a capacidade de executar diferentes funções a mais conhecida é a de anticoagulante com a habilidade de inibir a trombina (Fator IIa), Fator VIIa, Fator IXa, Fator Xa e Fator XIa. Mas pode também exercer a função anti-inflamatória e anti-angiogênese. (KARLSSON e WINGE, 2004)

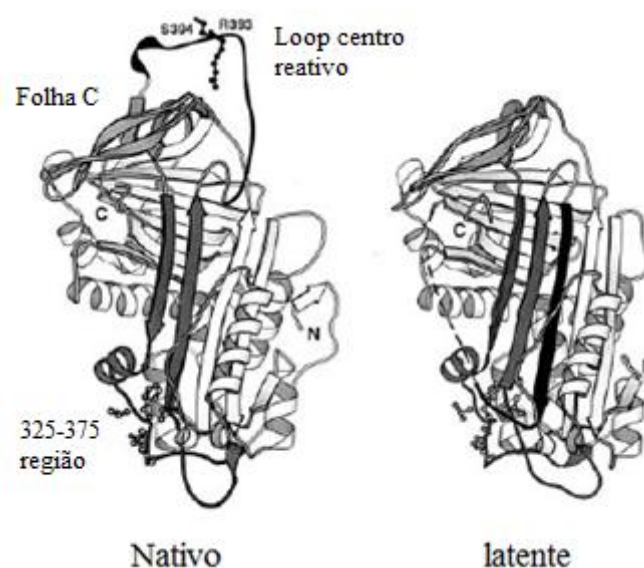
Como inibidor da coagulação, a antitrombina, é responsável por regular as proteases da cascata de coagulação junto com a proteína C e proteína A. Um importante aspecto da atividade anticoagulante é sua regulação pelo co-fator, heparina. Uma vez que o sítio alostérico esteja ativo pela ligação da sequência específica pentassacarídeo da heparina (DEFGH), há um aumento da reatividade da antitrombina para os fatores Xa e IXa (BEDSTED, et al., 2003; OLSON et al., 2010).

Figura 1.3. Mudanças conformacionais da antitrombina (serpina) pela presença do co-fator, heparina. Onde uma vez a heparina complexada a antitrombina induz ao Loop centro reativo (magenta) a se tornar mais acessível à ligação com a protease (LAW, et al 2006)



A mudança conformacional induzida pela ligação da heparina a antitrombina é iniciada pela expulsão do LCR pela β -folha (**Figura 1.3**), fazendo com que o LCR fique mais exposta, acessível à protease plasmáticas, fator Xa, IXa e trombina. Nessa região LCR existe a presença de um resíduo de arginina (P1) que se liga de modo covalente ao resíduo de serina ou cisteína da protease. Essa ligação resulta em uma nova mudança conformacional na antitrombina formado um complexo instável acil-intermediário. O complexo somente se estabiliza quando a ligação com a protease ocorre por um processo chamado mecanismo de suicídio, onde a antitrombina se desfaz de um pedaço da sua estrutura para criar um complexo ternário estável com um baixo grau de desacetilação (PIKE et al., 1997; OLSON et al., 2010).

Figura 1.4. Estrutura tridimensional da antitrombina, mostrando sua diferença conformacionais entre as formas nativa e latente. (Adaptado de Larsson et al, 2001).



A estrutura da antitrombina pode ser mudada com o aumento da temperatura ou por ação proteolítica, que deforma o LCR e o insere dentro da folha A, ilustrado na **Figura 1.4**. A forma latente da antitrombina, deformada, apresenta uma baixa afinidade a heparina e liga-se a proteases formando um complexo com atividade antiangiogênica, induzindo a apoptose de células endoteliais causando o rompimento das interações célula-matriz Larsson e

colaboradores em 2000 que demonstraram essa atividade antiangiogênica da antitrombina latente (LARSSON et al., 2001).

2.3 EXOPOLISSACARÍDEO CELULÓSICO PRODUZIDO PELA ZOOGLOEA SP.

Certas bactérias, algas e fungos são capazes de produzir e excretar certos tipos de polímeros, muitos casos são carboidratos que tem a função de proteger a colônia contra agentes externos, são os polissacarídeo extracelular (PSE). Nos últimos anos, tem aumentado o interesse por esses tipos de PSE tanto para a aplicação na industrial quanto na área médica, nesta inclui suporte para imobilização e cultivo de células, cobertura temerária de pele e substituição de tecidos (KLEMM et al, 2005)

A *Zoogloea sp.* pertencente a família *Pseudomonadaceae*, são bactérias gram-negativos com a capacidade de produzir e excretar polissacarídeos, estes podem ser encontrados ligados à parede celular ou em forma de mucos. Este último é a forma utilizada para produzir a membrana (**figura 1.5**), bactéria esse isolada na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina/UFPE, identificada no Instituto de Antibiótico/UFPE (PI9603700-8).

Melo e colaboradores (2003) elaboraram as condições para a conversão do substrato (melaço de cana-de-açúcar) em exopolissacarídeo. Nele permitiu definir o modelo estatístico experimental com 94,09% de variância expressa pela equação: $Y = 3,956 - 0,611 \cdot pH - 1,156 \cdot T + 0,341 \cdot \text{°Brix} \cdot pH$. Onde °Brix = 10, pH 4,5 e T=30°C, mostra a maior conversão de substrato em exopolissacarídeo (PI026132-5).

Esse PSE possui características similares à celulose com insolubilidade em meio aquoso, de composição centesimal definida: glicose (87,57), xilose (8,58), ribose (1,68), ácido glucorônico (0,83), manose (0,82), arabinose (0,37), galactose (0,13), fucose (0,01), ramnose (0,01). Sua estrutura molecular principal é formada por ligação do tipo β -D-Glicose e vários pontos de ramificação, permitindo criar várias camadas sobreposta de polímero, propiciando uma maior resistência e flexibilidade a mesma (PATERSON-BEEDLE et al., 2000; MELO, 2003).

Figura 1.5. Membrana produzida pela *Zoogloea* sp. Em meio de melaço de cana-de-açúcar, de características celulósicas, por isso denominada de exopolissacarídeo celulósico.



Sendo os principais componentes a glicose e o ácido glicurônico, componentes orgânicos biocompatíveis, o que proporciona uma baixa citotoxicidade (COELHO et al., 2002) e alta histocompatibilidade ao biopolímero (CASTRO et al., 2004), permitiu a sua utilização como um biomaterial; empregadas na reconstrução uretral (CHAGAS et al., 2005), enxerto livre em merigoplastias, remendo em arterioplastia femorais (LINS, 2007) e imobilização de tripsina e BSA (CAVALCANTE et al., 2006).

2.4 SÍTIOS DE IMOBILIZAÇÃO À HEPARINA

A heparina possui um número considerável de grupos químicos reativos (**Tabela 1.2**), em cada unidade repetida do dissacarídeo (GlcA-GlcNAc) contendo grupos carboxila, de 1 a 2 grupos hidroxila e uma média de 2 -2.5 grupos sulfatos. Aproximadamente 15 a 25% das unidades repetidas contêm grupos diol vicinais e em cada cadeia contém 0.3 grupos de amina e um grupo reduzido hemiacetal terminal. A cadeia polissacarídica contém aproximadamente. Esse grupo funcional pode ser ativado diretamente para ligasse a uma matriz de suporte ou ligasse a um espaçador para depois ligar ao suporte. (MURUGESAN et al., 2008; ISLAM et al., 2002).

A imobilização de heparina ou heparinização a uma matriz de suporte possibilita uma melhora da hemocompatibilidade e a biocompatibilidade. Suportes heparinizados mostram redução na agregação plaquetária, aumento do tempo de recalcificação do plasma e do tempo

da tromboplastina parcialmente atividade (TTPA), com também a inibição por contato com as enzimas da coagulação (SANCHEZ et al., 1998).

Existe um grande volume de literatura publicada sobre heparinização como também as diversas aplicações desta tecnologia. Dentre estas aplicações podem-se citar diversos suportes já utilizados, desde polímeros a nanomateriais, por diferentes mecanismos de imobilização; ligações covalentes a simples adsorção.

Suportes já utilizados para heparinização: no aumento da biocompatibilidade temos o copolímeros álcool etileno vinil (MARCONI et al., 1997), poliuretanos (KANG et al., 1996), microesferas de hidroxietilmetacrilato (DENIZLI, 1999), dacron e polietileno tereftalato (CHANDY et al., 2000), conjugado ao colágeno (WISSINK et al., 2001), conjugado com quitosana em membrana de poliacrilonitrila (YANG e LIN, 2002), encapsulados em polihidroxietil metacrilato (DUNCAN et al., 2001), imobilizado covalentemente com o copolímero ácido lático e ácido glicol (WANG et al., 2003), matriz de celulose (MURUGESAN et al., 2006), e imobilização em nanopartículas inorgânicas como nanotubos de carbono, óxidos de ferro, sílica, fosfato de cálcio e pontos quânticos (MURUGESAN et al., 2006; XING et al., 2010).

No caso do suporte utilizado neste trabalho esta representado na **Figura 1.6**, o SEC foi oxidado com periodato de sódio (NaIO_4), clivando carbonos vicinais, C2-C3 do anel glicopiranosil formando 2 grupos aldeídos na posição C2 e C3, resultando em um dialdeído celulose. Essa estrutura permite a imobilização a proteínas ou a amino polissacarídeos. (NIKOLIC et al., 2010). Para a imobilização a grupamentos carboxila da heparina faz necessário adicionar a polietilenoimina (PEI) que originará grupos aminas ao suporte e para dar maior estabilidade ao suporte, ele foi reduzido com borohidreto de sódio (NaBH_4).

Tabela 1.2. Lista de grupos funcionais da heparina que podem ser utilizados na imobilização de um suporte. (BLOMBACK e ANTOVIC; 2010).

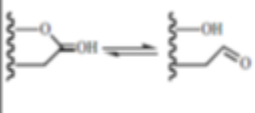
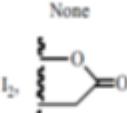
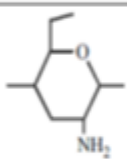
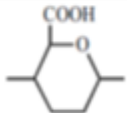
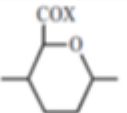
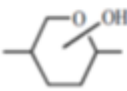
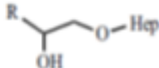
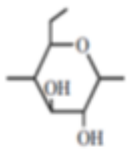
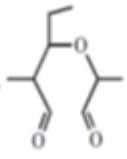
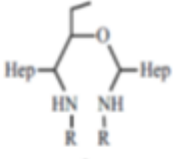
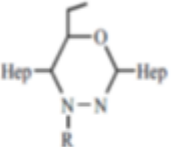
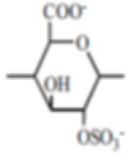
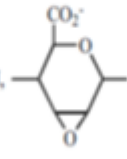
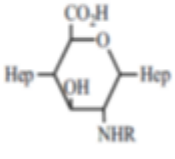
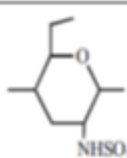
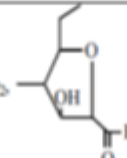
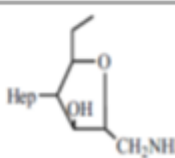
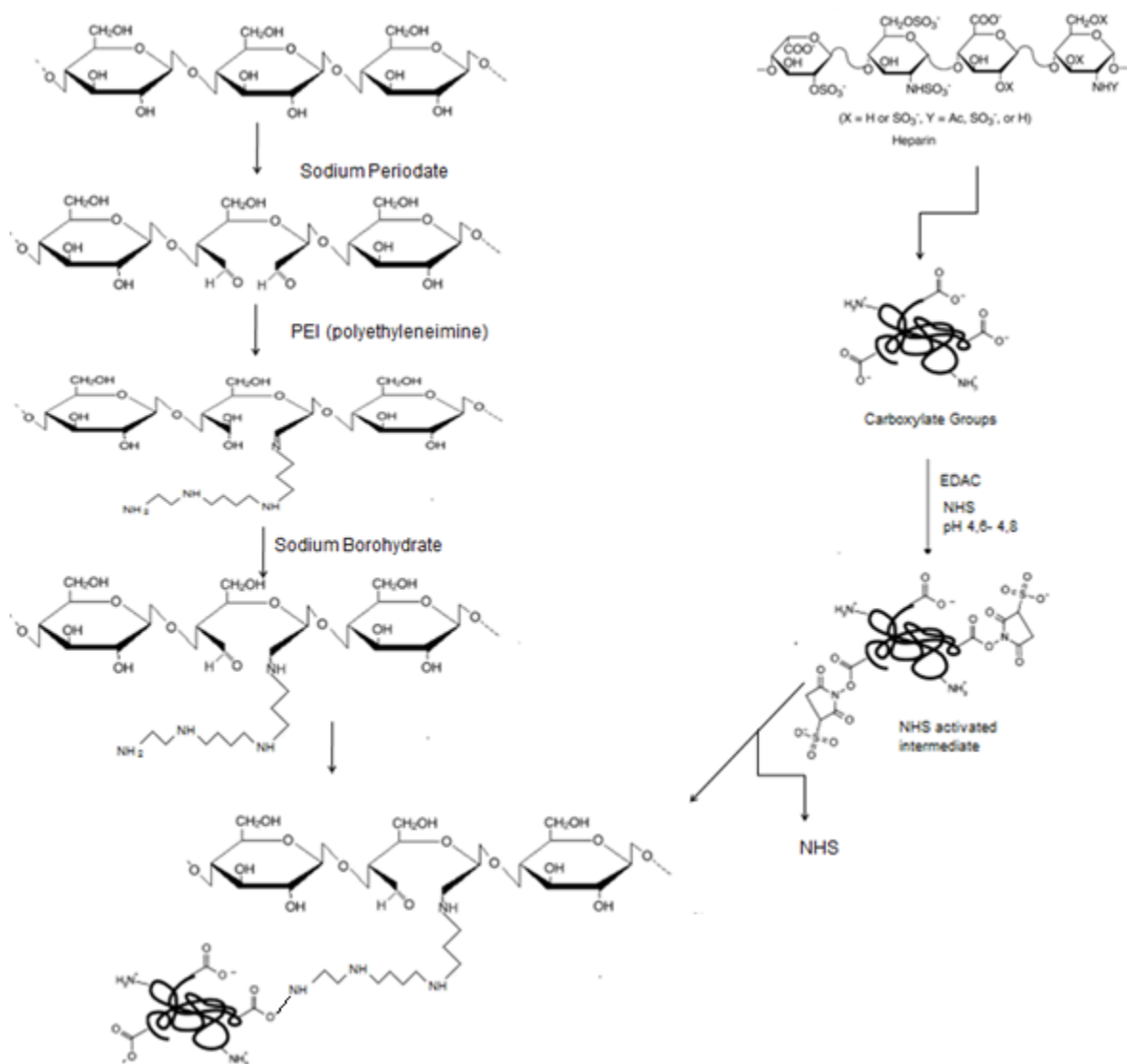
Grupos funcionais	n° sítios/ cadeia de heparina	ativação com	Reage com	Ligação
	1	None 	R-NH ₂ or RNH-NH ₂ , NaBH ₂ CN R-NH ₂ , RNH-NH ₂	RNHCH ₂ Hep RNHNHCH ₂ Hep RNHCOHep RNHNHCOHep
	~ 0.3	none	RCO ₂ X RCOH, NaBH ₂ CN	RCONH ₂ Hep RCH ₂ NH ₂ Hep
	~ 20	COX EDC, 	RNH ₂	RNHCOHep, RNHNHCOHep
	~ 60	CNBr, Hep-O-CN (or Triazine)	RNH ₂ 	RNHCOO-Hep 
	~ 5	Na ₂ IO ₄ , 	RNH ₂ , NaBH ₂ CN RNHNH ₂ , NaBH ₂ CN	 
	~ 15	NaOH, 	RNH ₂	
	~ 15	NaNO ₂ , 	RNH ₂ , NaBH ₂ CN	

Figura 1.6. Esquema químico do processo de preparo da membrana de exopolissacarídeo celulósico e a imobilização com a heparina. Os reagentes utilizados para o preparo foram; periodato de sódio (NaIO_4), polietilenoimina (PEI) e borohidreto de sódio (BH_4). A direita da figura representa o processo de ativação do grupo carboxílico da heparina com carbodiimide (EDAC) e N-hidroxilsuccimida (NHS).



3.JUSTIFICATIVA

A membrana produzida pela *Zoogloea sp.* vem sendo aplicado em pesquisas no departamento de Cirurgia Experimental pela Universidade Federal de Pernambuco, mostrando-se um bom biomaterial, mas limitado quando a sua incorporação a fluídos biológicos, como sangue. Outras pesquisas realizadas no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami dão uma nova perspectiva a esse material atribuindo novas propriedades; utilizado como um sistema de liberação controlada de drogas ou sendo um suporte para imobilização de biomoléculas. Em 2006, Cavalcante e colaboradores conseguiu imobilizar tripsina, mostrando que é possível mudar a estrutura original da membrana sem a perda de suas características.

Em virtude dos novos potenciais terapêuticos da antitrombina, como droga anticancerígena, houve um aumento por sua demanda e na busca de novas fontes de produção, que incluem plasmas de diferentes fontes animais ou por técnicas de recombinação genética.

A nova abordagem que proponho é dar características antitrombóticas ao suporte para que possa ser utilizado em contato com fluidos biológicos sem provocar processos coagulatórios, e devido à ligação com a heparina a proteínas plasmáticas o possibilita sua utilização para separação por afinidade proteínas plasmática, em especial a antitrombina.

4.OBJETIVOS

2.5 GERAL

Purificar antitrombina a partir da imobilização covalente da heparina a membrana de exopolissacarídeo celulósico produzido pela *Zoogloea sp.*

4.2. ESPECÍFICOS

- ✧ Revestir covalentemente a membrana de exopolissacarídeo celulósico de *Zoogloea sp.* com heparina não fracionada obtida comercialmente;
- ✧ Utilizar o desenho experimental para selecionar as variáveis que contribuem para uma melhor heparinização quanto reter a melhor atividade anticoagulante, como também obter as melhores condições experimentais;
- ✧ Purificar a antitrombina através da técnica de separação por afinidade;
- ✧ Quantificar e identificar a antitrombina purificada por eletroforese SDS-PAGE.

5.REFERÊNCIAS

- (1) AHMED, T; GARRIGO, J; DANTA, I, Preventing bronchoconstriction in exercise induced asthma with inhaled heparin, *N Engl J Med*(329)90-95,1993
- (2) BEDSTED, T; SWANSON, R; CHUANG, YJ; BOK, PE; BJÖRK, I; OLSON, ST, Heparin and calcium ions dramatically enhance antithrombin reactivity with factor IXa by generation new interaction exosites, *Biochemistry*(42)8143-8152,2003
- (3) BISHOP, JR; SCHUKSZ, M; ESKO, JD, Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology, *Nature*(446)1030-1037,2007
- (4) BLOMBACK, M e ANTOVIC, J; 2010: BLOMBACK, M; ANTOVIC, J, *Essencial Guide to Blood Coagulation*, 2010
- (5) BRENNAN, SO; GEOGE, PM; JORDAN, RE, Physiological variant of antithrombin III lacks carbohydrate sidechain at Asn 135, *FEBS Letters*(219)431-436,1987
- (6) CARLSSON, P; PRESTO, J; SPILLMANN, D; LINDAHL, U; KJELLEN, L, Heparin/heparan sulphate biosynthesis: processive formation of N-sulfated domains, *Journal Biological Chemistry*(283)20008-20014,2008
- (7) CARRELL, R; SKINNER, R; WARDELL M; WHISSTOCK, J, Antithrombin and heparin, *Molecular Medicine Today*(226)226-231,1995
- (8) CASTRO, CMMB; AGUIAR, JLA; DUTRA, FA; FERREIRA, WT; SILVA, DB, Citotoxicidade de biopolímero de cana-de-açúcar, *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco*(49)119-124,2004
- (9) CAVALCANTE, AHM; CARVALHO J, LB; CARNEIRO-DA-CUNHA, MG , Cellulosic exopolysaccharide produced by *Zoogloea* sp as film support for trypsin immobilization, *Biochemical Engineering Journal*(29)258-261,2006
- (10) CHAGAS, HM; AGUIAR, JLA; ANDRADE, RT; MONTORO, M; VILAR, FO; LIMA, SVC, Uso da membrana de biopolímero de cana-de-açúcar na reconstrução uretral, *Anais do 30º Congresso Brasileiro de Urologia*,2005
- (11) CHANDY, T; DAS, GS; WILSON, RF; ROA, GHR, Use of plasmaglow for surface-engineering biomolecules to enhance blood compatibility of Dacron and PTFE vascular prosthesis, *Biomaterials*(21)699-712,2000

- (12) COELHO, MCOC; CARRAZONI, PG; MONTEIRO, VLC; MELO, FAD; MOTA, RA; TENÓRIO FILHO, F, Biopolímero produzido a partir da cana-de-açúcar para cicatrização cutânea, *Acta Cirúrgica Brasileira*(17)11-13,2002
- (13) DENIZLI, A. Heparin-immobilized poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-based microspheres, *Polym Chem*(36)655-662,1999
- (14) DUNCAN, AC; BOUGHNER, D; CAMPBELL, G; WAN, WK, Preparation and chracterization of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) biomedical hydrogel, *Eur Polym J*(37)1821-1826,2001
- (15) GETTINS, P, Serpin strucuture, mechanism and function, *Chem Rev*(102)4751-4803,2002
- (16) IRVING, JA; STEENCAKKERS, P J M; LESK, AM; OP DEN CAMP, HJM; PIKE, RN; WHISSTOCL, JC, Serpins in Prokaryotes, *Molecular Biology and Evolution*(19)1881-1890,2002
- (17) ISLAM, T; BUTLER, M; SIKKANDER, SA; TOIDA, T; LINHARDT, RT, Further evidence that periodate cleavage of heparin occurs primarily through the antithrombin binding site, *Carbohydr Res*(337)2239-2243,2002
- (18) KANG, IK; KWON, OH; LEE, YM; SUNG, YK, Preparation and surface chracterization of funcional group-grafted and heparin-immobilized polyurethanes by plasma glow discharge, *Biomaterials*(17)841-847,1996
- (19) KARLSSON, G; WINGE, S, Separation of laten, prelatent and native forms of human antithrombin by heparin affinity high-performance liquid chromatografy, *Protein Expression and Purification*(33)339-345,2004
- (20) KLEMM, D; HEIBLIEIN, B; FINK, HP; BOHN, A, Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material., *Angew Chem Int Ed*(44)3358-3393,2005
- (21) LARSSON, H; AKERUD, P; NORDLING, K; RAUB-SEGALL, E; CLAESSION-WELSH, L; BJÖRK, I. A novel Anti-angiogenic Form of Antithrombin with Retained Proteinase Binding Ability and Heparin Affinity. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (15), 11996-12002, 2001
- (22) LARSSON, H; SJÖBLOM, T; ÖSTMAN, A; YLINENJARVI, K; BJÖRK, I.; CLAESSION-WELSH, L. Antiangiogenic effects of latent anti-thrombin through

perturbed cell-matrix interactions and apoptosis of endothelial cells. *Cancer Research*, 60, 6723-6729, 2000.

- (23) LAW, RHP; ZHANG, Q; MCGOWAN, S; BUCKLE, AM; SILVERMAN, GA; WONG, W; ROSADO, CJ; LANGENDORF, CG; PIKE, RN; BIRD, PI; WHISSTOCK, JC, An overview of the serpin superfamily, *Genome Biology*(7)216-227,2006
- (24) LEDSON, M; GALLAGHER, M; HART CA; WALSHAW, MJ, Nebulized heparin in Burkholderia cepacia colonised adults cystic fibrosis patients, *Eur Respir J*(17)36-38,2001
- (25) LINS, E.M. Membrana de biopolímero de cana-de-açúcar como remendo em arterioplastias femorais em cães. 2007. 75 f. Tese (Doutorado em Pós-graduação em Cirurgia) - Universidade Federal de Pernambuco. Recife.
- (26) MARCONI, W; BARONTINI, F; MARTINELLI, A; PIOZZI, A, New polyurethane compositions containing high amounts of covalently bonded heparin, *Makromol chem*(194)1347,1997
- (27) FAD, M. Contribuição ao estudo cinético da produção de polissacarídeo extracelular por *Zoogloea sp* em melaço de cana-de-açúcar. 2003. Tese (Doutorado em Centro de Tecnologia e Geociências) - Universidade Federal de Pernambuco. Recife.
- (28) MIDDELDORP, S, Heparin: from animal organ to designer drug, *Thrombosis Research*(122)753-762,2008
- (29) MULLOY, B; GRAY, E; BORROWCLIFFE, TW, Characterization of unfractionated heparin: comparison of materials from the last 50 years, *Tromb Haemost*(84)1052-1056,2000
- (30) MULLOY, B; GRAY, Hogwood E, Assay and reference materials for current and future applications of heparins , *Biologicals*()1-8,2010
- (31) MURUGESAN, S; PARK, TJ; YANG, H; LINHARDT, RJ, Blood compatible carbon nanotubes - Nano-based neoproteoglycans, *Langmuir*(22)3461-3463,2006
- (32) MURUGESAN, S; XIE, J; LINHARDT, RJ, Immobilization of heparin: approaches and applications, *Current Topics in Medical Chemistry*(8)90-100,2008

- (33) NIKOLIC, T; KOSTIC, M; PRASKOLO, J; PEJIC, B; PETRONIJEVIC, Z; SKUNDRIC, P, Sodium periodate oxidized cotton yarn as carrier for immobilization of trypsin, *Carbohydrate Polymers*(82)976-981,2010
- (34) OSLON, ST; BJORK, I, Regulation of thrombin activity by antithrombin and heparin, *Seminars in Thrombosis and Haemostasis*(20)373-409,1994
- (35) O'REILLY, MS. Antiangiogenic antithrombin. *Seminars in Thrombosis and Haemostasis* 33 (7), 660-666, 2007.
- (36) BECKMAN, M; HOLSINGER, R.M.; SMALL, H. D.Heparin Activates β -Secretase (BACE1) of Alzheimer's Disease and Increases Autocatalysis of the Enzyme. *Biochemistry*, 45 (21); 6703-6714, 2006.
- (37) PATERSON-BEEDLE, M; KENNEDY, JF; MELO, FAD; LLOYD, LL; MEDEIROS, VA, Cellulosic exopolysaccharide produced from sugarcane molasses by a *Zoogloea* sp, *Carbohydrate Polymers*(42)375-383,2000
- (38) PI9603700-8: MELO, FAD, Biopolímero produzido por materiais provenientes da cultura da cana-de-açúcar via microrganismo zoogloea sp. para utilização nas áreas de química e bioquímica: fio cirúrgico e membranas biodegradáveis., 1999
- (39) PI026132-5. MELO, F.A.D. Biomembranas produzidas a partir do melaço da cana-de-açúcar e de outros açúcares, via microorganismos *Zoogloea* sp. para fins de aplicação nas áreas de medicina clínica e experimental e bioquímica. 2004.
- (40) PIKE, RN; POTEMPA, J; SKINNER, R; FITTON, HI; MCGRAW, WT; TRAVIS, J; OWEN, M; JIN, L; CARRELL, RW, Heparin-dependent modification of the reactive center arginine of antithrombin and consequent increase in heparin binding affinity, *J Biol Chem*(272)19652-19655,1997
- (41) SANCHEZ, J; ELGUE, G; RIESENFELD, J; OLSSON, P, Studies of adsorption, activation and inhibition of factor XII on immobilized heparin, *Thromb Res*(71)41-50,1998
- (42) SASISEKHARAN, R; VENKATARAMAN, G, Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function, *Current Opinion in Chemical Biology*(4)626-631,2000

- (43) SILVERMAN, GA; BIRD, PI; CARRELL, RW; CHURCH, FC; COUGHLIN, PB; GETTINGS, PGW; IRVING, JA; LOMAS, DA; LUKE, CJ; MOYER, RW; PEMBERTON, PA; REMOLD-O'DONNELL, E; SALVESEN, GS; TRAVIS, J; WHISSTOCK, JC, The serpin are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins, *Journal of Biological Chemistry*(276)33293-33296,2001
- (44) TOSSAVAINEN, H; PIHLAJAMAA, T; HUTTUNEN, TK; RAULO E; RAUVALA, H; PERMI, P, The layered fold of the TSR domain of *P. falciparum* TRAP contains a heparin binding site, *Protein Sci*(15)1760-1768,2006
- (45) WANG, XH; LI, DP; WANG, WJ; FENG, QL; CUI, FZ; XU, YX; SONG, XH, Covalent immobilization of chitosan and heparin on PLGA surface ,*Int J Biol Macromol*(33)95-100,2003
- (46) WEI, M; TAI, G; GOA, Y; HUANG, B; ZHOU, Y; HOA, S, Modified heparin inhibits P-selectin-mediated cell adhesion of human colon carcinoma cells to immobilized plaquets under dynamic flow conditions, *J Biol Chem*(279)19202-19210,2004
- (47) WISSINK, MJ; BEERNINK, R; PIEPER, JS; POOT, AA; ENGBERS, GH; BEUGELING, T; VAN AKEN, WG; FEIJEN, J, Immobilization of heparin to EDC/NHS- crosslinked collagen. chracterization and in vitro evaluation, *Biomaterials*(22)151-163,2001
- (48) XING, ZC; CHANG, Y; KANG, IK, Immobilization of biomolecules on the surface of inorganic nanoparticles for biometical applications, *Sci Technol Adv Mater*(11),2010
- (49) YANG, MC; LIN, WC, Surface modification and blood compatibility of polyacrylonitrile membrane with immobilized chitosan-heparin conjugate, *J polym Res*(9)201-206,2002

6.ARTIGO 1

Otimização do suporte para imobilização à heparina

Será submetido à revista Journal of Biotechnology; fator de impacto 2,97; ISSN: 0168-1656

**APPLICATION OF DESIGN EXPERIMENTS IN DEVELOPMENT AND
EVALUATION OF HEPARIN IMMOBILIZATION ON CELLULOSIC MEMBRANE**

Melo, A. T.^{1,2}; Aguiar, J. L.³, Carvalho Jr, L.B.²

¹ Programa de Pós-graduação em Ciência Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil.

²Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), UFPE, Recife, PE

³Departamento de Cirurgia, UFPE, Recife, PE

Corresponding at:

Carvalho Jr., L. B.

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

Av. Prof Moraes Rego, 1235- Cidade Universitária- Recife/PE

50670-901 Brazil

Fax number: +55 81 2126 8000

E-mail: lbcj@hotmail.com.br

Abstract

The aim of this study was to identify and optimize the process of immobilization of heparin on a new cellulosic membrane and evaluate it hemocompatible. Design of experiments, aided using multivariate analysis techniques was employed to quantify the effects coating process conditions and their interactions on the heparin coated membrane support. The process parameters have included eight independent factors: concentration and reaction time of NaIO_4 , PEI and BH_4 solutions as well as heparin immobilization time and stirring rate. An initial screening stage was carried out using a $2^{8-3 \text{ (IV)}}$ fractional factorial design. Following these preliminary experiments, the study was carried out using the response surface methodology based on rotatable central composite design (RCCD) for optimization. Main responses measured include amount of heparin coating on support and its activity. This biomaterial was able to delay blood coagulation and the results of this study suggest that heparin immobilization on cellulosic membrane could improve the avoidance thrombus formation and blood coagulation.

Keywords: Heparin immobilization, cellulosic membrane, hemocompatibility, design of experiments.

1. Introduction

Heparin is a glycosaminoglycan that has a relatively large and heterogeneous molecular weight (5 - 40 kDa), linear polysaccharide comprised of repeating $\alpha 1 \rightarrow 4$ linked glucuronic-iduronic acid and D-glicosamine residues. It is a highly sulfated molecule with the highest negative charge density and its binding with proteins is mostly electrostatic and contains a number of chemically reactive functional groups sulfonic, sulfoamino and carboxyl groups. These groups can be utilized directly or activated to moieties capable of either directly attaching to a supporting matrix or accepting the introduction of a linker or spacer for attachment to a matrix. The heparin could catalyze the combination of coagulation factor and anticoagulation factor, which plays a dominating role in the blood formed before used in biomedical fields (Linhard, 2003; Mulloy and Gray, 2010).

Heparin immobilized to a surface, enhances various surface properties, improving blood compatibility and biocompatibility. Heparinized surfaces show reduced platelet adhesion, reduced loss of blood cells and increased plasma recalcification time and activated partial thromboplastin time, resulting in improved biocompatibility without compromising thromboresistant properties. News approaches of surface heparinization have been reported, such as layer-by-layer self assembly and covalent immobilization. The first one, a common limitation to the clinical translation of materials functionalized with biomolecules is that these coating are not robust enough to withstand *in vivo* long-term exposure (Murugesan et al., 2008).

In Northeast of Brazil, an extracellular polysaccharide produced by *Zoogloea sp.* was isolated from an agro-industrial environment, synthesis at Industrial Microbiological Laboratory of the Sugarcane Experimental Station at Carpina / Universidade Federal Rural de Pernambuco and purified for biological use at Experimental Surgical Research Laboratory/ Universidade Federal de Pernambuco. The main monosaccharides present were glucose (88%), xylose (9%), mannose (0.8%). This polysaccharide was evaluated through laboratorial tests and showed high biocompatibility besides low cytotoxicity and it has been used in many experimental surgeries areas as in the healing of skin wounds, urinary and tympanic reconstruction, it was used as arterial substitute and it was observed a chronic inflammatory reaction, fibrosis and fibroblasts invasion (Paterson-Beedle et al, 2000).

Design of experiments is a statistical technique, based on the fundamental principles of statistics, randomization, replication and duplication, which simplifies the optimization by studying the mutual interactions among the variables over a range of values in a statistically valid manner. It is an efficient statistical technique for optimization of multiple variables in order to predict the best performance condition with a minimum number of experiments. These designs are used to find improved or optimal process settings, troubleshoot process problems and weak points and make a product or process more robust against external and non-controllable influences (Wang, Z., et al. 2011). In this paper central composite design was applied for optimization of process parameters of heparinization on exopolysaccharide membrane produced by *Zoogloea sp.*

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Heparin (Hepamax S, 5000 U) was obtained from Blasiegel, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDAC), N-hydroxysuccinimide ester (NHS) and polyethyleneimine solution 50% were from Sigma-Aldrich Chem. Co., Methylene blue, Sodium Periodate and Sodium Borohydrate were from Merck AG, cellulosic membrane (PI9603700-8) Laboratory of the Sugarcane Experimental Station at Carpina (UFRPE), activated partial thromboplastin time (aTTP) was performed using the kit Labtest Diagnostic SA. All other chemicals were analytical grade and were purchased from Fluka analytical.

2.2. Heparin activation

Carbodiimide was added at heparin (w/w) to prepared 5 ml of heparin solution (3 mg/ml) following was added NHS to stabilize heparin-EDAC complex (M/M with EDAC) previously adjusted to pH 4.7-4.8 with 1N HCl. The reaction mixture was kept at 25°C stirring for 1 h with pH controlled. After that the pH was increased to 8.0 with NaOH.

2.3. Membrane treatment with heparin and immobilization

The exopolysaccharide membrane (1cm²) was treated with sodium periodate, polyethyleneimine and sodium borohydrate, concentration and reaction time were evaluate following design of experiment in **table 2.1**. After, 1 ml of heparin solution (1mg/ml) was incubated for determined time in agreement with design of experiments) and kept stirring.

2.4. *In vitro* anticoagulant assay

For the activated partial thromboplastin time (aPTT) measurement, samples were added in tube. Fresh human platelet poor plasma (250 µl) was added on heparinized membranes and incubated for a 1h at 37°C. Then 100 µl was collected and actin-cephrahaloplastin reagent (100 µl) was added followed by incubation for 3 min. After CaCl₂ solution (100 µl) and the clotting time of the plasma solution was measured (min).

2.5. Heparin quantification assay

The percentage of heparin immobilization was established employing methylene blue dye binding assay. This experiment was carried based on Oliveira et al. (2003) with modifications: dye solution (0.005% of methylene blue solution with 0.01N HCl and 0.2% NaCl) was poured into test tubes contains 87 µl of samples and added water until 1.5 mL, stirred with vortex and absorbance measured at 664 nm.

2.6. Design of experiments (DoE)

As initial step in DoE plan applied fractional design for screening of variables of studies heparinization thought a set of experiments proceeding from eight variables (concentration and reaction time of NaIO₄, PEI and BH₄ as well heparin immobilization time and stirring rate) use 2⁽⁸⁻³⁾ design a set of 32 experiments and made it in a random order. Then three important factors were identified, that were assumed to have a major influence on the result were set variable and used a new experimental design with the purpose of determining optimization of the operational procedures and the central composite design with 16 new experiments.

To obtain a mathematical model of the system, the data resulting from the experimental series were combined with the initial experimental design and the assumption about the underlying relationship between influencing factor and result used P-value. To analyze the resulting matrixes in combination with the corresponding experimental design, ANOVA analysis was performance. Used Statistica ® 9.0 (Statsoft, Inc)

Evaluable DoE was used multiple linear regression and can be described as

$$\gamma = \beta_o + \beta_1 x_{i1} + \beta_2 x_{i2} + \dots + \beta_p \beta_{ip} + \varepsilon_i, \text{ when } i=1,2,\dots,n$$

In addition, more complex interaction terms described co-variation of linear or quadratic terms could be included. The evaluation of the contribution of each coefficient and the subsequent optimization of the model, the aim was reduced the model deviation factor ε_i . The response surface curves were then plotted to study the interaction among different factors, and to determine the optimal concentration of each factor and the immobilization time for maximum heparin immobilized on support.

3. Results

3.1.1. Screening of variables

A total of thirty-two test comprising 8 factors, concentration for each reagent and their reaction time, immobilization time and stirring rate (**Table 2.1**) were analyzed. The results of effects studied in 32 trials were subjected to ANOVA. The effects that contribute most to increasing heparin amount on support were periodate concentration following the negative interaction between borohydrate concentrations with immobilization time. These three factors are the strongest candidates for further study.

The heparinized membranes that presented the high percentage were the test 7 (34.43%), 13 (31.72%), 16 (31.66%), 29 (35.27%), 30 (34.75 %) and 31 (53.30%) corresponds to a heparin density 134.53 to 226. 06 $\mu\text{g cm}^{-2}$. These data suggests that to increased heparin amount were need increased periodate concentration. When the response was the activity that has heparinization, the aTTP most representative tests were 3 (6.08 min), 5 (6.05 min), 9 (6.02 min), 12 (6.83min), 25 (6.42 min) and 29 (5.85 min). The factors that contribute to this response were immobilization time, interaction between periodate concentration with stirring rate and PEI concentration with immobilization time. However this latter interaction had an influence negatively.

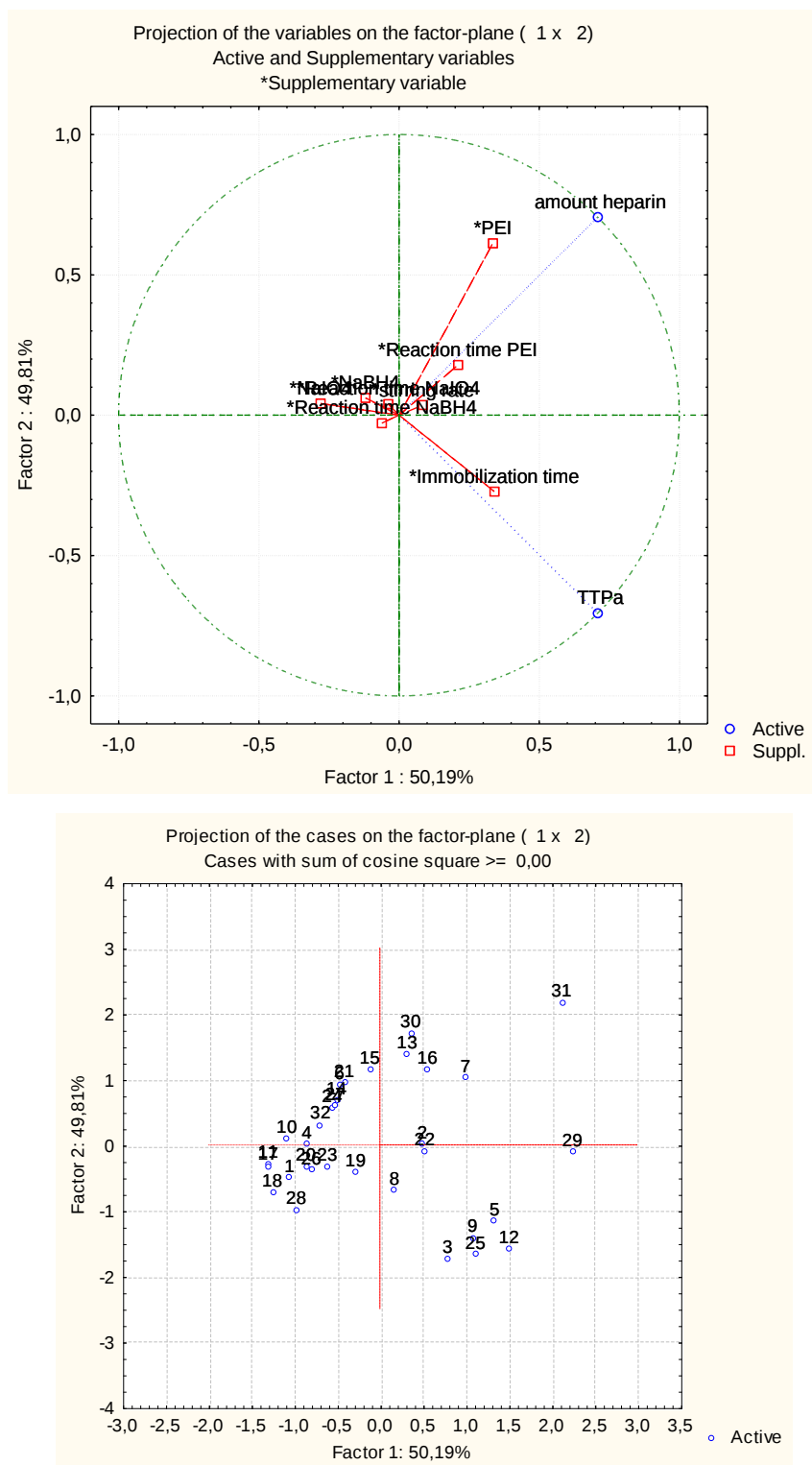
To analyze both responses and what variables the most contribute to increase them we perform Principal Components Analysis (PCA), **Figure 2.1**, observed that amount heparin and activity had opposite effects, variables their contributed for that were PEI, periodate and immobilization time. Then the best test that confirms was test 29 and we will that for central point in the next experiments.

Table 2.1. Heparinization factors and experimental layout of fractional factorial design $2^{(8-3)}$ used for heparinization support

Run	NaIO ₄ (M)	Time NaIO ₄ (min)	PEI %	Time PEI (min)	NaBH ₄ (M)	time NaBH ₄ (min)	Immobilization time (h)	Stirring rate (rpm)	Immobilization %	aTTP (min)
1	0,10	60	0,5	30	0,01	30	12	70	4,4278	2,00
2	0,35	60	0,5	30	0,01	90	36	70	21,5975	3,38
3	0,10	180	0,5	30	0,01	90	36	40	9,4903	6,08
4	0,35	180	0,5	30	0,01	30	12	40	10,3919	1,59
5	0,10	60	1,5	30	0,01	90	12	40	18,8399	6,05
6	0,35	60	1,5	30	0,01	30	36	40	21,1578	0,90
7	0,10	180	1,5	30	0,01	30	36	70	34,3444	2,70
8	0,35	180	1,5	30	0,01	90	12	70	13,1260	3,87
9	0,10	60	0,5	90	0,01	30	36	40	14,6496	6,03
10	0,35	60	0,5	90	0,01	90	12	40	9,2462	1,16
11	0,1	180	0,5	90	0,01	90	12	70	4,1268	1,39
12	0,35	180	0,5	90	0,01	30	36	70	16,7135	6,83
13	0,10	60	1,5	90	0,01	90	36	70	31,7243	1,31
14	0,35	60	1,5	90	0,01	30	12	70	18,9140	1,16
15	0,10	180	1,5	90	0,01	30	12	40	26,0346	1,06
16	0,35	180	1,5	90	0,01	90	36	40	31,6617	1,95
17	0,10	60	0,5	30	0,08	30	12	40	3,9376	1,42
18	0,35	60	0,5	30	0,08	90	36	40	0,9264	2,03
19	0,1	180	0,5	30	0,08	90	36	70	11,6481	2,9
20	0,35	180	0,5	30	0,08	30	12	70	7,5078	2,02
21	0,10	60	1,5	30	0,08	90	12	70	21,8773	0,93
22	0,35	60	1,5	30	0,08	30	36	70	20,9951	3,55
23	0,10	180	1,5	30	0,08	30	36	40	9,6122	2,35
24	0,35	180	1,5	30	0,08	90	12	40	17,5353	1,24
25	0,10	60	0,5	90	0,08	30	36	70	12,7486	6,42
26	0,35	60	0,5	90	0,08	90	12	70	7,5078	2,19
27	0,10	180	0,5	90	0,08	90	12	40	18,1048	1,25
28	0,35	180	0,5	90	0,08	30	36	40	1,0336	2,75
29	0,10	60	1,5	90	0,08	90	36	40	35,2694	5,85
30	0,35	60	1,5	90	0,08	30	12	40	34,7547	0,94
31	0,10	180	1,5	90	0,08	30	12	70	53,3020	2,66
32	0,35	180	1,5	90	0,08	90	36	70	14,2527	1,40

NaIO₄ – Sodium periodate, PEI – polietilenoimina, NaBH₄ – Sodium Borohydrate, aTTP – activated partial thromboplastin time

Figure 2.1. PCA score plot with the amount of immobilization plotted against the aTTP. The compounds selected for experimental testing are indicated by the filled symbols. On top were the eight variables effects and all experiments responses (bottom).



3.2. Optimization

A three variable with five level matrix of CCD was employed experimental to determine the optimized conditions and the interactive effects NaIO₄ and PEI concentrations and immobilization time were selected as the factors for CCD (**Table 2.2**). Heparin concentrations for each individual run along with the predicted responses are summarized in **Table 2.4**. The highest heparin amount of 63.06% (254.70 µg cm⁻²) was attained when the concentrations of periodate and PEI and immobilization time were 0.4 mM, 0.4 % and 12 h, respectively, with 1mg ml⁻¹ heparin solution. Also, the lowest heparin amount was 10.7 % (41.08 µg cm⁻²), which was gained when periodate, PEI and immobilization time were 0.4mM, 0.4% and 36 h, respectively.

Table 2.2. Coded and non-coded values of the experiment variables

	Variables	- α	-1	0	1	α
A	NaIO ₄ (M)	0,023	0,25	0,1	0,4	0,50
B	PEI %	0,03	0,4	0,95	1,5	1,87
C	Immobilization time (h)	3,81	12	24	36	44,18

The response data were analyzed by the application of RSM (response surface method) yielding the following regression equation, which is an empirical relationship between heparin amount and the test variables in coded units:

$$Y = 122,55 - 128,143 A - 121,84 B - 2,323 C + 39,028 AB - 1,518 AC + 1,815 BC + 273,626 A^2 + 34,72 B^2 + 0,016 C^2$$

Where Y is heparin concentrations produced as function of periodate concentration (A), PEI concentration (B) and immobilization time (C). The statistical significance of the above equation was checked by the F test, and the ANOVA for the response surface quadratic model, **Table 2.4**. The model F value of 29.83 and values of probability (P) > F (0.02) indicated that the model terms were significant. The regression equation showed that the R² was 0.7767, which indicated aptness of the model. This result indicates that approximately 73% of the variability in the dependent variable (response) can be explained by this model. The adjusted R², which corrects the R² value for the sample size and for the numbers of terms,

was 0.4419. The lack of fit F value was 71.10. Non-significant lack of fit indicated that the model was a good fit.

Table 2.3. Response surface central composite design and experiments

Run	A	B	C	heparin immobilized Measured (%)	heparin immobilized predicted (%)
1	-1 (0,1)	-1 (0,4)	-1 (12)	53,0387273	52,21757
2	-1 (0,1)	-1 (0,4)	1 (36)	26,3511015	29,02208
3	-1 (0,1)	1 (1,5)	-1 (12)	29,257266	19,00521
4	-1 (0,1)	1 (1,5)	1 (36)	35,2020883	43,71886
5	1 (0,4)	-1 (0,4)	-1 (12)	63,0621712	54,03772
6	1 (0,4)	-1 (0,4)	1 (36)	10,1695428	19,91392
7	1(0,4)	1 (1,5)	-1 (12)	36,8832328	33,70458
8	1 (0,4)	1 (1,5)	1 (36)	47,1764418	47,48992
9	-1,29 (0)	0 (0,95)	0 (24)	33,7576942	33,44484
10	1,29	0 (0,95)	0 (24)	37,1156391	38,14646
11	0 (0,25)	-1,29	0 (24)	52,2307354	50,45800
12	0 (0,25)	1,29	0 (24)	43,2277071	45,71841
13	0 (0,25)	0 (0,95)	-1,29	15,3823939	28,97782
14	0 (0,25)	0 (0,95)	1,29	33,942316	21,06485
15	0 (0,25)	0 (0,95)	0 (24)	19,4592779	18,38220
16	0 (0,25)	0 (0,95)	0 (24)	17,428299	18,38220

Note: periodate concentration (A), PEI concentration (B) and immobilization time (C)

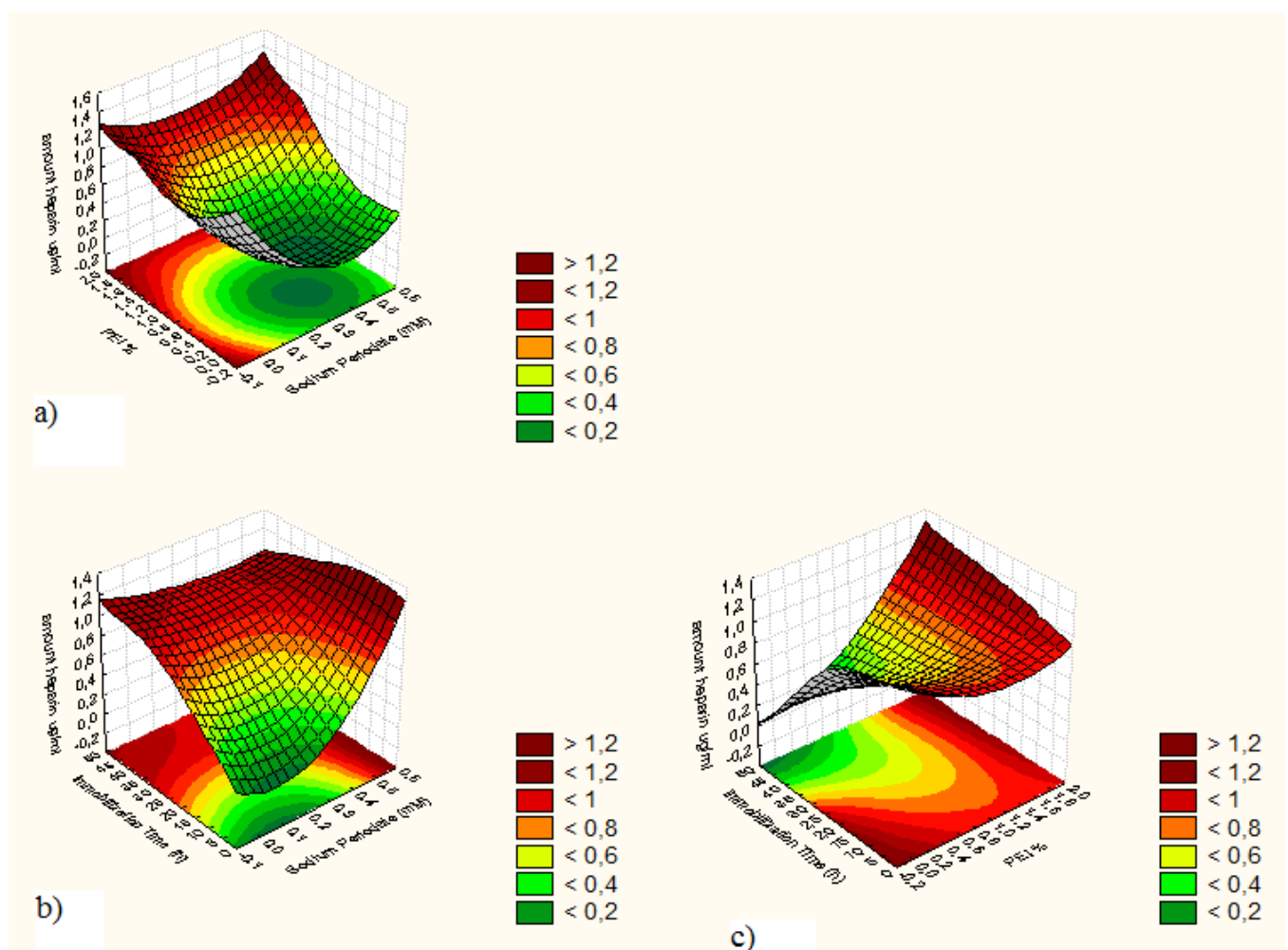
Table 2.4. Analysis of variance (ANOVA) for the quadratic model

Source	SS	df	MS	F	P
A (L)	26,683	1	26,683	12,9378	0,172631
A (Q)	351,144	1	351,144	170,2566	0,048695
B (L)	27,116	1	27,116	13,1476	0,171314
B (Q)	1021,889	1	1021,889	495,4761	0,028581
C (L)	75,583	1	75,583	36,6474	0,104221
C (Q)	51,043	1	51,043	24,7490	0,126285
AB	82,937	1	82,937	40,2132	0,099571
AC	59,714	1	59,714	28,9531	0,116978
BC	1147,643	1	1147,643	556,4498	0,026972
Lack of Pure	733,223	5	146,645	71,1026	0,089785
Total SS	3293,436	15			

Note: R² 0,7767, adjusted R² 0,4419, df degree freedom; SS Sum of squares, MS mean square; L linear, Q quadratic,

Figure 2.2a represents the concentrations effects of periodate and PEI to increase heparin immobilization. When periodate concentration was at low level and PEI was upper 1.0 %, we obtained the yield of heparin was high ($0.6\text{--}1.4 \mu\text{g cm}^2$). The effects of periodate concentration and immobilization time, Figure 2.3b, did not improve the heparin immobilization if their remained sodium periodate concentration below 0.4mM and 10 hours, respectively. The interaction of PEI concentration and immobilization time, **Figure 2.2c**, improve better condition for heparinization when the PEI exceeds 0.4% and immobilization time high than 5 hours and lower than 20 hours, the amount of heparin immobilized was $0.8\mu\text{g cm}^{-2}$.

Figure 2.2. Response surface plot and contour plot. (a) Combined effects of concentration periodate and concentration PEI. (b) Combined effects of concentration periodate with immobilization time. (c) Combined effects of concentration PEI with immobilization time.



The quantity of heparin immobilization on cellulosic membrane support was determined using methylene blue dye assay and the density was found ($41.08 - 254.70 \mu\text{g cm}^{-2}$). The conditions that were expected to give maximum uptake was periodate concentration 10mM for 1 h, PEI 0.4% for 1 h, sodium borohydrate 0.08mM for 90 minutes and immobilization time for 12 h under mild a moderate agitation .

4. Discussion

Biocompatible surface is very essential for the biomedical devices in direct contact with blood, such as vascular stents. Several approaches to improve their blood compatibility including immobilizing biomolecules have been explored and their focused either on the improvement of the blood compatibility or the cytocompatibility of inorganic and organic biomaterials (Kemp and Linhardt, 2010; Xing, et al. 2010; Huang et al. 2003). Murugesan et al (2008) reported that heparin immobilized on surface, enhances various surface properties show reduced platelet adhesion, reduced loss of blood cells and increased plasma recalcification time and activated partial thromboplastin time, resulting in improved biocompatibility without compromising thromboresistent properties.

Heparin has been covalently immobilized onto organic and inorganic support through its carboxylic acid groups or hydroxyl groups. The anticoagulant activity of heparin is partially influenced by the carboxyl groups (Miyuda et al. 1980). The heparin has been activated using EDAC/NHS and subsequently coupled to an amino functionalized support. After heparin EDAC/NHS activation their carboxylic acid group was exposed more binding sites to the antithrombin, therefore, the interaction between the heparin and the antithrombin was enhanced (Wissink, M et al. 2000).

Chemical modifications of cellulosic membrane proposed by Cavalcanti et al (2006) based in sodium periodate oxidation to trypsin immobilization, that shown also able to heparin immobilization. Periodate oxidation specifically react with molecules that have adjacent hydroxyl groups when applied to exopolysaccharide membrane, the C2-C3 bond in the glucopyranoside ring is cleaved and the adjacent hydroxyl groups at these positions are converted to aldehydes producing dialdehyde cellulose (Nikolic et al. 2010). Singh et al (1982) studies properties of periodate oxidation of cellulose structures shown a complex

process, the random initial oxidation occurs in the amorphous region of cellulose, flowed by the oxidation of the surface of crystallites. Prolonged oxidation times and higher periodate concentration could be necessary to access into the inner region of the polymer. In this study, different concentration of sodium periodate (0.1 – 0.35mM) with different reaction time (60 – 180 min) were determined to heparinize, but higher periodate concentration did not improved better heparin immobilization.

The amount of heparin coated and its activity anticoagulant of support was directly related the amine group added to support by poly-(ethylenimine) (PEI), especially when PEI concentration was higher than 1.0% shows a amount of heparin higher than $1.2 \mu\text{g cm}^{-2}$ and activity above 2 min. Results in agree with Xia et al. (2011) that related PEI concentration with increase heparinization such as their activity. However, this amine add can be react with aldehydes, created by periodate oxidation, formed Schiff bases and this structure could be interfering with heparinization decreasing amount of heparin covalent binding. It can be used to convert specifically the Schiff base with reducing agent such as sodium cyanoborohydride or sodium borohydrate that converts any aldehydes not yet reacted into nonreactive hydroxyls (De la Orden et al. 2004).

Heparin has a broad molecular weight distribution and different heparin densities on various surface were report, Chen et al (2005) covalently immobilization heparin silicone surface with density of $0.68 \mu\text{g cm}^{-2}$, Kang et al (2001) report a heparin density of approximately $1.1\text{-}1.3 \mu\text{g cm}^{-2}$ on polyurethane surface, Li et al, (2001) $4.9 \mu\text{g cm}^{-2}$ on poly(ethylene oxide) and Sack et al (2011) $0.23 \mu\text{g cm}^{-2}$ obtained by gold support. Our studies were higher than theses we could obtained range heparin densities between $41.08 - 254.70 \mu\text{g cm}^{-2}$.

5. Conclusion

Cellulosic membrane was functionalized via chemical method and heparin immobilization. The method RMS was successfully applied to the optimization of heparinization. The predicted model of heparinization was developed in terms of immobilization factors by RSM and an ANOVA test was performed. The concentration of periodate and PEI such as immobilization time were the most significant factors to heparinization. The optimum values for concentration periodate, PEI and immobilization time

were found to be 0.1 mM, 0.4 % and 12 hours, respectively. This resulted in a predicted value 52.21 % compared with 53.04 % obtained from the one-at-a-time method if used NaIO₄ 0.10mM and PEI 0.4%, both with reaction time for 1 hour, and BH₄ 0.08 M for 90 min, and immobilization time 12 h under low stirring. Therefore, the RSM approach can be quite efficient and useful for the optimization of heparin immobilization, and the optimal conditions provide import parameters for scaled-up industry.

6. Acknowledgements

Authors thanks the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq/CAPES) for financial support and a special thankful to Dr. Benício Barros (*in memoriam*).

7. References

- [1]. Cavalcante, A.H.M.; Carvalho J, L.B.; Carneiro-da-Cunha, M.G. 2006. Cellulosic exopolysaccharide produced by *Zoogloea* sp as film support for trypsin immobilization. *Biochemical Engineering Journal*, 29, 258-261.
- [2]. Chen, H.; Chen, Y.; Sheardown, H.; Brook, M.A. 2005. Immobilization of heparin on a silicone surface through a heterobifunctional PEG spacer. *Biomaterials*, 26, 7418-7424.
- [3]. De la Orden, M.U; Matías, M.C.; Urreaga, J.M. 2004. Spectroscopic study of the modification of cellulose with polyethylenimines. *Journal of Applied Polymer Science*, 92 (4), 2196-2202.
- [4]. Huang, N. et al. 2003. Surface modification for controlling the blood-materials interface. *Engineering Materials*, 288-289,295 -298.
- [5]. Kang, I.K.; Seo, E.J.; Huh, M.W.; Kim, K.H. 2001. Interaction of blood components with heparin-immobilized polyurethanes prepared by plasma glow discharge. *Journal of Biomaterials Science, Polymers Edition*, 12 1091-1108.
- [6]. Kemp, M.M; Linhardt, R.J. 2010. Heparin-based nanoparticles. *Nonomed Nonobiotechnol*, 2, 77-87

- [7]. Langer, R.; Tirrell, D.A. 2004. Designing materials for biology and medicine. *Nature*, 428, 487-492.
- [8]. Li, G. et al. 2010. Coimmobilization of heparin/fibronectin mixture on titanium surface and their blood compatibility. *Colloids and SurfaceB: Biointerfaces*, 81, 255-262.
- [9]. Linhart, R.J.. Perspective. 2003 Claude S. Hudson Award address in Carbohydrate Chemistry. Heparin: Structure and Activity. *Journal Medicinal Chemistry* 24, 2551-2554.
- [10]. Miyura, Y. et al. 1980. *Journal Biomed Mater Res*, 14, 619-623.
- [11]. Mulloy, B.; Hogwoog, J.; Gray, E. 2010. Assay and reference materials for current and future applications of heparins. *Biologicals* 38(4), 458-466.
- [12]. Murugesan, S.; Xie, J.; Linhardt, R. J. 2008. Immobilization of heparin: approaches and applications. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 8, 80-100.
- [13]. Nikolic, T. et al. 2010. Sodium periodate oxidized cotton yarn as carrier for immobilization of trypsin. *Carbohydrate Polymers*, 82 (3), 976-981.
- [14]. Oliveira, G.B; Carvalho Jr., L.B; Silva, M.P.C. 2003. Properties of carbodiimide treated heparin. *Biomaterials* 24, 4777-4783.
- [15]. Parterson-Beedle, M et al. 2000. A cellulosic exopolysaccharide produced from sugarcane molasses by a *Zoogloea sp.* *Carbohydrate Polymers* 42, 375-385.
- [16]. PI9603700-8: MELO, FAD, Biopolímero produzido por materiais provenientes da cultura da cana-de-açúcar via microrganismo *Zoogloea sp.* para utilização nas áreas de química e bioquímica: fio cirúrgico e membranas biodegradáveis., 1999
- [17]. Sack, K. N. et al. 2011. Surface modification with an antithrombin-heparin complex for anticoagulation: studies on a model surface with gold as substrate. *Acta Biomaterialia*, 6 2911-2919.
- [18]. Sanchez, J; Elgue, G; Risenfeld, J; Olsson, P. 1998. Studies of adsorption, activation, and inhibition of factor XII on immobilized heparin. *Thrombosis Research* 89, 41-50.
- [19]. Singh, M; Ray, A.R.; Vasudevan, P. 1982. Biodegradation studies on periodate oxidized cellulose. *Biomaterials*, 3(1), 16-20.
- [20]. Wang, Z., et al. 2011. Response surface optimization of the heparin N-deacetylation in producing bioengineered heparin. *Journal of Biotechnology*, 156 (3), 188-196.
- [21]. Wissink, M.J.B. et al. 2010. Endothelial cell seeding of (heparinized) collagen matrices: effects of bFGF pre-loading on proliferation (after low density seeding) and pro-coagulant factors. *Journal Controlled Release*, 67, 141-155.

- [22]. Xia, B. et al. 2011. Preparation and characterization of chemically-crosslinked polyethyleneimine films on hydroxylated surfaces for stable bactericidal coatings. *Thin Solid Films*, 520 (3), 1120-1124.
- [23]. Xing, Zhin-Cai et al. 2010. Immobilization of biomolecules on the surface of inorganic nanoparticles for biomedical applications. *Science and Technology of Advanced Materials*, 11.

7. ARTIGO 2

Separação por afinidade de antitrombina plasmática

Será submetido à revista Biomedical Chromatography; Fator de Impacto 1.545; ISSN: 1099-0801.

PURIFICATION OF ANTITHROMBIN BASED ON AFFINITY BINDING USING CELLULOSIC MEMBRANE COATED WITH HEPARIN.

Melo, A. T.^{1,2}; Aguiar, J. L.³ Carvalho Jr, L.B.²

¹ Programa de Pós-graduação em Ciência Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil.

²Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), UFPE, Recife, PE

³Departamento de Cirurgia, UFPE, Recife, PE

Corresponding at:

Carvalho Jr., L. B.

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

Av. Prof Moraes Rego, 1235- Cidade Universitária- Recife/PE

50670-901 Brazil

Fax number: 55 81 2126 8000

E-mail: lbcj@hotmail.com.br

ABSTRACT

Antithrombin is the major physiological serine protease inhibitor of coagulation and has the ability to inhibit angiogenesis and tumor growth and shows a strong affinity towards heparin. This study aimed to purify antithrombin using cellulosic membrane coated with heparin. This support is produced from fermentation of sugarcane molasses by *Zoogloea sp.* The cellulosic membrane was first oxidized with 10mM sodium periodate; amine group was introduced by 0.4% polyethyleneimine and lastly reduced with 0.08 mM sodium borohydrate. Finally, heparin (1 mg/ml) activated via EDAC-NHS was offered to the activated cellulosic support. The amount of immobilized heparin and its anticoagulant activity were established employing methylene blue dye binding assay and the activated partial thromboplastin time (aTTP), respectively. The affinity separation was performed with human plasma for 1 h at 4°C under stirring. Then elution was carried out with NaCl stepwise elution (0.5 to 2 M) with PBS buffer pH 7.2 monitoring protein at 280nm. SDS-PAGE was carried out for proteins eluted and was stained with silver. The immobilization yield was about 134.53 to 226.06 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and the aTTP was longer than 10 min. Protein eluted was quantified by Lowry, aTTP test that shows anticoagulant activity and band appears in all eluted samples equivalent to the antithrombin standard (58 kDa) but is high in 0.5M NaCl elution. Thus the results showed a minimal non-specific interaction with other proteins and heparin-support were exploited successfully for antithrombin purification from human plasma.

Keywords: antithrombin, affinity separation, cellulosic membrane.

1. Introduction

Heparin is a polysaccharide with heterogeneity in its sequence and variables molecular weight (5- 40 kDa). Like the other glycosaminoglycan, heparin is build up of disaccharide repeating units, in which glucuronic acid and N-acetyl glucosamine residues and it's elongated from a specific linked region attached to serine residues in the protein core (Gray et al. 2008). Heparin consists mostly of S-domains interrupted by short unsulphated stretches. The distribution of S-domains through heparin is important in cases where the polysaccharide

binds to more than one protein molecules (Stringer et al. 2002). The anticoagulant activity of heparin is due to the presence of antithrombin-binding sequence pentasaccharide [GlcNAc(SO₄)-GlcA-GlcNS(3SO₄)-IdoA(2SO₄)-GlcNS(6SO₄)] (Yabeet al, 2001; Lindahl et al. 1980). Then, heparin binding on antithrombin in three distinct regions of the protein, N-terminal region, the N-terminal end of helix A and all of helix D together with its N-terminal loop. Positively charged basic residues in each of these regions interact through ionic and hydrogen bonds with negatively charged sulfate and carboxylate groups on the heparin pentasaccharide sequence (Olson et al. 2010)

Serine protease inhibitor, antithrombin (AT), plays a critical role in regulating proteinases in diverse physiologic process such as development, wound healing and the immune response including trypsin, chymotrypsin, plasmin, and most coagulation factors, such as thrombin, factors Xa, IXa, XIa and XIIa, and plasma kallikrein (Gettins, 2002; Van Boven and Lane, 1997). Antithrombin may occur as several conformational variants. The native form of AT is a major regulator of blood clotting and latent form have been shown antiangiogenic properties, this can be generated by heat treatment and proteinase (Larsson, H. et al, 2000).

Although the traditional plasma fractionation methods are based on ethanol fractionation or several step fractionation on chromatographic techniques. The use those methods has improved pure plasma, such as coagulation factors. Affinity chromatography had been introduced for extraction of plasma AT and other proteins, such as factor VIII, von Willebrand-factor, Factor IX and Protein C. (Burnouf, T and Rodosevich, M. 2001). The aim of this paper was to develop a new strategy for purification of Antithrombin using one-step purification to simplify chromatography analysis. In addition, this new methodology will allow for the purification another AT sources besides human plasma.

2. Material and Methods

2.1. Materials

Heparin (Hepamax S, 5000 U) was obtained from Blasiegel, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDAC), N-hydroxysuccinimide ester (NHS) and polyethyleneimine solution 50% were from Sigma-Aldrich Chem. Co., Methylene blue, Sodium Periodate and Sodium Borohydrate were from Merck AG, cellulosic membrane (PI9603700-8) Laboratory of the Sugarcane Experimental Station at Carpina (UFRPE), activated partial thromboplastin time (aTTP) was performed using the kit Labtest Diagnostic SA. All other chemicals were analytical grade and were purchased from Fluka analytical.

2.2. Heparin activation

Carbodiimide was added at heparin (w/w) to prepared 5 ml of heparin solution (3 mg/ml) following was added NHS to stabilize heparin-EDAC complex (M/M with EDAC) previously adjusted to pH 4.7-4.8 with 1N HCl. The reaction mixture was kept at 25°C stirring for 1 h with pH controlled. After that the pH was increased to 8.0 with NaOH.

2.3. Membrane treatment and immobilization with heparin

The exopolysaccharide membrane (1cm²) was treated with sodium periodate 10mM for 1h, polyethyleneimine 0.4% for 1h and sodium borohydrate 0.08 mM for 90 min. Then, 1 mL of heparin activated solution (1mg/ml) was incubated for 12 h and kept stirring.

2.4. In vitro anticoagulant assay and whole blood incubation

For the activated partial thromboplastin time (aPTT) measurement following kit instructions and to observe the clot formation on membrane was realized incubated heparinized membrane into cell culture plate with whole blood (1.5 mL) at 37°C for 5 min. After the blood clot the membrane was washed with PBS buffer pH 7.2 with 0.5 mM NaCl and photographed.

2.5. Heparin quantification assay

The percentage of heparin immobilization was established employing methylene blue dye binding assay. This experiment was carried based on Oliveira et al. (2003) with modifications: dye solution (0.005% of methylene blue solution with 0.01N HCl and 0.2% NaCl) was poured into test tubes contains 87 μ l of samples and added water until 1.5 mL, stirred with vortex and absorbance measured at 664 nm.

2.6 Plasma sample

Human blood was draw from healthy adults and collected by venipuncture into 4 ml sterile vaccum tubes with anticoagulant present. The blood was centrifuged at 2000 $\times$ g for 10 min at 25°C. The platelet-poor plasma supernatant was collected.

2.7 Antithrombin purification

Cellulosic membranes heparinized were incubated with human plasma, pure or diluted condition, at 4°C for 1 h under stirring. After, the sample were wash with PBS pH 7,2 following protein elution was performed by gradient with NaCl in the same buffer. Protein concentration was monitored at $\lambda = 280$ nm and quantify by Lowry's method (1951). Samples were 48 h dialyzed and lyophilized. SDS-PAGE was performed according to Laemmli (1970) in the presence of 2-ME. Proteins were silver stained.

3. Results and Discussion

Heparin coat supports are a powerful technology for separating various target proteins because it is able to bind a wide range of biomolecules, including enzymes, serine proteases inhibitors and growth factors (Karlsson and Winge, 2004), especially because heparin are negatively charged polydispersed linear polysaccharide. Heparin immobilization allows that biomolecules can be specifically and reversibly released to bind to heparin. An advantage of this chromatography is that heparin-binding proteins can be conveniently enriched using its

concentration effect, important for separating low abundance proteins for analysis (Lei et al, 2008).

In this study heparin affinity separation by cellulosic support obtained from heparin activated with EDAC/NHS and cellulosic membrane functionalized with amine groups have was able to purify 47.80 – 473.25 $\mu\text{g/ml}$ of protein after 1h of human plasma incubation at 4°C. This amount of protein was directly related to heparin coated on support and how many carboxylic groups were available (Miyuda et al. 1980). The amount of heparin immobilized on support was between 41.08 – 254.70 $\mu\text{g cm}^{-2}$, and the aTTP coagulation time was longer than 10 min. Similar characteristics were obtained by Farooqui (2001) using heparin-sepharose support, and Zhao and collaborated (2001) used PGMA beads 1.0-1.6mg/g bead. The whole blood test results (**Figure 3.1**) no clot remained attached to membrane as opposite to control.

Antithrombin was purified (27.625 – 159,67 $\mu\text{g/ml}$) after a unique incubation with human plasma by NaCl stepwise, but especially at 0.5M NaCl with human plasma diluted or not (**Figure 3.2**). Purification of antithrombin usually occurs by successive chromatography steps, depletion phase and affinity separation following size exclusion techniques (Kong et al, 2011). One-step chromatography purification this simplifies, that shown in your results.

Figure 3.1. Whole blood clotting test using cellulosic membrane (control) and membrane-heparin. Both membranes were incubated for 5 min before (left) and after being wash with PBS pH 7.2, 5 times (right).

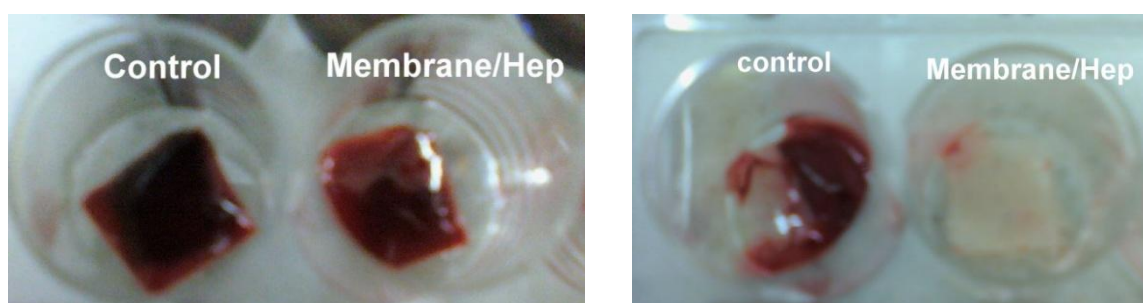


Figure 3.2. SDS-PAGE (12,5% acrylamide gel) of the protein purified with membrane-heparin in reducing conditions. Lane 1-4 samples from ten times plasma diluted plasma and Lane 5-8 samples from undiluted plasma. The bands corresponding to the antithrombin (arrows) presented aTTP values higher than 5 min.



4. Conclusion

This paper shown that heparin coat on cellulosic support can be used efficiently used as support to separate protein for human plasma also purifies antithrombin with a good quantity and quality. Considering cheapest support and easier manipulation in comparison with others support.

5. Acknowledgements

Thanks to CAPES/CNPq and University Federal of Pernambuco for the financial support.

6. References

- [1].Burnouf T.; Radosevich, M. 2001. Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins for therapeutic use. *Journal Biochemical and Biophysical Methods*, 49, 575-586.
- [2].Farooqui, A.A. 2001. Purification of enzymes by heparin-sepharose affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*, 184 (3), 335-345.
- [3].Gettins, P. 2002. Serpin structure, mechanism, and function. *Chemical Reviews*, 102, 4751-4803.
- [4].Gray, E; Mulloy, B.;Barrowcliffe, T.W. 2008. Heparin and low molecular weight heparin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 99, 807-818.
- [5].Karlsson, G.; Winge, S. 2004. Separation of latent, prelatent, and native forms of human antithrombin by heparin affinity high-performance liquid chromatography. *Protein Expression and Purification*, 33, 339-45.
- [6].Kong, Y. et al. 2011. Facile purification and characterization of recombinant human antithrombin III from transgenic goat milk. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86 (10), 1303-1309.
- [7].Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- [8].Larsson, H. et al. 2000. Antiangiogenic effects of latent antithrombin through perturbed cell-matrix interactions and apoptosis of endothelial cells. *Cancer Research*, 60, 6723-6729.
- [9].Lei, T et al. 2008. Heparin chromatography to deplete high-abundance proteins for serum proteomics. *Clinica Chimica Acta*, 388, 173-178.
- [10].Lindahl, U. et al. 1980. Evidence for a 3-O-sulfated D-glucosamine residue in the antithrombin-binding sequence of heparin. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 77, 6551-6555.
- [11].Oliveira, G.B; Carvalho Jr., L.B; Silva, M.P.C. 2003. Properties of carbodiimide treated heparin. *Biomaterials* 24, 4777-4783.

- [12]. Olson, S.T. et al. 2010. Molecular mechanisms of antithrombin-heparin regulation of blood clotting proteinases. A paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family proteinase inhibitors. *Biochimie*, 92, 1587-1596.
- [13]. Stringer, S.E. et al. 2002. Characterization of the binding site on heparan sulfate for macrophage inflammatory protein 1a. *Blood*, 100, 1543-1550.
- [14]. Van Boven, H.H.; Lane, D.A. 1997. Antithrombin and its inherited deficiency states. *Seminars in Hematology*, 34, 188-204.
- [15]. Yabe, T. et al. 2001. Portable sulphotransferase domain determines sequences specificity of heparan sulfate 3-O-sulphotransferase. *Biochemical Journal*, 359, 235-241.
- [16]. Zhao, Y et al. 2001. Three novel high performance affinity chromatography media for the separation of antithrombin III from human plasma. *Biomedical Chromatography*, 15 (8), 487-492.
- [17]. Lowry, OH et al 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry*, 193 (1), 265-275.
- [18]. Miyura, Y. et al. 1980. *Journal Biomed Mater Res*, 14, 619-623.

8. PERSPECTIVAS

- Aplicar esse biomaterial *in vivo* com a ajuda do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal de Pernambuco sob os cuidados do Profº José Lamartine Aguiar.
- Criar um gel da membrana, imobilizada covalentemente a heparina, para que possa ser empacotada em coluna e poder ser utilizada comercialmente como suporte cromatográfico.