



**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular**

JULIA FREITAS DALTRO VIDAL

**ESTUDO EVOLUTIVO E BIOQUÍMICO DE
SERINOPROTEASES DA PEÇONHA DE
TOXICÓFEROS**

Brasília - DF

2024

JULIA FREITAS DALTRO VIDAL

**ESTUDO EVOLUTIVO E BIOQUÍMICO DE SERINOPROTEASES DA PEÇONHA DE
TOXICÓFEROS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas (Biologia Molecular).

Orientador: Prof. Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa.

Brasília - DF
Outubro de 2024

Tese de doutorado de autoria de Julia Freitas Daltro Vidal, intitulada “Estudo evolutivo e bioquímico de serinoproteases da peçonha de toxicóferos” apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) da Universidade de Brasília, sob orientação do Professor Doutor João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade de Brasília

Presidente

Prof. Dr. Eládio Oswaldo Flores Sanchez

Fundação Ezequiel Dias

Membro Externo

Dr^a. Mônica Caraméz Triches Damaso

Embrapa Agroenergia

Membro Externo

Prof^a. Dr^a. Mariana de Souza Castro

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade de Brasília

Membro Interno

Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade de Brasília

Membro Interno - Suplente

Brasília-DF

2024

À minha mãe, por sempre acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente:

À minha família, por todo o suporte e apoio durante esses longos e difíceis anos. Em especial à minha mãe, Bárbara, por toda a sua dedicação e confiança nas minhas capacidades; e ao meu namorado, Diogo, pelo companheirismo e apoio emocional dado de forma incondicional.

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Alexandre, por toda a aprendizagem e incentivo à pesquisa durante os doze anos em que tive o prazer de ser sua aluna. Aquele convite de estágio no final de 2011 quando ainda era sua aluna de bioquímica me levou a entender o que queria para a minha vida profissional. Sou muito grata a isso.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Eládio Sanchez, Dr^a. Mônica Damaso, Prof^a. Dr^a Mariana Castro e Prof. Dr. Osmino Júnior. Muito obrigada por dedicarem seu tempo para contribuir com esse trabalho. Um agradecimento especial ao Prof. Eládio por aceitar se deslocar de Minas Gerais para Brasília para participar da defesa desse trabalho.

À Lavínia e à Isabela, alunas de iniciação científica brilhantes (hoje já bacharelas) cuja formação tive o prazer em participar. A participação delas na execução desse trabalho foi fundamental ao ponto de poder afirmar, categoricamente, que não teria sido possível sem elas. Sou imensamente grata às duas.

Aos professores Dr^a. Sônia de Freitas, Dr. Napoleão Valadares, e Dr. Aisel Garay, por todos os ensinamentos e ajuda prestada nos momentos de necessidade. Vocês são uma grande inspiração para mim.

À minha grande amiga Gideane Mendes, pelo suporte científico e emocional durante toda a minha jornada acadêmica. Às amigas Amanda Souza e Izadora de Oliveira, pelo suporte e toda a ajuda durante o desenvolvimento desse projeto. Também agradeço aos outros colegas da biofísica, Jônatas Lima, Renata Bueno, Diogo de Sá, Matheus Ferroni, Daniel Vieira, Liem Garay, Luana Fernandes e em especial ao técnico Chiquinho. Obrigada pelo suporte, pelo convívio e por transformarem o Laboratório de Biofísica Molecular em um lugar tão caloroso. Agradeço também aos outros colegas que passaram por esse laboratório durante os 11 anos em que estive por lá. Vocês foram muito importantes na minha jornada de formação como cientista e indivíduo. O Laboratório de Biofísica Molecular foi, durante anos, não somente meu local de trabalho, mas também minha segunda casa.

À Dr^a Maria Fátima Grossi de Sá, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório (LIMMP) na Embrapa CENARGEN após a finalização da minha bolsa de doutorado. Agradeço também aos colegas do LIMMP por todo o companheirismo.

Aos meus amigos pessoais e a todos os outros colegas da Universidade de Brasília que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa sem a qual não seria possível realizar esse trabalho. Também agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) pelo suporte financeiro necessário à execução desse projeto.

Por fim, agradeço a mim, por ter sido forte e não ter desistido apesar de toda a tempestade. Sinto orgulho em dizer que eu consegui.

O primeiro pecado da humanidade foi a fé. A primeira virtude foi a dúvida.
- Carl Sagan.

RESUMO

As serinoproteases da peçonha de répteis do clado Toxicofera são toxinas que atuam no sistema hemostático da presa. Suas versões presentes em serpentes são extensivamente estudadas há décadas. Em contrapartida, pouco se conhece bioquimicamente as de lagartos. Apesar da sua elevada similaridade de sequências, essas enzimas atuam em uma ampla variedade de substratos, apresentando, entre outros, atividade semelhante à calicreína e à trombina. A evolução que resultou nessa diversificação pode ser estudada através da técnica de reconstrução de sequências ancestrais. Nesta abordagem, as sequências ancestrais são construídas a partir de sequências modernas, permitindo-nos compreender as propriedades das proteínas extintas. Este trabalho tem como objetivo estudar a evolução das serinoproteases de peçonha através da reconstrução da sequência ancestral de Viperidae e de sua caracterização, além da caracterização de uma serinoprotease da peçonha do lagarto *Varanus komodoensis*. A filogenia dessas enzimas assim como a sequência ancestral de Viperidae foram construídas utilizando-se o software MEGA-X. Ambas as enzimas foram expressas em *Komagataella phaffii* e purificadas por cromatografia de afinidade a Ni^{2+} . A deglicosilação das proteínas foi feita com a enzima PNGase F e os testes enzimáticos realizados utilizando-se ambas glicosiladas e deglicosiladas. A sequência reconstruída apresentou bons valores estatísticos. As enzimas expressas apresentaram tamanho diferente do esperado, o que foi confirmado como sendo causado por N-glicosilações, uma modificação pós-traducional prevalente nessas toxinas. Testes de atividade mostraram que a enzima ancestral apresenta atividade sobre o fibrinogênio apenas quando deglicosilada, enquanto a de *V. komodoensis* somente quando glicosilada. A clivagem do fibrinogênio não gerou formação de coágulos por nenhuma das enzimas, indicando que ambas atuam na depleção de fibrinogênio plasmático. A enzima ancestral mostrou atividade sobre um substrato sintético de calicreína tanto glicosilada como deglicosilada, o que endossa a ideia de que a calicreína é o ancestral das serinoproteases da peçonha. Além disso, a ancestral demonstrou possuir estabilidade estrutural, não sendo desnaturada até 95°C. Esse estudo foi capaz de ampliar o conhecimento da diversidade e da evolução funcional e estrutural dessas toxinas de toxicóferos.

Palavras-chave: Toxina da peçonha, reconstrução de sequência ancestral, toxicofera, atividade enzimática.

ABSTRACT

The serine proteases found in the venom of reptiles from the Toxicofera clade are toxins that act on the prey's hemostatic system. Its versions present in snakes have been extensively studied for decades. On the other hand, little is known biochemically about lizards' enzymes. Despite their high sequence similarity, these enzymes act on a range of substrates, presenting, among others, activities similar to kallikrein and thrombin. The evolution that resulted in this diversification can be studied through the ancestral sequences reconstruction technique. In this approach, ancestral sequences are reconstructed from modern sequences, allowing us to understand the properties of extinct proteins. This work aims to study the evolution of venom serine proteases through the reconstruction of the ancestral sequence of Viperidae and its characterization, in addition to the characterization of a serine protease from the venom of the lizard *Varanus komodoensis*. The phylogeny of these enzymes and the ancestral sequence of Viperidae were built using the MEGA-X software. Both enzymes were expressed in *Komagataella phaffii* and purified by affinity chromatography by Ni²⁺. Proteins were deglycosylated using the PNGase F enzyme. Enzymatic tests were performed using both glycosylated and deglycosylated proteins. The reconstructed sequence showed good statistical values. The expressed enzymes were different in size than expected, which was confirmed to be caused by N-glycosylations, a post-translational modification prevalent in these toxins. Activity tests showed that the ancestral enzyme presents activity against fibrinogen only when deglycosylated, while that of *V. komodoensis* only when glycosylated. Fibrinogen cleavage did not generate clot formation by either enzyme, indicating that both act in fibrinogen depletion. The ancestral enzyme showed activity against a synthetic kallikrein substrate when it was both glycosylated and deglycosylated, in agreement with the belief that kallikrein is the ancestor of venom serine proteases. Additionally, the ancestral enzyme exhibited structural stability, remaining stable even at 95°C. This study was able to enhance the understanding of the diversity and functional and structural evolution of these toxins in venomous reptiles.

Keywords: Venom toxin, ancestral sequence reconstruction, toxicofera, enzymatic activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árvore filogenética dos grupos de répteis pertencentes ao clado Toxicofera.....	21
Figura 2. Mecanismo catalítico das serinoproteases.....	24
Figura 3. Ilustração esquemática da cascata de coagulação e processos hemostáticos de atuação das serinoproteases de peçonha.....	25
Figura 4. Estrutura do fibrinogênio.....	16
Figura 5. Estrutura de uma serinoprotease da peçonha de <i>Gloydius halys</i> (PDB ID: 4E7N)	31
Figura 6. Etapas para a reconstrução de sequências ancestrais.....	38
Figura 7. Árvore filogenética das serinoproteases da peçonha de serpentes e lagartos.....	55
Figura 8. Sequência ancestral dos viperídeos reconstruída com o uso do programa FireProt.....	56
Figura 9. Sequência ancestral dos viperídeos reconstruída com o uso do programa MEGAX.....	56
Figura 10. Alinhamento entre as sequências ancestrais de viperídeos preditas pelos programas MEGAX e FireProt.....	57
Figura 11. Alinhamento entre a sequência da SVSP ancestral e sequências similares com função caracterizada presentes nos bancos de dados (SwissProt e PDB)	58
Figura 12. Estrutura tridimensional predita pelo AlphaFold 2 para a SVSP ancestral.....	59
Figura 13. Gel de agarose 0,8% confirmando a linearização com a enzima PmeI do vetor pPICZαA clonado com o gene para a SVSP ancestral.....	60
Figura 14. Placas da transformação das células de <i>K. phaffii</i> com o vetor contendo o gene para a SVSP ancestral.....	60
Figura 15. Placas do teste de determinação do fenótipo muts e mut+ das células de <i>K. phaffii</i> transformadas com o vetor contendo o gene para a SVSP ancestral.....	61
Figura 16. Western blot das proteínas secretadas pela <i>K. phaffii</i> transformada com o vetor contendo o gene para a SVSP ancestral.....	62
Figura 17. Western blot das proteínas secretadas pela <i>K. phaffii</i> durante o teste de otimização de expressão da SVSP ancestral.....	63
Figura 18. Purificação da SVSP ancestral por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (Ni ²⁺)	64
Figura 19. SDS-PAGE 12% da SVSP ancestral pós deglicosilação com PNGase F.....	66
Figura 20. Espectros de MS da SVSP ancestral glicosilada e deglicosilada.....	67
Figura 21. SDS-PAGE 12% mostrando a atividade da SVSP ancestral glicosilada e deglicosilada sobre o fibrinogênio em diversas proporções molares de enzima:fibrinogênio.....	70

Figura 22. SDS-PAGE 12% mostrando a atividade da SVSP ancestral glicosilada e deglicosilada sobre o fibrinogênio em diferentes tempos de reação.....	70
Figura 23. SDS-PAGE 12% mostrando a atividade da SVSP ancestral glicosilada e deglicosilada sobre o fibrinogênio em diferentes temperaturas.....	71
Figura 24. SDS-PAGE 12% mostrando a atividade da SVSP ancestral glicosilada e deglicosilada sobre o fibrinogênio em diferentes pH.....	71
Figura 25. SDS-PAGE 12% mostrando a atividade da SVSP ancestral deglicosilada sobre o fibrinogênio na presença de diferentes inibidores.....	72
Figura 26. Teste de indução da formação de coágulos de fibrina pela SVSP ancestral deglicosilada.....	73
Figura 27. Teste de atividade enzimática da SVSP ancestral glicosilada e deglicosilada em diferentes concentrações sobre o substrato BAEE (N α -Benzoil-L-arginina etil ester cloridrato) pelo tempo.....	74
Figura 28. Teste de atividade enzimática da SVSP ancestral glicosilada e deglicosilada em diferentes concentrações sobre o substrato BApNA (N α -Benzoil-DL-arginina 4-nitroanilina cloridrato) pelo tempo.....	75
Figura 29. Perfil cinético da SVSP ancestral glicosilada em diferentes concentrações sobre o substrato Chromozym PK (Benzoil-Pro-Phe-Arg-4-nitroanilina).....	77
Figura 30. Perfil cinético da SVSP ancestral glicosilada em diferentes pH sobre o substrato Chromozym PK (Benzoil-Pro-Phe-Arg-4-nitroanilina).....	77
Figura 31. Perfil cinético da SVSP ancestral deglicosilada em diferentes concentrações sobre o substrato Chromozym PK (Benzoil-Pro-Phe-Arg-4-nitroanilina).....	78
Figura 32. Perfil cinético da SVSP ancestral deglicosilada em diferentes pH sobre o substrato Chromozym PK (Benzoil-Pro-Phe-Arg-4-nitroanilina).....	78
Figura 33. Concentração de produto liberado pela SVSP ancestral glicosilada, deglicosilada e pela caliceína do plasma humano após 30 minutos de reação enzimática sobre o Chromozym PK (Benzoil-Pro-Phe-Arg-4-nitroanilina).....	79
Figura 34. Espectros de dicroísmo circular (de 260 a 195 nm) da SVSP ancestral glicosilada a 25°C em tampão Tris e acetato de sódio 5 mM nos pH 5,0, 7,5 e 9,0.....	80
Figura 35. Curvas de desnaturação térmica da SVSP ancestral monitoradas a 208 nm nos pH 5,0, 7,5 e 9,0.....	81
Figura 36. Alinhamento entre a sequência da Vk_tox1 e sequências similares com função caracterizada presentes no banco de dados (SwissProt e PDB).....	91
Figura 37. Estrutura tridimensional predita pelo AlphaFold 2 para a Vk_tox1.....	91
Figura 38. Sobreposição estrutural entre a Vk_tox1 (azul) e a estrutura da sequência de <i>Deinagkistrodon acutus</i> (Q9I8X1; PDBID: 1OP2) (roxo)	92

Figura 39. Gel de agarose 0,8% confirmando a linearização com a enzima PmeI do vetor pPICZαA clonado com o gene para a Vk_tox1.....	93
Figura 40. Placas da transformação das células de <i>K. phaffii</i> com o vetor contendo o gene para a Vk_tox1.....	93
Figura 41. Western blot das proteínas secretadas pela <i>K. phaffii</i> transformada com o vetor contendo o gene para a Vk_tox1.....	94
Figura 42. Purificação da Vk_tox1 por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (Ni ²⁺).....	95
Figura 43. SDS-PAGE 12% da Vk_tox1 após deglicosilação com a enzima PNGase F.....	96
Figura 44. SDS-PAGE 12% mostrando a atividade da Vk_tox1 glicosilada e deglicosilada sobre o fibrinogênio em diversas proporções molares de enzima:fibrinogênio.	98
Figura 45. SDS-PAGE 12% mostrando a atividade da Vk_tox1 glicosilada e deglicosilada sobre o fibrinogênio em diferentes tempos de reação.....	98
Figura 46. SDS-PAGE 12% mostrando a atividade da Vk_tox1 glicosilada e deglicosilada sobre o fibrinogênio em diferentes temperaturas.....	99
Figura 47. SDS-PAGE 12% mostrando a atividade da Vk_tox1 glicosilada e deglicosilada sobre o fibrinogênio em diferentes pH.....	99
Figura 48. SDS-PAGE 12% mostrando a atividade da Vk_tox1 glicosilada sobre o fibrinogênio na presença de diferentes inibidores (proporção enzima:fibrinogênio de 1:8).....	100
Figura 49. Teste de indução da formação de coágulos de fibrina pela Vk_tox1 glicosilada...101	101
Figura 50. Teste de atividade enzimática da Vk_tox1 glicosilada e deglicosilada em diferentes concentrações sobre o substrato BAPNA (Nα-Benzoil-DL-arginina 4-nitroanilina cloridrato) pelo tempo.....	102
Figura 51. Teste de atividade enzimática da Vk_tox1 glicosilada e deglicosilada em diferentes concentrações sobre o substrato Chromozym PK (Benzoil-Pro-Phe-Arg-4-nitroanilina).....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estruturas cristalográficas de SVSP disponíveis no PDB (<i>Protein Data Bank</i>).....	30
Tabela 2. Comparação entre o percentual de estrutura secundária do modelo tridimensional feito pelo ColabFold da SVSP ancestral glicosilada com os obtidos em diferentes pH a 25 e 95°C.....	80

LISTA DE ABREVIações

BApNA	N _α -Benzoil-L-arginina 4-nitroanilina cloridrato
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
Cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidade ótica
DTT	DL-Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
g	Grama
HCl	Ácido clorídrico
h	Hora (s)
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Quilodalton
L	Litro
LB	Luria-bertani
mM	Milimolar
M	Molar
µg	Micrograma
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
µM	Micromolar
m/v	Massa por volume
mA	Miliampere
mg/mL	Miligrama por mililitro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mL/min	Mililitro por minuto
Min	Minutos
NaCl	Cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato monossódico
NaOH	Hidróxido de sódio
ng/mL	Nanograma por mililitro
nm	Nanômetro
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>

<i>K. phaffii</i>	<i>Komagataella phaffii</i>
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SVSP	Serinoproteases da peçonha de serpentes
PDB	<i>Protein Data Bank</i> (https://www.rcsb.org/pdb)
pH	Potencial Hidrogeniônico
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
Rpm	Rotação por minuto
s	Segundos
SDS	Dodecil sulfato de sódio
UV	Ultravioleta
U/μL	Unidade por microlitro
V	Volts
<i>V. komodoensis</i>	<i>Varanus komodoensis</i>
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA	19
1.1. CLADO TOXICOFERA: A ORIGEM DOS RÉPTEIS PEÇONHENTOS	20
1.1.1. PEÇONHA DE LAGARTOS.....	21
1.1.2. PEÇONHA DE SERPENTES	21
1.2. SERINOPROTEASES DA PEÇONHA DE TOXICÓFEROS	22
1.2.1. SERINOPROTEASES: CARACTERÍSTICAS E MECANISMO CATALÍTICO	22
1.2.2. SERINOPROTEASES COMO TOXINAS.....	23
1.2.2.1. <i>Atividades biológicas</i>	24
1.2.2.2. <i>Características estruturais</i>	29
1.2.2.3. <i>Surgimento e evolução</i>	31
1.2.2.4. <i>Aplicações biotecnológicas e terapêuticas</i>	33
1.3. JUSTIFICATIVA	34
1.4. OBJETIVOS	35
1.4.1. OBJETIVOS GERAIS.....	35
1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
CAPÍTULO 2: ESTUDO DE UMA SERINOPROTEASE DA PEÇONHA DE SERPENTES CONSTRUÍDA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE RECONSTRUÇÃO DE SEQUÊNCIA ANCESTRAL.....	36
2.1. INTRODUÇÃO.....	37
2.1.1. TÉCNICA DE RECONSTRUÇÃO DE SEQUÊNCIAS ANCESTRAIS.....	37
2.1.1.1. <i>Aplicação da técnica</i>	38
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS	40
2.2.1. CRIAÇÃO DE UMA SERINOPROTEASE ANCESTRAL A PARTIR DA TÉCNICA DE RECONSTRUÇÃO DE SEQUÊNCIA ANCESTRAL	40
2.2.1.1. <i>Obtenção de sequências atuais e construção de uma árvore filogenética de tripsinas e proteínas similares</i>	40
2.2.1.2. <i>Construção da árvore filogenética de serinoproteases da peçonha de serpentes e lagartos</i>	41
2.2.1.3. <i>Geração da sequência ancestral e predições in silico</i>	42
2.2.2. OBTENÇÃO DA SVSP ANCESTRAL HETERÓLOGA.....	42
2.2.2.1. <i>Transformação de células de Escherichia coli por choque térmico e midipreparação plasmidial</i>	42
2.2.2.2. <i>Linearização do vetor e confirmação por eletroforese em gel de agarose</i>	43
2.2.2.3. <i>Transformação de células de Komagataella phaffii por eletroporação</i>	44
2.2.2.4. <i>Determinação do fenótipo Mut</i>	45
2.2.2.5. <i>Screening de expressão gênica</i>	45
2.2.2.6. <i>Confirmação da expressão por SDS-PAGE e Western Blot</i>	46
2.2.2.7. <i>Testes de otimização da expressão</i>	48
2.2.2.8. <i>Purificação da SVSP ancestral por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (Ni²⁺)</i>	48
2.2.2.9. <i>Teste de deglicosilação utilizando-se a enzima PNGase F</i>	49

2.2.2.10. Análise da deglicosilação por espectrometria de massas.....	49
2.2.3. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS APRESENTADAS PELA SVSP ANCESTRAL	49
2.2.3.1. Caracterização da atividade de clivagem do fibrinogênio.....	49
2.2.3.2. Determinação da atividade de esterase.....	51
2.2.3.3. Determinação da atividade amidolítica	51
2.2.3.4. Determinação da atividade do tipo calicreína.....	51
2.2.4. ANÁLISE DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA E TERMOESTABILIDADE POR DICROÍSMO CIRCULAR.....	52
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
2.3.1. CRIAÇÃO DE UMA SERINOPROTEASE ANCESTRAL A PARTIR DA TÉCNICA DE RECONSTRUÇÃO DE SEQUÊNCIA ANCESTRAL	53
2.3.1.1. Árvore filogenética das serinoproteases da peçonha de serpentes e lagartos	53
2.3.1.2. Reconstrução da sequência ancestral dos viperídeos	54
2.3.1.3. Análises <i>in silico</i> da sequência construída.....	57
2.3.2. OBTENÇÃO DA SVSP ANCESTRAL HETERÓLOGA.....	59
2.3.2.1. Confirmação da linearização do vetor por eletroforese em gel de agarose.....	59
2.3.2.2. Transformação de células de <i>Komagataella phaffii</i> e determinação do fenótipo Mut	60
2.3.2.3. Screening de expressão gênica.....	62
2.3.2.4. Otimização da expressão gênica	62
2.3.2.5. Purificação da SVSP ancestral por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (Ni^{2+})	63
2.3.2.6. Deglicosilação proteica.....	65
2.3.2.7. Análise da deglicosilação por espectrometria de massas	66
2.3.3. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS APRESENTADAS PELA SVSP ANCESTRAL	68
2.3.3.1. Caracterização da atividade de clivagem do fibrinogênio.....	68
2.3.3.2. Determinação da atividade de esterase.....	73
2.3.3.3. Determinação da atividade amidolítica	74
2.3.3.4. Determinação da atividade do tipo calicreína.....	75
2.3.4. AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA E TERMOESTABILIDADE POR DICROÍSMO CIRCULAR.....	79
2.3.4.1. Estrutura secundária a 25°C em diferentes pH	79
2.3.4.2. Análise de termoestabilidade.....	80
2.4. CONCLUSÕES	83
2.5. PERSPECTIVAS	84
CAPÍTULO 3: ESTUDO DE UMA SERINOPROTEASE DA PEÇONHA DO LAGARTO VARANUS KOMODOENSIS	85
3.1. INTRODUÇÃO.....	86
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS	88
3.2.1. SELEÇÃO DA ENZIMA E PREDIÇÕES <i>IN SILICO</i>	88
3.2.2. OBTENÇÃO DA SERINOPROTEASE VK_TOX1 HETERÓLOGA.....	88

3.2.3. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS APRESENTADAS PELA VK_TOX1	89
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
3.3.1. PREDIÇÕES <i>IN SILICO</i>	90
3.3.2. OBTENÇÃO DA VK_TOX1 HETERÓLOGA	92
3.3.2.1. <i>Confirmação da linearização do vetor por eletroforese em gel de agarose.....</i>	92
3.3.2.2. <i>Transformação de células de Komagataella phaffii com vetor pPICZαA contendo o gene para a Vk_tox1</i>	93
3.3.2.3. <i>Screening de expressão gênica.....</i>	94
3.3.2.4. <i>Purificação da Vk_tox1 por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (Ni²⁺)</i>	94
3.3.2.5. <i>Deglicosilação proteica.....</i>	96
3.3.3. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS APRESENTADAS PELA VK_TOX1	96
3.3.3.1. <i>Caracterização da atividade de clivagem do fibrinogênio.....</i>	96
3.3.3.2. <i>Determinação da atividade amidolítica</i>	101
3.3.3.3. <i>Determinação da atividade do tipo calicreína.....</i>	102
3.4. CONCLUSÕES.....	105
3.5. PERSPECTIVAS	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
ANEXO I – ÁRVORE FILOGENÉTICA DAS SERINOPROTEASES DO TIPO TRIPSINA	120
ANEXO II– RESULTADO DAS PREDIÇÕES PARA A SEQUÊNCIA DA SVSP ANCESTRAL.....	121
ANEXO III - RESULTADO DAS PREDIÇÕES PARA A SEQUÊNCIA VK_TOX1	123

Capítulo 1

Revisão da literatura

“O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem sua própria razão de existência.

Não podemos deixar de ficar maravilhados quando contemplamos os mistérios da eternidade, da vida, da maravilhosa estrutura da realidade. Basta que se tente apenas compreender um pouco deste mistério a cada dia.”

- Albert Einstein.

1.1. CLADO TOXICOFERA: A ORIGEM DOS RÉPTEIS PEÇONHENTOS

Durante muito tempo acreditou-se que entre os répteis atuais somente duas linhagens tivessem evoluído sistemas de peçonha: sendo elas as serpentes avançadas (Caenophidia) e os lagartos helodermatídeos (família Helodermatidae). Devido à presença da glândula produtora de peçonha em regiões orais diferentes e pela distância filogenética, o aparecimento da peçonha em ambos os grupos era dado como independente (Fry *et al.*, 2006). Em serpentes cenofídicas, a glândula produtora de peçonha e a presa inoculadora estão localizadas na maxila superior, diferente dos lagartos helodermatídeos, que possuem glândulas compartimentalizadas produtoras de peçonha na maxila inferior. Entretanto, hoje sabe-se que ambas as linhagens fazem parte de um clado denominado Toxicofera, o qual inclui ainda outros lagartos descobertos como possuidores de uma glândula produtora de toxinas (Fry *et al.*, 2009a). A presença de glândulas produtoras de peçonha foi detectada há poucos anos em lagartos da família Varanidae e da infraordem Iguania, demonstrando que todas as linhagens de répteis com glândulas produtores de toxinas formam um mesmo clado e que a origem da peçonha em serpentes e lagartos é a mesma (Fry *et al.*, 2006).

O clado Toxicofera é formado por todas as serpentes, pelos lagartos anguimorfos (famílias Helodermatidae, Varanidae e Anguidae) e pela clado Iguania (Figura 1). Embora várias toxinas presentes na peçonha desses animais tenham surgido em diferentes tempos evolutivos durante o desenvolvimento do grupo, algumas são presentes em todos eles, indicando que esteve presente no ancestral comum do grupo, sendo toxinas basais. Dentre elas temos as hialuronidases, que causam danos teciduais na presa e as enzimas do tipo calicreínas, que atuam desestabilizando o sistema hemostático e que, em serpentes, sofreram grande diversificação, de forma a desempenharem diversas atividades diferentes (Fry *et al.*, 2009a; Fry *et al.*, 2010). As toxinas proteicas presentes na peçonha teriam evoluído a partir de proteínas expressas nos mais diferentes tecidos cujas funções desempenhadas eram bastante diferentes das adquiridas secundariamente. Elas teriam sido cooptadas para a peçonha a partir da sua duplicação gênica seguida pela expressão seletiva na glândula peçonhenta (Fry *et al.*, 2012).

A glândula produtora de peçonha do ancestral dos répteis toxicóferos era muito provavelmente uma glândula dentária simples localizada nas regiões maxilar e mandibular do animal. O clado Iguania teria se separado quando esse órgão era ainda insipiente e assim permaneceu, tendo visto que seu sistema de peçonha tem praticamente nenhuma importância ecológica conhecida dentro do grupo. Em contrapartida, a peçonha evoluiu de forma a tornar-se essencial para muitas serpentes e lagartos anguimorfos (Fry *et al.*, 2012). Em *Abronia graminea*, um lagarto anguídeo arbóreo, a glândula mandibular produtora de peçonha é robusta, indicando seu uso e sua importância para o animal (Koludarov *et al.*, 2012). As

glândulas peçonhentas de serpentes originaram-se da diversificação das glândulas maxilares e as de lagartos a partir da diversificação das mandibulares. Tal diferenciação do padrão espacial de localização da glândula foi uma das razões pelas quais demorou-se tanto para se compreender a origem comum da peçonha em répteis (Fry *et al.*, 2012).

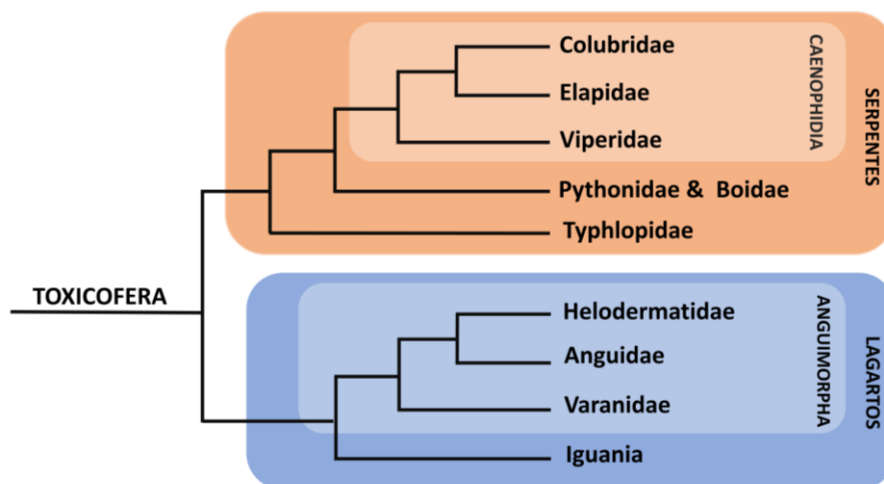


Figura 1. Árvore filogenética dos grupos de répteis pertencentes ao clado Toxicofera (informações obtidas em Fry *et al.*, 2006 e Reyes-Velasco *et al.*, 2015).

1.1.1. PEÇONHA DE LAGARTOS

A glândula mandibular produtora de peçonha em lagartos toxicóferos não apresenta uma anatomia uniforme entre os clados. Em anguídeos, a glândula possui uma mistura de arranjo seroso/mucoso, possuindo um compartimento por dente. Em helodermatídeos e varanídeos é uma glândula encapsulada secretora de proteínas segregada da região onde produz o muco. Todavia, acredita-se que essa estrutura de glândula tenha evoluído independentemente nos dois grupos (Fry *et al.*, 2010). Já no clado Iguania há a retenção das características do sistema de peçonha ancestral, onde a glândula é presente nas maxilas superior e inferior, sendo seriada, lobular e não composta. Nove toxinas estão presentes nas peçonhas de todos os lagartos toxicóferos, sendo elas as toxinas AVIT, peptídeos natriuréticos tipo B (BNP), proteínas secretadas ricas em cisteínas (CRISPs), *cobra venom factors*, crotaminas, cistatinas, calicreínas, fatores de crescimento nervoso e *vespryns*. Análises filogenéticas demonstraram que todas as nove toxinas são monofiléticas (Fry *et al.*, 2006).

1.1.2. PEÇONHA DE SERPENTES

Com o reconhecimento da existência do clado Toxicofera e da produção de toxinas orais como uma característica basal do grupo, a compreensão sobre a evolução da peçonha

em serpentes sofreu enormes mudanças. Durante muito tempo acreditou-se que as serpentes de presas traseiras (colubrídeos) seriam um grupo de transição para as linhagens que possuem presas frontais (elapídeos e viperídeos), as quais acreditava-se que possuísem um ancestral comum. Entretanto, a resolução da relação entre os grupos de serpentes demonstrou que viperídeos teriam surgido no início da evolução das serpentes avançadas (Caenophidia) e os elapídeos seriam um grupo de origem mais recente. Logo, as presas dianteiras teriam evoluído independentemente em cada um dos grupos que as possui (Fry & Wüster, 2004; Fry *et al.*, 2008). As presas das serpentes da família Elapidae são posicionadas na frente da boca em um maxilar relativamente imóvel, sendo chamadas de proteróglifas. As presentes em Viperidae são frontais e articuladas, conhecidas como solenóglifas, e as presentes em algumas serpentes da família Colubridae são posicionadas no fundo da boca, sendo chamadas de opistóglifas (Palci *et al.*, 2023).

A glândula produtora de peçonha em serpentes localiza-se posteriormente ao olho, estendendo-se em todo o comprimento da mandíbula superior. Nas serpentes com presas dianteiras a peçonha é liberada através da compressão muscular da glândula. Naquelas que não possuem as presas frontais, as glândulas possuem um único e curto ducto que se estende do lúmen da glândula até a base dos dentes posteriores (Kardong, 2002; Fry *et al.*, 2008). Além das toxinas presentes na peçonha dos lagartos, as serpentes também produzem em grande quantidade outras proteínas. Entre elas pode-se citar as toxinas de três dedos, as metaloproteases (SVMP) e as lectinas (Fry *et al.*, 2008; Fry *et al.*, 2009a).

1.2. SERINOPROTEASES DA PEÇONHA DE TOXICÓFEROS

1.2.1. SERINOPROTEASES: CARACTERÍSTICAS E MECANISMO CATALÍTICO

As serinoproteases são enzimas proteolíticas que utilizam uma serina ativada no sítio ativo para realizar um ataque nucleofílico à ligação peptídica do substrato (Hedstrom, 2002). É um dos grupos de protease mais diversos e abundante, sendo encontrado em todos os reinos de seres vivos, assim como no genoma de muitos vírus, compreendendo um terço de todas as proteases existentes. Desempenham diversos papéis em processos fisiológicos de animais, com suas propriedades químicas tendo moldado a evolução desses processos (Di Cera, 2009; Niu *et al.*, 2011; Vandermarliere *et al.*, 2013). Com base em suas similaridades de sequências e estruturas, são agrupadas em 13 clãs e divididas em 40 famílias (Di Cera, 2009; Rawlings *et al.*, 2014). O clã PA é o maior dentre eles e provavelmente o grupo de enzimas mais extensivamente estudado. É composto por serinoproteases com o dobramento do tipo tripsina, sendo bastante comum na maior parte dos organismos eucariontes,

principalmente animais vertebrados, embora escasso em plantas e em procariontes (Di Cera, 2009).

A maioria das enzimas pertencentes ao clã PA possuem especificidade de substrato igual ao da tripsina, ou seja, clivam onde há resíduos de Arginina/Lisina em P1 (nomenclatura de resíduos do substrato “P” e seus respectivos bolsões “S” (Hedstrom, 2002)), embora algumas, tais como a quimotripsina, clivem após resíduos aromáticos (fenilalanina, triptofano e tirosina). A maior família dentro do clã é a S1, que divide-se em S1A e S1B, as quais compartilham a estrutura tridimensional formada por dois barris β . A família S1A compreende as tripsinas e enzimas de mesma origem, que atuam em reações extracelulares. A família S1B, em contrapartida, possui enzimas responsáveis pelo *turnover* intracelular. Em humanos, as enzimas S1A são classificadas em seis categorias baseando-se em sua filogenia, sendo: de digestão, de coagulação e imunidade, matriptases, calicreínas e granzimas (Rothman, 1977; Di Cera, 2009).

O mecanismo catalítico das serinoproteases inicia-se com um ataque nucleofílico da serina do sítio ativo ao grupo carbonila de uma ligação peptídica do substrato. Este ataque é potencializado pela tríade catalítica (His57, Asp102 e Ser195, numeração referente à sequência da quimotripsina) que aumenta o caráter nucleofílico do oxigênio gama da serina. Isto ocorre por meio da ionização da serina através da doação de seu próton ligado ao oxigênio gama ao nitrogênio da histidina. Essa histidina forma uma ligação de hidrogênio com o ácido aspártico do sítio ativo, tornando o seu nitrogênio mais eletronegativo. O ataque da serina resulta na formação de um intermediário acil-enzima e na liberação do fragmento N-terminal da ligação peptídica rompida. Em seguida uma molécula de água é ativada pela histidina e ataca o intermediário acil-enzima, o que resulta na liberação do C-terminal. Ao final o próton da histidina restitui a serina restaurando assim a enzima (Figura 2) (Hedstrom, 2002; Vandermarliere *et al.*, 2013).

1.2.2. SERINOPROTEASES COMO TOXINAS

As serinoproteases encontradas na peçonha de toxicóferos são glicoproteínas capazes de reconhecer diversos substratos macromoleculares, atuando de forma a afetar o sistema hemostático da presa por meio da ação em diversas etapas da cascata de coagulação (Ullah *et al.*, 2018). São classificadas como serinoproteases pertencentes ao clã PA e à família S1, do tipo quimotripsina, visto que possuem a tríade catalítica His57, Asp102 e Ser195 (Rawlings *et al.*, 2014). Quanto à especificidade de substrato, classificam-se como do tipo tripsina, uma vez que clivam após resíduos de arginina ou lisina (Serrano, 2013). Embora tenham sido detectadas em todos os grupos de toxicóferos, existem poucos estudos

dedicados à sua caracterização em lagartos. Até o momento, somente algumas proteases de helodermátídeos foram caracterizadas bioquimicamente (Alagon *et al.*, 1986; Utaisincharoen *et al.*, 1993). Em contrapartida, são extensivamente estudadas há décadas em serpentes, de forma a serem comumente chamadas de SVSPs (*Snake Venom Serine Proteases*). Sua capacidade de afetar o sistema hemostático fez com que várias fossem bastante exploradas para aplicações farmacêuticas (Serrano, 2013). Estão presentes na peçonha de serpentes do clado Caenophidia (Figura 1), também conhecidas como “serpentes avançadas”, embora sua maior diversificação tenha ocorrido dentro da família Viperidae, onde é o componente de maior abundância na peçonha (Vaiyapuri *et al.*, 2012)

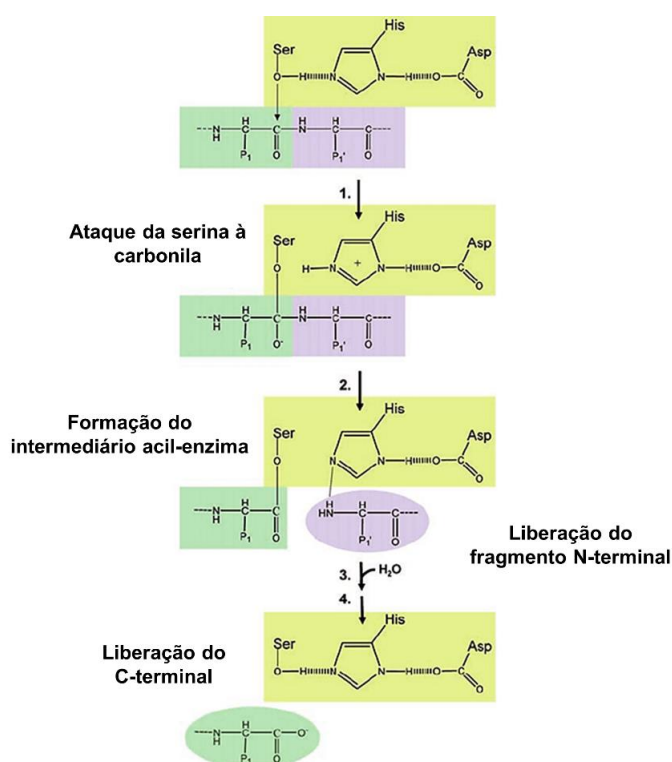


Figura 2. Mecanismo catalítico das serinoproteases. Adaptado de Schaller (2004). A tríade catalítica (His, Asp e Ser) encontra-se destacada em amarelo, a porção C-terminal do substrato em roxo e a porção N-terminal em verde.

1.2.2.1. Atividades biológicas

As serinoproteases da peçonha atuam afetando o sistema hemostático de presas vertebradas por meio de alterações nas suas vias da cascata de coagulação, no seu sistema cinina-caliceína, na agregação plaquetária, bem como no sistema fibrinogenolítico. Sua atuação pode ser por meio da ativação de componentes pró- ou anticoagulantes (Serrano & Maroun, 2005). As atividades apresentadas por elas são diversas, podendo ser do tipo

calicreína, do tipo trombina, ativadora de proteína C, ativadora de protrombina, ativadora de plasminogênio, ativadora plaquetária e ativadora dos fatores V e X (Figura 3), além de algumas poderem apresentar mais de uma dessas atividades. Essa grande diversidade de substratos clivados é encontrada majoritariamente nas toxinas da peçonha das víboras (Viperidae) (Serrano & Maroun, 2005; Serrano, 2013).

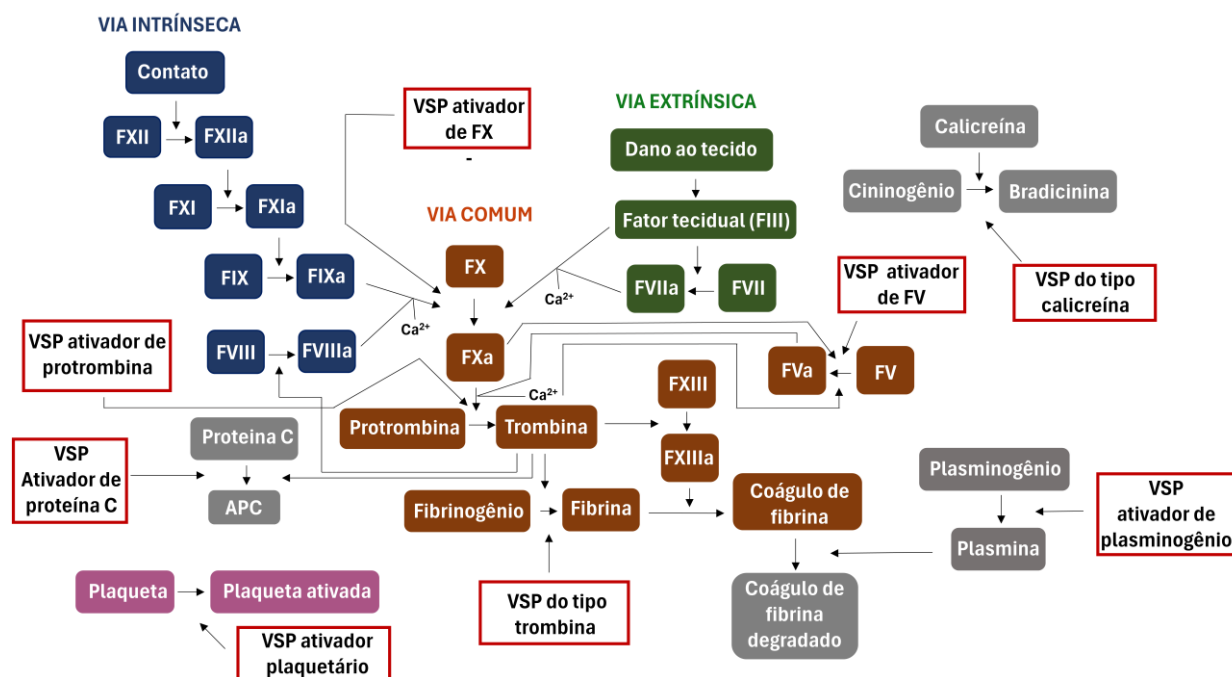


Figura 3. Ilustração esquemática da cascata de coagulação e processos hemostáticos de atuação das serinoproteases de peçonha (VSP, *venom serine protease*).

1.2.2.1.1. Atividade do tipo calicreína

As calicreínas são serinoproteases secretadas que atuam nos tecidos ou no plasma sanguíneo promovendo a clivagem do cininogênio e a liberação de bradicinina (Koumandou & Scorilas, 2013). A bradicinina é um nonapeptídeo (Arg-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) que possui ação vasodilatadora e diurética, podendo ocasionar a redução da pressão arterial por meio de alterações na concentração intracelular de Ca^{2+} (Golias *et al.*, 2007). As SVSPs com atividade do tipo calicreína são capazes de liberar bradicinina a partir do cininogênio, reduzindo assim a pressão arterial da presa (Hung & Chiou, 2001).

Várias serinoproteases da peçonha de serpentes já foram caracterizadas como possuidoras de tal atividade (Serrano & Maroun, 2005). Toxinas como a KN-BJ de *Bothrops jararaca* (Serrano *et al.*, 1998) e elegaxobin II de *Protobothrops elegans* (Oyama & Takahashi, 2003) possuem, além da atividade de calicreína, atividade pró-coagulante. Em contrapartida, toxinas como Tm-VIG e Tm-IIG da peçonha de *Protobothrops mucrosquamatus* (Hung & Chiou, 2001) bem como harobin de *Hydrophis hardwickii* (He *et al.*, 2007), apresentam

atividade complementar na diminuição da pressão arterial por meio da degradação da angiotensina I em angiotensina II. As únicas serinoproteases tóxicas de lagartos caracterizadas bioquimicamente até então, pertencentes às espécies *Heloderma horridum horridum* (Alagon *et al.*, 1986) e *Heloderma suspectum* (Hendon & Tu, 1981) apresentam atividade de liberação de bradicinina.

1.2.2.1.2. Atividade do tipo trombina

A trombina é uma enzima presente no plasma sanguíneo de vertebrados e que apresenta diversas atividades relacionadas à cascata de coagulação, tanto como pró- quanto como anticoagulante. Em sua atividade pró-coagulante a trombina cliva as cadeias α e β do fibrinogênio de forma a liberar os peptídeos A e B. As cadeias resultantes interagem entre si formando coágulos de fibrina, os quais são responsáveis por estancar sangramentos (figura 4) (Mann *et al.*, 2003). Além disso, a trombina também é responsável por ativar o fator de coagulação VIII, o qual atua na ligação cruzada entre os monômeros de fibrina, estabilizando assim o coágulo (Bagoly *et al.*, 2012). Sua atividade anticoagulante se dá por meio da formação do complexo trombina-trombomodulina, o qual ativa a proteína C. A proteína C ativa, por sua vez, inativa os fatores FVa e FVIIIa, e ativa o ativador do plasminogênio, o qual transforma o plasminogênio em plasmina, a qual cliva as cadeias de fibrina, desfazendo os coágulos (Narayanan & Hamasaki, 1998; Rezaie, 2010).

As serinoproteases de peçonha rotuladas como do tipo trombina são assim classificadas por apresentam a atividade de clivagem do fibrinogênio típica da trombina, podendo clivar somente uma das cadeias, ou ambas (Serrano & Maroun, 2005). Entretanto, algumas toxinas, embora clivem o fibrinogênio, não induzem a formação de coágulos. Essas enzimas acabam por clivar as cadeias α e β de forma a não permitir que as cadeias de fibrina se liguem. Podem atuar tanto na depleção do fibrinogênio plasmático como na clivagem dos coágulos de fibrina (Carone *et al.*, 2018). A toxina da peçonha do lagarto *Heloderma horridum horridum*, além de atividade do tipo calicreína, também apresenta atividade de clivagem do fibrinogênio, embora não forme coágulos (Datta & Tu, 1997).

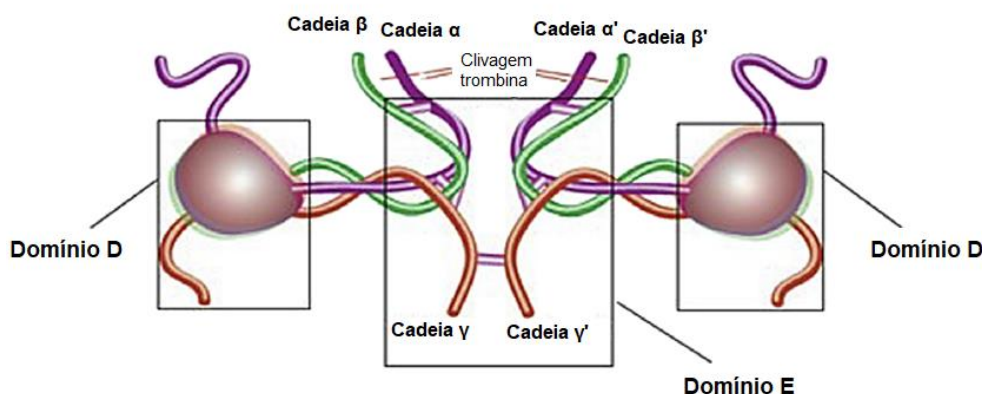


Figura 4. Estrutura do fibrinogênio. Adaptado de Nacca e colaboradores, 2016.

1.2.2.1.3. Atividade de ativadora de proteína C

A proteína C é um zimogênio plasmático que, quando ativo, inibe a coagulação sanguínea pela inativação dos fatores Va e VIIIa, além de ativar o ativador de plasminogênio t-PA (Marlar *et al.*, 1982). A inativação dos fatores Va e VIIIa limita a geração de trombina, atenuando a coagulação e tendo um papel fundamental na diminuição do risco de trombose venosa (Gale *et al.*, 2008).

Diversas serinoproteases ativadoras de proteína C já foram identificadas na peçonha de serpentes, sendo mais abundantemente achadas nas espécies de víboras dos gêneros *Gloydius*, *Deinagkistrodon* e *Agkistrodon* (Asmat & Ramzan, 2018). Aquelas presentes na peçonha de *Gloydius* e *Deinagkistrodon* diferem das de *Agkistrodon* em diversas características bioquímicas, onde as de *Agkistrodon* exibem massa molecular de menos de 40 kDa, uma faixa de pH ótima entre 7,5-8,0, além de ativar a proteína C do plasma humano de forma mais rápida que a do rato. As de *Gloydius* e *Deinagkistrodon*, em contrapartida, apresentam massa molecular acima de 40 kDa, pH ótimo entre 5,0-6,5 e um maior grau de ativação da proteína C do plasma de rato quando comparado com a humana (Kini, 2006; Asmat & Ranzan, 2018).

1.2.2.1.4. Atividade de ativadora do plasminogênio

A ativação do plasminogênio o converte na enzima plasmina, a qual é responsável pela destruição dos coágulos de fibrina a partir de sua proteólise (Vassali *et al.*, 1992). Além dos coágulos de fibrina, a plasmina também possui como substrato outros fatores de coagulação, o que intensifica o seu efeito anticoagulante (Cesarman-Maus & Hajjar, 2005). Em humanos existem dois tipos de ativadores de plasminogênio, os ativadores teciduais (t-PA) e os ativadores do tipo uroquinase (u-PA). Ambos ativam o plasminogênio através da clivagem da ligação Arg561–Val562 (Collen & Lijnen, 1991).

Os ativadores de plasminogênio encontrados na peçonha de serpentes realizam a ativação também através da clivagem da ligação Arg561–Val562 (Zhang *et al.*, 2013). Somente três ativadores de plasminogênio diferentes foram purificados a partir da peçonha, todos em espécies de víboras, sendo eles TSV-PA de *Trimeresurus stejnegeri* (Zhang *et al.*, 1995), Haly-PA de *Agkistrodon halys* (Park *et al.*, 1998), e LV-PA de *Lachesis muta muta* (Hermogenes *et al.*, 2006).

1.2.2.1.5. Atividade de ativadora do fator X

O fator de coagulação X (ou FX) é ativado pelo complexo tenase, seja pela via intrínseca ou pela via extrínseca (figura 3), a partir da clivagem da ligação Arg194-Ile195, resultando no fator X ativado, também chamado de FXa. O FXa participa na ativação do fator V, com quem forma o complexo protrombinase, o qual, na presença de ions de Ca^{2+} , é responsável por clivar a protrombina transformando-a em trombina (forma ativa) (Monkovic & Tracy, 1990; Hertzberg, 1994).

As SVSPs que ativam o fator X também clivam a ligação Arg194-Ile195. São encontradas na peçonha de serpentes das famílias Viperidae e Elapidae (Tans & Rosing, 2002). *Walterinnesia aegyptia* por exemplo, uma espécie de serpente da família Elapidae, possui uma serinoprotease ativadora do fator X em sua peçonha, a qual demonstrou ser bastante específica para esse substrato, não tendo clivado nenhum outro substrato testado de fatores envolvidos na coagulação sanguínea (Khan & Al-Saleh, 2015).

1.2.2.1.6. Atividade de ativadora do fator V

O fator V (ou FV) é uma proteína multidomínio que, após ser clivada pela trombina depois dos resíduos Arg709, Arg1018 e Arg1545, libera o domínio B e se torna FVa. O FVa é um cofator essencial para o fator X ativado na formação do complexo protrombinase, o qual converte a protrombina em trombina (Nicolaes & Dahlback, 2002).

Ativadores do fator V são encontrados principalmente na peçonha de serpentes da família Viperidae. Diferente da ativação em três etapas realizada pela trombina, as SVSPs clivam somente uma ligação, não levando à total liberação do domínio B, e gerando, muitas vezes, um FVa com um potencial reduzido na formação do complexo protrombinase (Gerads *et al.*, 1992). RVV-V de *Daboia russelii* é um exemplo desses ativadores, o qual cliva o FV após o resíduo Arg1545, sem haver a liberação do domínio B. Entretanto, o FVa gerado é capaz de ligar-se ao FXa e exercer seu papel de cofator de forma similar ao FV ativado pela trombina (Rosing *et al.*, 2002).

1.2.2.1.7. *Atividade de ativadora de protrombina*

A protrombina após ser clivada pelo complexo protrombinase (formado pelos fatores Xa e Va) converte-se em sua forma ativa, a enzima trombina (Whelihan *et al.*, 2012). Essa ativação ocorre após a clivagem da protrombina entre as ligações Arg314–Thr315 e Arg363–Ile364. A clivagem após a Arg363 é responsável por expor o sítio ativo do domínio de protease no C-terminal da trombina (Carlisle *et al.*, 1990).

As proteases ativadoras de protrombina presentes na peçonha são classificadas como do tipo A, B, C e D. As pertencentes aos grupos A e B são metaloproteases e as pertencentes aos grupos C e D são serinoproteases. Embora sejam serinoproteases, não são homólogas às outras serinoproteases da peçonha descritas até aqui, e estão presentes somente em elapídeos australianos. Os ativadores do grupo C são proteínas de alta massa molecular (~250 kDa) formadas por várias subunidades se assemelhando ao complexo protrombinase. Já os ativadores do Grupo D apresentam uma forte similaridade com o fator Xa (Walker *et al.*, 1980; Joseph & Kini, 2002). Uma ativadora de protrombina homóloga às proteínas aqui relatadas, todavia, já foi encontrada na peçonha de *Bothrops cotiara*. Ela é denominada cotiarinase, e não é possível classificá-la em nenhum dos 4 grupos existentes (Kitano *et al.*, 2013).

1.2.2.1.8. *Atividade de ativação plaquetária*

As plaquetas são células anucleadas cuja função é estancar uma hemorragia após um trauma vascular ou tecidual através de sua agregação formando trombos (Davi & Patrono, 2007). Sua ativação pode ser induzida por diversos fatores, tais como fatores teciduais e produtos secretados por plaquetas já ativadas. Sua ativação envolve receptores de membrana tal como a *C-type lectin-like* (CLEC-2), as glicoproteínas GP Ib-IX-V e GP VI e os receptores PAR (*protease-activated receptors*) (Thomas & Storey, 2015).

A ativação realizada por serinoproteases da peçonha é parecida com a realizada pela trombina plasmática, a qual cliva os receptores PARs (*protease activated receptor*) na membrana das plaquetas induzindo a sua agregação (Serrano *et al.*, 1995; De Candia, 2012).

1.2.2.2. **Características estruturais**

As serinoproteases da peçonha são expressas como zimogênios que apresentam entre 232-238 resíduos de aminoácidos quando em sua forma ativa. Apresentam-se como proteínas de cadeia simples, com sua estrutura sendo composta por 12 fitas β e 2 hélices α , formando dois barris β , um dobramento típico de proteínas do tipo quimotripsina (Figura 5). O sítio ativo localiza-se entre os dois barris, sendo formado pela tríade His57, Asp102 e Ser195

(numeração referente ao quimotripsinogênio). Apresentam 12 resíduos de cisteína que geralmente estão envolvidos na formação de seis pontes dissulfeto. Sua estrutura terciária possui diversos *loops* na superfície, os quais foram nomeados de acordo com a numeração de resíduos que os compõe (Figura 5) (Ullah *et al.*, 2018). Em agosto de 2024, o PDB (*Protein Data Bank*) contava com 13 estruturas depositadas, as quais compreendem proteínas de sete espécies diferentes. Somente estruturas de toxinas de serpentes foram resolvidas e estão depositadas no PDB. Na tabela 1 é possível visualizar os dados referentes a essas estruturas.

Tabela 1. Estruturas cristalográficas de SVSP disponíveis no PDB (*Protein Data Bank*).

Código PDB	Glicosilação	Organismo	Referência
1BQY	-	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	Parry <i>et al.</i> , 1998
1OP0	Asn35	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	Zhu <i>et al.</i> , 2005
1OP2	Asn35		
5XRF	Asn81, Asn124		A ser publicado
2AIQ	Asn37, Asn96A, Asn148	<i>Agkistrodon contortrix</i>	Murakami & Arni, 2005
2AIP			
3S69	-	<i>Goydius intermedius</i>	Huang <i>et al.</i> , 2011
3S9A	Asn245	<i>Daboia siamensis</i>	Nakayama <i>et al.</i> , 2011
3S9B	Asn245		
3S9C	Asn245		
3SBK	Asn245		
4E7N	Asn95A	<i>Gloydius halys</i>	Zeng <i>et al.</i> , 2013
4GSO	-	<i>Bothrops jararacussu</i>	Ullah <i>et al.</i> , 2013

A diversidade de substratos reconhecidos pelas SVSPs está relacionada a oito *loops* presentes em sua superfície circundando o sítio ativo. Os *loops* 37, 60, 99 e 174 apresentam baixa conservação, sendo considerados os mais importantes à variação de especificidade, enquanto os *loops* 70, 148, 189 e 218 possuem um alto grau de conservação. As variações nos resíduos desses *loops* resultam em diferentes formas e cargas do ambiente ao redor do sítio ativo, resultando nas diferenças de substrato observadas. Além disso, a maioria das glicosilações ocorre dentro desses *loops* (Zeng *et al.*, 2013).

As glicosilações estão presentes em grandes quantidades nessas toxinas, variando em tamanho e posição a depender da enzima. Podem ser do tipo N- ou O-, embora as N-glicosilações sejam mais frequentes (Serrano, 2013). As glicosilações presentes na estrutura conferem a ela características estéricas que podem estar envolvidas no reconhecimento do

substrato (Zhu *et al.*, 2005) assim como no acesso de inibidores macromoleculares ao sítio ativo da enzima (Soares & Oliveira, 2009). Todas as estruturas cristalográficas glicosiladas possuem o glicano N-acetilglucosamina (Zhu *et al.*, 2005; Murakami & Armi, 2005; Huang *et al.*, 2011; Nakayama *et al.*, 2011). Ácido N-acetilneuraminico e N-acetilgalactosamina também já foram encontrados em outras toxinas (Pfeiffer *et al.*, 1993).

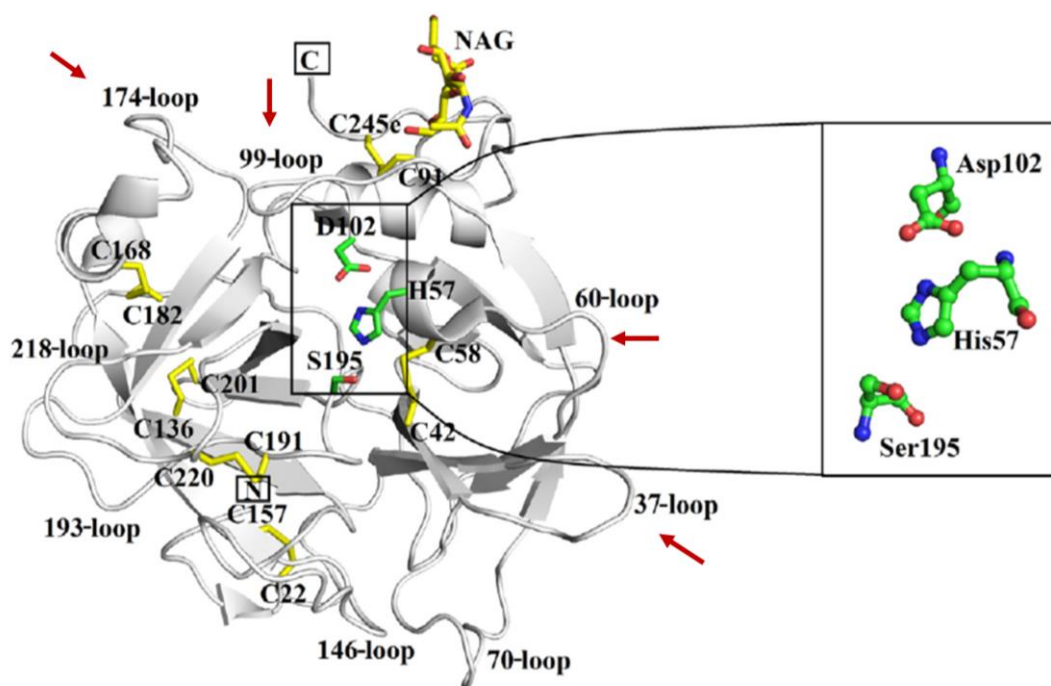


Figura 5. Estrutura de uma serinoprotease da peçonha de *Gloydius halys* (PDB ID: 4E7N). Os resíduos do sítio ativo encontram-se em verde e as pontes dissulfeto assim como a molécula de NAG (N-acetilglucosamina) encontram-se em amarelo. Os *loops* presentes na estrutura assim como o N- e o C-terminal estão indicados. As setas vermelhas indicam os loops 37, 60, 99 e 174, responsáveis pelo reconhecimento do substrato. Figura extraída de Ullah *et al.*, 2018.

1.2.2.3. Surgimento e evolução

A maioria das proteínas presentes na peçonha de répteis toxicóferos teria evoluído por duplicação gênica seguida pelo recrutamento do gene duplicado. Todavia, postula-se que as serinoproteases teriam se originado de uma maneira diferente. Essas enzimas teriam surgido a partir da modificação de calicreínas anteriormente secretadas pela glândula salivar, a qual viria a se tornar a glândula peçonhenta. A justificativa para essa hipótese baseia-se na atividade de calicreína apresentada pelas serinoproteases presentes na peçonha de lagartos

helodermátídeos e pela identificação por filogenia que as serinoproteases de peçonha de répteis formam grupo um irmão das calicreínas teciduais de mamíferos (Fry, 2005). Além dos toxicóferos, mamíferos que produzem saliva peçonhenta, como solenodontes e musaranhos, também expressam calicreínas em suas peçonhas (Ligabue-Braun *et al.*, 2012). As calicreínas são enzimas presentes em grande quantidade na saliva de muitos amniotas e teriam sido cooptadas para essas peçonhas em desenvolvimento porque, quando injetadas em uma presa, levam a um choque hipotensivo (Barua *et al.*, 2020).

Análises filogenéticas das serinoproteases de peçonha concluíram que elas são monofiléticas, o que indica a ocorrência de um evento único de recrutamento antes da separação de iguanas, anguimorfos e serpentes (Fry *et al.*, 2006). Entretanto, foram realizados estudos onde foi encontrada a não monofilia dessas enzimas (Heargraves *et al.*, 2014; Casewell *et al.*, 2012). Todavia, foi interpretado que a presença de enzimas não peçonhentas nos clados de toxinas seria devido a eventos de a recrutamento reverso, onde enzimas originalmente tóxicas ganharam uma nova função fisiológica não tóxica (Casewell *et al.*, 2012).

Os resultados do sequenciamento do genoma da serpente *Bothrops jararaca* (Viperidae) mostraram que os genes que codificam para serinoproteases da peçonha estão agrupados em tandem, demonstrando que a enzima sofreu diversos processos de duplicação dentro dos viperídeos. Comparando com os genomas de outros répteis toxicóferos, verificou-se que o mesmo locus onde situam-se as serinoproteases em víboras também está presente nas serpentes da família Elapidae, a qual possui, entretanto, apenas um único gene de serinoprotease. Em lagartos helodermátídeos esse mesmo locus contém o gene para a serinoprotease do tipo gilatoxina (Almeida *et al.*, 2020).

A grande diversidade de substratos clivados pelas serinoproteases de peçonha é consequência da evolução acelerada que essas proteínas sofreram. Foi demonstrado que seus genes em viperídeos acumularam muitas mutações não sinônimas nas suas regiões codificantes, o que levou à enorme diversificação apresentada pela família (Deshimaru *et al.*, 1996). Doley e Colaboradores (2009) identificaram três segmentos da enzima, que ficam localizados na superfície de sua estrutura, que estariam sofrendo essas mudanças aceleradas, que poderiam estar sendo ocasionadas por variação de *splicing*, acúmulo de mutações pontuais ou recombinação. Esses segmentos correspondem aos *loops* chamados de 37, 99 e 174, os quais, como descrito anteriormente, estão relacionados à diversificação dos substratos reconhecidos.

1.2.2.4. Aplicações biotecnológicas e terapêuticas

Devido à sua atuação nos processos envolvidos na coagulação sanguínea, diversas serinoproteases de peçonha são hoje utilizadas para fins terapêuticos e biotecnológicos. A enzima Batroxobin, (Stocker & Barlow, 1976) uma toxina do tipo trombina, é uma das mais utilizadas, possuindo diversos nomes comerciais e sendo utilizada para diversos fins. A Batroxobin cliva somente a cadeia α do fibrinogênio, gerando cadeias de fibrinas pouco estáveis. Esse mecanismo de ação permite com que essa enzima seja aplicada em diversos processos, sozinha ou em conjunto com outras substâncias (Lan *et al.*, 2021). Sob o nome Reptilase® (Funk *et al.*, 1971), por exemplo, é utilizada em testes de coagulação sanguínea; como Vivostat® é usada como um selante de fibrina em aplicações médicas para controle de sangramentos (Kjaergard & Trumbull, 1998). Outra toxina utilizada de forma terapêutica é a Ancrod. Essa enzima é obtida a partir da peçonha da serpente *Agkistrodon rhodostoma* e é utilizada como agente defibrinogenador, visto que cliva o fibrinogênio sem levar à formação de coágulos. Essa ação causa a depleção do fibrinogênio plasmático e evita a formação de coágulos. Apresenta importante uso no caso de derrame isquêmico agudo (Hennerici *et al.*, 2006).

1.3. JUSTIFICATIVA

Pouco se sabe sobre a evolução das proteínas devido a sua história evolutiva não poder ser diretamente examinada da mesma forma que mudanças em características macroscópicas. Por conseguinte, o advento da técnica de reconstrução de sequência ancestral (ASR) aliada à caracterização experimental trouxe uma abordagem que permite o estudo de questões até então difíceis de serem tratadas, tal como a identificação de resíduos chave para a estrutura e função das proteínas, o que pode ser difícil de ser feito somente comparando as proteínas atualmente existentes. As serinoproteases da peçonha de serpentes (conhecidas como SVSPs), especialmente aquelas da família Viperidae (víboras) são enzimas que, embora reconheçam uma grande variedade de substratos, possuem um alto percentual de identidade entre si. Essa particularidade levanta questionamentos sobre como essa diversidade foi alcançada, quais são os resíduos de aminoácidos envolvidos no reconhecimento do substrato, bem como qual ou quais as atividades que a enzima ancestral possuía antes de tamanha diversificação. A reconstrução de uma enzima ancestral de SVSP pode ajudar a elucidar esses questionamentos, além de fornecer informações valiosas sobre a evolução estrutural dessas enzimas. Além disso, por conta das SVSPs serem proteínas com alto potencial biotecnológico, a produção de uma enzima até então inédita e com características primitivas pode ser de imenso valor em aplicações terapêuticas, além de abrir caminho para futuras criações de outras serinoproteases voltadas para o uso biotecnológico.

Embora sejam relevantes alvos biotecnológicos, as serinoproteases da peçonha de lagartos são quase completamente ignoradas, havendo pouquíssimos estudos as caracterizando. O dragão-de-komodo, um lagarto varanídeo conhecido por sua perigosa e tóxica mordida, possui uma peçonha com enzimas altamente promissoras e nunca antes isoladas e caracterizadas. Além de uma possível aplicação biotecnológica/farmacêutica que essas enzimas possam vir a ter, o seu estudo pode também ajudar a compreender o efeito fisiológico da peçonha no organismo da presa, ajudando na conduta adequada em casos de acidentes com animais e humanos.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho tem como objetivo estudar a evolução bioquímica das serinoproteases de peçonha através da reconstrução da sequência ancestral da família Viperidae, além de fornecer informações bioquímicas sobre uma serinoprotease inédita da peçonha do lagarto *Varanus komodoensis* (dragão-de-komodo).

1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Reconstruir a serinoprotease ancestral da peçonha dos viperídeos por meio da técnica de reconstrução de sequências ancestrais.
- Expressar a proteína reconstruída assim como a proteína de *V. komodoensis* em células de *Komagataella phaffii*.
- Purificar as proteínas expressas de forma heteróloga.
- Caracterizá-las enzimaticamente quanto aos substratos reconhecidos.
- Compreender suas características estruturais por meio de técnicas *in silico* e experimentais.

Capítulo 2

Estudo de uma serinoprotease da peçonha de serpentes construída através da técnica de reconstrução de sequência ancestral

“Assim, da guerra da natureza, da fome e da morte, decorre diretamente o objeto mais exaltado que somos capazes de conceber, a saber, a produção dos animais superiores. Há grandeza nesta visão da vida, com seus vários poderes, tendo sido originalmente inspirada em algumas formas ou em uma; e que, embora este planeta tenha continuado a circular de acordo com a lei fixa da gravidade, desde um início tão simples, formas infinitas, mais belas e mais maravilhosas, foram e estão sendo desenvolvidas.”

- Charles Darwin.

2.1. INTRODUÇÃO

2.1.1. TÉCNICA DE RECONSTRUÇÃO DE SEQUÊNCIAS ANCESTRAIS

Para entender como uma enzima apresenta uma dada atividade ou quais os resíduos responsáveis por uma característica estrutural de interesse, utiliza-se, comumente, o que se chama de comparação horizontal. Ela nada mais é do que a comparação de sequências e/ou estruturas de diferentes membros de uma família a fim de detectar resíduos responsáveis pelas características desejadas e mutá-los a fim de confirmação da hipótese. Tal técnica detecta os resíduos cruciais para uma função, já que verifica que os mutar leva à sua perda; entretanto, dificilmente identifica o conjunto de resíduos os quais, se mudados, alteram a função de uma proteína para outra. É uma abordagem falha porque ignora que a função de uma proteína evoluiu através de mutações acumuladas pelo tempo, as quais podem não ser mais visíveis nas proteínas atuais. A melhor forma de superar essa limitação é através da comparação vertical. Nessa abordagem, estuda-se a filogenia daquela sequência de forma a encontrar as mutações que ocorreram durante o período em que aquela função/característica estrutural apareceu, visto que essas mutações são as que mais necessitam de investigação. À técnica de comparação vertical dá-se o nome de reconstrução de sequência ancestral (Harms & Thornton, 2010; Merkl & Sterner, 2016).

A reconstrução de sequências ancestrais (ASR, *Ancestral Sequence Reconstruction*) infere qual seria a sequência de aminoácidos de proteínas antigas a partir das sequências atuais. A metodologia infere a sequência ancestral a partir de um alinhamento de sequências atuais, da sua filogenia (dada pela elaboração de uma árvore filogenética), além de um modelo de substituição de aminoácidos que descreva a probabilidade da substituição de um aminoácido por outro (figura 6). A sequência mais provável em qualquer nó ancestral na filogenia daquela proteína será a sequência com a maior probabilidade de gerar as sequências modernas (Harms & Thornton, 2010). Os métodos existentes para reconstrução de sequências são divididos entre os baseados em máxima parcimônia (MP) e os probabilísticos, que são a inferência bayesiana (BI) e a máxima verossimilhança (ML, *maximum likelihood*). O método por máxima parcimônia foi o primeiro a ser utilizado, e compreende a construção de uma árvore filogenética que minimizava o número de mutações necessárias para explicar os dados observados. Entretanto, não leva em conta padrões de substituições enviesados ou comprimentos de galhos diferentes. Na inferência bayesiana são geradas árvores as quais são otimizadas a partir dos modelos evolutivos. No método de máxima verossimilhança busca-se a árvore com maior probabilidade dadas as sequências atuais e os parâmetros evolutivos escolhidos (Cai *et al.*, 2004; Merkl & Sterner, 2016).

Os métodos de reconstrução baseados em máxima verossimilhança podem ser de dois tipos: de reconstrução marginal e reconstrução de junção. Na reconstrução marginal há

a comparação da probabilidade para cada posição em cada nó da árvore, e seleciona aquele aminoácido que gera a maior verossimilhança para a árvore naquela posição. Já a reconstrução de junção procura encontrar o conjunto de aminoácidos mais provável para cada posição em cada nó que aumente a verossimilhança da árvore como um todo (Cai *et al.*, 2004; Vialle *et al.*, 2018).

Existem diversos programas disponíveis atualmente para a construção de sequências ancestrais. Os programas FireProt e MEGA X são dois que podem ser utilizados para a construção de árvores filogenéticas e inferência de sequências por meio de máxima verossimilhança. Nesses programas há a reconstrução marginal, onde é dada a probabilidade de cada um dos aminoácidos em cada uma das posições da sequência (Kumar *et al.*, 2018; Musil *et al.*, 2021)

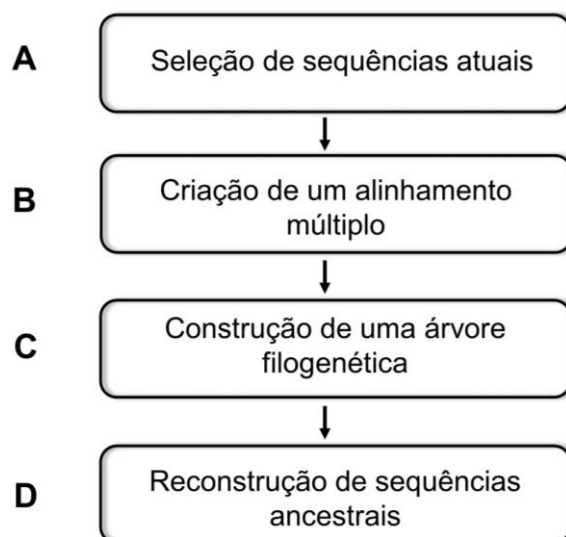


Figura 6. Etapas para a reconstrução de sequências ancestrais. A: Um grupo de sequências de interesse são obtidas em bancos de dados; B: As sequências são alinhadas em um alinhamento múltiplo, permitindo a detecção de mutações; C: Determinação da filogenia das sequências analisadas; D: Baseado na filogenia, no alinhamento fornecido e no modelo evolutivo (modelo de substituição de aminoácidos) escolhido, a sequência ancestral de cada nó interno da árvore é inferida. Imagem adaptada de Merkl & Sterner (2016).

2.1.1.1. Aplicação da técnica

AASR é uma técnica muito útil na compreensão da evolução molecular e estrutural de proteínas, identificando resíduos importantes para a diversidade funcional de grupos

proteicos, já que isso nem sempre é possível a partir da comparação das sequências atuais (Harms & Thornton, 2010; Merkl & Sterner, 2016). Além da identificação de resíduos chave, a reconstrução de sequências também ajuda a entender como funciona a evolução da especificidade de substrato em enzimas. A partir do uso da técnica, Risso e colaboradores (2013) verificaram que a β -lactamase ancestral bacteriana era capaz de hidrolisar vários antibióticos β -lactâmicos com eficiência similar às enzimas atuais, que possuem especificidade de antibiótico. Foi encontrado uma flexibilidade no sítio ativo da enzima ancestral, o que permitia comportar diversos substratos, algo que não é visto nas atuais. Além disso, a técnica também é utilizada para estudos evolutivos em um contexto mais amplo. Gaucher e colaboradores (2008) por exemplo, conseguiram determinar a temperatura de *melting* (T_m) de fatores de alongação de organismos que viveram de 3,5 bilhões a 500 milhões de anos atrás (período pré-cambriano). Em seus resultados, verificaram que houve um resfriamento de cerca de 30°C nos seres vivos durante esse período, um dado que foi corroborado por Robert & Chaussidon (2006), que acharam valores de temperatura similares para o resfriamento dos oceanos durante esse período a partir de dados de depósitos de isótopos de silício (Merkl & Sterner, 2016). Ademais, a reconstrução de sequências pode ser utilizada visando a engenharia de enzimas com propriedades desejadas. Gumulya e colaboradores (2018) reconstruíram diversas enzimas do período pré-cambriano visando encontrar proteínas bastante termoestáveis. Conseguiram criar uma cetol-ácido redutoisomerase oito vezes mais específica que a de *E. coli*, além de uma atividade 3,5 vezes maior a 50°C, mostrando que a técnica não precisa se restringir aos estudos evolutivos.

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. CRIAÇÃO DE UMA SERINOPROTEASE ANCESTRAL A PARTIR DA TÉCNICA DE RECONSTRUÇÃO DE SEQUÊNCIA ANCESTRAL

2.2.1.1. Obtenção de sequências atuais e construção de uma árvore filogenética de tripsinas e proteínas similares

Inicialmente, o projeto de reconstrução de sequências visava reconstruir as sequências ancestrais das tripsinas de metazoários. Por conta disso, para obter as sequências de tripsinas atuais foi feita uma busca utilizando-se o *software* HMMER (HmmerWeb version 2.40.0) (Potter *et al.*, 2018) contra o banco de dados MEROPS (Rawlings *et al.*, 2014) (banco de dados de proteases e seus inibidores, v.12.1) com a busca restrita aos metazoários. A busca foi feita utilizando-se a tripsina pancreática bovina (UniprotKb P00760). Ao final o programa retornou 38289 sequências, as quais foram agrupadas em etapas utilizando-se o *software* CD-HIT (Fu *et al.*, 2012), onde primeiro houve o agrupamento daquelas com 90% ou mais de identidade, seguido pelo agrupamento desses grupos com aqueles com 60% ou mais de identidade e por fim seu agrupamento com aqueles com 30% ou mais de identidade. Por fim gerou-se grupos cujas sequências possuíam $\geq 30\%$ de identidade entre si. Dentre os grupos gerados, escolheu-se aquele que possuía entre seus representantes a tripsina bovina utilizada nas buscas. Esse grupo possuía no total 1386 sequências proteicas. Essas sequências foram separadas e agrupadas somente entre si a 90% seguido por 80% de identidade. Ao final obteve-se 332 grupos. Selecionou-se uma sequência representante de cada um dos grupos (a maior dentre seus constituintes) para as análises posteriores.

A próxima etapa correspondia à geração de uma árvore filogenética com essas sequências. Dentre as 332 sequências, 24 foram removidas por estarem incompletas e serem as únicas representantes de seus clados. Também foram adicionadas duas sequências de quimotripsinas (MER0000004 e MER0002683) para servirem como *outgroup*. Gerou-se um alinhamento utilizando-se o *software* CLUSTALW (Larkin *et al.*, 2007) dentro do *software* MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). Para melhorar o alinhamento utilizou-se o *software* TrimAL (Capella-Gutiérrez *et al.*, 2009) parâmetro automated1 sem deleção de sequências espúrias. A árvore foi construída utilizando-se o *software* MEGA X, pelo método de máxima verossimilhança, com o modelo de substituição WAG, sem deleção parcial de resíduos e com 500 replicatas *bootstrap*.

Verificava-se na árvore gerada a presença de agrupamentos separados de tripsinas, calicreínas e toxinas da peçonha de serpentes e lagartos. O clado das toxinas de répteis possuía um *bootstrap* de 99, e seus grupos internos também possuíam *bootstraps* altos, destoando do restante dos grupos encontrados na árvore. Por conta disso, foi decidido seguir

nesse estudo com a reconstrução de sequências ancestrais do grupo das toxinas de peçonha de serpentes e lagartos.

2.2.1.2. Construção da árvore filogenética de serinoproteases da peçonha de serpentes e lagartos

As sequências que constituíam o clado das toxinas de peçonha (ler item 2.2.1.1.) eram representantes de grupos e, por conta disso, todas as sequências dentro desses 70 grupos foram selecionadas. Essas sequências foram agrupadas em grupos com $\geq 90\%$ de identidade utilizando-se o *software* CD-HIT. Ao total obteve-se 150 sequências representantes desses novos grupos. Essas sequências foram utilizadas para a construção de uma nova árvore filogenética.

O alinhamento para a construção dessa árvore foi feito de forma diferente do anterior, sendo realizado em etapas. Inicialmente foram obtidos no PDB (*Protein Data Bank*) 9 estruturas resolvidas de outras serinoproteases da peçonha de répteis. Essas estruturas foram alinhadas par a par utilizando-se o *software* POSA (*Partial Order Structure Alignment*) (Li *et al.*, 2014) a fim de gerar um alinhamento de sequências com informações estruturais. Dentre as estruturas encontradas, selecionou-se aquela de PDB ID 4E7N para ser usada como referência, por ser a que possuía maior identidade com as demais. As 150 sequências obtidas foram agrupadas (CD-HIT) de forma a ficar somente a mesma família (táxon) dentro de cada grupo. Isso foi alcançado pelo agrupamento com 55% de identidade, obtendo-se, ao final, 11 grupos. As sequências representantes de cada grupo foram alinhadas (CLUSTALW) com a sequência do PDB referência (4E7N) para identificar qual era a mais semelhante a ela. Utilizando-se o *software* MAFFT (versão merge) (Katoh & Standley, 2014) as sequências alinhadas par a par pelo POSA foram mescladas em um único alinhamento. Utilizando-se a versão *add* do MAFFT os grupos de toxinas foram adicionados um a um ao alinhamento, onde o alinhamento inicial utilizado para a adição de um novo grupo era o alinhamento gerado pela adição do grupo anterior. O primeiro grupo a ser adicionado ao alinhamento mesclado do POSA foi aquele com maior identidade com a sequência do PDB de referência, seguido pelo segundo e assim sucessivamente até todos os grupos terem sido adicionados. Por fim adicionou-se os *outgroups*, sendo eles duas tripsinas, (código MEROPS MER0000020 e MER0000024) e três calicreínas (MER0225979, MER0578331 e MER0262392) e retirou-se do alinhamento as sequências referentes às estruturas obtidas no PDB. A árvore filogenética foi montada a partir do alinhamento gerado, utilizando-se o *software* MEGA X pelo método de máxima verossimilhança, modelo de substituição JTT, com 10 categorias de distribuição Gamma, sem deleção parcial de resíduos e com 2000 replicatas *bootstrap*. A árvore foi visualizada e editada com o uso do programa iTOL (Letunic & Bork, 2021).

2.2.1.3. Geração da sequência ancestral e predições *in silico*

A partir da árvore filogenética obtida em 2.2.1.2. foi decidido que seria reconstruída a sequência ancestral que deu origem às serinoproteases da peçonha da família de serpentes Viperidae, visto que nessa família há uma maior diversificação dessas enzimas. Para a geração da sequência utilizou-se dois programas diferentes, o FireProt (Musil *et al.*, 2017) e o MEGA X. As sequências geradas por ambos foram alinhadas e comparadas quanto às suas probabilidades. Após a geração das sequências foi observado que elas não possuíam sete resíduos terminais característicos das SVSPs. Foi verificado que as sequências do MEROPS obtidas pelo HMMER não continham esses resíduos, embora as mesmas sequências em outros bancos de dados tivessem. Uma cisteína presente nesse C-terminal está envolvida em uma ponte dissulfeto nas estruturas cristalizadas de SVSPs, portanto, foi decidido que era mais sensato adicioná-los à sequência ancestral. Adicionou-se à sequência ancestral final os resíduos TDASCPP, os mesmos presentes na enzima AhV_TL-I de *Agkistrodon halys* (PDB ID 4E7N), uma vez que ela era a SVSP de estrutura resolvida com maior identidade com a ancestral (82,5%). Foi realizada uma busca pelo BLASTp contra o SwissProt a fim de detectar com quais SVSPs a ancestral mais se assemelhava.

A sequência teve pontes dissulfeto preditas pelo *software* Dipro (Cheng *et al.*, 2006), sítios de N-glicosilações preditos pelo *software* NetNGlyc 1.0 (Gupta & Brunak, 2001) e sítios de O-glicosilação predito pelo *software* NetOGlyc 4.0 (Steentoft *et al.*, 2013). Seu modelo tridimensional foi predito utilizando-se *software* AlphaFold 2, disponível na versão ColabFold (Mirdita *et al.*, 2022), com a utilização do modo de alinhamento múltiplo mmseqs2_uniref_env e como *template* o pdb_100. A visualização da estrutura foi feita com o uso do *software* PyMOL (Versão 2.5, Schrödinger, LLC).

2.2.2. OBTENÇÃO DA SVSP ANCESTRAL HETERÓLOGA

2.2.2.1. Transformação de células de *Escherichia coli* por choque térmico e midipreparação plasmidial

A construção contendo o gene da serinoprotease ancestral de viperídeos foi sintetizada pela empresa GenScript (Nova Jersey, Estados Unidos). A sequência foi sintetizada contendo em seu C-terminal uma cauda com seis resíduos de histidina (HisTag 6x) a qual confere à enzima a capacidade de ser purificada utilizando-se uma coluna de afinidade a níquel (Ni^{2+}). A clonagem foi feita no vetor pPICZαA com o uso das enzimas de restrição EcoR1 (sítio 5') e Not1 (sítio 3') e seus códons foram otimizados para a expressão na levedura *Komagataella phaffii* (anteriormente designada como *Pichia pastoris*). O vetor utilizado confere ao N-terminal da proteína heteróloga o α-Factor, um peptídeo sinal que

direciona a proteína ao meio extracelular, o que facilita seu processo de purificação. A escolha da *K. phaffii* como sistema de expressão se deve a ela ser capaz de formar pontes dissulfeto e de fazer glicosilações, ambas modificações pós-traducionais necessárias a essa proteína.

Para a transformação das células de *K. phaffii* era necessário ~10ug de DNA plasmidial, um quantitativo muito acima do fornecido pela empresa (~4 µg). Devido a isso, foi necessário a utilização de células de *Escherichia coli* cepa XL-10 para a replicação do vetor. Para a transformação dessas células, adicionou-se ~200 ng do vetor a 100 µL de células de *E. coli* XL-10 competentes (D.O.₆₀₀ de ~9,0). A mistura foi incubada em gelo por aproximadamente 45 minutos e em seguida submetida a 42°C por 90 segundos. Após o choque térmico, as células foram novamente incubadas em gelo por 5 minutos. Logo após, 900 µL de meio de cultura LB (peptona de caseína 1 % (m/v), NaCl 0,29 % (m/v) e extrato de levedura 0,5 % (m/v)) foi adicionado às células e essas foram incubadas a 37°C durante 1 h. Posteriormente, 100 µL de células foram plaqueadas em placa de Petri contendo 25 mL de meio LB (Luria-Bertani) sólido (peptona de caseína 1% (m/v), NaCl 0,29% (m/v), extrato de levedura 0,5% (m/v) e ágar 2% (m/v)), acrescido de zeocina (25 µg/mL). A zeocina age como marcador de seleção, ou seja, seleciona positivamente aqueles clones que foram transformados, tendo em vista que o vetor pPICZα confere ao microrganismo resistência a esse antibiótico. A placa de Petri foi acondicionada em estufa a 37°C por aproximadamente 24 horas. Uma colônia de *E. coli* transformada foi inoculada em 50 mL de meio LB contendo zeocina (25 µg/mL) e deixada crescer a 37°C e 220 rpm por ~16 horas. Após esse período, as células foram centrifugadas a 5000 x g e passaram pelo processo de midipreparação plasmidial (Midiprep), onde o plasmídeo de interesse foi purificado utilizando-se o kit The PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega) seguindo-se as recomendações do fabricante.

2.2.2.2. Linearização do vetor e confirmação por eletroforese em gel de agarose

Para que ocorresse a integração do vetor ao genoma de *K. phaffii* via recombinação homóloga era necessário que este se encontrasse linearizado. Para tal, utilizou-se a enzima PmeI (NEB). Na reação utilizou-se 10 ug do plasmídeo obtido após a midiprep do Item 2.2.2.1., 30U de PmeI e tampão CutSmart NEB em concentração final de 1x. A reação ocorreu por ~7 horas a 37°C. Em seguida foi feita a inativação da enzima de restrição por meio da incubação da reação a 65°C por 20 minutos. A seguir, o DNA linearizado foi precipitado a fim de remover a enzima de restrição. Para isso adicionou-se à reação acetato de sódio 3 M (1:10) e etanol 100% (2,5x o volume da reação). A reação foi deixada a -20°C por ~16 horas. Posteriormente a amostra foi centrifugada a 14000 x g por 30 minutos, o sobrenadante descartado e o pellet (DNA) lavado com 500 µL de etanol 80%. A amostra foi novamente

centrifugada a 14000 x g por 30 minutos, seu sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi deixado secar em temperatura ambiente. Após a secagem o DNA foi ressuspensão em H₂O MiliQ.

Para a confirmação da linearização do vetor foi realizada a eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) preparado com TBE 1x (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM) e corado com brometo de etídio a 0,25 mg/mL. A amostra foi preparada através da mistura do DNA com o tampão de amostra 6x (na proporção 5:1). Foi adicionado ao gel o vetor linearizado e o vetor intacto (controle negativo). O gel foi corrido em tampão TBE a 80 V.

2.2.2.3. Transformação de células de *Komagataella phaffii* por eletroporação

Toda metodologia de manipulação de *K. phaffii* descrita nesse documento foi retirada do manual *EasySelect™ Pichia Expression Kit*, da Invitrogen, publicado em 2010 (disponível em: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/easyselect_man.pdf).

Para a transformação de *K. phaffii*, uma colônia de células cepa X-33 não transformada foi plaqueada em placa de Petri contendo meio de cultura YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) sólido (extrato de levedura 1% (m/v), peptona de caseína 2% (m/v), glicose 2% (m/v) e ágar 2% (m/v)). A placa foi acondicionada em estufa a 28°C por ~48 horas. Após esse período, uma colônia de X-33 foi inoculada em 5 mL de meio YPD líquido (sem a adição de ágar) e o inóculo foi deixado crescer a 28°C sob agitação de 250 rpm por aproximadamente 16 horas. Após esse período, a D.O.₆₀₀ do inóculo foi medida. Em um erlenmeyer de 1L foi colocado 100 mL de YPD e a ele adicionou-se um volume de inóculo calculado para que após 16 horas de crescimento se atingisse a D.O.₆₀₀ entre 1,5-1,8. Para isso, considerou-se que o tempo de duplicação das células de *K. phaffii* era de 2 horas. O erlenmeyer foi acondicionado em *shaker* e o inóculo cresceu a 28°C e 250 rpm. Atingida a D.O.₆₀₀ desejada, a cultura foi centrifugada a 1500 x g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão em 100 mL de água MiliQ gelada autoclavada. As células foram centrifugadas novamente a 1500 x g por 5 min a 4°C e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 50 mL de água gelada autoclavada e centrifugadas como descrito anteriormente. Em seguida, as células foram ressuspensas em 4 mL de sorbitol 1 M gelado e centrifugadas como anteriormente. O sobrenadante foi descartado e por fim as células foram ressuspensas em 200 µL de sorbitol 1M gelado. Misturou-se 10 µg de DNA plasmidial linearizado a 80 µL dessas células e transferiu-se as células + DNA para uma cubeta de eletroporação. A cubeta foi incubada em gelo por ~5 minutos e em seguida submetida à eletroporação por 10 ms a 1500V, 400 Ω e 25 µF. Imediatamente após a eletroporação adicionou-se à cubeta 1 mL de sorbitol 1 M gelado. Transferiu-se o conteúdo da cubeta para um tubo de 1,5 mL o qual foi incubado a

28°C por 2 horas sem agitação. O tubo foi centrifugado a 1500 x g, 780 µL de sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas nos 300 µL restantes. O mesmo processo foi realizado para o controle negativo, onde, nesse caso, não houve a adição de DNA. Em placas contendo meio YPD sólido acrescido de zeocina (100 µg/mL) foram plaqueadas as células eletroporadas. As placas foram incubadas a 28°C de 3 a 5 dias. Como esperado, apareceram colônias nas placas contendo as células transformadas com o DNA linearizado, não havendo o mesmo perfil nas placas com o controle negativo.

Um total de 44 colônias foram replaqueadas em placas de Petri enumeradas contendo meio de cultura YPD sólido acrescido de zeocina (100 µg/mL). As placas foram incubadas em estufa a 28°C e deixadas crescer por 72 horas.

2.2.2.4. Determinação do fenótipo Mut

Caso a recombinação do vetor linearizado dentro do locus AOX1 ocorresse de forma a danificar o gene AOX1, a levedura teria uma capacidade diminuída de metabolização do metanol. Foi feita a determinação do fenótipo mut para definir se os clones obtidos após a transformação eram plenamente capazes de metabolizar o metanol (mut⁺) ou metabolizavam o metanol de forma mais lenta (mut^s). Para isso, plaqueou-se em placas de Petri os meios sólidos *Minimum Methanol* (MM, *Yeast Nitrogen Base* 1,34%, biotina 4x10⁻⁵%, metanol 0,5% e ágar 2%) e *Minimum Dextrose* (MD, *Yeast Nitrogen Base* 1,34%, biotina 4x10⁻⁵%, glicose 2% e ágar 2%) e a eles adicionou-se zeocina 100 µg/mL. Cada um dos 44 clones anteriormente plaqueados foram replaqueados tanto nas placas contendo o meio MM, quando nas contendo o meio MD. As placas foram incubadas em estufa a 28°C por ~48 horas. Em seguida, comparou-se o crescimento dos clones entre as duas placas e selecionou-se 8 entre aqueles que cresceram de forma semelhante nos dois meios, tendo em vista que isso é um indicativo de que aquele clone é capaz de crescer plenamente utilizando metanol como fonte de carbono.

2.2.2.5. Screening de expressão gênica

Foi realizado um experimento de expressão em pequena escala (em 25 mL de meio de cultura, utilizando-se frascos de 250 mL de volume) para determinar se oito clones selecionados eram capazes de expressar o gene da SVSP ancestral. Inicialmente realizou-se uma tentativa de expressão com meio BMMY e alimentação com metanol a 1%, mas não foi detectada expressão. Por conta disso, trocou-se o meio de cultura para o meio mínimo BMM. Utilizando-se esse meio de cultura foram testados inicialmente somente 3 clones, sendo eles o 3, o 33 e o 36. Também foi realizado o experimento com células de *K. phaffii* transformadas com o vetor pPicZαA vazio (controle negativo). Inicialmente, cada um dos

clones foi inoculado em 5 mL de meio BMG (fosfato de potássio 100 mM pH 6,0, *Yeast Nitrogen Base* 1,34%, biotina $4 \times 10^{-5}\%$, glicerol 1%) e deixado crescer a 28°C e 250 rpm por 48 horas. Em seguida, a D.O.₆₀₀ dos inóculos foi medida e logo após eles foram centrifugados a 1500 x g por 5 minutos. Foi centrifugado o volume de células necessário para que a D.O.₆₀₀ no meio BMM fosse de 1. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 25 mL de meio BMM (fosfato de potássio 100 mM pH 6,0, *Yeast Nitrogen Base* 1,34%, biotina $4 \times 10^{-5}\%$, metanol 1%). O inóculo em BMM foi acondicionado em *shaker* a 28°C e 250 rpm, onde ficou por 96 horas, sendo realizadas a cada 24 horas alimentações com metanol 1% e leituras da densidade ótica a 600 nm. Ao final dos quatro dias de expressão os inóculos foram centrifugados a 5000 x g por 10 minutos e o sobrenadante guardado a 4°C.

2.2.2.6. Confirmação da expressão por SDS-PAGE e Western Blot

Para a confirmação da expressão em SDS-PAGE (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), 1 mL dos sobrenadantes obtidos no item anterior foram submetidos à precipitação proteica, a fim de concentrar as proteínas ali presentes. Para isso, adicionou-se a esses sobrenadantes 250 µL de ácido tricloroacético (TCA) e acondicionou-se a -20°C por aproximadamente 16 horas. Logo após, centrifugou-se as amostras a 14000 x g por 15 minutos e descartou-se o sobrenadante. Os *pellets* formados foram lavados com 500 µL de acetona 100% e centrifugados a 14000 x g por 15 minutos. A última etapa foi repetida uma segunda vez. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* resultantes foram deixados secar a 37°C. Em seguida, as amostras foram ressuspensas em 20 µL de água MilliQ, misturadas a 5 µL de tampão de amostra Laemmli (300 mM Tris-HCl pH 6.8, SDS (Dodecil sulfato de sódio) 10% (m/v), β-mercaptoetanol 25% (v/v) e azul de bromofenol 0,05% (m/v)) e fervidas por 10 minutos.

Os géis separadores 12% (m/v) foram preparados com 3 µL de TEMED, 150 µL de SDS 10% (m/v), 50 µL de PSA (persulfato de amônia) 10% (m/v), 1,25 mL de Tris-HCl pH 8.8, 2 mL de acrilamida 30% (m/v) e 1,7 mL de água destilada. Os géis concentradores 5% (m/v) foram preparados utilizando-se 75 µL de SDS 10% (m/v), 3 µL de TEMED, 25 µL de PSA 10% (m/v), 340 µL de Tris-HCl pH 6,8, 420 µL de acrilamida 30% (m/v) e 1,75 mL de água destilada. Foi adicionado à canaleta do gel 25 µL de cada amostra, as quais foram corridas em tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 200 mM e SDS 0,1% (m/v)) a aproximadamente 35 mA.

A coloração do gel para a visualização das proteínas foi feita com nitrato de prata. Após a corrida, foi adicionado ao gel 60 mL de acetona 50% (v/v), 1,5 mL de TCA 50% (v/v) e 25 µL de formaldeído 37% (v/v). O gel foi deixado sob agitação por 5 minutos. Em seguida a solução foi descartada, o gel lavado três vezes com água destilada e deixado em água por 5 minutos

sob agitação. Logo após foi novamente lavado três vezes com água destilada e submetido a 60 mL de acetona 50% por 5 minutos sob agitação. A acetona foi descartada e ao gel foi adicionado 60 mL de uma solução de tiosulfato de sódio 0,016% (m/v). Ficou sob agitação por 1 minuto. A solução foi descartada, o gel foi lavado três vezes com água destilada e corado com 60 mL de uma solução contendo 800 µL de AgNO₃ 20% (m/v) e 600 µL de formaldeído 37% (v/v). O gel ficou sob agitação por 8 minutos. A solução de nitrato de prata foi descartada e o gel foi lavado duas vezes com água destilada. A revelação das proteínas foi feita a partir da adição ao gel de 60 mL de uma solução contendo 1,2 g de Na₂CO₃, 25 µL de formaldeído 37% (v/v) e 25 µL de tiosulfato de sódio 10% (m/v). Agitou-se o gel até ser possível observar as bandas de proteínas. A reação de revelação foi finalizada com a adição de 30 mL de ácido acético 1% (v/v).

Para o *Western Blot* foi corrido um gel SDS-PAGE 12% conforme descrito acima. Após a corrida, o gel ficou 10 minutos submerso em tampão de transferência (Tris base 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20% (v/v)) e a membrana de nitrocelulose ficou submersa em água destilada pelo mesmo período. Em seguida o gel e a membrana foram montados no aparato de transferência semi-seca (*Power Blotter–Semi-dry Transfer System* – ThermoFisher) seguindo o protocolo do fabricante. A transferência das proteínas do gel para a membrana ocorreu por 7 minutos a 1,3 A. Logo após, a membrana de nitrocelulose foi lavada com PBS (*Phosphate-buffered saline*, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4), e submersa em uma solução contendo 5% de leite em pó desnatado dissolvido em PBS. A membrana permaneceu nessa solução sob agitação por 1 hora, e em seguida foi lavada duas vezes com PBS com 0,05% de Tween 20, com cada lavagem durando 5 minutos sob agitação. A solução de lavagem foi descartada e a membrana foi submersa em uma solução contendo o anticorpo primário anti-HisTag (Abcam) na proporção 1:10000 diluído em PBS. A membrana permaneceu nessa solução por ~16 horas a 4°C. Em seguida, a solução com anticorpo foi removida e a membrana foi lavada duas vezes com PBS com 0,05% de Tween 20 durante 5 minutos. Logo após, a membrana foi submersa em uma solução contendo o anticorpo secundário anti-mouse conjugado a fosfatase alcalina (Abcam) na proporção 1:3000 diluído em PBS, onde ficou incubada por 1 hora. Passado o tempo de incubação, a solução com o anticorpo foi removida e a membrana foi lavada três vezes com PBS com 0,05% de Tween 20, seguido por uma lavagem com PBS e uma com água destilada. A revelação das bandas foi feita utilizando-se 1 mL da solução de substrato NBT/BCIP (ThermoFisher). Após o aparecimento das bandas o substrato foi descartado e a membrana foi lavada com água destilada.

2.2.2.7. Testes de otimização da expressão

Um teste de otimização da expressão foi realizado com a colônia 33, visto que ela apresentou resultado positivo. A expressão foi feita em meio de cultura BMM seguindo o protocolo descrito no item 2.2.2.5., com algumas modificações que visavam induzir uma maior produção proteica. Foram feitos seis inóculos com diferentes variações em condições de expressão. Três inóculos variaram na concentração de indutor, onde utilizou-se metanol a 2%, 3% e dependente da D.O. do inóculo, onde induziu-se com metanol 1% quando a D.O. se encontrava entre 1-10, com metanol 2 % quando a D.O. estava entre 10,1-20, e metanol 4% quando a D.O. estava acima de 20. Os outros três inóculos variavam a D.O. do momento da indução, sendo utilizadas as D.O. iniciais de 1, 2,5 e 5. Ao final das 96 h as células foram centrifugadas a 5000 x g e o sobrenadante foi acondicionado a 4°C. O comparativo da expressão entre as seis estratégias foi feito por meio de SDS-PAGE 12% e *Western Blot* conforme descrito no item 2.2.2.6.

2.2.2.8. Purificação da SVSP ancestral por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (Ni²⁺)

Foi realizada uma expressão da SVSP ancestral em 1 litro de meio de cultura BMM conforme descrito no item 2.2.2.5, onde foram utilizados 10 frascos erlenmeyers de 1 litro com 100 mL de inóculo em cada (utilização de 10% do volume total do frasco). Após a finalização da expressão e centrifugação da cultura, o sobrenadante resultando foi concentrado, dialisado para água e em seguida para o tampão de purificação (Tris 75mM, NaCl 150mM, pH 7,5) utilizando-se um concentrador com uma membrana com *cutoff* de 10 kDa.

A purificação foi realizada utilizando-se o equipamento ÄKTA Purifier (GE Healthcare) e a coluna HisTrap HP de 1 mL (GE Healthcare). A amostra dialisada e concentrada foi filtrada em uma membrana com poro de 0,45 µm e injetada na coluna a um fluxo de 1 mL/min. A coluna foi submetida a diversas lavagens com tampão de eluição (Tris 75mM, NaCl 150mM, imidazol 500 mM pH 7,5) em diferentes concentrações de imidazol (25, 50, 100, 150, 250 e 500 mM) para a remoção de proteínas contaminantes e determinação do perfil de eluição. A purificação foi confirmada por SDS-PAGE 12%, conforme descrito no item 2.2.2.6. A concentração da proteína obtida foi determinada de acordo com a Equação 1:

$$\text{Equação 1: } C \text{ (mg/mL)} = 10 \times A_{280} / A_{280}^{1\%}$$

Onde C é a concentração em mg/mL, A_{280} é a absorbância a 280 nm e $A_{280}^{1\%}$ é a absorbância da proteína a 280 nm quando a 1%, cujo valor teórico para a SVSP ancestral é de 14,13 UA.

2.2.2.9. Teste de deglicosilação utilizando-se a enzima PNGase F

Por conta do tamanho maior do que o esperado apresentado pela SVSP ancestral no SDS-PAGE e por possuir sítios preditos de N-glicosilação, foi realizado um teste de deglicosilação utilizando-se a enzima PNGase F, cuja atividade é específica para N-glicosilações. Para a reação foi utilizado tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,5, Triton-X 0,75% e a enzima PNGase F de *Elizabethkingia miricola* (5000U/mL, Sigma Aldrich) na proporção de 1 µL para cada 100 µg de proteína a ser deglicosilada. Foram preparadas 3 reações, onde cada uma foi retirada 24 horas após a outra. A deglicosilação foi confirmada por SDS-PAGE 12%, conforme descrito no item 2.2.2.6. Para a retirada da PNGase F (quando necessário) a amostra foi dialisada para água e em seguida para tampão de purificação utilizando-se um concentrador com *cutoff* de 3 kDa e submetida a uma nova purificação por cromatografia de afinidade, conforme descrito no item 2.2.2.8.

2.2.2.10. Análise da deglicosilação por espectrometria de massas

Amostras da SVSP ancestral purificada glicosilada e deglicosilada tiveram sua massa estimada por meio de espectrometria de massas. Para isso, elas foram inicialmente dialisadas em água MiliQ utilizando-se um concentrador com uma membrana com *cutoff* de 3 kDa e em seguida aplicadas em uma placa de MALDI Anchorchip (600 mm) na proporção 1:1 com ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) diluído em solução de acetonitrila e TFA 3% (proporção de acetonitrila/água MiliQ/TF 3% de 5:4:1). A massa molecular média das amostras foi adquirida no equipamento Autoflex Speed MALDI-TOF (Bruker Daltonics) utilizando o modo linear positivo (LP). Os resultados obtidos foram analisados com o uso do software FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics).

2.2.3. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS APRESENTADAS PELA SVSP ANCESTRAL

2.2.3.1. Caracterização da atividade de clivagem do fibrinogênio

Por conta da atividade fibrinogenolítica (clivagem do fibrinogênio) ser uma das mais comumente apresentadas pelas SVSPs (Mackessy, 2010), esse foi o primeiro teste enzimático realizado com a SVSP ancestral. O teste foi baseado no realizado por Megale e Colaboradores (2019). O substrato utilizado foi o fibrinogênio humano (Sigma Aldrich) e a sua clivagem foi confirmada através de SDS-PAGE 12% (conforme descrito no item 2.2.2.6.), com a diferença de que foi corado com solução de Commassie (*commassie brilliant blue* R-250 0,1% (m/v), metanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v)) e descorado com ácido acético 20% (v/v). É importante salientar que este teste não determina se a clivagem ocorreu de forma a

liberar os peptídeos A e B, o que induz à formação de fibrinas. Ele somente determina se a proteína é capaz de clivar as cadeias α e β do fibrinogênio.

O teste foi realizado com a SVSP ancestral tanto glicosilada quanto deglicosilada. O ensaio inicial foi feito em tampão PBS a 37°C durante 2 horas, utilizando-se a enzima e o fibrinogênio, respectivamente, nas proporções molares 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64. A reação foi finalizada com a adição de tampão de amostra Laemmli 5x. Confirmada a clivagem do fibrinogênio em SDS-PAGE, a menor concentração enzimática onde foi possível observar clivagem foi selecionada para ser utilizada nos testes subsequentes. Foi realizado um ensaio pelo tempo, com duração total de 24 h e coletas nos períodos de 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h e 24 h. Para esse ensaio também utilizou-se tampão PBS e foi realizado a 37°C. Um ensaio pela temperatura também foi feito, onde também utilizou-se tampão PBS e avaliou-se o perfil de clivagem do fibrinogênio a 4, 25, 37, 42 e 75°C por 2 horas. No teste pelo pH, utilizou-se tampões de mesma composição que o PBS para aqueles com pH entre 7 e 8, tampão citrato de sódio para aquelas com pH <7 (Citrato de sódio 50 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM) e tampão tris (Tris 50mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM) para o pH 9,0. Os testes foram feitos nos pH 5,0, 6,0, 7,0, 7,4, 8,0 e 9,0 a 37°C por 2 horas. Por último foi realizado um ensaio utilizando-se moléculas possivelmente inibidoras da atividade enzimática. Utilizou-se os inibidores de serinoproteases aprotinina (0,6 μ M), leupeptina (10 μ M) e fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF, 1 mM), e as moléculas Ditioneitol (DTT, 10 mM) (para avaliar a importância das pontes dissulfeto) e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, 10 mM) (para avaliar a dependência de íon divalente). O ensaio foi realizado em PBS a 37°C por 2 horas.

2.2.3.1.1. Identificação da atividade de indução da formação de coágulos de fibrina

A clivagem do fibrinogênio de forma a liberar os peptídeos A e B das cadeias α e β , respectivamente, induz a formação de coágulos de fibrina. Um teste enzimático de detecção de formação desses coágulos foi realizado utilizando-se o fibrinogênio e a SVSP ancestral deglicosilada de forma a detectar se a enzima apresentava tal atividade (protocolo adaptado de Menaldo e Colaboradores, (2012) e Chernyshenko e Colaboradores (2014)). O teste foi realizado em triplicata em placa de 96 poços e lido a 405 nm utilizando-se uma leitora de microplaca (SpectraMax M5). Para cada uma das replicatas utilizou-se 250 μ g de fibrinogênio e 715,7 ng da SVSP (concentração final de fibrinogênio e SVSP de 3,68 e 1,32 μ M, respectivamente). A reação ocorreu em tampão PBS por 30 minutos, com leituras sendo realizadas a 405 nm a cada 15 segundos. A enzima trombina do plasma bovino (Sigma Aldrich) foi utilizada como controle positivo (84 nM).

2.2.3.2. Determinação da atividade de esterase

A atividade de esterase (clivagem da ligação éster após um resíduo de aminoácido) é comumente detectada em SVSPs e outras proteases (Wang *et al.*, 2014). Para testar se a ancestral possuía esse tipo de atividade utilizou-se o substrato sintético N α -Benzoil-L-arginina etil ester cloridrato) (BAEE, Sigma Aldrich), onde há a liberação de N α -Benzoil-L-arginina + etanol como produto da hidrólise. Os ensaios foram feitos em triplicata com a enzima glicosilada e deglicosilada em microplaca de 96 poços e lido a 253 nm utilizando-se uma leitora de microplaca (SpectraMax) durante 30 min com leituras a cada 1 min. Os testes foram realizados em tampão fosfato de sódio 67 mM pH 7,6 com o BAEE a 0,5 mM e a enzima em diversas concentrações diferentes. A tripsina bovina (Sigma Aldrich) foi utilizada como controle positivo. A atividade foi dada em milimolar de produto produzido, considerando-se o coeficiente de extinção molar do N α -Benzoyl-L-arginine como 808 a 253 nm.

2.2.3.3. Determinação da atividade amidolítica

A atividade amidolítica (clivagem da ligação peptídica) após resíduos de arginina foi testada com o substrato sintético N α -Benzoil-DL-arginina 4-nitroanilina cloridrato (BAPNA, Sigma Aldrich), onde há a liberação de N α -Benzoil-L-arginina + 4-nitroanilina como produto da hidrólise. Os ensaios foram feitos em triplicata com a enzima glicosilada e deglicosilada em microplaca de 96 poços e lido a 405 nm utilizando-se uma leitora de microplaca (SpectraMax) durante 30 min com leituras a cada 1 min. Os testes foram realizados em tampão fosfato de sódio 67 mM pH 7,6 com o BAPNA a 1,46 mM e a enzima em diversas concentrações diferentes. O BAPNA foi inicialmente dissolvido em dimetilsulfóxido 100% (DMSO) e em seguida misturado ao tampão da reação. A tripsina bovina (Sigma Aldrich) foi utilizada como controle positivo. A atividade foi dada em μ M de produto produzido, considerando-se o coeficiente de extinção molar da 4-nitroanilina como 9500 a 405 nm.

2.2.3.4. Determinação da atividade do tipo calicreína

As calicreínas são proteínas plasmáticas ou teciduais que atuam na clivagem do cininogênio e liberação de cinina. É considerada a atividade ancestral das serinoproteases da peçonha de serpentes e lagartos sendo uma atividade encontrada em algumas SVSPs (ler o item 1.2.2.3.). Para testar se a ancestral possuía esse tipo de atividade utilizou-se o substrato sintético Benzoil-Pro-Phe-Arg-4-nitranilina acetato (Chromozym PK, Roche), onde há a liberação de Benzoil-Pro-Phe-Arg + 4-nitroanilina como produto da hidrólise. Os ensaios foram feitos em triplicata com a enzima glicosilada e deglicosilada em microplaca de 96 poços e lido a 405 nm utilizando-se uma leitora de microplaca (SpectraMax). Os testes foram realizados

em PBS com o Chromozym PK a 0,25 mM e a SVSP ancestral em diversas concentrações. Além das variações de concentração foram feitos testes com variação de pH (de 5 a 9). A calicreína humana (Sigma Aldrich) foi utilizada como controle positivo. A atividade foi dada em μM de produto produzido, considerando-se o coeficiente de extinção molar da 4-nitroanilina como 9500 a 405 nm.

2.2.4. ANÁLISE DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA E TERMOESTABILIDADE POR DICROÍSMO CIRCULAR

Utilizou-se para as medidas de dicróismo circular um espectropolarímetro Jasco J-815 provido de um sistema de controle de temperatura Peltier. Os ensaios foram realizados com os tampões acetato de sódio (5 mM, pH 5,0) e Tris-HCl (5 mM, pH 7,5 e 9,0) somente com a proteína glicosilada. Para a obtenção dos espectros utilizou-se uma cubeta de 0,1 cm. Utilizando-se a Equação 2 calculou-se as elipticidades molares a partir das elipticidades obtidas:

$$\text{Equação 2: } [\theta] \text{ (grau.cm}^2\text{.dmol}^{-1}\text{)} = 115.\alpha/10.C.l$$

Sendo, α o sinal dicróico em miligraus, C a concentração da amostra (0,13 mg/mL para a SVSP glicosilada) e l o trajeto ótico (cm) da cubeta utilizada. Primeiro foram gerados espectros a 25 °C seguido pela desnaturação térmica a qual foi conduzida de 25 °C a 95 °C para todos os pH. A partir das curvas obtidas a estabilidade térmica da proteína foi determinada. A deconvolução do sinal dicróico para percentual de estrutura secundária foi feita utilizando-se o software BeStSel (Micsonai *et al.*, 2022) e estimativa de estrutura secundária do modelo predito pelo ColabFold foi feito pelo software 2struc (Klose *et al.*, 2010).

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. CRIAÇÃO DE UMA SERINOPROTEASE ANCESTRAL A PARTIR DA TÉCNICA DE RECONSTRUÇÃO DE SEQUÊNCIA ANCESTRAL

2.3.1.1. **Árvore filogenética das serinoproteases da peçonha de serpentes e lagartos**

Como explicado anteriormente, dentre as tripsinas, calicreínas e toxinas de peçonha, enzimas presentes na primeira árvore construída (a árvore pode ser visualizada no Anexo I), foi escolhido o último grupo para ser mais profundamente estudado e ter uma sequência ancestral reconstruída. Para isso foi construída a árvore filogenética somente das toxinas de peçonha, a qual contava com 150 sequências de toxinas e 5 sequências como *outgroup*.

Como mostrado na Figura 7, a família Viperidae é a mais presente na árvore, possuindo 76% das sequências apresentadas. As outras famílias de serpentes representadas são a Elapidae, que conta com 5 sequências, Colubridae, com 2 sequências e a família Pythonidae, com 2 sequências. Exceto a família Pythonidae, todas as outras famílias de serpentes possuem espécies reconhecidamente peçonhentas. Como observado, os lagartos formaram um grupo à parte das serpentes. Estão presentes as famílias Varanidae, Helodermatidae, Anguidae e Diploglossidae, todas pertencentes ao clado Anguimorpha, e a família Polychrotidae, pertencente ao clado Iguania. Todos os répteis presentes na árvore são pertencentes ao clado Toxicofera (ler capítulo 1).

Observa-se na árvore que muitas espécies possuem várias sequências, principalmente dentro da família dos viperídeos, demonstrando a intensa diversificação dessas serinoproteases. Esse resultado é semelhante ao encontrado por Xie e Colaboradores (2022). Os autores construíram uma filogenia das serinoproteases de serpentes cenofídicas e também verificaram a diversidade de parálogos que surgiu após a separação da família Viperidae, o que contrasta com as poucas sequências encontradas para outras famílias de serpentes.

Devido ao excesso de parálogos não foi possível separar as sequências de viperídeos em grupos filogenéticos distintos. Por conta disso, pressupôs-se que as sequências poderiam estar agrupadas na árvore quanto ao substrato reconhecido, como verificado por Wang e Colaboradores (2001). Os autores criaram uma árvore filogenética com 43 sequências de viperídeos e identificaram três grupos separados quanto ao substrato reconhecido, o de quininogenases (KN), enzimas de coagulação (CL) e ativadores de plasminogênio (PA). Entretanto, a maioria das sequências presentes na árvore não foram caracterizadas bioquimicamente, sendo inviável afirmar qual/quais substrato(s) elas clivam. Dentre as que foram caracterizadas, não foi possível identificar nenhum padrão claro dentre os clados da árvore. Ademais, as serinoproteases da peçonha podem apresentar mais de uma atividade, sendo difícil classifica-las em somente uma função. Vaiyupuri e Colaboradores (2012) também

montaram uma árvore filogenética das serinoproteases da peçonha de viperídeos. Os autores utilizaram 196 sequências e também concluíram que não era possível separá-las quanto ao substrato reconhecido. O uso de um grupo maior de sequências faz desaparecer tendências visualizadas quando se analisa poucas sequências.

A árvore presente na figura 7 assim como a árvore do anexo I contradizem completamente os argumentos de Hargreaves e Colaboradores (2014) contra a veracidade do clado Toxicofera. Os autores questionam, dentre outras coisas, a monofilia das serinoproteases da peçonha. Como demonstrado, as serinoproteases da peçonha de lagartos e serpentes agrupam-se separadamente de outras serinoproteases. Além disso, somente é observado agrupadas na árvore sequências de espécies caracterizadas como pertencentes ao clado Toxicofera.

2.3.1.2. Reconstrução da sequência ancestral dos viperídeos

Devido à importância das SVSPs na composição da peçonha dos viperídeos e à grande variedade de atividades biológicas que elas exercem quando comparadas às presentes em outras serpentes/lagartos (ver capítulo 1), foi definido que seria criada sua sequência ancestral, a fim de compreender de onde teria surgido tamanha diversidade de substratos clivados. A partir da árvore dessas serinoproteases (figura 7) foi reconstruída a sequência ancestral das víboras (família Viperidae) utilizando-se dois diferentes programas: o FireProt e o MEGA X. Nas figuras 8 e 9 encontram-se as sequências preditas por cada um dos programas. A predita pelo FireProt possui 227 resíduos e a predita pelo MEGA X, 229. Como mostrado na figura 10, as sequências tiveram poucas diferenças, apresentando entre si 98,68% de identidade. Por conta do programa MEGA X ter sido utilizado desde o início para a realização das análises filogenéticas, foi selecionada a sequência predita por ele para ser produzida e caracterizada. Ao seu C-terminal foi adicionado os resíduos TDASCPP como descrito no item 2.2.1.3. A SVSP ancestral ao final ficou com 236 resíduos e tamanho estimado de 27,11 kDa.

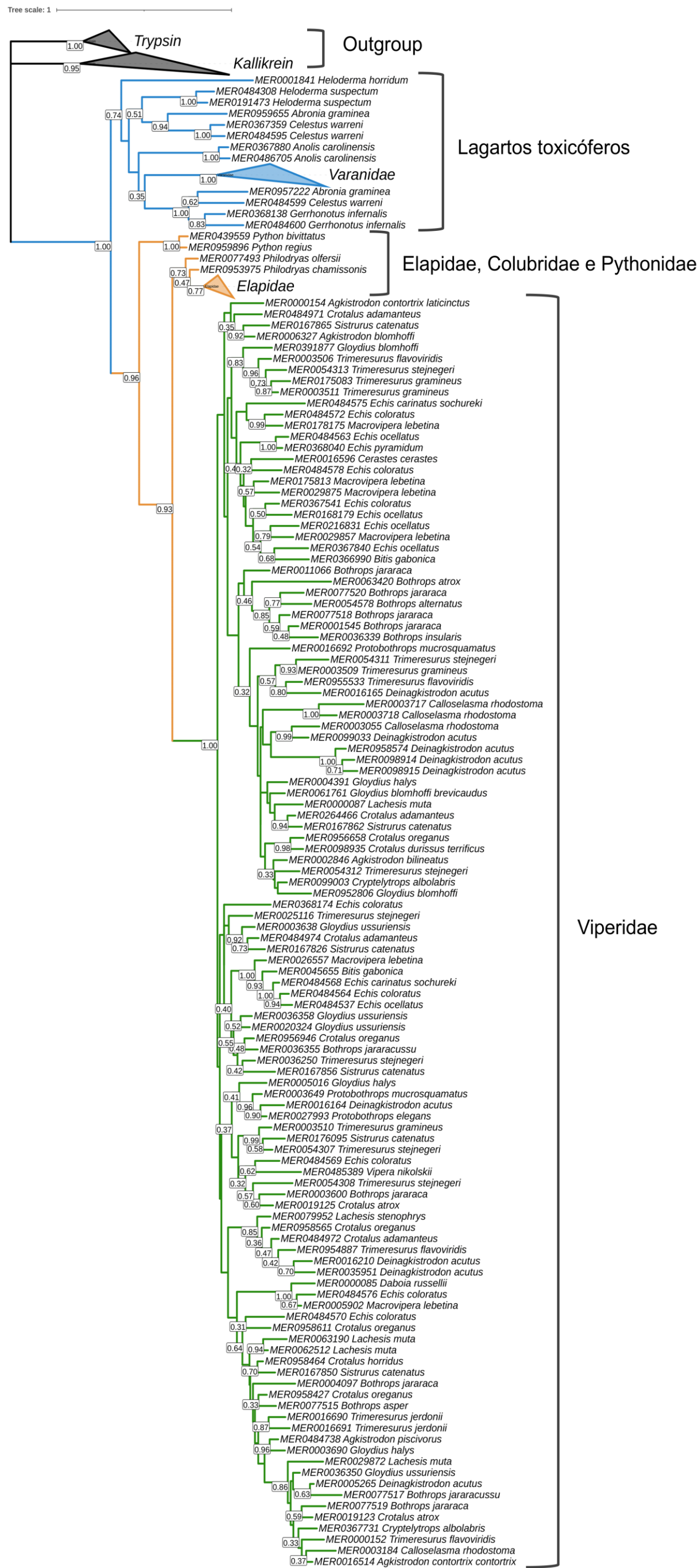


Figura 7. Árvore filogenética das serinoproteases da peçonha de serpentes e lagartos. Árvore construída pelo método de máxima verossimilhança com 2000 replicatas *bootstrap*. Valores de *bootstrap* encontram-se acima de cada nó, onde 1.0 equivale a 100%. Estão omitidos na árvore *bootstraps* <0.3 (30%).

VIGGDECNINEHRFLVLLYNSSGFLCGGTLINQEWVLTAHCDRNM
 QIKLGVHNKNVPNEDEQTRVPKEKFFCLSSKNYTKWDKDIMLIRLNR
 PVNNSITHIAPLSLPSSPPSVGSVCRIMGWGTITSPKETYPDVPHCAN
 INILDYEVCRAAYPGLPATSRITLCAGILEGGKDTCKGDSGGPLICNG
 QFQGIVSWGGHPCAQPLKPGLYTKVFDYTDWIQSIAGN

Probabilidades:

45 - K: 0,64 E: 0,311
 50 - K: 0,714 Q: 0,231
 57 - N: 0,382 S: 0,227 K: 0,364
 65 - T: 0,821
 130 - K: 0,711 N: 0,262
 156 - G: 0,648 W: 0,351
 206 - K: 0,884 E: 0,115

Figura 8. Sequência ancestral dos viperídeos reconstruída com o uso do programa FireProt. Marcados em vermelho está o resíduo cuja probabilidade é < 50% (N57) e em amarelo aqueles com probabilidade entre 70 - 90% (todos os outros resíduos marcados). Abaixo da sequência encontram-se as probabilidades dos resíduos marcados bem como de outros resíduos para aquela posição. (Imagem borrada para proteção de dados ainda não publicados).

IIGGDECNINEHRFLVLLYNSRS SGFLCGGTLINQEWVLTAHCDRK
 NMQIKLGVHNKNVPNEDEQTRVPKEKFFCLSSKNYTKWDKDIMLIRL
 NRPVNNSITHIAPLSLPSSPPSVGSVCRIMGWGTITSPKETYPDVPHC
 ANINILDYEVCRAAYPGLPATSRITLCAGILEGGKDTCKGDSGGPLIC
 NGQFQGIVSWGGHPCAQPREPGLYTKVFDYTDWIQSIAGN

Probabilidades:

01 - I: 0,52 W: 0,48
 24 - S: 0,88
 47 - K: 0,66 E: 0,26
 50 - Q: 0,89
 52 - K: 0,45 Q: 0,33
 102 - T: 0,71 A: 0,29
 132 - K: 0,68 N: 0,31
 208 - E: 0,75 K: 0,25

Figura 9. Sequência ancestral dos viperídeos reconstruída com o uso do programa MEGA X. Marcados em vermelho está o resíduo cuja probabilidade é < 50% (K52) e em amarelo aqueles com probabilidade entre 70 - 90% (todos os outros resíduos marcados). Abaixo da sequência encontram-se as probabilidades dos resíduos marcados bem como de outros resíduos para aquela posição. (Imagem borrada para proteção de dados ainda não publicados).

```

MEGAX      TIGGDECNINEHRFLVLLYNSRS--SGFLCGGT LINQE WVLTA AHCDRKNMQIKLG VHNKNV 60
FireProt   VIGGDECNINEHRFLVLLYNS--SGFLCGGT LINQE WVLTA AHCDRKNMQIKLG VHNKNV 58
:*****

MEGAX      PNEDEQTRVPKEKFFCLSSKNYTKWDKDIMLIRLNRPVNNSTHIAPLSLPSSPPSVGSVC 120
FireProt   PNEDEQTRVPKEKFFCLSSKNYTKWDKDIMLIRLNRPVNNSTHIAPLSLPSSPPSVGSVC 118
*****

MEGAX      RIMGWGTITSPKETYPDVPHCANINILDYEVCR AAYPGLPAT SRTL CAGILEGGKDTCKG 180
FireProt   RIMGWGTITSPKETYPDVPHCANINILDYEVCR AAYPGLPAT SRTL CAGILEGGKDTCKG 178
*****

MEGAX      DSGGPLICNGQFQGIVSWGGHPCAQPRLKPGLYTKVFDYTDWIQSIIAGN 229
FireProt   DSGGPLICNGQFQGIVSWGGHPCAQPRLKPGLYTKVFDYTDWIQSIIAGN 227
*****

```

Figura 10. Alinhamento entre as sequências ancestrais de viperídeos preditas pelos programas MEGA X e FireProt. As sequências apresentaram identidade de 98,68%. Alinhamento realizado pelo programa Clustal Omega (Sievers & Higgins, 2014). Quadrados em cinza mostram os resíduos diferentes entre as duas sequências. (Imagem borrada para proteção de dados ainda não publicados).

2.3.1.3. Análises *in silico* da sequência construída

Foi realizada uma busca pelo BLASTp contra o banco de dados SwissProt a fim de detectar com quais SVSPs a ancestral mais se parecia. Na figura 11 encontra-se um alinhamento entre ela e as 4 sequências mais parecidas com ela que possuíam sua função descrita, além da sequência da estrutura do PDB mais similar. As sequências foram: Q9PT51 (Uniprot ID) de *Gloydius blomhoffii* com 83% de identidade; P0C5B4.2 de *Gloydius shedaoensis* com 85,15%; Q9PTU8 de *Bothrops jararaca* com 79,5%; Q8AY80.1 de *Trimeresurus stejnegeri* com 85,15% e a estrutura do PDB (4E7N) I4CHP3 de *Agkistrodon halys* com 81,8%. A enzima referente à sequência Q9PT51 apresenta clivagem das cadeias alfa e beta do fibrinogênio além de clivar a fibrina (Lee *et al.*, 1999); a referente à sequência P0C5B4.2 também possui atividade de clivagem das cadeias alfa e beta do fibrinogênio, porém induz a formação de coágulos de fibrina além de ter atividade de esterase (Yang *et al.*, 2009). As enzimas referentes às sequências Q8AY80.1, Q9PTU8 e I4CHP3 degradam as cadeias alfa e beta do fibrinogênio, mas não induzem a formação de coágulos (Gao *et al.*, 1998; Leme *et al.*, 2008; Zeng *et al.*, 2013).

Na figura 11 é possível observar a presença dos resíduos do sítio ativo na mesma posição em todas as sequências analisadas (His, Asp e Ser). Na figura também estão marcadas as regiões que formam os *loops* 37, 60, 99 e 174. Essas regiões formam *loops* na superfície da estrutura das SVSPs sendo os principais responsáveis pelo reconhecimento do substrato (Zeng *et al.*, 2013) (figura 12). Por conta disso, tendem a apresentar baixa

estendida para uma conformação plana. Logo, a presença de glicosilação nesse local pode influenciar na interação da enzima com o substrato (os resultados disponibilizados pelo Dlpro, NetNGlyc 1.0 e NetOGlyc 4.0 encontram-se no Anexo II).

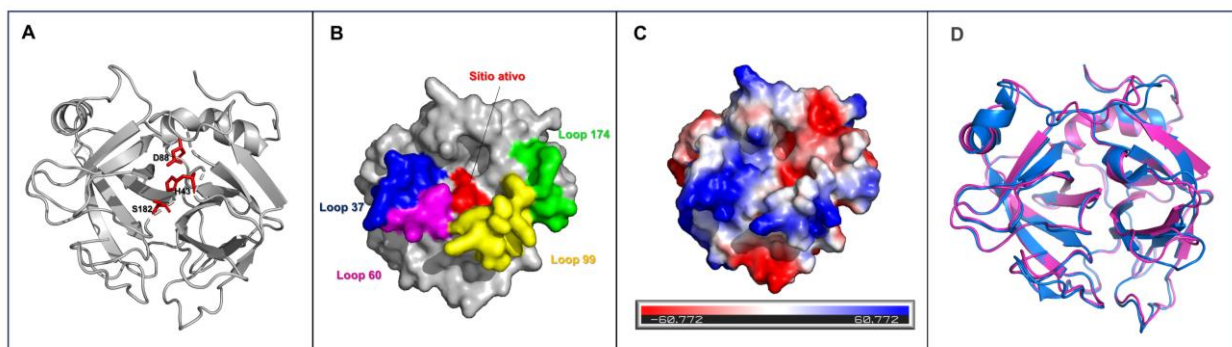


Figura 12. Estrutura tridimensional predita pelo AlphaFold 2 para a SVSP ancestral. **A** – Estrutura tridimensional da SVSP ancestral, destacando os resíduos do sítio ativo, His43, Asp88 e Ser182. **B** – Superfície da SVSP ancestral mostrando a posição dos *loops* envolvidos no reconhecimento do substrato; **C** - Potencial eletrostático da superfície da proteína; **D** – Sobreposição estrutural entre a SVSP ancestral (rosa) e a estrutura de *Agkistrodon halys* (azul, PDB ID 4E7N). RMSD de 0,408 e 189 átomos alinhados.

2.3.2. OBTENÇÃO DA SVSP ANCESTRAL HETERÓLOGA

2.3.2.1. Confirmação da linearização do vetor por eletroforese em gel de agarose

Para a transformação das células de *K. phaffii* foi necessário a linearização do vetor fornecido pela empresa GenScript, tendo em vista que esse é um passo necessário para que haja a integração do vetor no genoma da levedura. Para isso utilizou-se a enzima PmeI (NEB), cujo sítio de restrição (5' GTTT'AAAC 3') no vetor encontra-se dentro da região do promotor AOX1. Na figura 13 encontra-se o gel de agarose com o padrão de migração após a linearização. Como observado, o plasmídeo migrou mais quando linearizado quando comparado à versão circular. Isso se deve ao vetor circular ocupar um maior volume e assim migrar de forma mais devagar que o linear.

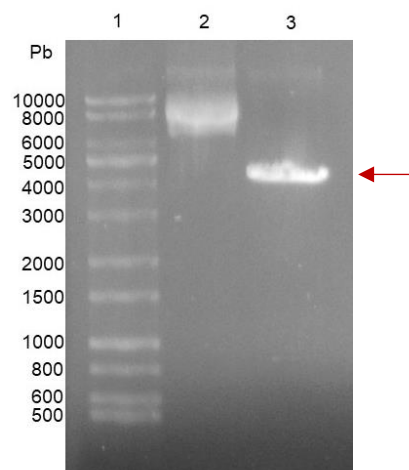


Figura 13. Gel de agarose 0,8% confirmando a linearização com a enzima PmeI do vetor pPICZα clonado com o gene para a SVSP ancestral. O vetor com o inserto possui 4285 pares de bases (pb), um tamanho com equivalência à banda encontrada. 1: Marcador de massa molecular; 2: Vetor não linearizado. 3: Vetor linearizado.

2.3.2.2. Transformação de células de *Komagataella phaffii* e determinação do fenótipo Mut

Após a eletroporação das células de *K. phaffii* foram feitas placas com 100 µL e com 200 µL de células além do controle negativo, como observado na Figura 14. Como esperado, cresceram mais colônias na placa contendo uma maior quantidade de células, e não houve crescimento na placa de controle negativo, visto que no meio continha zeocina e o que confere resistência a esse antibiótico é o gene presente no vetor pPICZα.



Figura 14. Placas da transformação das células de *K. phaffii* com o vetor contendo o gene para a SVSP ancestral. Da esquerda para a direita: placa com 100 µL de células eletroporadas; placa com 200 µL de células eletroporadas e controle negativo onde células foram eletroporadas sem a adição de DNA.

Quarenta e quatro colônias presentes nas placas mostradas na Figura 14 foram replaqueadas em meio YPD com zeocina. Com essas colônias foi feita a determinação dos fenótipos *mut*^s, para detectar aquelas que metabolizavam bem o metanol. Para isso, essas colônias foram crescidas em meios mínimos cujas fontes de carbono eram glicose ou metanol. Aqueles que cresceram bem em glicose, mas não em metanol eram considerados *mut*^s e aqueles que cresceram bem tanto na glicose quanto no metanol eram *mut*⁺ (Figura 15). Nenhuma das colônias crescidas em metanol apresentou o mesmo crescimento que aquelas crescidas em glicose. Isso muito provavelmente se deve ao fato de o metanol ser bastante volátil e ter sido em boa parte perdido durante o preparo das placas. Apesar disso, algumas colônias tiveram um bom crescimento e foram selecionadas para os estudos posteriores.

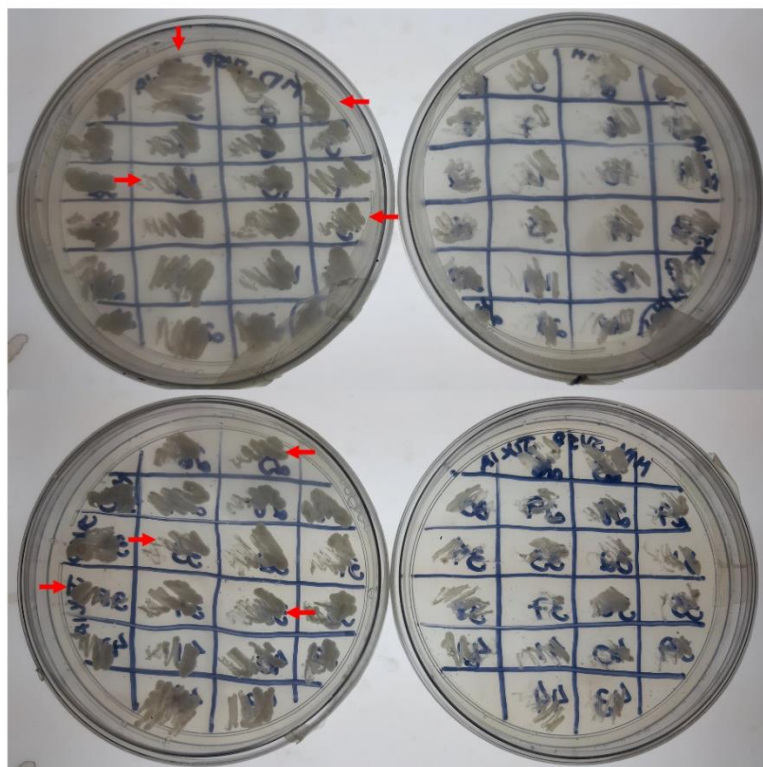


Figura 15. Placas do teste de determinação do fenótipo *mut*^s e *mut*⁺ das células de *K. phaffii* transformadas com o vetor contendo o gene para a SVSP ancestral. Nas placas da esquerda encontram-se as 44 colônias (22 em cada placa) crescidas com glicose como fonte de carbono e na direita encontra-se as placas com as mesmas colônias crescidas em metanol como fonte de carbono. As setas em vermelho indicam as colônias determinadas como *mut*⁺ e selecionadas para o *screening* de expressão (colônias 1, 3, 11, 13, 25, 33 e 36).

2.3.2.3. Screening de expressão gênica

Inicialmente testou-se a expressão gênica das oito colônias escolhidas em meio BMMY mas não foi detectada expressão no SDS-PAGE e nem no *Western Blot*. Devido a isso, testou-se a expressão em um novo meio de cultura (BMM) utilizando-se somente três colônias dentre as oito selecionadas (colônias 3, 33 e 36). A expressão ocorreu por 96 h sob a indução do metanol. Foi considerado que a colônia 33 apresentou resultado positivo, como observado na Figura 16. A membrana revelada do *western blot* não apresentou bandas muito nítidas, mas é possível observar uma banda abaixo do tamanho de 36 kDa e um rastro entre 98 e 36 kDa, o qual não é visualizado no controle negativo. As outras duas colônias não apresentaram resultado positivo. Por conta disso, a colônia 33 foi escolhida para as próximas etapas.

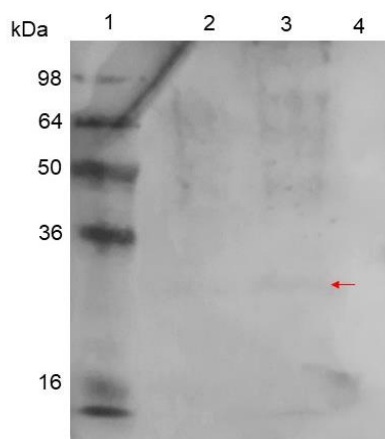


Figura 16. *Western blot* das proteínas secretadas pela *K. phaffii* transformada com o vetor contendo o gene para a SVSP ancestral. A imagem corresponde à colônia 33. 1: Marcador de massa molecular; 2: Sobrenadante da colônia 33; 3: Sobrenadante da colônia 33 com o uso do dobro de volume do poço 2. 4: Controle negativo. A seta em vermelho indica a possível localização da banda referente à SVSP ancestral.

2.3.2.4. Otimização da expressão gênica

Foi realizado um pequeno teste de otimização visando identificar as condições onde houvesse maior expressão da SVSP ancestral. Para isso, testou-se o uso do metanol nas concentrações de 2%, 3% e dependente da D.O. e também testou-se o início da indução com as D.O. em 1, 2,5 e 5. Como observado na Figura 17, uma banda de ~36 kDa apareceu em todas as condições testadas, assim como um rastro entre 98 e 36 kDa, tal qual o encontrado anteriormente (figura 16). Além disso, nas condições com uma concentração maior de metanol surgiram bandas menores que 36 kDa que não são visualizadas nos testes com metanol a 1%. Os testes variando a D.O. não demonstraram muita diferença significativa, exceto que, quando a D.O. era maior que 1, visualizou-se a presença de bandas com ~16 kDa. A SVSP

ancestral possui uma massa estimada em 27,1 kDa, logo, bandas com tamanhos menores que isso indicam a expressão de proteína truncada (parcial), ou proteólise da enzima. Nenhuma das duas opções é desejável.

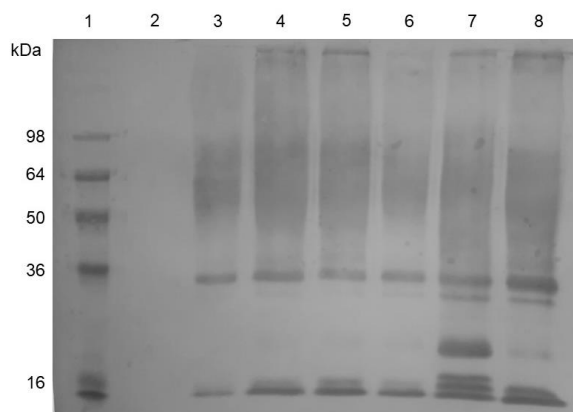


Figura 17. *Western blot* das proteínas secretadas pela *K. phaffii* durante o teste de otimização de expressão da SVSP ancestral. 1: Marcador de massa molecular; 2: Controle negativo (células transformadas com o vetor vazio); 3: teste com O.D. inicial de 1 e metanol 1%; 4: teste com O.D. inicial de 2,5 e metanol 1%; 5: teste com O.D. inicial de 5 e metanol 1%; 6: teste com O.D. inicial de 1 e metanol 2%; 7: teste com O.D. inicial de 1 e metanol 3%; 8: teste com O.D. inicial de 1 e metanol variável.

2.3.2.5. Purificação da SVSP ancestral por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (Ni^{2+})

Baseando-se no resultado do item anterior, foi definido que a expressão da SVSP ancestral seria feita com D.O. inicial de 1 e indução com metanol 1%. Um litro de expressão foi concentrado, dialisado e submetido à coluna cromatográfica de afinidade ao Ni^{2+} . A eluição da proteína foi feita a partir de lavagens com tampão contendo diferentes concentrações de imidazol (25, 50, 100 e 150, 250 e 500 mM). Como visualizado na figura 18A, em quase todas as concentrações de imidazol houve eluição proteica, havendo um pico maior na concentração de 25 mM. Essas proteínas eluídas devem corresponder, em parte, a proteínas endógenas da levedura que interagiram fracamente com a coluna. Na figura 18B é possível verificar que nos picos eluídos com 25, 50 e 100 mM de imidazol há a presença de um rastro semelhante àquele presente nos *westerns blots* (figuras 16 e 17). Embora 25 mM seja uma concentração baixa e parte do constituinte do pico possa ser proteína da levedura, os picos eluídos com 50 e 100 mM de imidazol já indicam uma maior chance de pureza da SVSP ancestral. Esse rastro/borrão apresentado é um perfil em gel comum em proteínas glicosiladas

de forma heterogênea (An *et al.*, 2003). Diferentemente, o pico eluído com 150 mM de imidazol apresentou-se muito mais limpo, com um leve rastro e uma banda definida próximo de 35 kDa, tamanho similar às bandas encontradas nos experimentos de *western blot*.

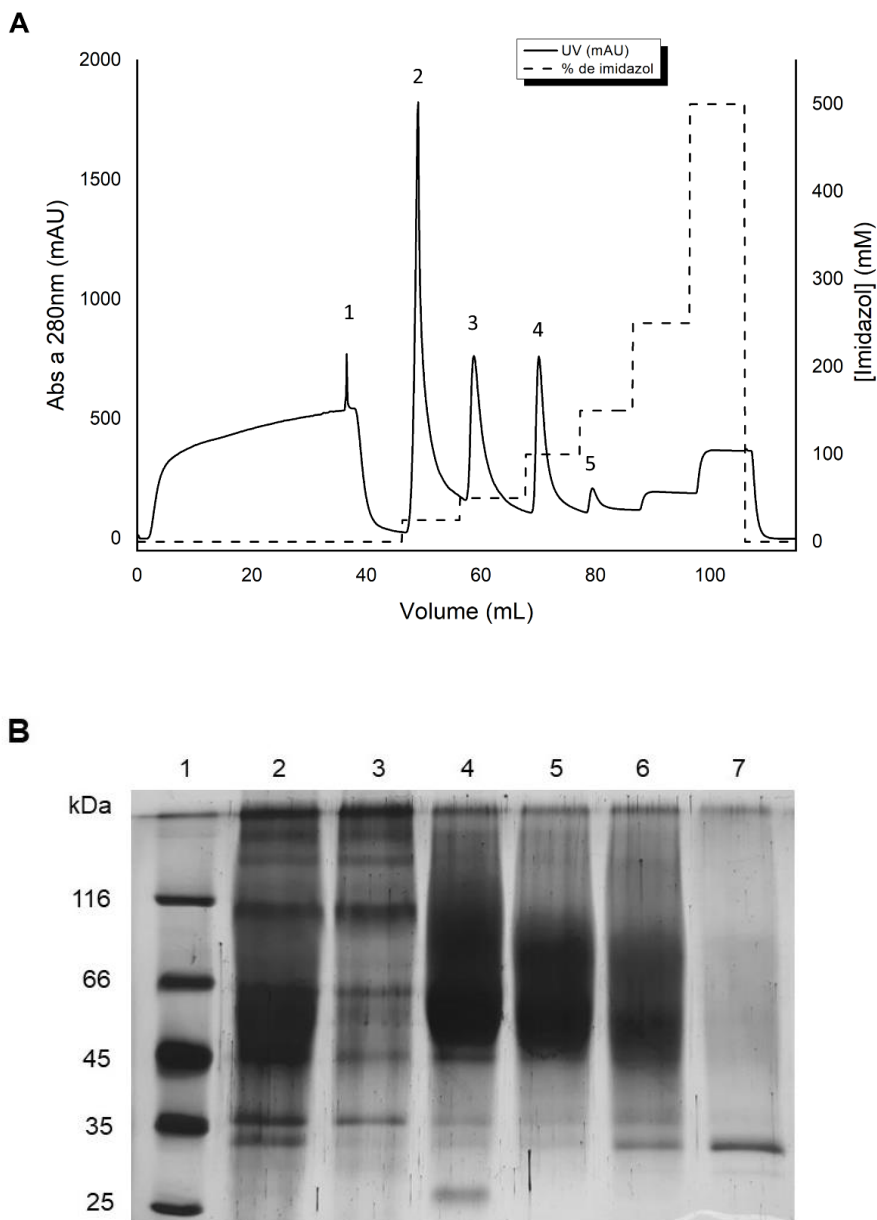


Figura 18. Purificação da SVSP ancestral por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (Ni^{2+}). **A** - Cromatograma da purificação. Os números de 1 a 5 equivalem às amostras, respectivamente, do *flow through* (proteínas que não interagiram com a coluna), do pico eluído com 25 mM de imidazol, com 50 mM de imidazol, com 100 mM de imidazol e com 150 mM de imidazol. **B** – SDS-PAGE 12% com as amostras obtidas na purificação proteica. 1: Marcador molecular; 2: Amostra antes de ser injetada na coluna; 3: *Flow through*; 4: Pico eluído com 25 mM de imidazol; 5: Pico eluído com 50 mM de imidazol; 6: Pico eluído com 100 mM de imidazol; 7: Pico eluído com 150 mM de imidazol.

2.3.2.6. Deglicosilação proteica

As SVSP são enzimas conhecidas por serem altamente glicosiladas (Serrano, 2013) e a SVSP ancestral possui 2 sítios de N-glicosilações, como mostrado no 2.3.1.3. Aliado a isso, a levedura *K. phaffii* também é conhecida por glicosilar as proteínas heterólogas que expressa (Daly & Hearn, 2005). Logo, os padrões observados em *western blots* (figuras 16 e 17) e no gel de purificação (figura 18B) indicam que os tamanhos divergentes do esperado para a SVSP ancestral (27,1 kDa) devem-se, muito provavelmente, a glicosilações. Para confirmar essa hipótese, foi realizado o ensaio de N-deglicosilação da SVSP ancestral utilizando-se a enzima PNGase F, onde foi deglicosilada as amostras eluídas com 100 e 150 mM de imidazol separadamente. Na figura 19 é possível observar que houve uma grande diminuição no tamanho da enzima quando deglicosilada. Na figura 19A, onde consta a enzima eluída com 100 mM de imidazol, verifica-se que o rastro visualizado anteriormente em SDS-PAGE e *western blot* era formado pela SVSP ancestral glicosilada de forma não uniforme, visto que não formava bandas definidas. Quando o rastro foi deglicosilado, houve o aparecimento de uma banda de ~35 kDa, como visualizado anteriormente (figuras 17 e 18) e de uma segunda banda que aparentava ter ~30 kDa. À medida em que o tempo de incubação com a enzima PNGase F aumentava, a banda de ~35 kDa ia sumindo ficando somente a banda de ~30 kDa. Já a amostra glicosilada na figura 19B, a qual corresponde àquela eluída com 150 mM de imidazol, era formada majoritariamente pela banda de ~35 kDa e, quando deglicosilada, também apresentou a banda de ~30 kDa. Por conta dessa reação de deglicosilação somente ter durado 24h, não foi possível observar o desaparecimento total da banda de ~35 kDa. Curiosamente, uma banda de ~50 kDa também surgiu, podendo corresponder a uma versão intermediária da deglicosilação do rastro ainda presente nessa amostra (mesmo que mais sutil). O poço do gel com a enzima PNGase F demonstra que essa banda não corresponde à essa enzima, uma vez que ela não foi nem mesmo visualizada no gel em razão da baixa concentração utilizada (0,25 µg de PNGase F para cada 100 µg de SVSP ancestral).

A levedura *K. phaffii* inicialmente adiciona às proteínas expressas uma unidade de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, o qual sofre modificações no complexo de Golgi onde será adicionado unidades de manose (Daly & Hearn, 2005). Em contrapartida, as glicosilações encontradas em toxinas da peçonha de serpentes são formadas por diferentes glicanos. Enquanto inicialmente também é ligada à proteína a unidade de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, no complexo de Golgi de serpentes há a adição de diferentes sacarídeos. Já foram encontrados em proteases da peçonha, por exemplo, moléculas de N-acetilglucosamina, resíduos de NeuNAc α 2,3Gal β 1-3GlcNAc (Soares & Oliveira, 2009), ácido N-acetilneuramínico e N-acetilgalactosamina (Pfeiffer *et al.*, 1993). Isso demonstra que a glicosilação realizada pela

levedura, embora ocorra no mesmo local na proteína, não modifica a enzima da mesma forma que a realizada pelas serpentes.

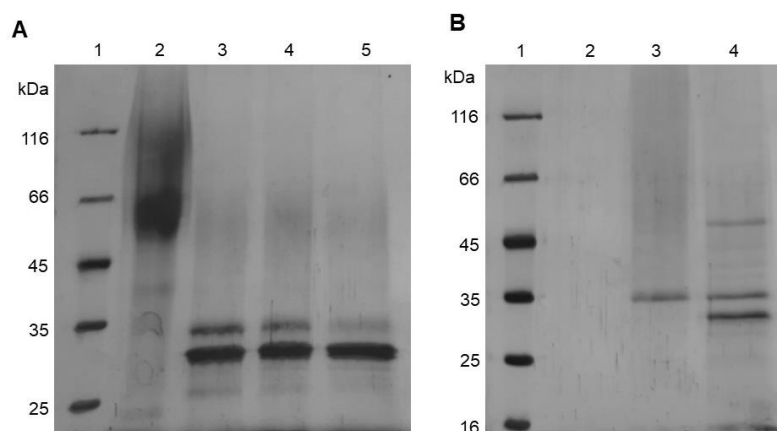


Figura 19. SDS-PAGE 12% da SVSP ancestral após a deglicosilação com a PNGase F. **A-** Deglicosilação da fração eluída com 100 mM de imidazol. 1: Marcador molecular; 2: Amostra antes da deglicosilação (C-); 3: amostra após 24h de deglicosilação; 4: após 48h; 5: após 72h de deglicosilação. **B-** Deglicosilação da fração eluída com 150 mM de imidazol. 1: Marcador molecular; 2: enzima PNGase F na concentração utilizada na deglicosilação; 3: Amostra antes da deglicosilação (C-); 4: amostra após 24h de deglicosilação.

2.3.2.7. Análise da deglicosilação por espectrometria de massas

A análise de espectrometria de massas foi realizada com a amostra eluída com 150 mM de imidazol tanto glicosilada quanto deglicosilada. Na figura 20 observa-se o resultado encontrado para ambas as análises. Na figura 20A, referente à amostra glicosilada, é possível verificar que houve somente a detecção de uma proteína com média de massa de 29,5 kDa (o pico de 14,7 kDa encontrado corresponde à mesma proteína com $z=2$, visto que os picos obtidos referem-se a massa/carga). Essa proteína detectada corresponde ao pico de ~35 kDa encontrado em *western blot* e SDS-PAGE (figuras 16, 17 e 18). A diferença entre o tamanho da banda visualizada e a massa detectada é normal, já que isso ocorre porque a comparação com o tamanho apresentado por marcador de massa molecular em SDS-PAGE não é uma forma acurada de determinar o tamanho de uma proteína, uma vez que a técnica não tem essa finalidade. Na figura 20B verifica-se as massas encontradas após a deglicosilação. O espectro mostra a presença da proteína de 29,5 kDa, assim como uma de 27,5 kDa e outra de 49,3 kDa. Esses três picos correspondem às bandas encontradas no SDS-PAGE da deglicosilação (figura 19B), com o pico de 27,5 kDa equivalendo à SVSP ancestral deglicosilada. Tal resultado é condizente com o tamanho estimado da proteína sem glicosilações (27,1 kDa). A equivalência entre as duas massas não é total porque os valores

dados no espectro correspondem à média das massas encontradas para aquele pico. Baseado nas massas estimadas pela espectrometria, é possível inferir que há a adição de, aproximadamente, 2 kDa de sacarídeos à SVSP ancestral analisada. Todavia, essa massa não diz respeito a toda a enzima expressa pela *K. phaffii*, visto que a maior parte da enzima produzida se encontra altamente glicosilada formando os rastros visualizados anteriormente (Figuras 16, 17 e 18).

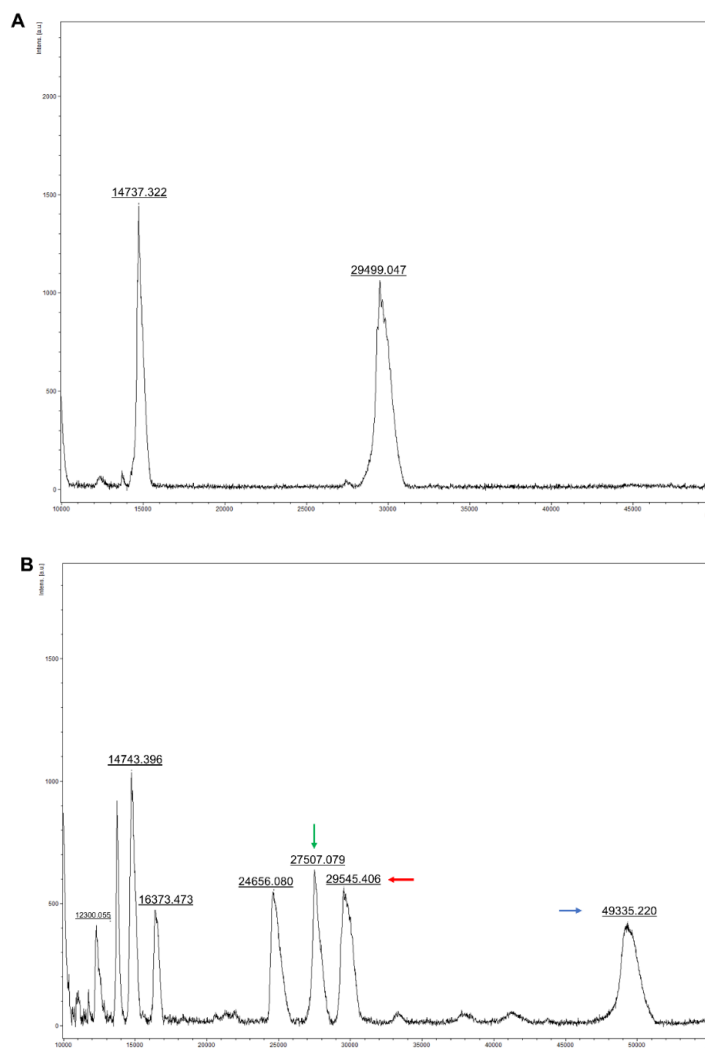


Figura 20. Espectros de MS da SVSP ancestral glicosilada e deglicosilada. **A** – Amostra glicosilada. Corresponde à proteína eluída com 150 mM de imidazol; **B** – Amostra correspondente àquela eluída com 150 mM de imidazol e deglicosilada por 24 horas com a enzima PNGase F. Setas azul, vermelha e verde correspondem, respectivamente a: pico de ~50 kDa anteriormente visualizado em SDS-PAGE (figura 18B), pico correspondente à enzima glicosilada e pico correspondente à proteína deglicosilada.

2.3.3. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS APRESENTADAS PELA SVSP ANCESTRAL

2.3.3.1. Caracterização da atividade de clivagem do fibrinogênio

O fibrinogênio é um dos principais substratos biológicos clivados pelas SVSPs, o que faz com que muitas delas sejam classificadas como do tipo trombina (*thrombin-like*). Devido a isso, era importante identificar se a SVSP ancestral era capaz de clivá-lo assim como as enzimas atuais. É importante salientar que apresentar atividade de clivagem do fibrinogênio não necessariamente significa que a proteína é pró-coagulante. Para que haja a indução da formação de coágulos de fibrina o fibrinogênio deve ser clivado de forma a liberar os peptídeos A e B das cadeias α e β , respectivamente. Outros padrões de clivagem são destrutivos ao fibrinogênio, induzindo somente a sua depleção do plasma sanguíneo. Para mais informações, ler o capítulo 1.

Os testes de atividade sobre o fibrinogênio foram realizados em tubo e verificados em SDS-PAGE. Foram feitos com a enzima tanto glicosilada quanto deglicosilada a fim de detectar se as glicosilações exerciam algum tipo de influência na atividade. Inicialmente, testou-se a atividade em uma proporção crescente de enzima. Como mostrado na figura 21, somente a proteína deglicosilada apresentou clivagem das cadeias α e β do fibrinogênio, indicando que as glicosilações adicionadas pela *K. phaffii* interferiam em sua atividade. Como discutido no item 2.3.1.3., há uma provável glicosilação situada no *loop* 99 que, de acordo com Zeng e Colaboradores (2013), pode estar alterando sua conformação. Logo, é provável que a presença dessa glicosilação esteja interferindo no reconhecimento do substrato pela SVSP ancestral.

Na figura 21C é possível verificar que nas proporções molares de enzima:fibrinogênio de 1:2 e 1:4 houve clivagem das cadeias α e β pela enzima deglicosilada durante o tempo de reação (2 horas). Nas outras proporções não é possível verificar se houve clivagem significativa. A proporção 1:4 foi selecionada para ser utilizada nos outros testes com a enzima deglicosilada e a proporção 1:2 com a enzima glicosilada. Na figura 22 confirma-se que a enzima glicosilada não apresenta qualquer atividade sobre o fibrinogênio, visto que a reação ocorreu por 24 horas. Na figura 22C é possível observar que entre 4 e 8 horas de reação a enzima deglicosilada já havia clivado todo o fibrinogênio disponível, sobrando somente a cadeia γ , a qual não é clivada por enzimas fibrinogenolíticas.

Após a confirmação da atividade da SVSP ancestral sobre o fibrinogênio, foram realizados testes em condições diferentes a fim de caracterizar essa atividade. Na figura 23 é possível observar que a enzima está ativa de 25 a 42°C, não sendo possível verificar diferenças entre as temperaturas de 37 e 42°C. Tal achado é condizente com a temperatura ótima esperada para uma enzima que atuaria na corrente sanguínea de animais vertebrados.

A enzima parece ser bastante tolerante a mudanças no pH, visto que houve pouca diferença em sua atividade dos pH 6 a 9. Entretanto, verifica-se que em pH mais ácido sua atividade foi bastante diminuída (pH 5), embora ainda aparente ser ativa (Figura 24). Esses resultados encontrados são semelhantes aos achados para pH e temperatura ótimos de outras SVSPs. Torres-Ruaco e Colaboradores (2013), encontraram para uma SVSP pró-coagulante de *Lachesis muta rhombeata* maiores atividades em pH de neutro a básico (7-10) e temperatura ótima entre 40-50°C. Silva-Junior e Colaboradores (2007), encontraram para uma enzima do tipo trombina de *Bothrops jararacussu* maiores taxas de hidrólise a partir de 25°C, indo até 45-50°C, com 50% de perda de atividade a partir de 60°C. Para o pH, os autores definiram entre 7 e 8 como pH ótimo.

Diversas moléculas responsáveis por inibir a atividade de serinoproteases e/ou especificamente SVSP foram testadas com a enzima deglicosilada. Utilizou-se nesse teste os inibidores de serinoproteases, aprotinina, leupeptina e PMSF, e as moléculas DTT (agente redutor), visto que a enzima possui diversas pontes dissulfeto e EDTA (quelante de íons divalentes), tendo em vista que muitas SVSPs têm atividade dependente de Ca^{2+} (Liu *et al.*, 2008). Como mostrado na figura 25, os inibidores aprotinina e leupeptina não inibiram a atividade enzimática. Entretanto, foi encontrada inibição por essas duas moléculas em outra SVSP (Menaldo *et al.*, 2012). Já o PMSF inibiu, porém não completamente. A redução da atividade proteolítica pelo PMSF foi encontrada para diversas SVSP (Mamede *et al.*, 2016; Vilca-Quispe *et al.*, 2010; Menaldo *et al.*, 2012). O DTT inibiu completamente a atividade enzimática, demonstrando a importância das pontes dissulfeto para seu funcionamento. Embora importante para a SVSP ancestral, algumas SVSP não têm a atividade tão atingida pelo DTT (Mukherjee & Mackessy, 2013). O EDTA pareceu inibir, visto que a cadeia α do fibrinogênio parece intacta. Entretanto, há uma diminuição das cadeias β e γ , um padrão não observado nos outros testes de atividade. O EDTA é uma molécula que é solubilizada em pH básico e, para seu preparo para essa reação utilizou-se NaOH 5M até que o mesmo se encontrasse totalmente solúvel. O uso do NaOH em uma concentração tão alta pode ter elevado o pH da solução acima do esperado e, dessa forma, ter afetado a reação enzimática, a levando a apresentar o perfil visualizado.

Xie e Colaboradores (2022), em suas análises filogenéticas das proteínas constituintes da peçonha de serpentes, concluíram que a atividade fibrinogenolítica, ou seja, de clivagem do fibrinogênio, seria a atividade esperada para a serinoprotease ancestral dos viperídeos. Tal conclusão está de acordo com o que foi encontrado no presente estudo. Os autores argumentam que a grande diversificação dessas enzimas ocorreu após a separação da linhagem dos viperídeos e que as serpentes das outras linhagens superiores (cenofídicas)

que possuem serinoproteases caracterizadas, tendem a apresentar atividade do tipo fibrinogenolítica, fazendo com que essa seja uma atividade ancestral esperada.

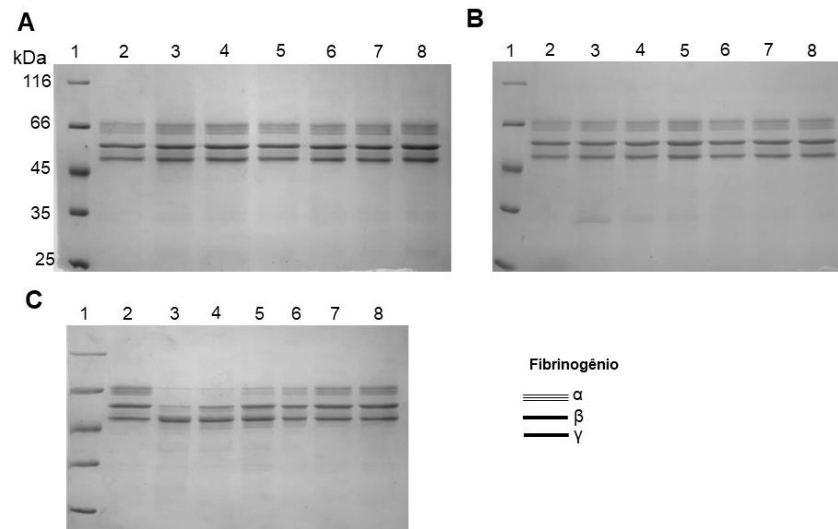


Figura 21. SDS-PAGE 12% mostrando a atividade da SVSP ancestral glicosilada e deglicosilada sobre o fibrinogênio em diversas proporções molares de enzima:fibrinogênio por 2 horas. **A** – Amostra eluída com 100 mM de imidazol; **B** – Amostra eluída com 150 mM de imidazol; **C** – SVSP deglicosilada por 72 h. 1: Marcador molecular; 2: Controle negativo (fibrinogênio intacto); 3: Proporção molar de 1:2; 4: 1:4; 5: 1:8; 6: 1:16; 7: 1:32; 8: 1:64.

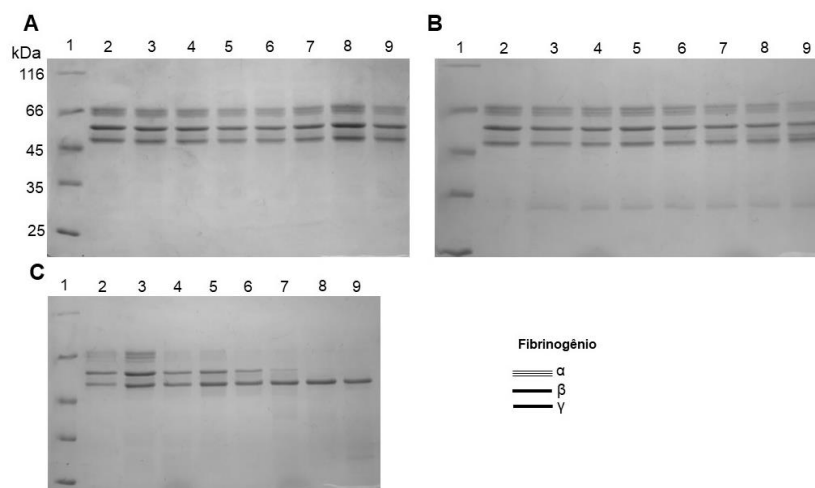


Figura 22. SDS-PAGE 12% mostrando a atividade da SVSP ancestral glicosilada e deglicosilada sobre o fibrinogênio em diferentes tempos de reação. A proporção molar de enzima:fibrinogênio para as reações com a enzima glicosilada foi de 1:2 e para a enzima deglicosilada foi de 1:4. **A** – Amostra eluída com 100 mM de imidazol; **B** – Amostra eluída com 150 mM de imidazol; **C** – SVSP deglicosilada por 72h. 1: Marcador molecular; 2: Controle negativo (fibrinogênio intacto); 3: 15 min de reação; 4: 30 min; 5: 1 h; 6: 2 h; 7: 4 h; 8: 8 h; 9: 24 h.

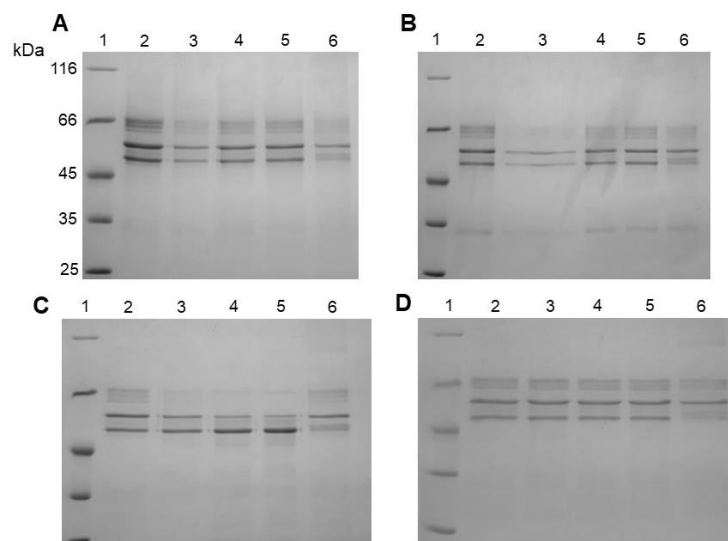


Figura 23. SDS-PAGE 12% mostrando a atividade da SVSP ancestral glicosilada e deglicosilada sobre o fibrinogênio em diferentes temperaturas. A proporção molar de enzima:fibrinogênio para as reações com a enzima glicosilada foi de 1:2 e para a enzima deglicosilada foi de 1:4. **A** – Amostra eluída com 100 mM de imidazol; **B** – Amostra eluída com 150 mM de imidazol; **C** – SVSP deglicosilada por 72h. **D** – Controle do fibrinogênio sozinho nas diferentes temperaturas (C-). 1: Marcador molecular; 2: Reação a 4°C; 3: 25°C; 4: 37°C; 5: 42°C; 6: 75°C.

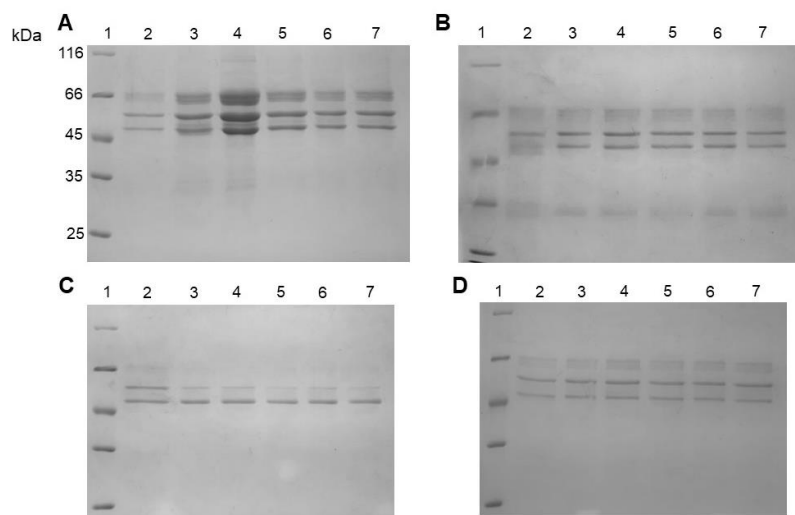


Figura 24. SDS-PAGE 12% mostrando a atividade da SVSP ancestral glicosilada e deglicosilada sobre o fibrinogênio em diferentes pH. A proporção molar de enzima:fibrinogênio para as reações com a enzima glicosilada foi de 1:2 e para a enzima deglicosilada foi de 1:4. **A** – Amostra eluída com 100 mM de imidazol; **B** – Amostra eluída com 150 mM de imidazol; **C** – SVSP deglicosilada por 72h. **D** – Controle do fibrinogênio sozinho nos diferentes pH (C-). 1: Marcador molecular; 2: Reação em pH 5,0; 3: 6,0; 4: 7,0; 5: 7,4; 6: 8,0; 7: 9,0.

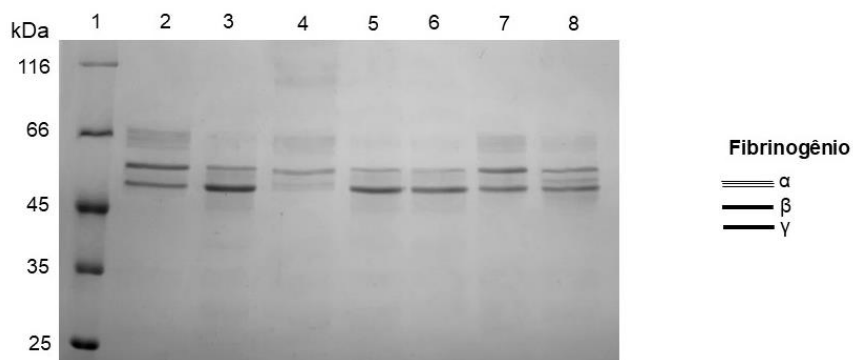


Figura 25. SDS-PAGE 12% mostrando a atividade da SVSP ancestral deglicosilada sobre o fibrinogênio na presença de diferentes inibidores. 1: Marcador molecular; 2: Controle negativo (fibrinogênio intacto); 3: controle positivo (sem adição de inibidor); 4: reação com EDTA; 5: aprotinina; 6: leupeptina; 7: DTT; 8: PMSF.

2.3.3.1.1. Teste de atividade de indução da formação de coágulos de fibrina

A clivagem do fibrinogênio de forma a liberar os peptídeos A e B induz a formação dos coágulos de fibrina. Visando identificar se a SVSP ancestral era capaz de induzir a formação desses coágulos realizou-se um teste de detecção de coágulos de fibrina. As redes de fibrina absorvem a 405 nm, fazendo com que seja possível detectá-las com o uso de um espectrofotômetro. Como demonstrado na figura 26, a trombina levou à formação do coágulo de fibrina, como observado pelo aumento na absorbância pelo tempo. Entretanto, tal perfil não foi detectado para a SVSP ancestral, já que não houve aumento na absorbância da amostra. Isso indica que essa enzima não atua de forma a induzir a coagulação sanguínea por meio da clivagem do fibrinogênio.

Como demonstrado pelos resultados apresentados no item 2.3.3.1., a SVSP ancestral cliva as cadeias α e β do fibrinogênio de forma a destruí-las, visto que elas desaparecem do SDS-PAGE. Para que haja a formação dos coágulos de fibrina é necessário a clivagem somente dos peptídeos A e B, que possuem < 2kDa de tamanho. Logo, os resultados visualizados em gel de fato não condiziam com o esperado para uma enzima que induza a formação de coágulos de fibrina. Devido a isso e ao resultado negativo apresentado na figura 26, conclui-se que a SVSP ancestral possui atividade de destruição das moléculas de fibrinogênio, uma atividade também encontrada em outras SVSPs (Matsui *et al.*, 2001; Carone *et al.*, 2018). Tal atividade leva ao consumo do fibrinogênio plasmático o deixando indisponível para o processo de coagulação.

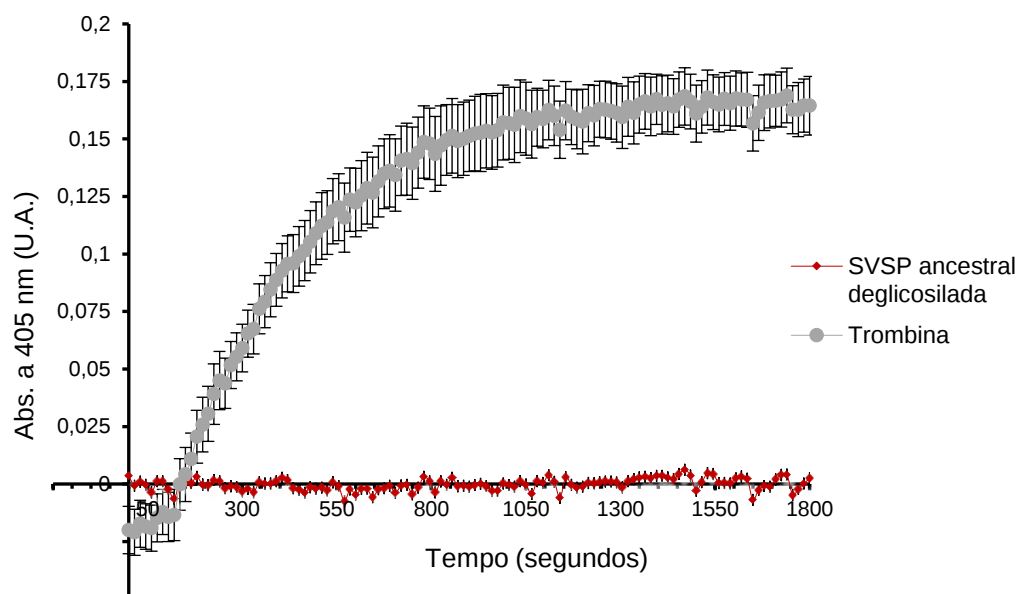


Figura 26. Teste de indução da formação de coágulos de fibrina pela SVSP ancestral deglicosilada. Uso de fibrinogênio, SVSP ancestral e trombina nas concentrações, respectivamente, 3,68 μM , 1,32 μM e 84 nM. Os dados de absorbância iniciando em valores negativos deve-se ao valor obtido ter sido menor que o valor detectado para o branco (tampão + fibrinogênio).

2.3.3.2. Determinação da atividade de esterase

SVSPs e outras proteases costumam possuir atividade esterolítica em conjunto com atividade proteolítica. Visando identificar se a SVSP ancestral possuía tal atividade foram realizados testes enzimáticos utilizando-se a enzima glicosilada e deglicosilada. Foi utilizado como substrato o BAEE ($\text{N}\alpha$ -Benzoil-L-arginina etil ester cloridrato) e foram realizados testes com a enzima em diferentes concentrações. Como visualizado na Figura 21, nem a SVSP glicosilada nem a deglicosilada apresentaram atividade sobre o BAEE na condição testada. A ausência de atividade sobre esse substrato especificamente não determina em definitivo que ela não possua esse tipo de atividade, sendo necessário o teste com outros substratos para um resultado conclusivo.

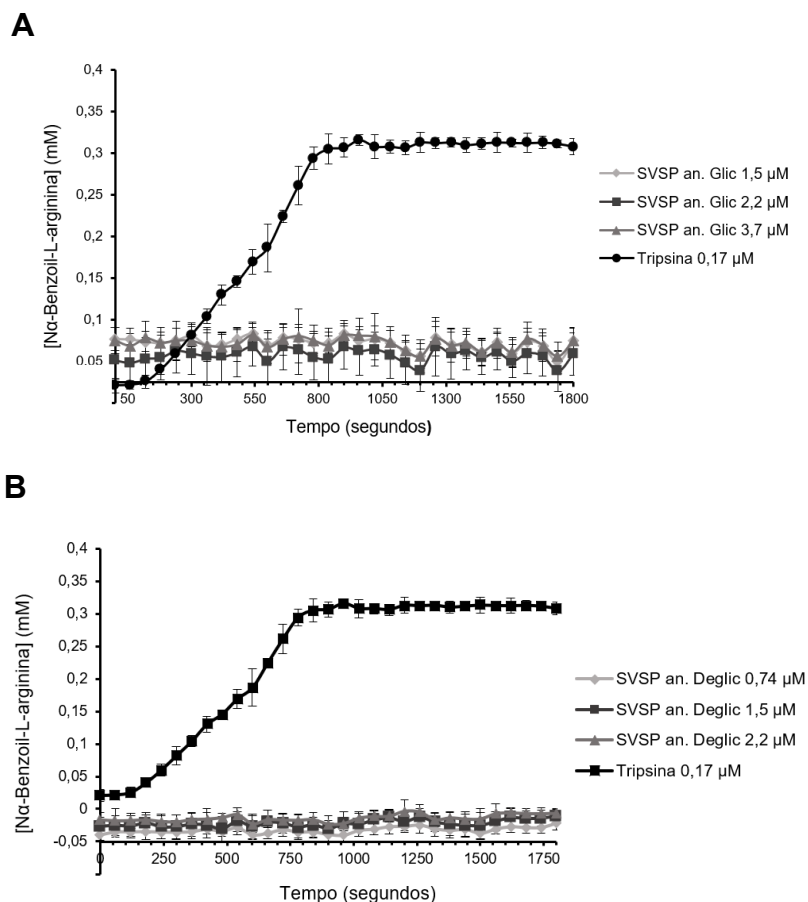


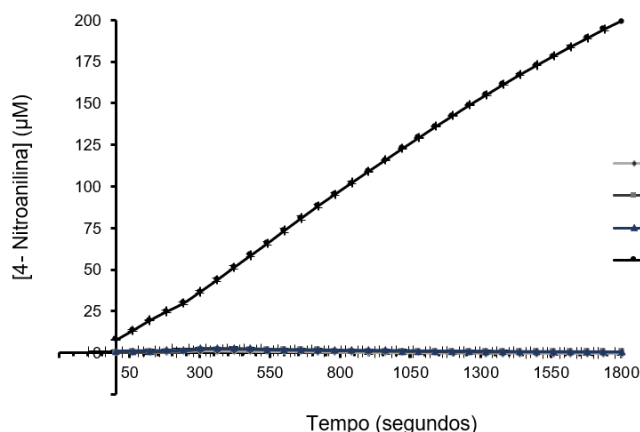
Figura 27. Teste de atividade enzimática da SVSP ancestral glicosilada e deglicosilada em diferentes concentrações sobre o substrato BAEE (N α -Benzoil-L-arginina etil ester cloridrato) pelo tempo. A atividade é dada pela concentração de produto produzido (N α -Benzoil-L-arginina). **A** – SVSP ancestral glicosilada; **B**- SVSP ancestral deglicosilada.

2.3.3.3. Determinação da atividade amidolítica

A atividade amidolítica refere-se à capacidade da enzima em clivar a ligação peptídica. Como demonstrado no item 2.3.3.1., a SVSP ancestral deglicosilada apresenta essa atividade, visto que foi capaz de hidrolisar o fibrinogênio. O substrato sintético BApNA (N α -Benzoil-DL-arginina 4-nitroanilina cloridrato) foi utilizado para verificar se a SVSP ancestral glicosilada também possuía tal atividade, tendo em vista que é um substrato pequeno e as glicosilações afetariam menos sua entrada no sítio ativo. Na figura 28 é possível observar que nenhuma das duas versões da SVSP ancestral foi capaz de clivar o substrato BApNA. Devido ao fato da enzima deglicosilada ter mostrado que possui atividade proteolítica, esse resultado somente indica que ela não é capaz de clivar esse substrato especificamente. A ausência de atividade sobre esse substrato pode indicar que a presença de somente um

resíduo de aminoácido (arginina) em sua estrutura pode dificultar sua acomodação adequada no sítio ativo.

A



B

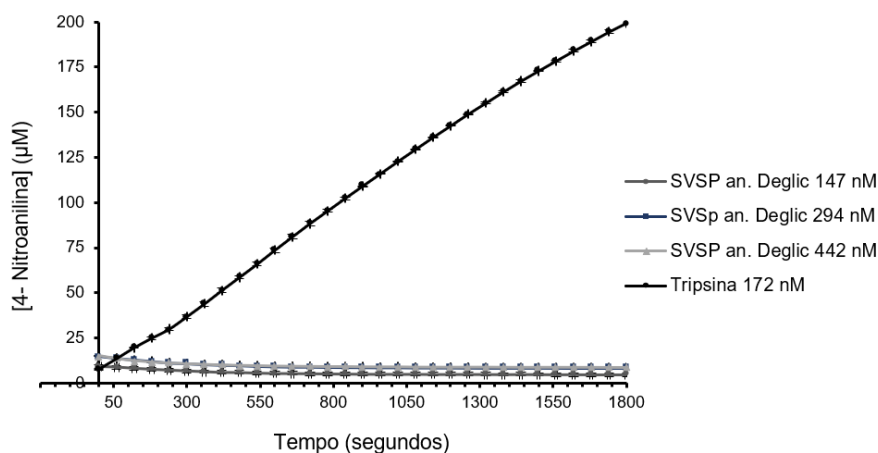


Figura 28. Teste de atividade enzimática da SVSP ancestral glicosilada e deglicosilada em diferentes concentrações sobre o substrato BApNA (N α -Benzoil-DL-arginina 4-nitroanilina cloridrato) pelo tempo. A atividade é dada pela concentração de produto produzido (4-nitroanilina). **A** – SVSP ancestral glicosilada; **B**- SVSP ancestral deglicosilada.

2.3.3.4. Determinação da atividade do tipo caliceína

A atividade do tipo caliceína (clivagem do cininogênio e liberação de cinina) é considerada a atividade ancestral das serinoproteases de peçonha de toxicóferos, tendo em vista que acredita-se que estas evoluíram a partir de caliceínas salivares (ler item 1.2.2.3.). As caliceínas clivam pós resíduos de arginina, quando em P2 há um resíduo de fenilalanina. O substrato sintético Benzoil-Pro-Phe-Arg-4-nitroanilina acetato (Chromozym PK, Roche) foi

utilizado para detectar se a SVSP ancestral possuía essa atividade. Como visualizado nas figuras 29 e 31, tanto a SVSP ancestral glicosilada quanto a deglicosilada apresentaram atividade similar sobre o substrato. Isso demonstra que a versão glicosilada é ativa e sua ausência de atividade sobre o fibrinogênio é provavelmente ocasionada por impedimento de acesso do substrato ao sítio ativo conferido pelas glicosilações. Esse resultado também mostra que a SVSP ancestral cliva após resíduo de arginina, mesmo não tendo clivado o substrato BApNA. O Chromozym PK é um substrato maior, com dois resíduos de aminoácidos a mais, o que pode levar a uma melhor acomodação da molécula no sítio ativo. Embora clive um substrato de calicreína, indicando que possui tal atividade, a SVSP ancestral demonstrou ser menos eficiente que a calicreína plasmática humana (figura 33), tendo em vista que sua atividade foi em torno de 10 vezes menor.

Nas figuras 30 e 32 verifica-se que em pH mais ácido a atividade da SVSP ancestral é bem menor, aumentando à medida em que se aumenta o pH, chegando à sua maior atividade em pH 9,0, um resultado similar ao apresentado para o fibrinogênio (ver item 2.3.3.1.) Tal perfil demonstra que a atividade está fortemente relacionada à desprotonação de resíduos de aminoácidos, seja pela alteração que isso gere em sua estrutura tridimensional, seja pela importância que tais grupos exerçam na catálise.

Como descrito no item 1.2.2.1.1., algumas SVSP caracterizadas na literatura apresentam atividade do tipo calicreína. Além disso, não é difícil encontrar entre elas aquelas caracterizadas como possuindo tanto a atividade de liberação de bradicinina como a depleção do fibrinogênio plasmático (Hung & Chiou, 2001), tal como a SVSP ancestral. Como discutido no item 2.3.3.1., a destruição do fibrinogênio é uma atividade que já havia sido postulada como a apresentada pela ancestral das víboras, diferente da atividade do tipo calicreína. Como são escassas as enzimas caracterizadas bioquimicamente de outras famílias de serpentes quanto a todos os possíveis substratos, não há dados quanto há presença ou ausência dessa atividade em outras famílias. Entretanto, atividade do tipo calicreína junto com atividade de degradação do fibrinogênio foi visualizado em serinoprotease da peçonha de lagarto helodermátídeo (Utaisincharen *et al.*, 1993). Ademais, a presença dessa atividade na ancestral das víboras assim como em helodermátídeos pode ser um resquício da atividade de calicreína apresentada pela ancestral de todas essas enzimas no surgimento do clado Toxicófera.

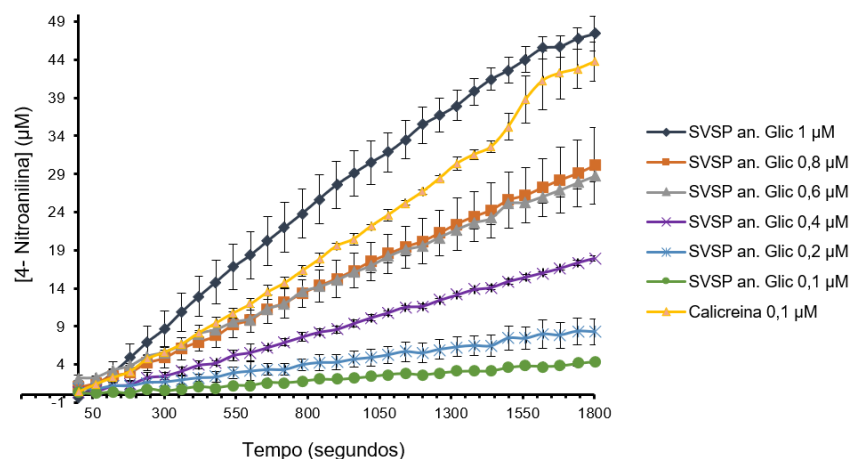
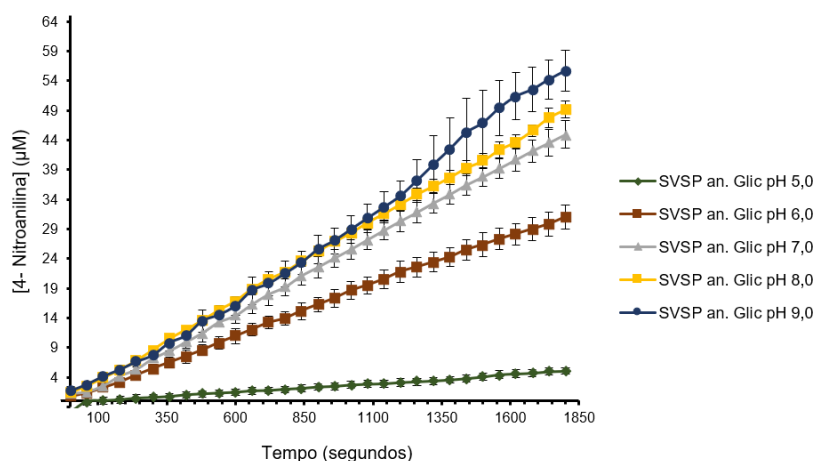


Figura 29. Perfil cinético da SVSP ancestral glicosilada em diferentes concentrações sobre o substrato Chromozym PK (Benzoil-Pro-Phe-Arg-4-nitroanilina). A atividade é dada pela concentração em μM de produto produzido (4-nitroanilina). Caliceína plasmática humana a 100 nM é utilizada como controle positivo.

A



B

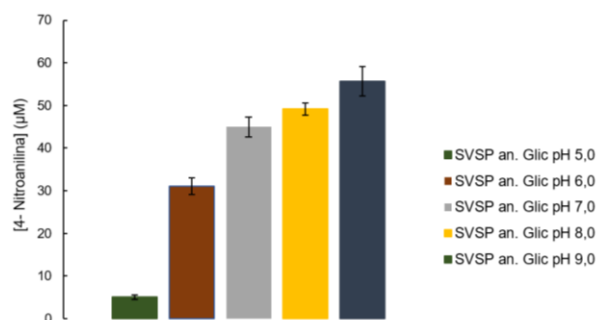


Figura 30. Perfil cinético da SVSP ancestral glicosilada em diferentes pH sobre o substrato Chromozym PK (Benzoil-Pro-Phe-Arg-4-nitroanilina). A atividade é dada pela concentração em μM de produto produzido (4-nitroanilina). **A** – Atividade pelo tempo. **B** – Comparativo entre a concentração de produto produzida após 30 minutos para cada um dos pH testados.

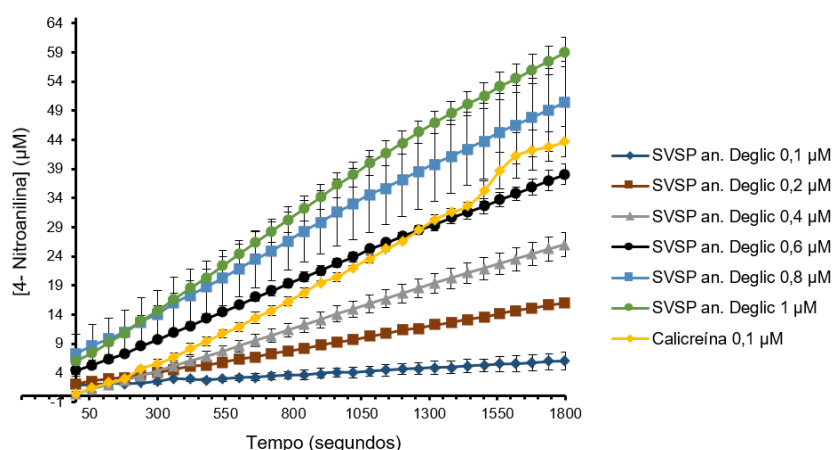
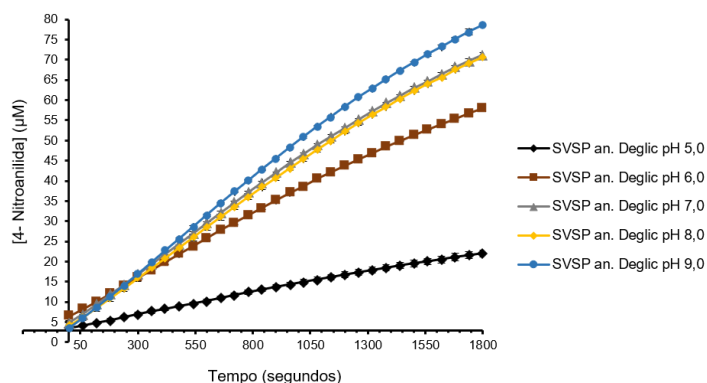


Figura 31. Perfil cinético da SVSP ancestral deglicosilada em diferentes concentrações sobre o substrato Chromozym PK (Benzoil-Pro-Phe-Arg-4-nitranilina). A atividade é dada pela concentração em μM de produto produzido (4-nitroanilina). Caliceína plasmática humana a 100 nM é utilizada como controle positivo.

A



B

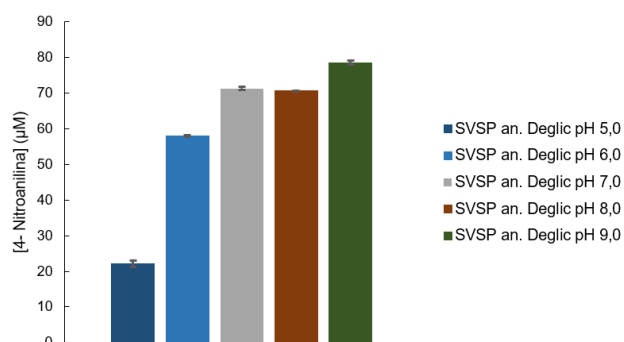


Figura 32. Perfil cinético da SVSP ancestral deglicosilada em diferentes pH sobre o substrato Chromozym PK (Benzoil-Pro-Phe-Arg-4-nitroanilina). A atividade é dada pela concentração em μM de produto produzido (4-nitroanilina). **A** – Perfil cinético. **B** – Comparativo entre a concentração de produto produzida após 30 minutos para cada um dos pH testados.

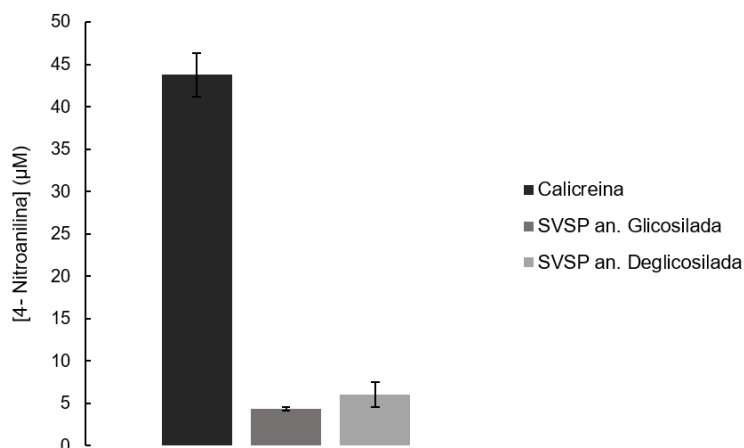


Figura 33. Concentração de produto liberado pela SVSP ancestral glicosilada, deglicosilada e pela calicreína do plasma humano após 30 minutos de reação enzimática sobre o Chromozym PK (Benzoil-Pro-Phe-Arg-4-nitroanilina). Todas as enzimas encontravam-se a 100 nM.

2.3.4. AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA E TERMOESTABILIDADE POR DICROÍSMO CIRCULAR

2.3.4.1. Estrutura secundária a 25°C em diferentes pH

O percentual de estrutura secundária da SVSP ancestral glicosilada foi avaliado por dicróismo circular, com o espectro sendo acompanhado de 260-195 nm (do ultravioleta próximo ao ultravioleta distante) para os pH 5,0, 7,5 e 9,0. A partir da deconvolução dos sinais dicróicos foi possível obter os percentuais de cada uma das estruturas secundárias, como descrito na Tabela 2. Como é possível verificar, houve grande variação do percentual de estrutura secundária para cada pH testado. Os pH 5,0 e 7,5 apresentaram percentuais mais similares à estrutura modelada pelo ColabFold do que o pH 9,0, embora em nenhum dos casos os valores tenham sido iguais. Todavia, a estrutura modelada pela ColabFold, embora seja confiável, é somente um modelo computacional de como a estrutura original deve ser, e não deve ser usada como um parâmetro final.

As análises de perfil de estrutura secundária demonstram que o pH tem uma forte influência na estrutura da SVSP ancestral, assim como exerce em sua atividade enzimática. Curiosamente, quanto maior o pH, maior os percentuais de hélices α e folhas β , indicando uma maior estruturação da proteína. As glicosilações presentes na enzima também podem ter influenciado os perfis de estrutura secundária observados. Para resultados mais conclusivos é necessário realizar o mesmo ensaio com a enzima deglicosilada.

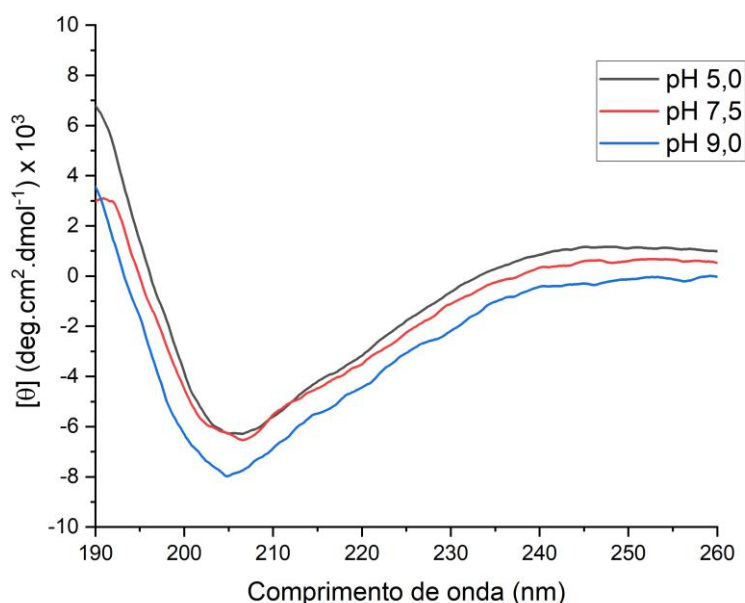


Figura 34. Espectros de dicroísmo circular (de 260 a 195 nm) da SVSP ancestral glicosilada a 25°C em tampão Tris e acetato de sódio 5 mM nos pH 5,0, 7,5 e 9,0.

Tabela 2. Comparação entre o percentual de estrutura secundária do modelo tridimensional feito pelo ColabFold da SVSP ancestral glicosilada com os obtidos em diferentes pH a 25 e 95°C.

pH	Temperatura (°C)	Estrutura secundária (%)			
		<i>hélice α</i>	<i>Folha β</i>	<i>Turn</i>	<i>Outros</i>
5,0	25°C	8,8	22,5	6,7	62
	95°C	40,8	16,7	5	37,4
7,5	25°C	16,3	25,8	5,3	52,7
	95°C	31,3	26	2,4	40,3
9,0	25°C	23,1	35,7	0	41,1
	95°C	24,2	33	0	42,8
<i>Estrutura ColabFold</i>		10,2	29,7	13,4	46,7

2.3.4.2. Análise de termoestabilidade

A estabilidade estrutural da SVSP ancestral foi avaliada a partir da medição de seu sinal dicróico à medida em que a temperatura era elevada. Alterações no sinal o deixando mais negativo é um indicativo de que a proteína perdeu sua estrutura e desnaturou. Como visualizado na figura 35, não houve essa mudança no sinal dicróico, indicando que em nenhum dos pH testados a SVSP ancestral desnaturou quando submetida até 95°C. Como mostrado na tabela 2, houve mudanças no perfil de estrutura secundária a 95°C, mas em

nenhum pH houve desestruturação. Curiosamente, no pH 9,0 houve a menor variação estrutural, com os valores de hélices α e folhas β muito similares a 25°C e 95°C.

A estabilidade térmica é uma característica relatada na literatura para outras SVSPs. Amorim e Colaboradores (2018) verificaram que a atividade de uma serinoprotease do tipo trombina mantinha-se estável quando a enzima era aquecida até 100°C. Lee e Colaboradores (1999) também encontraram algo parecido. Em seu estudo, verificaram que uma serinoprotease fibrinolítica mantinha cerca de 80% de sua atividade após ser fervida a 100°C. As SVSPs costumam possuir seis pontes dissulfeto, o que ajuda a lhes conferir termoestabilidade.

Entretanto, tal característica não pode ser atribuída somente às pontes dissulfeto, pelo menos não para todas as SVSPs. Silva-Junior e Colaboradores (2007) verificaram que uma serinoprotease do tipo trombina extraída de *Bothrops jararacussu* apresentava atividade depois de ser aquecida a 65°C quando estava glicosilada, e não quando estava deglicosilada. Os autores doo trabalho concluíram que as glicosilações também eram responsáveis pela termoestabilidade dessas enzimas. Isso demonstra que a mesma análise deve ser feita com a SVSP deglicosilada para entender melhor como lhe é conferida sua termoestabilidade.

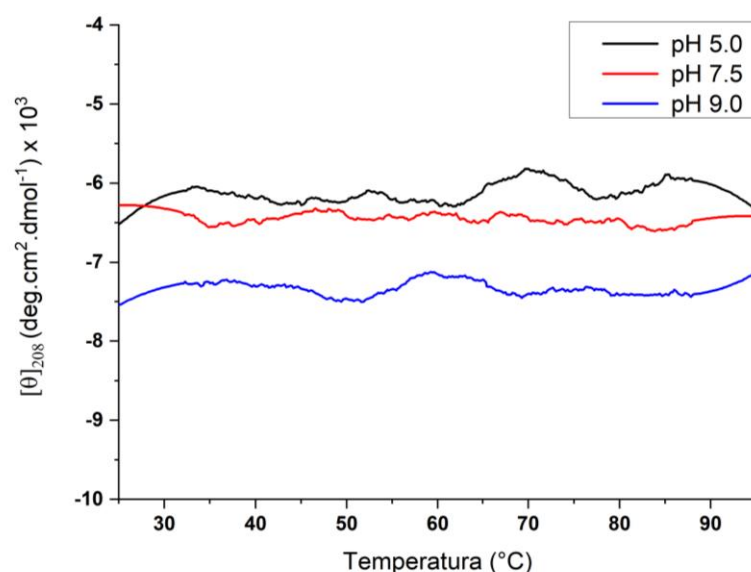


Figura 35. Curvas de desnaturação térmica da SVSP ancestral monitoradas a 208 nm nos pH 5,0, 7,5 e 9,0.

Os resultados aqui apresentados mostram que a SVSP ancestral é uma enzima ativa, capaz de clivar o fibrinogênio e o cininogênio (com base na clivagem do substrato sintético Chromozym PK) e que possui uma alta estabilidade térmica. Embora possua atividade limitada quando glicosilada, é eficaz quando deglicosilada. Análises de bancada demonstraram que ela é estável em água, permanecendo ativa por, no mínimo, um mês quando acondicionada a 4°C. Sua expressão em *K. phaffii* possui um rendimento de ~1mg de proteína por litro de inóculo induzido (em meio BMM) quando efetuada em frascos erlenmeyers. Tais características demonstram que a SVSP ancestral é uma enzima de fácil produção e manutenção, características desejáveis a enzimas com potencial biotecnológico. A expressão de uma versão mutada onde não haja mais sítios de glicosilação é desejável, visto que resolveria a limitação de atividade conferida pelas glicosilações.

2.4. CONCLUSÕES

Os estudos de filogenia e de caracterização bioquímica e *in silico* da serinoprotease ancestral dos viperídeos mostraram que:

- As serinoproteases da peçonha sofreram grande multiplicação após a separação da família Viperidae.
- A serinoprotease ancestral de viperídeos possui sequência e estrutura muito similar às enzimas atuais.
- A SVSP ancestral foi efetivamente expressa em células de *K. phaffii* e purificada por cromatografia de afinidade ao Ni²⁺.
- A enzima ancestral foi capaz de clivar as cadeias α e β do fibrinogênio, mas não induziu a formação de coágulos de fibrina, indicando uma atividade de depleção do fibrinogênio plasmático.
- A serinoprotease ancestral apresentou atividade significativa sobre o fibrinogênio em temperaturas equivalentes às fisiológicas dos animais vertebrados (37- 42°C).
- As glicosilações exercem um importante papel na atividade enzimática dessa enzima sobre o fibrinogênio, visto que não foi detectada atividade quando ela se encontrava glicosilada.
- A enzima ancestral possui atividade do tipo calicreína, o que pode ser um vestígio da calicreína salivar que deu origem às serinoproteases de peçonha em toxicóferos.
- Embora ativa em pH mais ácido (5 e 6) sua maior atividade foi encontrada em pH de neutro a básico (7-9) tanto sobre o fibrinogênio quanto sobre o substrato de calicreína.
- Sua estrutura tridimensional é bastante termoestável, não sofrendo desnaturação térmica até quando submetida a 95°C, independente se em pH neutro, básico ou ácido.

2.5. PERSPECTIVAS

Estudos posteriores a serem realizados com a SVSP ancestral incluem:

- Elaboração de um novo vetor com mutações nas asparaginas que sofrem glicosilação. Ácidos aspárticos serão colocados em seu lugar para inibir a glicosilação.
- Caracterização da termoestabilidade da versão deglicosilada por dicroísmo circular.
- Cristalização e resolução de sua estrutura tridimensional.
- Realização de testes enzimáticos com outros substratos sintéticos a fim de detectar se a enzima apresenta outras atividades.
- Análise do uso da SVSP ancestral em aplicações biotecnológicas.

Capítulo 3

Estudo de uma serinoprotease da peçonha do lagarto *Varanus komodoensis*

*"Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais
para temer menos"*

- Marie Curie

3.1. INTRODUÇÃO

O dragão-de-komodo (*Varanus komodoensis*) é o maior lagarto atualmente existente, podendo chegar a 90 kg e 3 metros de comprimento e sua distribuição é restrita a somente cinco ilhas no leste da Indonésia (Bull *et al.*, 2010). Pertence à família Varanidae, a qual é composta somente pelo gênero *Varanus*. São animais de grande comprimento quando comparados a outros lagartos, sendo comumente conhecidos como lagartos monitores (Boeme, 2003).

O dragão-de-komodo é um superpredador dentro de seu território, sendo capaz de matar as maiores presas encontradas nas ilhas, como veados, porcos e búfalos, presas que muitas vezes excedem a sua massa corporal (Bull *et al.*, 2010). Durante muito tempo acreditou-se que, além de gerar um trauma através da mordida, os dragões também infectavam as presas com bactérias patogênicas que estariam presentes em sua saliva, ocasionando um quadro de sepse. A sepse levaria à morte da presa a qual seria rastreada pelo dragão ou comida por um outro espécime oportunista (Fry *et al.*, 2009b). Entretanto, essa hipótese não foi confirmada. Embora tenha sido verificado que diversos dragões registrados na natureza e em cativeiro possuem várias bactérias orais, nenhum microrganismo patogênico foi encontrado em todos os espécimes analisados (Montgomery *et al.*, 2002; Goldstein *et al.*, 2013). Logo, parece improvável a ideia da importância de bactérias patogênicas na ecologia predatória do dragão-de-komodo (Fry *et al.*, 2009b).

A explicação para o que é observado nas presas capturadas pelo dragão é o uso de peçonha pelo animal. Os varanídeos são lagartos anguimorfos pertencentes ao clado Toxicofera, o que significa que possuem glândulas orais capazes de produzir toxinas. Já foi anteriormente detectada em espécies de varanídeos uma peçonha com potente efeito na pressão sanguínea e na habilidade de coagulação, levando ao sangramento da presa (Fry *et al.*, 2006). Fry e Colaboradores (2009b) conseguiram constatar a produção de peçonha pelo dragão-de-komodo, chegando a estimar uma produção de 150 mg de proteína e 1,2 mL de peçonha em um indivíduo adulto. A ausência de uma denteção modificada é a explicação que os autores dão para a falta de exploração da natureza peçonhenta do dragão-de-komodo durante tanto tempo. Entretanto, os autores postulam que seus dentes cerrados junto com a força exercida por seu crânio são capazes de gerar feridas profundas, facilitando assim a entrega da peçonha.

Estudos subsequentes conseguiram detectar atividade de clivagem do fibrinogênio levando a sua depleção em peçonhas de diversas espécies de varanídeos, incluso o dragão-de-komodo. Tal atividade leva a uma dificuldade de coagulação sanguínea por parte da presa, o que pode ser relacionado ao sangramento prolongado visualizado após uma mordida (Dobson *et al.*, 2019). Ademais, a presença de enzimas do tipo calicreínas foi relatada na

peçonha do dragão-de-komodo assim como em todas as peçonhas de varanídeos estudados (Koludarov *et al*, 2017).

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. SELEÇÃO DA ENZIMA E PREDIÇÕES *IN SILICO*

Foi escolhida para ser estudada uma enzima do lagarto varanídeo *Varanus komodoensis* (Dragão-de-komodo) dentre aquelas presentes na árvore filogenética das serinoproteases de peçonha de toxicóferos construída anteriormente (Figura 7). A sequência foi obtida a partir do transcrito da glândula da peçonha do varanídeo (Fry *et al.*, 2009) e possui 259 resíduos de aminoácidos (NCBI ID é ABY89666.1). Por ser uma enzima nunca antes estudada e não possuir um nome, neste trabalho ela foi nomeada como Vk_tox1 para facilitar sua menção no texto e em figuras.

A sequência possui peptídeo sinal de 20 resíduos predito pelo *software* SignalP 5.0 (Almagro Armenteros *et al.*, 2019) e 4 resíduos presentes na pró-enzima e que são removidos após a maturação da proteína. Tanto o peptídeo sinal quanto os resíduos da pró-enzima foram removidos da sequência que foi utilizada nesse estudo. A proteína teve pontes dissulfeto preditas pelo *software* Dipro (Cheng *et al.*, 2006), sítios de N-glicosilações preditos pelo *software* NetNGlyc 1.0 (Gupta & Brunak, 2001) e sítios de O-glicosilação predito pelo *software* NetOGlyc 4.0 (Steentoft *et al.*, 2013).

O modelo da estrutura tridimensional da enzima foi predito utilizando-se *software* AlphaFold 2, disponível na versão ColabFold (Mirdita *et al.*, 2022), com a utilização do modo de alinhamento múltiplo mmseqs2_uniref_env e como *template* o pdb_100. A visualização da estrutura e sobreposições estruturais foram feitos com o uso do *software* PyMOL (Versão 2.5, Schrödinger, LLC).

3.2.2. OBTENÇÃO DA SERINOPROTEASE VK_TOX1 HETERÓLOGA

Boa parte dos protocolos utilizados no estudo da Vk_tox1 foi igual àqueles usados para a SVSP ancestral, logo, eles não serão descritos novamente. Os protocolos idênticos somente terão sua numeração citada e os que sofreram modificação terão suas diferenças descritas (para informações mais detalhadas, ler o capítulo 2).

O vetor pPICZαA contendo o gene para a Vk_tox1 foi sintetizado pela empresa GenScript (Nova Jersey, Estados Unidos) conforme descrito no item 2.2.2.1., assim como a transformação das células de *E. coli* e a midipreparação plasmidial. A linearização do vetor com enzima de restrição e a confirmação em gel de agarose foi feita conforme o item 2.2.2.2. A transformação das células de *K. phaffii* por eletroporação foi realizada como o item 2.2.2.3. Não foi feita a determinação do fenótipo mut com a Vk_tox1, visto que, em sua maioria, as células transformadas tendem a ter o fenótipo desejado mut⁺.

Após a transformação, foi realizado o *screening* de expressão gênica conforme o item 2.2.2.5. com modificações. Foram feitos ensaios com 4 diferentes colônias obtidas e o meio

de cultura utilizado foi o BMMY com indução por metanol 1%. A confirmação da expressão foi feita por SDS-PAGE e *Western Blot*, conforme descrito no item 2.2.2.6. A purificação da proteína foi realizada da mesma forma que o descrito no item 2.2.2.8, exceto que a expressão não foi realizada em meio BMM e sim em BMMY. O teste de deglicosilação foi realizado de acordo com o item 2.2.2.9.

3.2.3. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS APRESENTADAS PELA VK_TOX1

Os testes enzimáticos testados com a Vk_tox1 também foram realizados com a SVSP ancestral e, por isso, também se encontram descritos no capítulo 2. Foram realizados os testes de caracterização da atividade de clivagem do fibrinogênio tanto com a enzima glicosilada quanto com a deglicosilada, assim como o teste de indução da formação de coágulos de fibrina, conforme os itens 2.2.3.1. e 2.2.3.1.1., respectivamente. Também foram realizados os testes para determinar a atividade amidolítica e de calicreína com a enzima tanto glicosilada quanto deglicosilada, tal qual os itens 2.2.3.3. e 2.2.3.4., respectivamente.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. PREDIÇÕES *IN SILICO*

Foi realizada uma busca pelo BLASTp contra o banco de dados SwissProt a fim de detectar com quais proteínas a *Vk_tox1* mais se parecia. Na figura 36 encontra-se um alinhamento entre ela e as 3 sequências mais parecidas com ela que possuíam sua função descrita, além da sequência da estrutura do PDB mais similar. As sequências foram: P43685 (código do Uniprot) do lagarto *Heloderma horridum horridum*, com 44,64% de identidade; Q5MCS0 da serpente *Hydrophis hardwickii* com 44,68%; A8QL56 da serpente *Ophiophagus hannah*, com 45,34% de identidade e Q9I8X1 (PDB ID: 1OP2) da serpente *Deinagkistrodon acutus* com 42,13% de identidade. As enzimas referentes às sequências P43685 e Q5MCS0 liberam cinina a partir do cininogênio, além de serem capazes de clivar o fibrinogênio (Utaisincharoen *et al.*, 1993; He *et al.*, 2007). Aquelas referentes às sequências A8QL56 e Q9I8X1 clivam as cadeias alfa e beta do fibrinogênio (Zhang *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 2005).

Na figura 36 é possível observar a presença dos resíduos do sítio ativo na mesma posição em todas as sequências analisadas (His, Asp e Ser). Na figura também estão marcadas as regiões que formam os loops 37, 60, 99 e 174. Esses loops estão presentes na sequência da mesma forma que nas SVSPs, indicando que também devem atuar no reconhecimento do substrato nas enzimas de lagartos. Na figura 37 observa-se a estrutura tridimensional da *Vk_tox1* modelada pelo ColabFold. Como mostrado, a *Vk_tox1* possui o *folding* clássico das SVSPs e tripsinas, formado por dois barris β com o sítio ativo entre eles. Na figura 38 é possível verificar que a estrutura da *Vk_tox1* é muito similar à de uma SVSP, com grande parte das diferenças sendo encontradas principalmente em seus *loops*.

O programa Dipro fez a predição de 5 pontes dissulfeto a partir da sequência de aminoácidos da *Vk_tox1*. Elas seriam formadas pelos resíduos 187-212, 26-42, 161-176, 74-86, 129-150. O modelo predito pelo ColabFold, entretanto, mostrou todas as cisteínas presentes envolvidas em pontes dissulfeto, sendo formadas, ao total, 6 pontes. As pontes são formadas por 74-86, 26-42, 187-212, 150-7, 161-176 e 129-196. De acordo com o software NetNGlyc 1.0, a *Vk_tox1* possui dois sítios de N-glicosilações, sendo o Asn83 e Asn141. A asparagina 81 fica localizada dentro do loop 99 logo, a glicosilação nessa localidade pode influenciar na interação com o substrato, como discutido no item 2.3.1.3. do capítulo 2. O programa NetOGlyc 4.0 não previu nenhuma O-glicosilação para a *Vk_tox1* (os resultados disponibilizados pelo Dipro, NetNGlyc 1.0 e NetOGlyc 4.0 encontram-se no Anexo III).

Vk_tox1	VVGGQECEKDGHRLGLQTTEGPGYCGVALISQNWVLSAACYESMKLQVRLGVHHRGKP	60
P43685.2	IIGGQECDETHGHPWLALLHRSEGSTCSGVLLNQDWIVTAAACFYLGELRIGLGVHNRRLV	60
Q9I8X1.2	VIGGNECDINEHRFLVAFNTTGFFCGGTLINPEWVVTAAACDS-TDFQMLGVHSHKKVL	59
A8QL56.1	IIGGFECNEYEHRSLVHLNYSNGFFCSGTLNHEWVLTAAACNR-DDIQIKLGVHNVSVN	59
Q5MCS0.1	IIGGFECNPSEHRSVLVLYNSAGFFCSGTLNHEWVLTAAACNR-EDIQIRLGVHNVVHVH	59
	::** **:	
Vk_tox1	IADEQLRDVDSTFCYPDAPDT-TNSTCPYLGFDNISIMLMKLSSPVTYNEHIASIALP	119
P43685.2	RGNEQVRVSARKKCYPATASIIITNSSC-----SEYTDIMLIKLDSSVEYTERVRPLSLP	115
Q9I8X1.2	NEDEQTRNPKEKFCPNK-----NNN-----EVLDDIMLIKLDKPISSKHIAPLSLP	108
A8QL56.1	YEDEQIRVPKEKLCCNST-----NNC-----TQLGQIMLIRLNSSVNYSEHIAPLSLP	108
Q5MCS0.1	YEDEQIRVPKEKLCCNST-----NNC-----TQFSQIMLIRLNSPVNYSEHIAPLSLP	108
	:** * .	
Vk_tox1	DHDAPMGTECTIMGWLTGATNGSYPKVPLCASVNTFHNSVCDVYYPWWDLTDNQLCAGV	179
P43685.2	TSPASEGAECTVMGWGTTTPPDVTYPVPVPCVRIEMLNNAVCELARDLWNITDSVLCAGT	175
Q9I8X1.2	SSPPSVGVCVRIMGWSITPVKETFPDVPYCANINLLDHAVCQAGYPELLAEYRTLACAGI	168
A8QL56.1	SNRPSMGSVCRVMGWLLTSPVETFPKVPVHCVDINILHIQVCQAAYPSMSEN-YLLCAGV	167
Q5MCS0.1	SNPPSMGSVCCVMGWGTTISPEVTYPVPHCVNDINILHIPVCQAAYPTMSGK-NILCAGI	167
	*: * :**** . : : * * * . : : . **:	
Vk_tox1	LLGGIDTCKGDSGGPLVCGGRIQGVVSFGDDPCGQLLKPGVYTNVYKYVHVIHRYI----	235
P43685.2	WFGGKDSCKGDSGGPLICRGQLTGIVSWGPFCEQPLEYGVYTKVISFLFWIQSI----	230
Q9I8X1.2	VQGGKDTCKGDSGGPLICNGQFQGIYSYGAHPCGQPKPGIYTNVFDYTDWIQRNIAGNT	228
A8QL56.1	LEGGKDSCKGDSGGPLICNREIQGIVSWGPFPCAQLLEPGVYTKVFDYIDWIEGIIAGNT	227
Q5MCS0.1	LEGGKDSCKGDSGGPLICNGQIQGIVSWGPFPCAQLLEPGIYTKVFDYKDWIEGIIAGNS	227
	** *: * *****: * . : *: *: * * * : *: *: * . : **:	
Vk_tox1	-----	235
P43685.2	-----	230
Q9I8X1.2	DATCPP---	234
A8QL56.1	SVTCPSDNF	236
Q5MCS0.1	NVICP----	232

Figura 36. Alinhamento entre a sequência da Vk_tox1 e sequências similares com função caracterizada presentes no banco de dados (SwissProt e PDB). Marcado em vermelho encontram-se os resíduos do sítio ativo, em azul a região referente ao loop 37, em cinza o loop 60, em amarelo o loop 99 e em verde o loop 174.

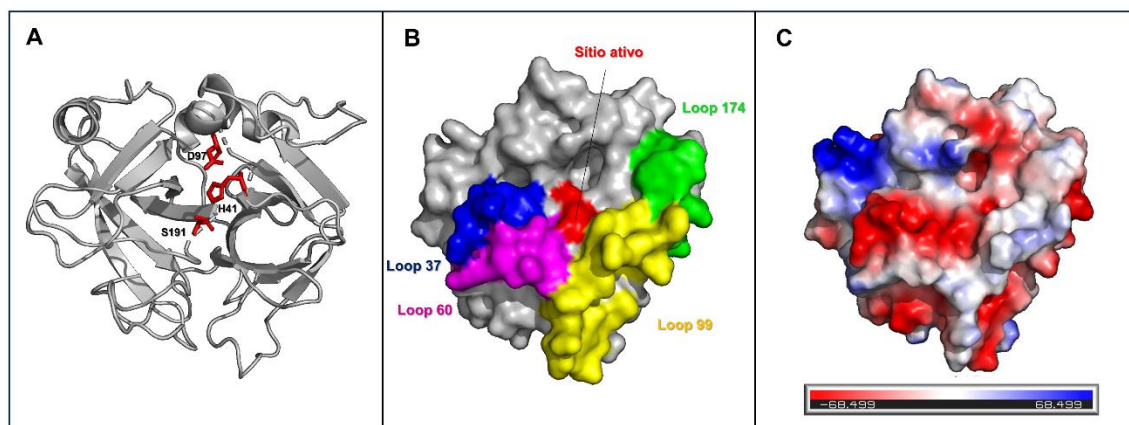


Figura 37. Estrutura tridimensional predita pelo ColabFold para a Vk_tox1. **A** – Estrutura tridimensional da Vk_tox1, destacando os resíduos do sítio ativo, His41, Asp97 e Ser191. **B** – Superfície da Vk_tox1 mostrando a posição dos loops envolvidos no reconhecimento do substrato; **C** - Potencial eletrostático da superfície da proteína.

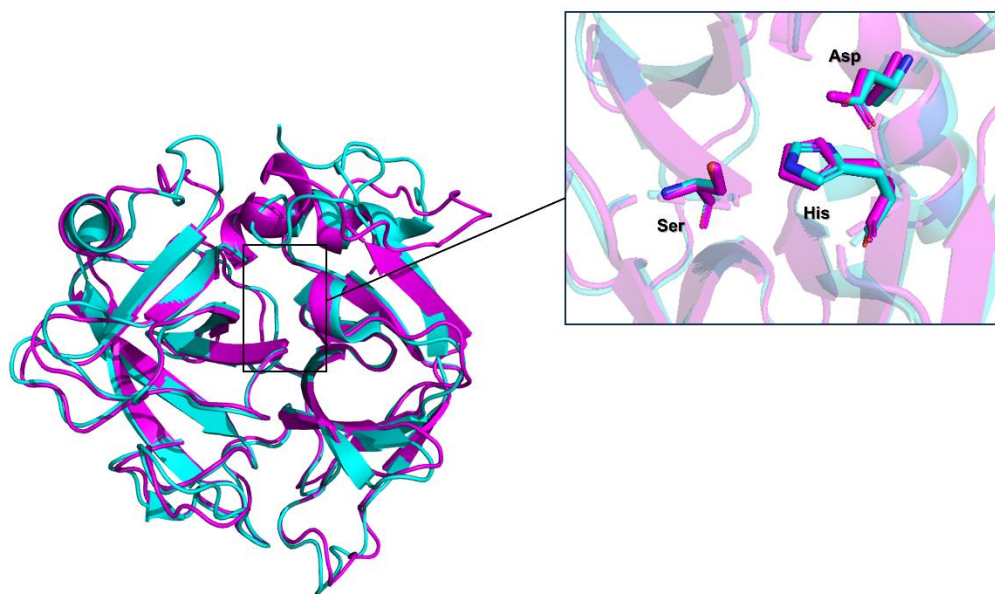


Figura 38. Sobreposição estrutural entre a Vk_tox1 (azul) e a estrutura da enzima de *Deinagkistrodon acutus* (Q9I8X1; PDBID: 1OP2) (roxo). Em destaque a conservação da posição dos resíduos do sítio ativo. O RMSD da sobreposição foi de 0,606, com 174 átomos alinhados.

3.3.2. OBTENÇÃO DA VK_TOX1 HETERÓLOGA

3.3.2.1. Confirmação da linearização do vetor por eletroforese em gel de agarose

Para a transformação das células de *K. phaffii* era necessário a realização da linearização do vetor fornecido pela empresa GenScript, para que houvesse a integração do vetor no genoma da levedura. Para isso utilizou-se a enzima PmeI (NEB), cujo sítio de restrição (5' GTTT'AAAC 3') no vetor encontra-se dentro da região do promotor AOX1. Na figura 39 encontra-se o gel de agarose com o padrão de migração após a linearização. Como observado, o plasmídeo migrou um pouco menos quando linearizado quando comparado à versão circular. Isso se deve ao fato do vetor circular muito provavelmente estar na conformação *supercoiled*, onde o DNA encontra-se mais compactado, ocupando um menor volume e migrando de forma mais rápida.

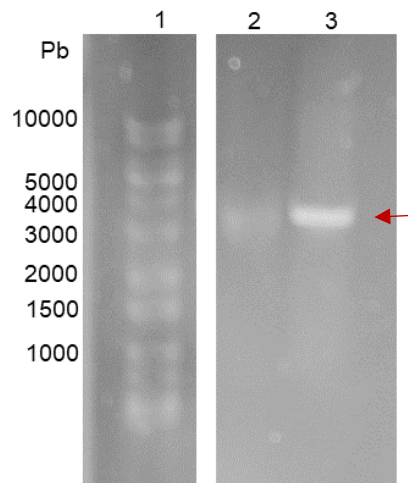


Figura 39. Gel de agarose 0,8% confirmando a linearização com a enzima PmeI do vetor pPICZαA clonado com o gene para a *Vk_tox1*. O vetor com o inserto possui 4276 pares de bases (pb). 1: Marcador de massa molecular; 2: Vetor não linearizado. 3: Vetor linearizado.

3.3.2.2. Transformação de células de *Komagataella phaffii* com vetor pPICZαA contendo o gene para a *Vk_tox1*

A transformação das células de *K. phaffii* foi feita por eletroporação e as células foram plaqueadas em meio YPD sólido acrescido de zeocina. Foram feitas placas com 100 µL e 200 µL de células eletroporadas e com o controle negativo, como observado na Figura 40. Como visualizado, cresceram mais colônias na placa contendo uma maior quantidade de células, e não houve crescimento na placa de controle negativo.

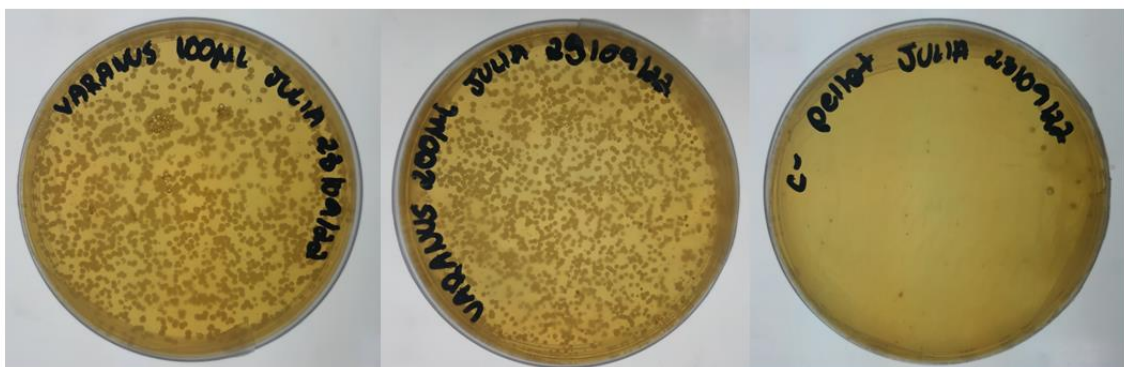


Figura 40. Placas da transformação das células de *K. phaffii* com o vetor contendo o gene para a *Vk_tox1*. Da esquerda para a direita: placa com 100 µL de células eletroporadas; placa com 200 µL de células eletroporadas; controle negativo onde as células foram eletroporadas sem a adição de um vetor.

3.3.2.3. Screening de expressão gênica

Foram escolhidas 4 colônias para terem sua expressão testada. A expressão foi realizada em meio BMMY com indução por metanol 1%. Como observado na figura 41, as quatro colônias testadas mostraram expressão. Todas as colônias apresentaram no *Western Blot* uma banda > 36 kDa, sendo ela melhor visualizada na primeira colônia. Também é possível verificar a presença de um rastro acima da banda, assim como o verificado para a SVSP ancestral (capítulo 2). Isso indica que a proteína estivesse sendo expressa glicosilada de forma heterogênea. Também é visível um rastro abaixo da banda, o que pode ser devido à degradação da proteína, algo comum quando proteínas são precipitadas com TCA/acetona.

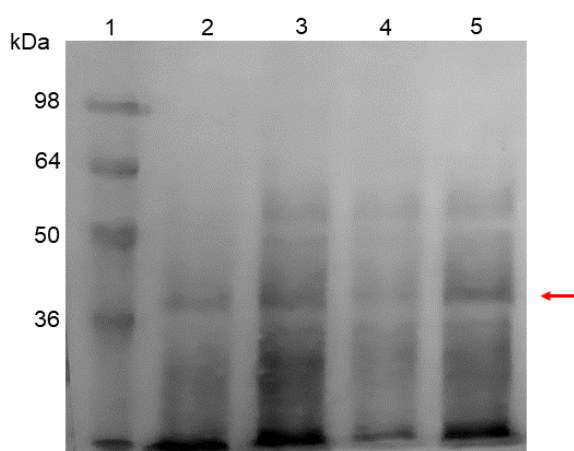


Figura 41. *Western blot* das proteínas secretadas pela *K. phaffii* transformada com o vetor contendo o gene para a *Vk_tox1*. O *western blot* mostra as quatro colônias selecionadas para o teste de expressão. 1: Marcador de massa molecular; 2: Sobrenadante da colônia 1; 3: colônia 2; 4: colônia 3; 5: colônia 4. A seta em vermelho indica a possível localização da banda referente à *Vk_tox1*.

3.3.2.4. Purificação da *Vk_tox1* por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (Ni^{2+})

A colônia 1 do experimento anterior (item 3.3.2.3.) foi escolhida para ser utilizada em uma expressão em larga escala da *Vk_tox1*. Um litro de expressão em meio BMMY foi concentrado, dialisado e submetido à coluna cromatográfica de afinidade ao Ni^{2+} . A eluição da proteína foi feita a partir de lavagens com tampão contendo diferentes concentrações de imidazol (25, 50, 100 e 150, 200, 250 e 500 mM). Como visualizado na figura 42A, nas quatro primeiras concentrações de imidazol utilizadas houve eluição proteica, havendo um pico maior na concentração de 25 mM. Esse pico, junto com aqueles eluídos com 50 e 100 mM de imidazol (figura 42B) devem corresponder a proteínas endógenas da levedura e a proteínas

presentes no meio de cultura que interagiram fracamente com a coluna, visto que em nenhum deles há bandas que pareçam com a encontrada no *Western blot* (figura 41). O pico eluído com 150 mM de imidazol apresentou-se muito mais limpo que os outros, com um rastro e uma banda definida em torno de 40 kDa, semelhante ao encontrado no *Western blot*. A presença de uma banda definida acima do tamanho que seria esperado (26,7 kDa) e a presença do rastro acima da banda demonstra que a Vk_tox1 estava sendo expressa glicosilada tal qual a SVSP ancestral.

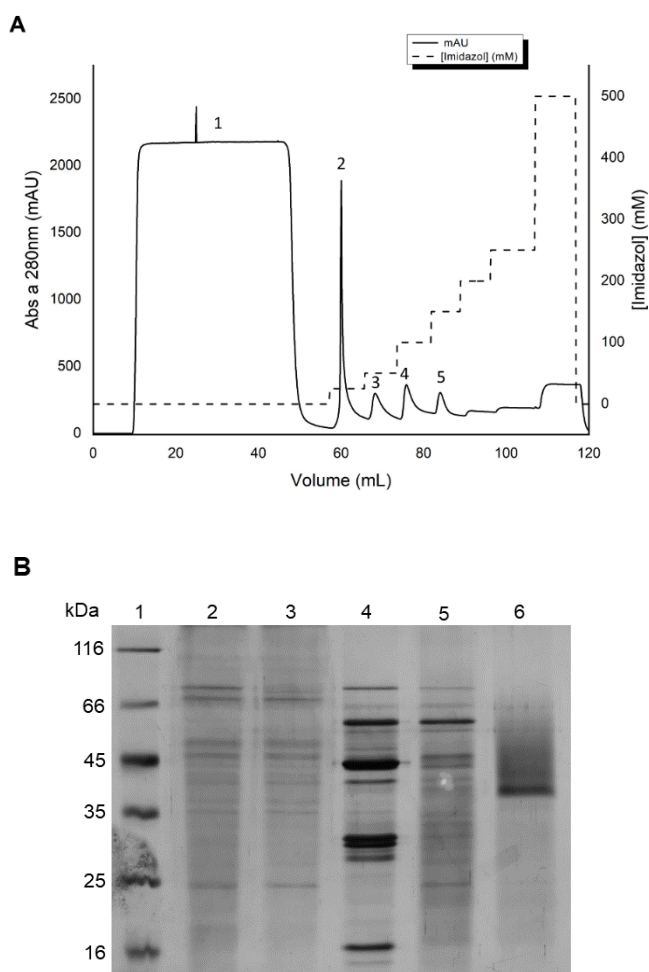


Figura 42. Purificação da Vk_tox1 por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (Ni^{2+}).

A - Cromatograma da purificação. Os números de 1 a 5 equivalem às amostras, respectivamente, do *flow through* (proteínas que não interagiram com a coluna), do pico eluído com 25 mM de imidazol, com 50 mM de imidazol, com 100 mM de imidazol e com 150 mM de imidazol. **B** – SDS-PAGE 12% com as amostras obtidas na purificação proteica. 1: Marcador molecular; 2: Amostra antes de ser injetada na coluna; 3: *Flow through*; 4: Pico eluído com 50 mM de imidazol; 5: Pico eluído com 100 mM de imidazol; 6: Pico eluído com 150 mM de imidazol.

3.3.2.5. Deglicosilação proteica

A enzima *Vk_tox1* possui 2 sítios de N-glicosilação e nenhum de O-glicosilação, como mostrado no item 3.3.1. Aliado a isso, os resultados de *Western blot* (figura 41) e o SDS-PAGE da purificação (figura 42) indicam que a enzima é glicosilada, visto que apresentou o mesmo padrão apresentado pela SVSP ancestral antes da deglicosilação (ver resultados do Capítulo 2). Para confirmar essa hipótese, foi realizado o ensaio de N-deglicosilação da *Vk_tox1* utilizando-se a enzima PNGase F. Na figura 43 é possível observar que houve uma diminuição no tamanho da banda quando deglicosilada, além do total desaparecimento do rastro. A partir desse resultado é possível inferir que o rastro visualizado em SDS-PAGE e *Western blot* era formado pela *Vk_tox1* glicosilada de forma não uniforme, e que a banda de ~40 kDa era de uma versão também glicosilada da *Vk_tox1*, porém com glicosilações de tamanho similar. (para mais detalhes sobre glicosilação em *K. phaffii*, ler item 2.3.2.6.).

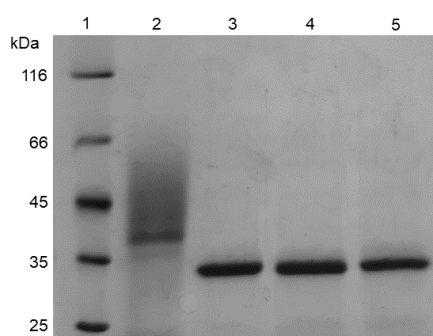


Figura 43. SDS-PAGE 12% da *Vk_tox1* após deglicosilação com a enzima PNGase F. 1: Marcador molecular; 2: Amostra antes da deglicosilação (C-); 3: amostra após 24h de deglicosilação; 4: após 48h; 5: após 72h de deglicosilação.

3.3.3. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS APRESENTADAS PELA VK_TOX1

3.3.3.1. Caracterização da atividade de clivagem do fibrinogênio

O fibrinogênio é um dos principais substratos biológicos clivados pelas serinoproteases presentes na peçonha de serpentes e, embora haja poucas serinoproteases da peçonha de lagartos caracterizadas, essa atividade já foi detectada em helodermatídeos (Utaisincharoen *et al.*, 1993). Devido a isso e ao fato da clivagem do fibrinogênio já ter sido detectada na peçonha do dragão-de-komodo (Dobson *et al.*, 2019), era importante identificar se a *Vk_tox1* era capaz de clivá-lo. Os testes de atividade sobre o fibrinogênio foram realizados em tubo e verificados em SDS-PAGE. Foram feitos com a enzima tanto glicosilada quanto deglicosilada a fim de detectar se as glicosilações exerciam algum tipo de influência na atividade. Inicialmente, testou-se a atividade em uma proporção crescente de enzima. Como mostrado

na figura 44, a proteína glicosilada apresentou clivagem das cadeias α e β do fibrinogênio e a deglicosilada não, indicando que essa enzima possui a atividade fibrinogenolítica e que as glicosilações são necessárias ou no reconhecimento do substrato ou na atividade enzimática. A *Vk_tox1*, assim como a SVSP ancestral (capítulo 2), possui uma glicosilação predita no *loop* 99, uma região definida como importante para o reconhecimento do substrato. Zeng e Colaboradores (2013) identificaram que a glicosilação nesse *loop* está relacionada a uma mudança em sua conformação. Curiosamente, a glicosilação nessa região teve efeito oposto em ambas as enzimas. Essa discrepância pode ocorrer por conta das diferenças de tamanho entre os *loops* 99 de ambas as enzimas. O *loop* da *Vk_tox1* é maior que o dos encontrados em serpentes, logo, o efeito estrutural sofrido por ele pode também ser diferente. Além disso, é possível que o efeito positivo/negativo gerado pelas glicosilações na atividade enzimática da *Vk_tox1* e da SVSP ancestral não esteja diretamente associado a essa glicosilação do *loop* 99.

Na figura 44A é possível verificar que nas proporções molares de enzima:fibrinogênio de 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 houve clivagem das cadeias α e β pela enzima glicosilada. Nas outras proporções não é possível verificar se houve clivagem significativa durante o tempo analisado. A proporção 1:8 foi selecionada para ser utilizada nos outros testes com a enzima glicosilada e a proporção 1:2 com a enzima deglicosilada. Na figura 45 confirma-se que a enzima deglicosilada não apresenta qualquer atividade sobre o fibrinogênio na condição testada, visto que a reação ocorreu por 24 horas. Na figura 45A é possível observar que a partir de 8 horas de reação a enzima glicosilada já havia clivado todas as cadeias α e β disponíveis, restando somente a cadeia γ , a qual não é clivada por enzimas fibrinogenolíticas, e uma quarta banda, localizada abaixo da cadeia β . Essa banda, entretanto, é totalmente clivada após 24 horas.

Após a confirmação da atividade da *Vk_tox1* sobre o fibrinogênio, foram realizados testes em condições diferentes a fim de caracterizar essa atividade. Na figura 46 é possível observar que a enzima está ativa nas temperaturas 37 e 42°C, não apresentando atividade a temperatura ambiente (25°C), o que indica que a *Vk_tox1* é ativa em temperaturas próximas às fisiológicas dos animais. Outras serinoproteases de serpentes também apresentam temperaturas ótimas próximas às fisiológicas de animais de sangue quente, como uma de *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* que é em 41°C (Liu *et al.*, 2008) e uma de *Agkistrodon halys* que é 37°C (Ghorbanpur *et al.*, 2009). Na figura 47 observa-se que a proteína não apresentou atividade em pH 5,0, pouca atividade em pH 6,0 e atividade semelhante em pH neutro e básico (7,0 a 9,0). Esse resultado é similar ao apresentado pela SVSP ancestral (capítulo 2).

Diversas moléculas responsáveis por inibir a atividade de serinoproteases e/ou especificamente serinoproteases de peçonha foram testadas com a enzima glicosilada. Utilizou-se nesse teste os inibidores de serinoproteases, aprotinina, leupeptina e PMSF, e as

moléculas DTT (agente redutor), visto que a enzima possui cinco ou seis pontes dissulfeto e EDTA (quelante de íons divalentes), tendo em vista que muitas dessas enzimas têm atividade dependente de Ca^{2+} . Como mostrado na figura 48, os inibidores aprotinina e leupeptina, assim como o quelante EDTA não inibiram a atividade enzimática. Já o PMSF inibiu completamente. O DTT também inibiu a atividade enzimática, embora não completamente, demonstrando que as pontes dissulfeto são importantes para o funcionamento enzimático (para maiores detalhes sobre esses inibidores, ler o item 2.3.3.1.).

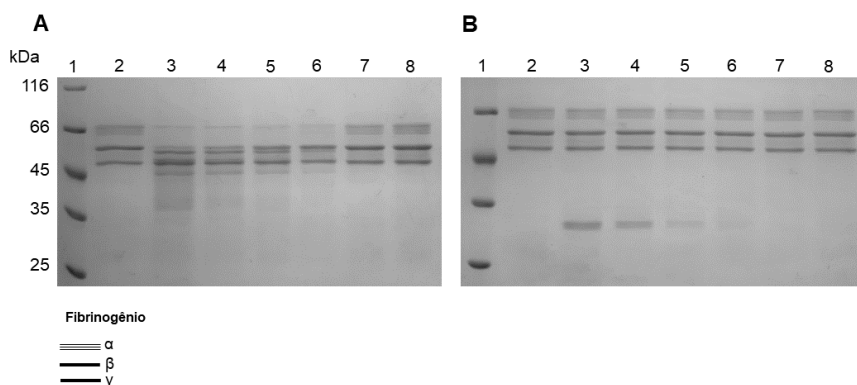


Figura 44. SDS-PAGE 12% mostrando a atividade da *Vk_tox1* glicosilada e deglicosilada sobre o fibrinogênio em diversas proporções molares de enzima:fibrinogênio. **A** – *Vk_tox1* glicosilada; **B** – *Vk_tox1* deglicosilada. 1: Marcador molecular; 2: Controle negativo (fibrinogênio intacto); 3: Proporção molar de 1:2; 4: 1:4; 5: 1:8; 6: 1:16; 7: 1:32; 8: 1:64. (As bandas localizadas entre 24-35 kDa em B correspondem à *Vk_tox1*).

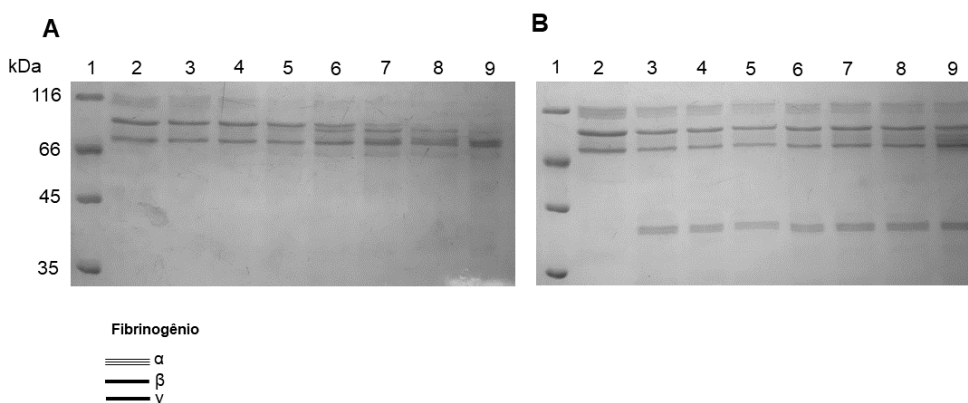


Figura 45. SDS-PAGE 12% mostrando a atividade da *Vk_tox1* glicosilada e deglicosilada sobre o fibrinogênio em diferentes tempos de reação. A proporção molar de enzima:fibrinogênio para as reações com a enzima glicosilada foi de 1:8 e para a enzima deglicosilada foi de 1:2. **A** – *Vk_tox1* glicosilada; **B** – *Vk_tox1* deglicosilada. 1: Marcador molecular; 2: Controle negativo (fibrinogênio intacto); 3: 15 min de reação; 4: 30 min; 5: 1h; 6: 2h; 7: 4 h; 8: 8h; 9: 24 h. (As bandas localizadas entre 24-35 kDa em B correspondem à *Vk_tox1*).

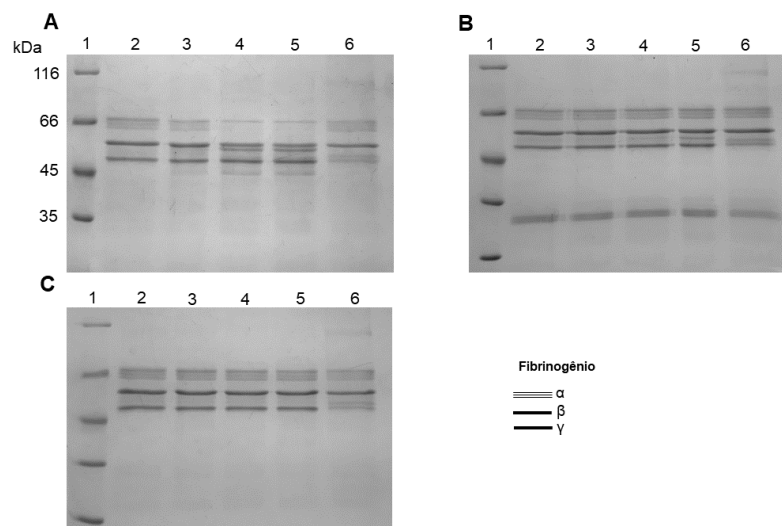


Figura 46. SDS-PAGE 12% mostrando a atividade da Vk_tox1 glicosilada e deglicosilada sobre o fibrinogênio em diferentes temperaturas. A proporção molar de enzima:fibrinogênio para as reações com a enzima glicosilada foi de 1:8 e para a enzima deglicosilada foi de 1:2. **A** – Vk_tox1 glicosilada; **B** – Vk_tox1 deglicosilada; **C** – Controle negativo com o fibrinogênio em diferentes temperaturas na ausência de enzima. 1: Marcador molecular; 2: Reação a 4°C; 3: 25°C; 4: 37°C; 5: 42°C; 6: 75°C. (As bandas localizadas entre 24-35 kDa em B correspondem à Vk_tox1).

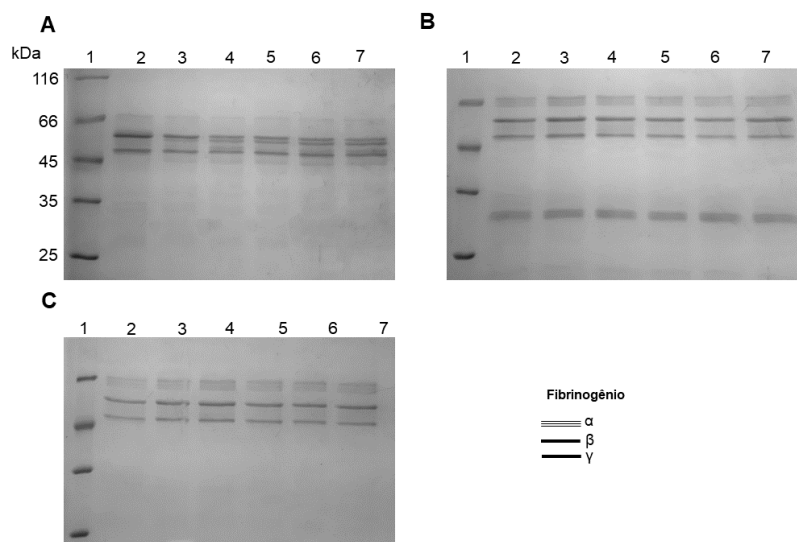


Figura 47. SDS-PAGE 12% mostrando a atividade da Vk_tox1 glicosilada e deglicosilada sobre o fibrinogênio em diferentes pH. A proporção molar de enzima:fibrinogênio para as reações com a enzima glicosilada foi de 1:8 e para a enzima deglicosilada foi de 1:2. **A** – Vk_tox1 glicosilada; **B** – Vk_tox1 deglicosilada; **C** – Controle negativo com o fibrinogênio em diferentes pH na ausência de enzima. 1: Marcador molecular; 2: Reação em pH 5,0; 3: 6,0; 4: 7,0; 5: 7,4; 6: 8,0; 7: 9,0. (As bandas localizadas entre 24-35 kDa em B correspondem à Vk_tox1).

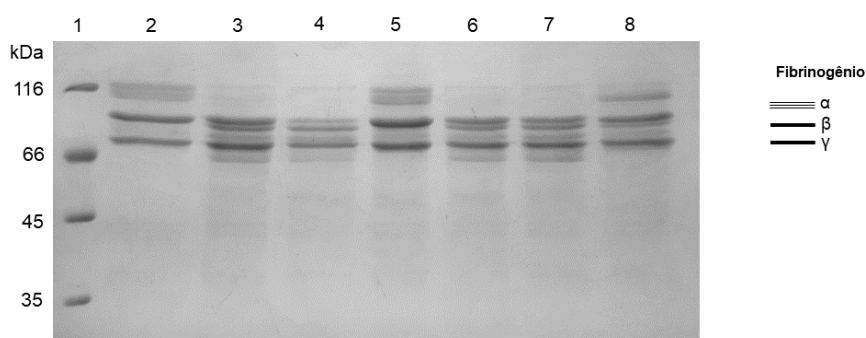


Figura 48. SDS-PAGE 12% mostrando a atividade da Vk_tox1 glicosilada sobre o fibrinogênio na presença de diferentes inibidores (proporção enzima:fibrinogênio de 1:8). 1: Marcador molecular; 2: Controle negativo (fibrinogênio intacto); 3: controle positivo (sem adição de inibidor); 4: reação com EDTA; 5: PMSF; 6: aprotinina; 7: leupeptina; 8: DTT.

3.3.3.1.1. Teste de atividade de indução da formação de coágulos de fibrina

A clivagem do fibrinogênio de forma a liberar os peptídeos A e B induz a formação dos coágulos de fibrina. Visando identificar se a Vk_tox1 era capaz de induzir a formação desses coágulos realizou-se um teste de detecção de coágulos de fibrina. As redes de fibrina absorvem a 405 nm, fazendo com que seja possível detectá-las com o uso de um espectrofotômetro. Como demonstrado na figura 49, a trombina (controle positivo) levou à formação do coágulo de fibrina, como observado pelo aumento na absorbância pelo tempo. Entretanto, tal perfil não foi detectado para a Vk_tox1, já que não houve aumento na absorbância da amostra. Isso indica que essa enzima não atua de forma a induzir a coagulação sanguínea por meio da transformação do fibrinogênio em fibrina e sim por meio da depleção do fibrinogênio plasmático. Essa depleção leva à falta de fibrinogênio disponível no sangue, inibindo, dessa forma, a formação de coágulos. Essa atividade era esperada para essa enzima, tendo em vista que foi detectado por Koludarov e Colaboradores (2017) atividade de clivagem destrutiva do fibrinogênio na peçonha de *Varanus komodoensis*. Entretanto, diferente do encontrado para a Vk_tox1, os autores do estudo não detectaram clivagem da cadeia β , somente da cadeia α . Uma explicação plausível para tal discrepância pode ser o fato de que em seu experimento os autores somente monitoraram a reação por 1 hora. Como visualizado na figura 45, a clivagem da cadeia β foi visualizada somente após duas horas de reação.

A atividade de destruição do fibrinogênio levando à sua depleção na corrente sanguínea é condizente com os efeitos fisiológicos causados pela mordida do dragão-de-komodo. O animal é conhecido por induzir forte sangramento na presa, levando à sua queda de pressão e dificuldade de coagulação sanguínea (Ducey *et al.*, 2016).

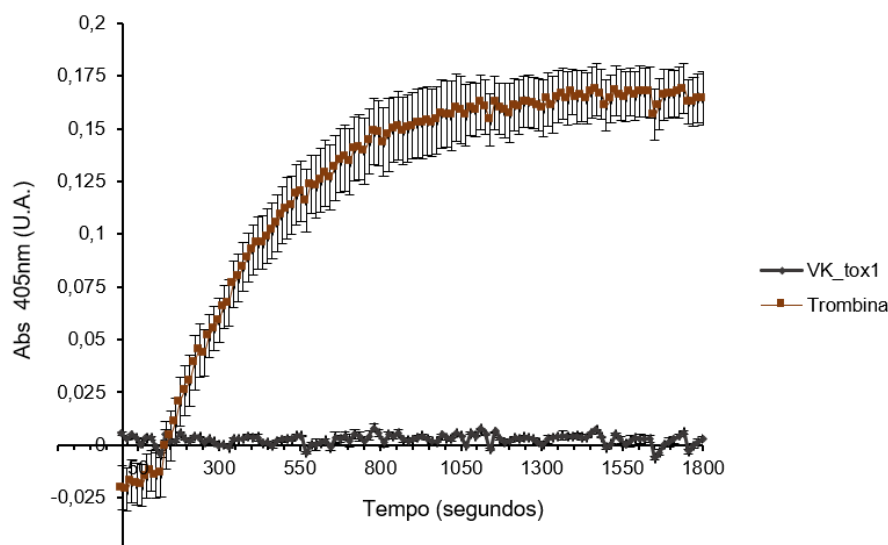


Figura 49. Teste de indução da formação de coágulos de fibrina pela *Vk_tox1* glicosilada. Uso de fibrinogênio, *Vk_tox1* e trombina nas concentrações, respectivamente, 3,68 μ M, 1,34 μ M e 84 nM. Os dados de absorbância iniciando em valores negativos deve-se ao valor obtido ter sido menor que o valor detectado para o branco (tampão + fibrinogênio).

3.3.3.2. Determinação da atividade amidolítica

Como demonstrado no item 3.3.3.1., a *Vk_tox1* glicosilada apresenta atividade amidolítica, visto que foi capaz de hidrolisar o fibrinogênio. O substrato sintético BApNA (N α -Benzoil-DL-arginina 4-nitroanilina cloridrato) foi utilizado para verificar se a *Vk_tox1* deglicosilada também possuía tal atividade, o que indicaria que as glicosilações são necessárias ao reconhecimento do fibrinogênio e não afetam sua atividade enzimática. Na figura 50 é possível observar que nenhuma das duas versões da *Vk_tox1* foi capaz de clivar o substrato BApNA. Devido ao fato de a enzima glicosilada ter mostrado que possui atividade proteolítica, esse resultado somente indica que esse substrato não é clivado por ela. As serinoproteases da peçonha fazem parte de um grupo de enzimas que clivam após resíduos de aminoácidos básicos (lisina e/ou arginina) logo, a ausência de clivagem após uma arginina pode ser indicativa de que essa enzima hidrolisa especificamente após resíduos de lisina, ou que a ausência de outros resíduos no substrato dificulta sua acomodação adequada no sítio ativo.

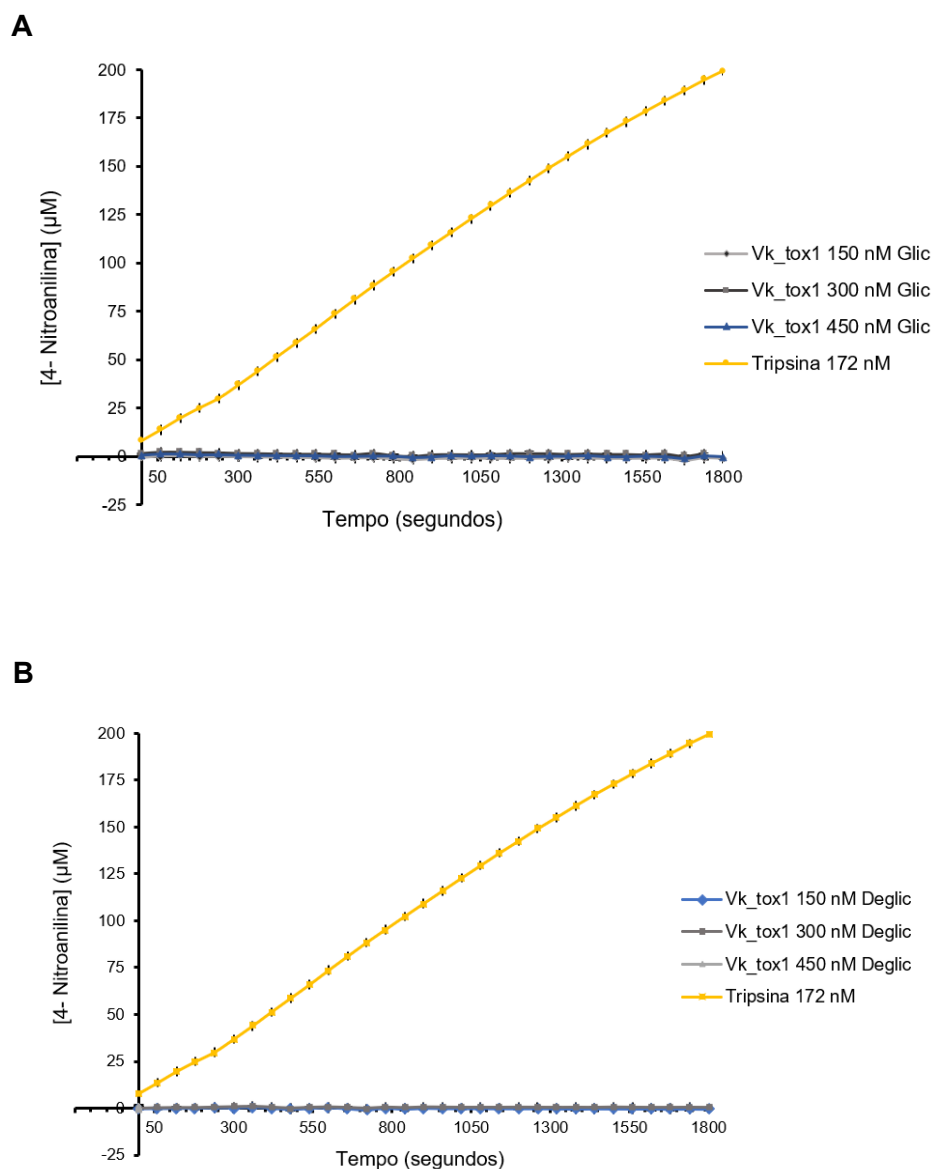


Figura 50. Teste de atividade enzimática da Vk_tox1 glicosilada e deglicosilada em diferentes concentrações sobre o substrato BApNA (N α -Benzoil-DL-arginina 4-nitroanilina cloridrato) pelo tempo. A atividade é dada pela concentração de produto produzido (4-nitroanilina). **A** – Vk_tox1 glicosilada; **B**- Vk_tox1 deglicosilada.

3.3.3.3. Determinação da atividade do tipo calicreína

A atividade do tipo calicreína (clivagem do cininogênio e liberação de cinina) é considerada a atividade ancestral das serinoproteases de peçonha, tendo em vista que acredita-se que estas evoluíram a partir de calicreínas salivares. As calicreínas clivam após resíduos de arginina, quando em P2 há um resíduo de fenilalanina. O substrato sintético Benzoil-Pro-Phe-Arg-4-nitroanilina acetato (Chromozym PK, Roche) foi utilizado para detectar se a Vk_tox1 possuía essa atividade. Como visualizado na figura 51, a Vk_tox1 não foi capaz

de clivar o substrato na condição testada nem glicosilada nem deglicosilada, indicando que a enzima não possui atividade do tipo caliceína.

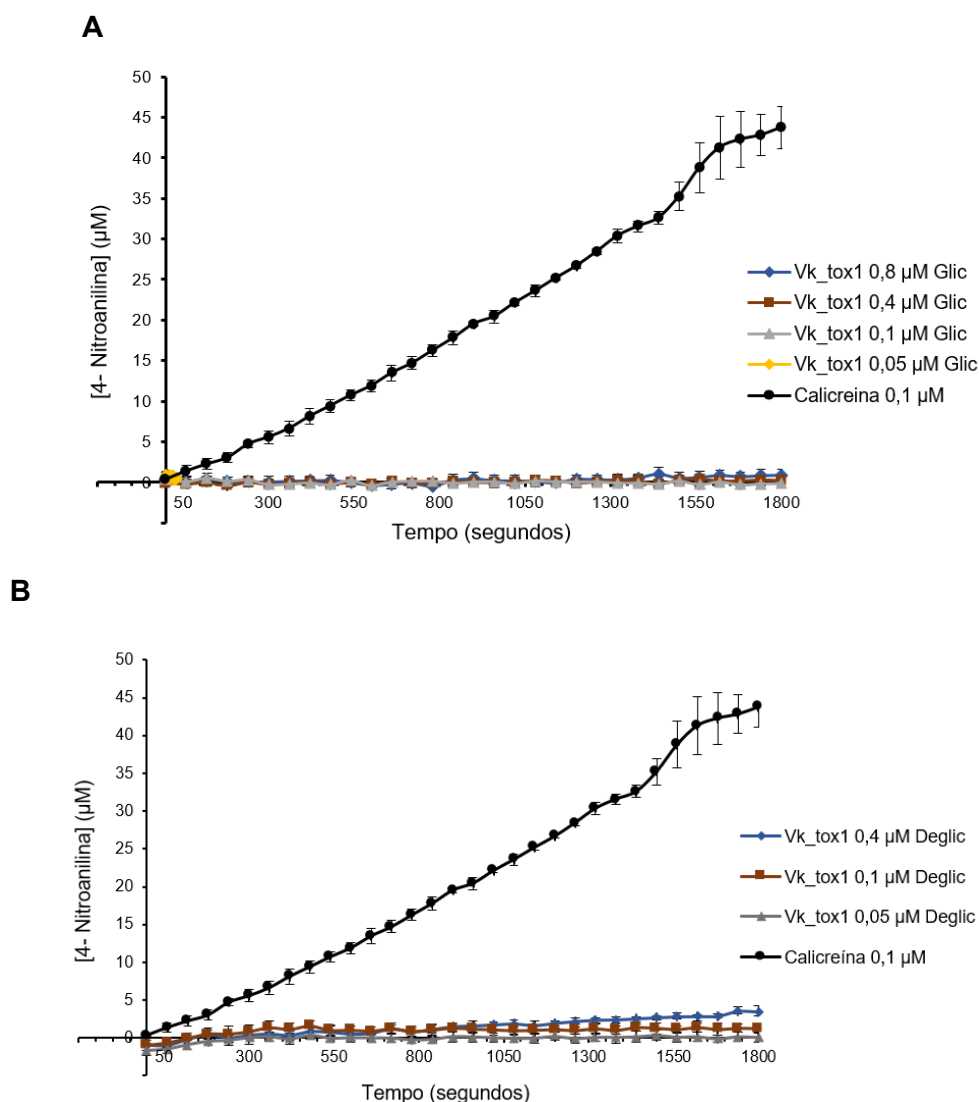


Figura 51. Teste de atividade enzimática da Vk_tox1 glicosilada e deglicosilada em diferentes concentrações sobre o substrato Chromozym PK (Benzoil-Pro-Phe-Arg-4-nitroanilina). A atividade é dada pela concentração em µM de produto produzido (4-nitroanilina). Caliceína plasmática humana a 100 nM é utilizada como controle positivo. **A** - Vk_tox1 glicosilada; **B** - Vk_tox1 deglicosilada.

Os dados de caracterização bioquímica da Vk_tox1 aqui relatados são os primeiros desse tipo que se tem conhecimento para uma enzima da peçonha do dragão-de-komodo. Esses dados representam um passo inicial no estudo bioquímico dessa peçonha visando a descoberta de moléculas promissoras. Todavia, a Vk_tox1 , diferente da SVSP ancestral

(capítulo 2), tem um baixo rendimento em *K. phaffii* ($< 0,5$ mg por litro de inóculo induzido em meio BMMY), fazendo-se necessária a otimização dos parâmetros de expressão para que seja possível vislumbrar uma aplicação biotecnológica. Além disso, caracterizações mais detalhadas quanto à sua estabilidade também devem ser realizadas.

3.4. CONCLUSÕES

Os estudos de caracterização bioquímica da serinoprotease da peçonha do lagarto *Varanus komodoensis* (denominada Vk_tox1) mostraram que:

- A enzima Vk_tox1 foi efetivamente expressa em células de *K. phaffii* e purificada por cromatografia de afinidade ao Ni²⁺.
- A enzima analisada somente apresenta atividade catalítica sobre o fibrinogênio quando glicosilada.
- A Vk_tox1 é ativa sobre o fibrinogênio, clivando suas cadeias α e β , mas não induzindo a formação de coágulos de fibrina e sim a depleção do fibrinogênio plasmático. Esse resultado é condizente com o efeito da peçonha do Dragão-de-komodo.
- A Vk_tox1 apresenta atividade em temperaturas características de condições fisiológicas de animais vertebrados: sem atividade a 4°C, 25°C e 75°C e com atividade a 37°C e 42°C.
- A Vk_tox1 não apresenta atividade em pH 5, estando o seu pH ótimo em condições de neutras para básicas, entre os pH 7-9.
- A Vk_tox1 não possui atividade do tipo calicreína.

3.5. PERSPECTIVAS

Estudos posteriores a serem realizados com a Vk_tox1 incluem:

- Otimização da expressão a fim de obter um melhor rendimento.
- Caracterização por dicroísmo circular do perfil de estrutura secundária e termoestabilidade da enzima glicosilada e deglicosilada.
- Cristalização e resolução de sua estrutura tridimensional.
- Realização de testes enzimáticos com outros substratos sintéticos a fim de detectar se a enzima apresenta outras atividades.
- Análise do uso da Vk_tox1 em aplicações biotecnológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAGON, A., POSSANI, L. D., SMART, J. O. H. N. et al. Helodermatine, a kallikrein-like, hypotensive enzyme from the venom of *Heloderma horridum horridum* (Mexican beaded lizard). **The Journal of experimental medicine**, v. 164, n. 6, p. 1835-1845, 1986.
- ALMAGRO ARMENTEROS, J. J.; TSIRIGOS, K. D.; SONDERBY C. K., et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nature biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 420-423, 2019.
- ALMEIDA, D. D., VIALA, V. L., NACHTIGALL, P. G. et al. Tracking the recruitment and evolution of snake toxins using the evolutionary context provided by the *Bothrops jararaca* genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 20, p. e2015159118, 2021.
- AMORIM, F. G.; MENALDO, D. L.; CARONE, S. E. et al. New insights on moojase, a thrombin-like serine protease from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxins**, v. 10, n. 12, p. 500, 2018.
- AN, H. J., PEAVY, T. R., HEDRICK, J. L. et al. Determination of N-glycosylation sites and site heterogeneity in glycoproteins. **Analytical chemistry**, v. 75, n. 20, p. 5628-5637, 2003.
- ASMAT, A., RAMZAN, F. Venom protein C activators as diagnostic agents for defects of protein C system. **Protein and Peptide Letters**, v. 25, n. 7, p. 643-651, 2018.
- BAGOLY, Z., KONCZ, Z., HÁRSFALVI, J. et al. Factor XIII, clot structure, thrombosis. **Thrombosis research**, v. 129, n. 3, p. 382-387, 2012.
- BARUA, A., MIKHEYEV, A. S. Toxin expression in snake venom evolves rapidly with constant shifts in evolutionary rates. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 287, n. 1926, p. 20200613, 2020.
- BÖHME, W. Checklist of the living monitor lizards of the world (family Varanidae). **Zoologische Verhandelingen**, v. 341, p. 4-43, 2003.
- BULL, J. J., JESSOP, T. S., WHITELEY, M. Deathly drool: evolutionary and ecological basis of septic bacteria in Komodo dragon mouths. **PLOS one**, v. 5, n. 6, p. e11097, 2010.
- CAI, W., PEI, J., GRISHIN, N. V. Reconstruction of ancestral protein sequences and its applications. **BMC evolutionary biology**, v. 4, p. 1-23, 2004.

CAPELLA-GUTIÉRREZ, S.; SILLA-MARTÍNEZ, J. M.; GABALDÓN, T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. **Bioinformatics**, v. 25, n. 15, p. 1972-1973, 2009.

CARLISLE, T. L.; BOCK, P. E.; JACKSON, C. M. Kinetic intermediates in prothrombin activation. Bovine prethrombin 1 conversion to thrombin by factor X. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 35, p. 22044-22055, 1990.

CARONE, S. E., MENALDO, D. L., SARTIM, M. A. et al. BjSP, a novel serine protease from Bothrops jararaca snake venom that degrades fibrinogen without forming fibrin clots. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 357, p. 50-61, 2018.

CASEWELL, N. R., HUTTLEY, G. A., WÜSTER, W. Dynamic evolution of venom proteins in squamate reptiles. **Nature communications**, v. 3, n. 1, p. 1066, 2012.

CESARMAN-MAUS, G.; HAJJAR, K. A. Molecular mechanisms of fibrinolysis. **British journal of haematology**, v. 129, n. 3, p. 307-321, 2005.

CHENG, J.; SAIGO, H.; BALDI, P. Large-scale prediction of disulfide bridges using kernel methods, two-dimensional recursive neural networks, and weighted graph matching. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 62, n. 3, p. 617-629, 2006.

CHERNYSHENKO, V., PLATONOVA, T., MAKOGONENKO, Y. et al. Fibrin (ogen) olytic and platelet modulating activity of a novel protease from the Echis multisquamatis snake venom. **Biochimie**, v. 105, p. 76-83, 2014.

COLLEN, D.; LIJNEN, H.R. Basic and Clinical Aspects of Fibrinolysis and Thrombolysis. **Blood**, v. 78, p. 3114–3124, 1991.

DALY, R., HEARN, M. T.W. Expression of heterologous proteins in Pichia pastoris: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition: An Interdisciplinary Journal**, v. 18, n. 2, p. 119-138, 2005.

DATTA, G., TU, A. T. Structure and other chemical characterizations of gila toxin, a lethal toxin from lizard venom. **The Journal of peptide research**, v. 50, n. 6, p. 443-450, 1997.

DAVÌ, G., PATRONO, C. Platelet activation and atherothrombosis. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 24, p. 2482-2494, 2007.

DE CANDIA, E. Mechanisms of platelet activation by thrombin: a short history. **Thrombosis research**, v. 129, n. 3, p. 250-256, 2012.

DESHIMARU, M., OGAWA, T., NAKASHIMA, K. I. et al. Accelerated evolution of crotalinae snake venom gland serine proteases. **FEBS letters**, v. 397, n. 1, p. 83-88, 1996.

DI CERA, E. Serine proteases. **IUBMB life**, v. 61, n. 5, p. 510-515, 2009.

DOBSON, J. ZDENEK, C. N., HAY, C., S. et al. Varanid lizard venoms disrupt the clotting ability of human fibrinogen through destructive cleavage. **Toxins**, v. 11, n. 5, p. 255, 2019.

DOLEY, R., MACKESSY, S. P., KINI, R. Manjunatha. Role of accelerated segment switch in exons to alter targeting (ASSET) in the molecular evolution of snake venom proteins. **BMC evolutionary biology**, v. 9, p. 1-14, 2009.

DUCEY, S. D., COOPER, J. S., WADMAN, M. C. Bitten by a Dragon. **Wilderness & environmental medicine**, v. 27, n. 2, p. 291-293, 2016.

FRY, B. G., WÜSTER, W. Assembling an arsenal: origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences. **Molecular biology and evolution**, v. 21, n. 5, p. 870-883, 2004.

FRY, B. G. From genome to “venome”: molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. **Genome research**, v. 15, n. 3, p. 403-420, 2005.

FRY, B. G., VIDAL, N., NORMAN, J. A. et al. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. **Nature**, v. 439, n. 7076, p. 584-588, 2006.

FRY, B. G., SCHEIB, H., VAN DER WEERD, L. et al. Evolution of an arsenal: structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Caenophidia). **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 7, n. 2, p. 215-246, 2008.

FRY, B. G., VIDAL, N., VAN DER WEERD, L. et al. Evolution and diversification of the Toxicofera reptile venom system. **Journal of proteomics**, v. 72, n. 2, p. 127-136, 2009a.

FRY, B. G., WROE, S., TEEUWISSE, W., et al. A central role for venom in predation by *Varanus komodoensis* (Komodo Dragon) and the extinct giant *Varanus* (Megalania) *priscus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 22, p. 8969-8974, 2009b.

FRY, B. G., WINTER, K., NORMAN, J. A., et al. Functional and structural diversification of the Anguimorpha lizard venom system. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 9, n. 11, p. 2369-2390, 2010.

- FRY, B. G., CASEWELL, N. R., WUSTER, W., et al. The structural and functional diversification of the Toxicofera reptile venom system. **Toxicon**, v. 60, n. 4, p. 434-448, 2012.
- FU, L., NIU, B., ZHU, Z. et al. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 23, p. 3150-3152, 2012.
- FUNK, C., GMUR, J., HEROLD, R. et al. Reptilase®-R—A New Reagent in Blood Coagulation. **British journal of haematology**, v. 21, n. 1, p. 43-52, 1971.
- GALE, A. J.; CRAMER, T.J.; ROZENSHTEYN, D. et al. Detailed mechanisms of the inactivation of factor VIIIa by activated protein C in the presence of its cofactors, protein S and factor V. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 24, p. 16355-16362, 2008.
- GAO, R., ZHANG, Y., MENG, Q. et al. Characterization of three fibrinogenolytic enzymes from Chinese green tree viper (*Trimeresurus stejnegeri*) venom. **Toxicon**, v. 36, n. 3, p. 457-467, 1998.
- GAUCHER, E. A., GOVINDARAJAN, S., GANESH, O. K. Palaeotemperature trend for Precambrian life inferred from resurrected proteins. **Nature**, v. 451, n. 7179, p. 704-707, 2008.
- GERADS, I.; TANS, G.; YUKELSON, L.Y, et al. Activation of bovine factor V by an activator purified from the venom of *Naja naja oxiana*. **Toxicon**, v. 30, n. 9, p. 1065-1079, 1992.
- GHORBANPUR, M. ZARE M., A., ZOKAEE, F. et al. Purification and partial characterization of a coagulant serine protease from the venom of the Iranian snake *Agkistrodon halys*. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 15, p. 411-423, 2009.
- GOLDSTEIN, E. J., TYRRELL, K. L., CITRON, D. M. et al. Anaerobic and aerobic bacteriology of the saliva and gingiva from 16 captive Komodo dragons (*Varanus komodoensis*): new implications for the "bacteria as venom" model. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, p. 262-272, 2013.
- GOLIAS, C. CHARALABOPOULOS, A., STAGIKAS, D. et al. The kinin system-bradykinin: biological effects and clinical implications. Multiple role of the kinin system-bradykinin. **Hippokratia**, v. 11, n. 3, p. 124, 2007.
- GUMULYA, Y. BAEK, J. M., WUN, S. J. et al. Engineering highly functional thermostable proteins using ancestral sequence reconstruction. **Nat Catal** 1: 878-888. 2018.
- GUPTA, Ramneek; BRUNAK, Søren. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. In: **Biocomputing 2002**. p. 310-322. 2001.

HARGREAVES, A. D., SWAIN, M. T., LOGAN, D. W. et al. Testing the Toxicofera: comparative transcriptomics casts doubt on the single, early evolution of the reptile venom system. **Toxicon**, v. 92, p. 140-156, 2014.

HARMS, M. J., THORNTON, J. W. Analyzing protein structure and function using ancestral gene reconstruction. **Current opinion in structural biology**, v. 20, n. 3, p. 360-366, 2010.

HE, J., CHEN, S., GU, J. Identification and characterization of Harobin, a novel fibrinolytic serine protease from a sea snake (*Lapemis hardwickii*). **FEBS letters**, v. 581, n. 16, p. 2965-2973, 2007.

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical reviews**, v. 102, n. 12, p. 4501-4524, 2002.

HENDON, R. A., TU, A. T. Biochemical characterization of the lizard toxin gilatoxin. **Biochemistry**, v. 20, n. 12, p. 3517-3522, 1981.

HENNERICI, M. G., KAY, R., BOGOUSSLAWSKY, J., et al. Intravenous ancrod for acute ischaemic stroke in the European Stroke Treatment with Ancrod Trial: a randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 368, n. 9550, p. 1871-1878, 2006.

HERMOGENES, A. L., RICHARDSON, M., MAGALHAES, A. et al. Interaction of a plasminogen activator proteinase, LV-PA with human α 2-macroglobulin. **Toxicon**, v. 47, n. 4, p. 490-494, 2006.

HERTZBERG, M. Biochemistry of Factor X. **Blood Rev.**, v. 8, p. 56–62, 1994.

HUANG, K., ZHAO, W., GAO, Y. et al. Structure of saxthrombin, a thrombin-like enzyme from *Gloydus saxatilis*. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 67, n. 8, p. 862-865, 2011.

HUNG, C., CHIOU, S. Fibrinogenolytic proteases isolated from the snake venom of Taiwan habu: serine proteases with kallikrein-like and angiotensin-degrading activities. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 281, n. 4, p. 1012-1018, 2001.

JOSEPH, J. S.; KINI, R. M. Snake venom prothrombin activators homologous to blood coagulation factor Xa. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v. 31, n. 3-6, p. 234-240, 2002.

KOLUDAROV, I., JACKSON, T. N., OP DEN BROUW, B. et al. Enter the dragon: the dynamic and multifunctional evolution of Anguimorpha lizard venoms. **Toxins**, v. 9, n. 8, p. 242, 2017.

- LEME, A.F. P., PREZOTO, B. C., YAMASHIRO, E. T. et al. Bothrops protease A, a unique highly glycosylated serine proteinase, is a potent, specific fibrinogenolytic agent. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 6, n. 8, p. 1363-1372, 2008.
- LIGABUE-BRAUN, R., VERLI, H., CARLINI, C. R. Venomous mammals: a review. **Toxicon**, v. 59, n. 7-8, p. 680-695, 2012.
- LIU, S., SUN, M. Z., SUN, C., et al. A novel serine protease from the snake venom of Agkistrodon blomhoffii ussuriensis. **Toxicon**, v. 52, n. 7, p. 760-768, 2008.
- KARDONG, K. V. Colubrid snakes and Duvernoy's "venom" glands. **Journal of Toxicology: Toxin Reviews**, v. 21, n. 1-2, p. 1-19, 2002.
- KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT: iterative refinement and additional methods. **Multiple sequence alignment methods**, p. 131-146, 2014.
- KHAN, S. U., AL-SALEH, S. S. Biochemical characterization of a factor X activator protein purified from Walterinnesia aegyptia venom. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, v. 26, n. 7, p. 772-777, 2015.
- KINI, R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **Biochemical Journal**, v. 397, n. 3, p. 377-387, 2006.
- KITANO, E. S., GARCIA, T. C., MENEZES, M. C. et al. Cotiarinase is a novel prothrombin activator from the venom of Bothrops cotiara. **Biochimie**, v. 95, n. 8, p. 1655-1659, 2013.
- KJAERGARD, H. K., TRUMBULL, H. R. Vivostat system autologous fibrin sealant: preliminary study in elective coronary bypass grafting. **The Annals of thoracic surgery**, v. 66, n. 2, p. 482-486, 1998.
- KLOSE, D. P.; WALLACE, B. A.; JANES, R. W. 2Struc: the secondary structure server. **Bioinformatics**, v. 26, n. 20, p. 2624-2625, 2010.
- KOLUDAROV, I., SUNAGAR, K., UNDHEIM, E. A. B. et al. Structural and molecular diversification of the Anguimorpha lizard mandibular venom gland system in the arboreal species Abronia graminea. **Journal of molecular evolution**, v. 75, p. 168-183, 2012.
- KOUMANDOU, V. L., SCORILAS, A. Evolution of the plasma and tissue kallikreins, and their alternative splicing isoforms. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e68074, 2013.
- KUMAR, S., STECHER, G., LI, M. et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547, 2018.

- LAN, D., SONG, S., LIU, Y. et al. Use of batroxobin in central and peripheral ischemic vascular diseases: A systematic review. **Frontiers in Neurology**, v. 12, p. 716778, 2021.
- LARKIN, M. A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N. P. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.
- LEE, J-W., SEU, J. H., RHEE, I. K. et al. Purification and characterization of brevinase, a heterogeneous two-chain fibrinolytic enzyme from the venom of Korean snake, *Agkistrodon blomhoffii brevicaudus*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 260, n. 3, p. 665-670, 1999.
- LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. **Nucleic acids research**, v. 49, n. W1, p. W293-W296, 2021.
- LI, Z., NATARAJAN, P., YE, Y., et al. POSA: a user-driven, interactive multiple protein structure alignment server. **Nucleic acids research**, v. 42, n. W1, p. W240-W245, 2014.
- LIU, S., SUN, M.Z.; SUN, C. et al. A novel serine protease from the snake venom of *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*. **Toxicon**, v. 52, n. 7, p. 760-768, 2008.
- MACKESSY, S. P. Thrombin-like enzymes in snake venoms. **Toxins and hemostasis: from bench to bedside**, p. 519-557, 2010.
- MAMEDE, C. C. N., DE SOUSA, B. B., DA CUNHA PEREIRA, D. F., et al. Comparative analysis of local effects caused by *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* snake venoms: enzymatic contributions and inflammatory modulations. **Toxicon**, v. 117, p. 37-45, 2016.
- MANN, K. G., BRUMMEL, K., BUTENAS, S. What is all that thrombin for?. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 1, n. 7, p. 1504-1514, 2003.
- MARLAR, R. A., KLEISS, A. J., GRIFFIN, J. H. Mechanism of action of human activated protein C, a thrombin-dependent anticoagulant enzyme. **Blood**, v. 59, n. 5, p. 1067-1072, 1982.
- MATSUI, T.; SAKURAI, Y.; FUJIMURA, Y. et al. Purification and amino acid sequence of halystase from snake venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*, a serine protease that cleaves specifically fibrinogen and kininogen. **European journal of biochemistry**, v. 252, n. 3, p. 569-575, 1998.
- MEGALE, A. A. A.; MAGNOLI, F.C.; KUNIYOSHI, A.K. et al. Kn-Ba: a novel serine protease isolated from *Bitis arietans* snake venom with fibrinogenolytic and kinin-releasing activities. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 24, p. 38, 2019.

- MENALDO, D. L., BERNARDES, C. P., SANTOS-FILHO, N. A. et al. Biochemical characterization and comparative analysis of two distinct serine proteases from Bothrops pirajai snake venom. **Biochimie**, v. 94, n. 12, p. 2545-2558, 2012.
- MERKL, R., STERNER, R. Ancestral protein reconstruction: techniques and applications. **Biological chemistry**, v. 397, n. 1, p. 1-21, 2016.
- MICSONAI, A.; MOUSSONG, E.; WIEN, F. et al. BeStSel: webserver for secondary structure and fold prediction for protein CD spectroscopy. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. W1, p. W90-W98, 2022.
- MIRDITA, M.; Schütze, K., Moriwaki, Y. et al. ColabFold: making protein folding accessible to all. **Nature methods**, v. 19, n. 6, p. 679-682, 2022.
- MONKOVIC, D. D.; TRACY, P. B. Activation of human factor V by factor Xa and thrombin. **Biochemistry**, v. 29, n. 5, p. 1118-1128, 1990.
- MONTGOMERY, J. M., GILLESPIE, D., SASTRAWAN, P., et al. Aerobic salivary bacteria in wild and captive Komodo dragons. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 38, n. 3, p. 545-551, 2002.
- MUKHERJEE, A. K., MACKESSY, S P. Biochemical and pharmacological properties of a new thrombin-like serine protease (Russelobin) from the venom of Russell's Viper (Daboia russelii russelii) and assessment of its therapeutic potential. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3476-3488, 2013.
- MURAKAMI, M. T., ARNI, R. K. Thrombomodulin-independent activation of protein C and specificity of hemostatically active snake venom serine proteinases: crystal structures of native and inhibited Agkistrodon contortrix contortrix protein C activator. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 47, p. 39309-39315, 2005.
- MURAKAMI, M. T.; ARNI, R. K. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of Protac®, a commercial protein C activator isolated from Agkistrodon contortrix contortrix venom. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1752, n. 2, p. 202-204, 2005.
- MUSIL, M. STOURAC J., BENDL, J. et al. FireProt: web server for automated design of thermostable proteins. **Nucleic acids research**, v. 45, n. W1, p. W393-W399, 2017.
- NACCA, C. R., SHAH, K. N., TRUNTZER, J. N. et al. Total knee arthroplasty in a patient with hypofibrinogenemia. **Arthroplasty Today**, v. 2, n. 4, p. 177-182, 2016.
- NAKAYAMA, D., AMMAR, Y. B., MIYATA, T. et al. Structural basis of coagulation factor V recognition for cleavage by RVV-V. **FEBS letters**, v. 585, n. 19, p. 3020-3025, 2011.

- NARAYANAN, S.; HAMASAKI, N. Current concepts of coagulation and fibrinolysis. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 33, p. 133-168, 1998.
- NICOLAES, G. A.F., DAHLBÄCK, B. Factor V and thrombotic disease: description of a janus-faced protein. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 22, n. 4, p. 530-538, 2002.
- NIU, W., CHEN, Z., GANDHI, P. S. et al. Crystallographic and Kinetic Evidence of Allostery in a Trypsin-like Protease. **Biochemistry**, v. 50, n. 29, p. 6301–6307, 2011.
- OYAMA, E., TAKAHASHI, H. Purification and characterization of a thrombin like enzyme, elegaxobin II, with lys-bradykinin releasing activity from the venom of *Trimeresurus elegans* (Sakishima-Habu). **Toxicon**, v. 41, n. 5, p. 559-568, 2003.
- PALCI, A., LEE, M.S.Y., CROWE-RIDDELL, J.M., et al. Shape and Size Variation in Elapid Snake Fangs and the Effects of Phylogeny and Diet. **Evolutionary Biology**, v. 50, n. 4, p. 476-487, 2023.
- PARK, D., KIM, H., CHUNG, K. et al. Expression and characterization of a novel plasminogen activator from *Agkistrodon halys* venom. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1807-1819, 1998.
- PARRY, M. A.; JACOB, U.; HUBER, R. et al. The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases. **Structure**, v. 6, n. 9, p. 1195-1206, 1998.
- PFEIFFER, G. LINDER, D., STRUBE, K. et al. Glycosylation of the thrombin-like serine protease ancrod from *Agkistrodon rhodostoma* venom. Oligosaccharide substitution pattern at each N-glycosylation site. **Glycoconjugate journal**, v. 10, p. 240-246, 1993.
- POTTER, S. C., LUCIANI, A., EDDY, S. R. et al. HMMER web server: 2018 update. **Nucleic acids research**, v. 46, n. W1, p. W200-W204, 2018.
- RAWLINGS, N. D., WALLER, M., BARRETT A. J. et al. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic acids research**, v. 42, n. D1, p. D503-D509, 2014.
- REYES-VELASCO, J., CARD, D.C., ANDREW, A. et al. Expression of venom gene homologs in diverse python tissues suggests a new model for the evolution of snake venom. **Molecular biology and evolution**, v. 32, n. 1, p. 173-183, 2015.
- REZAIE, A. R. Regulation of the protein C anticoagulant and antiinflammatory pathways. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 19, p. 2059-2069, 2010.

- RISSE, V. A., GAVIRA, J. A., MEJIA-CARMONA, D. F. et al. Hyperstability and substrate promiscuity in laboratory resurrections of Precambrian β -lactamases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 8, p. 2899-2902, 2013.
- ROBERT, F., CHAUSSIDON, M. A palaeotemperature curve for the Precambrian oceans based on silicon isotopes in cherts. **Nature**, v. 443, n. 7114, p. 969-972, 2006.
- ROTHMAN, S. S. The digestive enzymes of the pancreas: a mixture of inconstant proportions. **Annual Review of Physiology**, v. 39, n. 1, p. 373-389, 1977.
- ROSING, J., GOVERS-RIEMSLAG, J. W., YUKELSON, L. et al. Factor V activation and inactivation by venom proteases. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v. 31, n. 3-6, p. 241-246, 2002.
- SCHALLER, A. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. **Planta**, v. 220, p. 183-197, 2004.
- SERRANO, S. M. T. The long road of research on snake venom serine proteinases. **Toxicon**, v. 62, p. 19-26, 2013.
- SERRANO, S. M.T., HAGIWARA, Y., MURAYAMA, N. et al. Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ) from the venom of Bothrops jararaca, and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. **European Journal of Biochemistry**, v. 251, n. 3, p. 845-853, 1998.
- SERRANO, S. M.T., MENTELE, R., SAMPAIO, C. A. et al. Purification, characterization, and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet-aggregating activity from the venom of Bothrops jararaca. **Biochemistry**, v. 34, n. 21, p. 7186-7193, 1995.
- SERRANO, S. M.T., MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1115-1132, 2005.
- SIEVERS, F.; HIGGINS, D. G. Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. **Multiple sequence alignment methods**, p. 105-116, 2014.
- SILVA-JUNIOR, F., GUEDES, H. L., GARVEY L. C. P. et al. BJ-48, a novel thrombin-like enzyme from the Bothrops jararacussu venom with high selectivity for Arg over Lys in P1: role of N-glycosylation in thermostability and active site accessibility. **Toxicon**, v. 50, n. 1, p. 18-31, 2007.
- SOARES, S. G., OLIVEIRA, L. L. Venom-sweet-venom: N-linked glycosylation in snake venom toxins. **Protein and peptide letters**, v. 16, n. 8, p. 913-919, 2009.

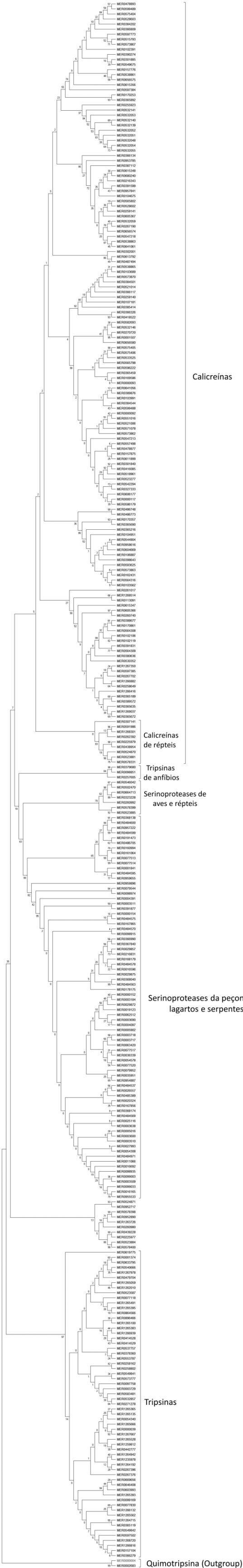
- STEENTOFT, C.; Vakhrushev, S. Y., Joshi, H. J. et al. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. **The EMBO journal**, v. 32, n. 10, p. 1478-1488, 2013.
- STOCKER, K., BARLOW, G. H. The coagulant enzyme from Bothrops atrox venom (batroxobin). **Methods in enzymology**. p. 214-223, 1976.
- TANS, G.; ROSING, J. Snake venom activators of factor X: an overview. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v. 31, n. 3-6, p. 225-233, 2002.
- THOMAS, M. R.; STOREY, R. F. The role of platelets in inflammation. **Thrombosis and haemostasis**, v. 114, n. 09, p. 449-458, 2015.
- TORRES-HUACO, F. D., WERNECK, C. C., VICENTE, C. P. et al. Rapid purification and procoagulant and platelet aggregating activities of Rhombeobin: a thrombin-like/gyroxin-like enzyme from Lachesis muta rhombeata snake venom. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.
- ULLAH, A., MASOOD, R., ALI, I., et al. Thrombin-like enzymes from snake venom: Structural characterization and mechanism of action. **International journal of biological macromolecules**, v. 114, p. 788-811, 2018.
- ULLAH, A.; SOUZA T.A.C.B.; ZANPHORLIN, L.M. et al. Crystal structure of Jararacussin-I: The highly negatively charged catalytic interface contributes to macromolecular selectivity in snake venom thrombin-like enzymes. **Protein Science**, v. 22, n. 1, p. 128-132, 2013.
- UTASINCHAROEN, P., MACKESSY, S. P., MILLER R. A. et al. Complete primary structure and biochemical properties of gilatoxin, a serine protease with kallikrein-like and angiotensin-degrading activities. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 29, p. 21975-21983, 1993.
- VANDERMARLIERE, E., MUELLER, M., MARTENS, L. Getting Intimate With Trypsin, the Leading Protease in Proteomics. **Mass Spectrometry Review**, v. 32, n. 6, p. 453–465, 2013.
- VASSALLI, J-D., SAPPINO, A. P., BELIN, D. et al. The plasminogen activator/plasmin system. **The Journal of clinical investigation**, v. 88, n. 4, p. 1067-1072, 1991.
- VAIYAPURI, S., THIYAGARAJAN, N., HUTCHINSON, E. G. et al. Sequence and phylogenetic analysis of viper venom serine proteases. **Bioinformatics**, v. 8, n. 16, p. 763, 2012.
- VIALLE, R. A., TAMURI, A. U., GOLDMAN, N. Alignment modulates ancestral sequence reconstruction accuracy. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 7, p. 1783-1797, 2018.

- VILCA-QUISPE, A., PONCE-SOTO, L. A., WINCK, F. V., et al. Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*. **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 745-753, 2010.
- WALKER, F. J.; OWEN, W. G.; ESMON, C. T. Characterization of the prothrombin activator from the venom of *Oxyuranus scutellatus scutellatus* (taipan venom). **Biochemistry**, v. 19, n. 5, p. 1020-1023, 1980.
- WANG, S.; XU, X.; GAO, S. et al. Purification and partial characterization of a novel fibrinogenase from the venom of *Deinagkistrodon acutus*: inhibition of platelet aggregation. **Protein Expression and Purification**, v. 99, p. 99-105, 2014.
- WANG, Y-M., WANG, S-R., TSAI, I-H. Serine protease isoforms of *Deinagkistrodon acutus* venom: cloning, sequencing and phylogenetic analysis. **Biochemical Journal**, v. 354, n. 1, p. 161-168, 2001.
- WHELIHAN, M. F., ZACHARY, V., ORFEO, T. et al. Prothrombin activation in blood coagulation: the erythrocyte contribution to thrombin generation. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 120, n. 18, p. 3837-3845, 2012.
- XIE, B., DASHEVSKY, D., ROKYTA, D., et al. Dynamic genetic differentiation drives the widespread structural and functional convergent evolution of snake venom proteinaceous toxins. **BMC biology**, v. 20, n. 1, p. 1-31, 2022.
- YANG, D., PENG, M., YANG, H. et al. Expression, purification and characterization of *Gloydius shedaoensis* venom glosedobin as Hsp70 fusion protein in *Pichia pastoris*. **Protein expression and purification**, v. 66, n. 2, p. 138-142, 2009.
- ZENG, F., SHEN, B., ZHU, Z. et al. Crystal structure and activating effect on RyRs of AhV_TL-I, a glycosylated thrombin-like enzyme from *Agkistrodon halys* snake venom. **Archives of toxicology**, v. 87, p. 535-545, 2013.
- ZHANG, J.; MENG, W.; WANG, C. et al. Expression, purification and characterization of recombinant plasminogen activator from *Gloydius brevicaudus* venom in *Escherichia coli*. **Protein expression and purification**, v. 91, n. 1, p. 85-90, 2013.
- ZHANG, Y., LEE, W. H., XIONG, Y. L. et al. Characterization of OhS1, an arginine/lysine amidase from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). **Toxicon**, v. 32, n. 5, p. 615-623, 1994.

ZHANG, Y., WISNER A., XIONG, Y. et al. A novel plasminogen activator from snake venom: Purification, characterization, and molecular cloning (*). **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 17, p. 10246-10255, 1995.

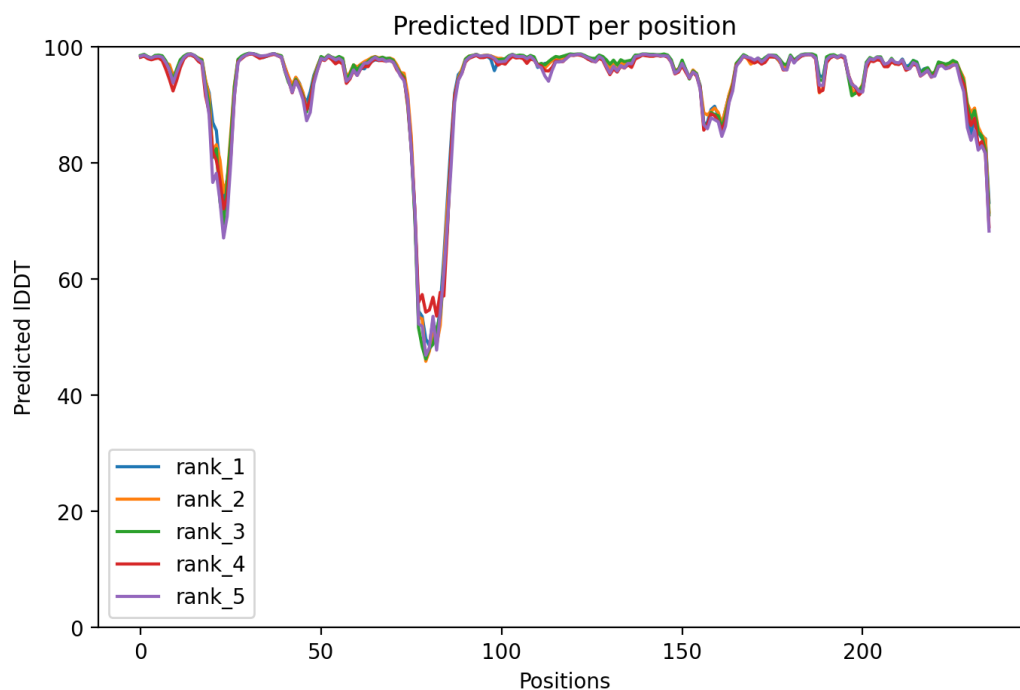
ZHU, Z., LIANG Z., ZHANG, T. et al. Crystal structures and amidolytic activities of two glycosylated snake venom serine proteinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 11, p. 10524-10529, 2005.

ANEXO I – Árvore filogenética das serinoproteases do tipo tripsina



ANEXO II– Resultado das predições para a sequência da SVSP ancestral

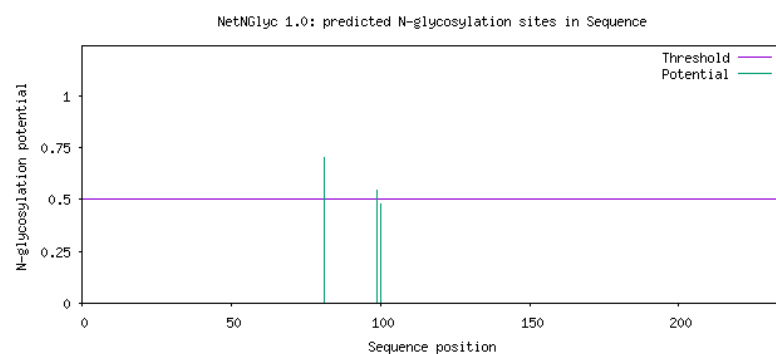
Gráfico PLDTT da estrutura da SVSP ancestral modelada pelo AlphaFold 2. A estrutura exibida nesse trabalho é a rank 1.



Resultado da predição de N-glicosilações da SVSP ancestral. Uso do programa NetNGlyc 1.0.

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
Sequence	81 NYTK	0.7031	(9/9)	++
Sequence	99 NNST	0.5420	(5/9)	+
Sequence	100 NSTH	0.4774	(5/9)	-



Resultado da predição de O-glicosilações da SVSP ancestral. Uso do programa NetOGlyc 4.0.

```
##gff-version 2
##source-version NetOGlyc 4.0.0.13
##date 23-12-30
##Type Protein
#seqname      source  feature start  end    score  strand  frame  comment
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  21     21     0.0345965  .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  23     23     0.00614389  .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  24     24     0.00314948  .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  31     31     0.0046981   .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  40     40     0.00291411  .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  67     67     0.0432695   .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  78     78     0.00991409  .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  79     79     0.0206258   .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  83     83     0.0126767   .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  101    101    0.332316    .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  102    102    0.119245    .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  108    108    0.151917    .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  111    111    0.33195     .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  112    112    0.302455    .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  115    115    0.12609     .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  118    118    0.0332624   .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  127    127    0.188202    .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  129    129    0.0992813   .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  130    130    0.160991    .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  134    134    0.124988    .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  162    162    0.275421    .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  163    163    0.276922    .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  165    165    0.103698    .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  177    177    0.0333256   .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  182    182    0.0196678   .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  197    197    0.0468555   .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  213    213    0.064582    .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  219    219    0.0485831   .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  224    224    0.117549    .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  230    230    0.145333    .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  233    233    0.102675    .      .
```

Resultado da predição de pontes de dissulfeto da SVSP ancestral. Uso do programa Dipro.

```
Amino Acids:
IIGGDECNINEHRLVLLYNSRSSGFLCGGTLINQEWLTAAHCDRKNMQIKLGVHNKNVPNEDEQTRVPKEKFFCLSSKNYTKWKDKIMLIRLNRPVNNSTHIAPLSLPSSPPSVGSVC
RIMGWGTITSPKETYPDVPHCANINILDYEVCRAYGPLPATSRITLCAGILEGGKDTCKGDSGGPLICNGQFQIGIVSWGHPCAQPREPGLYTKVFDYTDWIQSIAGNTDASCPP

Predicted Disulfide Bonds:
Classification Results using Support Vector Machine:
Classification: The sequence DOES NOT HAVE disulfide bonds.
Note: If classification results are incorrect, you can still use the following prediction for the locations of disulfide bonds

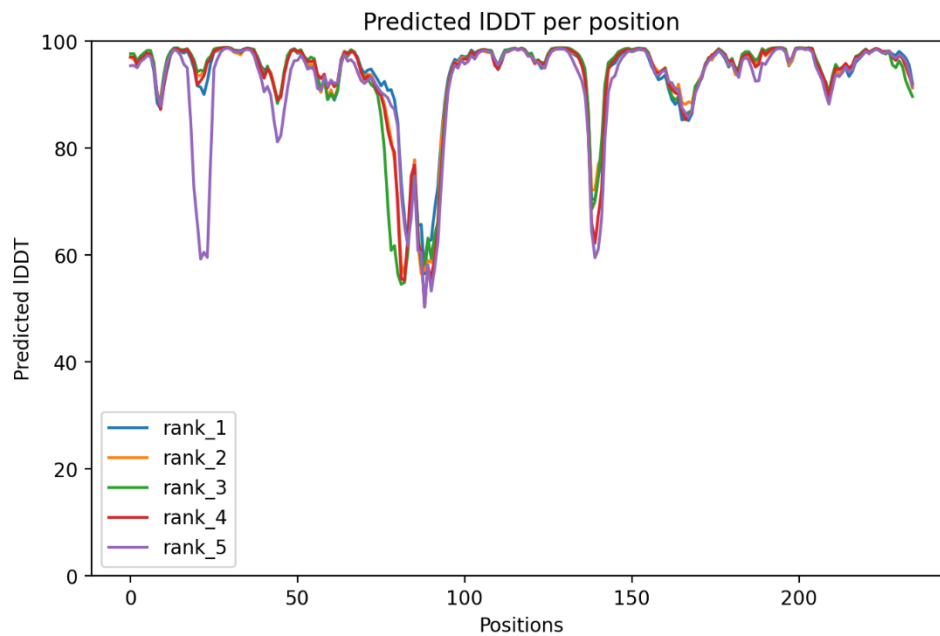
Total number of cysteines: 12
Predicted number of bonds: 5

Cysteines at the following positions are predicted to form the disulfide bond:
28,44,120,141,152,167,178,188,203,234

Predicted disulfide bonds(cysteine pairs) ordered by probability in descending order:
Bond_Index      Cys1_Position  Cys2_Position
1                178            203
2                152            167
3                28             44
4                120            141
5                188            234
```

ANEXO III - Resultado das predições para a sequência Vk_tox1

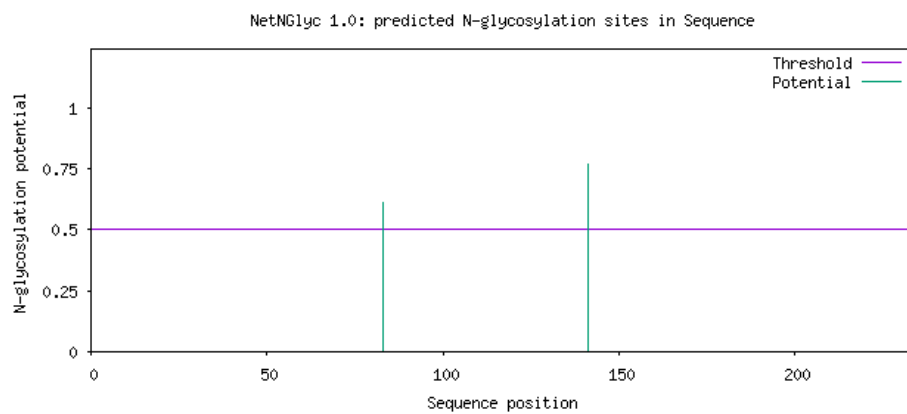
Gráfico PLDDT da estrutura da Vk_tox1 modelada pelo AlphaFold 2. A estrutura exibida nesse trabalho é a rank 1.



Resultado da predição de N-glicosilações da Vk_tox1. Uso do programa NetNGlyc 1.0.

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
Sequence	83 NSTC	0.6086	(7/9)	+
Sequence	141 NGSY	0.7679	(9/9)	+++



Resultado da predição de O-glicosilações da Vk_tox1. Uso do programa NetOGlyc 4.0.

```
##gff-version 2
##source-version NetOGlyc 4.0.0.13
##date 23-12-31
##Type Protein
#seqname      source  feature start    end    score   strand  frame  comment
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 20      20      0.0159454 .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 32      32      0.0035038 .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 38      38      1.15435e-05 .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 45      45      0.00752638 .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 71      71      0.055083 .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 72      72      0.131112 .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 81      81      0.179121 .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 82      82      0.194316 .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 84      84      0.178878 .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 85      85      0.0994178 .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 95      95      0.0365973 .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 104     104     0.0425805 .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 105     105     0.0971679 .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 108     108     0.0528248 .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 115     115     0.260866 .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 127     127     0.0408649 .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 130     130     0.111826 .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 137     137     0.12008 .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 140     140     0.157243 .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 143     143     0.0604741 .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 152     152     0.144219 .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 155     155     0.0875589 .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 159     159     0.102494 .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 171     171     0.0207406 .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 186     186     0.0211237 .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 191     191     0.0455153 .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 206     206     0.0187499 .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 222     222     0.0465958 .      .
```

Resultado da predição de pontes dissulfeto da Vk_tox1. Uso do programa Dipro.

```
Amino Acids:
VVGGECEKDGHRWLGLLQTEEGPYCGVALISQNNVLSAAHCYESMKLQVRLGVHHRGKPIADEQLRDVDSFCYPDAPDPTTNTCPYLGFDIAISNDIMLMKLSPPVTYNEHIASIALPD
HDAPMGTECTIMGWLTGATNGSPYKVPPLCASVNTFHNSVCDVVPWDLTDNQLCAGVLLGGIDTCKGDSGGPLVCGGRIQGVVSFGDDPCGQLLKPGVYTNVYKYVHWIHYRI

Predicted Disulfide Bonds:
Classification Results using Support Vector Machine:
Classification: The sequence DOES HAVE disulfide bonds.
Note: If classification results are incorrect, you can still use the following prediction for the locations of disulfide bonds

Total number of cysteines: 12
Predicted number of bonds: 5

Cysteines at the following positions are predicted to form the disulfide bond:
26,42,74,86,129,150,161,176,187,212

Predicted disulfide bonds(cysteine pairs) ordered by probability in descending order:
Bond_Index      Cys1_Position    Cys2_Position
1                187              212
2                26              42
3                161             176
4                74              86
5                129             150
```


Review

Exploring the Diversity and Function of Serine Proteases in Toxicofera Reptile Venoms: A Comprehensive Overview

Julia F. D. Vidal, Matheus F. Schwartz, Aisel V. Garay, Napoleão F. Valadares , Renata V. Bueno , Ana Carolina L. Monteiro, Sônia Maria de Freitas  and João Alexandre R. G. Barbosa *

Laboratory of Molecular Biophysics, Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, Darcy Ribeiro Campus, University of Brasília, Asa Norte, Brasília 70910-900, DF, Brazil

* Correspondence: joaobarbosa@unb.br

Abstract: Toxicofera reptile venoms are composed of several toxins, including serine proteases. These proteases are glycosylated enzymes that affect the prey's hemostatic system. Their actions extend across the coagulation cascade, the kallikrein–kinin system, and platelet activation. Despite their specificity for different substrates, these enzymes are homologous across all toxicoferans and display high sequence similarity. The aim of this review is to compile decades of knowledge about venom serine proteases, showing the diversity of biochemically and biophysically characterized enzymes, their structural characteristics, advances in understanding their origin and evolution, as well as methods of obtaining enzymes and their biotechnological applications.

Keywords: Toxicofera venom evolution; snake venom serine protease; venom toxin; hemostasis-affecting toxins; coagulation cascade; kallikrein–kinin system; platelet activation

Key Contribution: This review summarizes the knowledge produced by decades of research on serine proteases from reptile venom.



Citation: Vidal, J.F.D.; Schwartz, M.F.; Garay, A.V.; Valadares, N.F.; Bueno, R.V.; Monteiro, A.C.L.; Freitas, S.M.d.; Barbosa, J.A.R.G. Exploring the Diversity and Function of Serine Proteases in Toxicofera Reptile Venoms: A Comprehensive Overview. *Toxins* **2024**, *16*, 428. <https://doi.org/10.3390/toxins16100428>

Received: 27 May 2024

Revised: 5 July 2024

Accepted: 8 July 2024

Published: 3 October 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Reptile venoms contain proteins and peptides that immobilize and kill prey [1]. The venom-producing glands in snakes and lizards are homologous organs. Several of the secreted proteins have a common origin and their recruitment would have occurred at the emergence of the squamate clade Toxicofera (Figure 1). This clade includes Serpentes, Iguania, and Anguimorpha groups, the latter composed of the lizard families Anguidae, Helodermatidae, and Varanidae [2,3]. While the presence of venom was initially only attributed to the suborder Serpentes and the anguimorph family Helodermatidae, its detection in other groups has only come to light in recent decades [3,4]. Serine proteases are among the proteins secreted in these venoms, and the majority of those that exist today evolved from a kallikrein-like serine protease that emerged with the clade. They are one of the best-characterized proteins in snake venom and act on prey by destabilizing their hemostatic system [3,5].

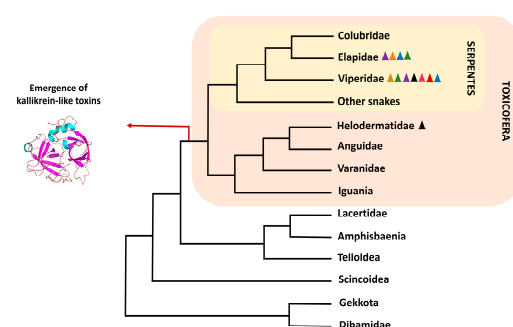


Figure 1. Phylogenetic tree of Squamata reptiles showing the emergence of kallikrein-like serine proteases on the Toxicofera ancestry. Tree based on Simões & Pyron, 2021 [6]. The colors of the

triangles correspond to the experimentally detected activities in venom serine proteases found in these groups. black: kallikrein-like; blue: thrombin-like; red: platelet aggregation; yellow: plasminogen activator; purple: factor X activator; green: factor V activator; pink: protein C activator; orange: prothrombin activator (the only activity that does not arise from kallikrein-like enzymes).

Serine proteases are enzymes that use an activated serine in the active site to carry out nucleophilic attack on the substrate [7]. Those found in reptile venom are classified as chymotrypsin-like, as they belong to the PA clan and the S1 family, and contain the conserved catalytic triad His57, Asp102, and Ser195 [8]. However, based on substrate specificity, they are also classified as trypsin-like as they cleave peptide bonds after Lys or Arg residues [5]. While studies on lizards remain relatively insufficient, with only a limited number of helodermatid enzymes characterized to date [9,10], their counterparts found in snake venom have been subject to extensive research over several decades and are commonly referred to as snake venom serine proteases (SVSPs) [5]. They are found in the Viperidae, Elapidae, and Colubridae snake families, with Viperidae showing the most extensive diversification of these enzymes [11,12].

Venom serine proteases are glycoproteins that recognize several macromolecular substrates, acting at various stages on the prey's coagulation cascade, affecting its hemostasis. Its most described activity is thrombin-like, consisting of a pro-coagulant enzyme that acts in the conversion of fibrinogen into fibrin through the cleavage of its α and β chains [13]. They also present other activities, such as kallikrein-like (the only activity found for serine proteases characterized in lizards) [9,10,14], platelet aggregation [15], and activators of the following substrates: plasminogen [16], factor X [17], factor V [18], prothrombin [19], and protein C [20]. Many enzymes can act on more than one of these substrates [21], and their actions can be pro- or anti-coagulant, depending on the recognized target. The broad spectrum of substrates makes them enzymes with high biotechnological potential.

In this review, data from the literature were compiled to describe various aspects related to serine proteases from lizard (when available) and snake venom, such as biological activities and structural characteristics, emergence and evolution, native and heterologous production, and biotechnological and therapeutic applications. Herein, the approach toward venom serine proteases is different from what is commonly observed, considering their presence in toxicoforans lizards, and not just in snakes.

2. Biological Activities

In vertebrate prey, venom serine proteases (VSPs) affect several key points of the homeostatic system by selectively promoting the proteolysis of several components involved in the blood coagulation cascade, kallikrein-kinin system, and fibrinolytic system. These proteolytic events lead to the activation or inactivation of such components, frequently called factors, disrupting the hemostatic system [5,22]. Although kallikrein-like VSPs exhibit significant sequence similarity, as shown in Figure 2, their specificity toward macromolecular substrates varies and is strongly influenced by the peptide moiety located near the cleavage site. Owing to the high structural similarity, those VSPs are classified by their ability to hydrolyze, activate, or deactivate macromolecular targets.

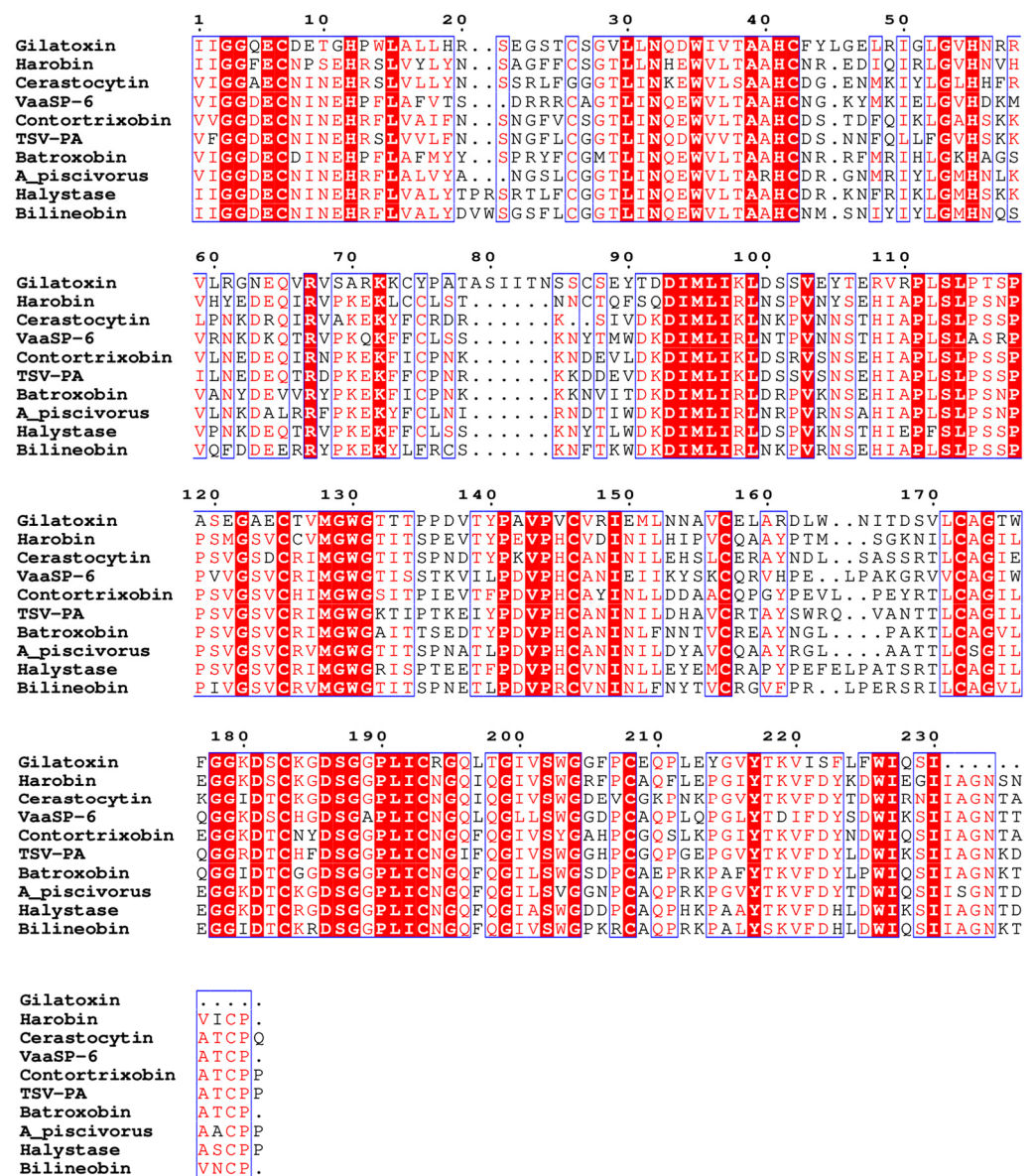


Figure 2. Protein sequence alignment of kallikrein-like VSPs with different substrate specificities showing the conservation among them. Gilatoxin is the only sequence from lizards. All others are snake enzymes. Gilatoxin (UniProt ID: P43685) has kallikrein-like activity; Harobin (UniProt ID: Q5MCS0) has kallikrein-like activity; Cerastocytin (UniProt ID: Q75YF1) is a platelet activator; VaaSP-6 (GenBank ID: QBF53412.1) is a factor V activator; Contortrixobin (UniProt ID: P82981) is a factor V activator; TSV-PA (UniProt ID: Q91516) is plasminogen activator; Batroxobin (UniProt ID: P04971) cleaves fibrinogen α -chain; A_piscivorus (UniProt ID: E5L0E6) is a protein C activator (the name of the original species, *Agkistrodon piscivorus*, was used since the protein does not have a name); Halystase (UniProt ID: P81176) cleaves fibrinogen β -chain; and Bilineobin (UniProt ID: Q9PSN3) cleaves fibrinogen α and β -chains. Prothrombin activators were not added to the alignment because they are not homologous to kallikrein-like VSPs. The alignment was calculated with the program Clustal Omega [23] and the alignment image was produced using ESPrnt 3.0 [24]. The blue boxes indicate conserved regions across the sequences.

2.1. Factor X Activators

Activated factor X (FXa) plays a central role in the coagulation cascade. The activation of factor X (FX) occurs mainly through the assembly and action of the intrinsic tenase complex formed by activated factor IX (FIXa), activated factor VIII (FVIIIa), and Ca^{2+} ion,

or of the extrinsic tenase complex formed by activated factor VII (FVIIa), factor III (FIII), and Ca^{2+} ions (Figure 3). In these complexes, a specific peptide bond (Arg194-Ile195) in the heavy chain of FX is cleaved, resulting in the active form with the active site exposed, sometimes called factor Xa. A second cleavage at the Lys435-Ser436 bond can also occur, resulting in factor Xa β . FXa participates in the activation of factor V (FV) following the formation of the prothrombinase complex (FVa-FXa- Ca^{2+}) and, finally, leading to the conversion of prothrombin into thrombin [25–27].

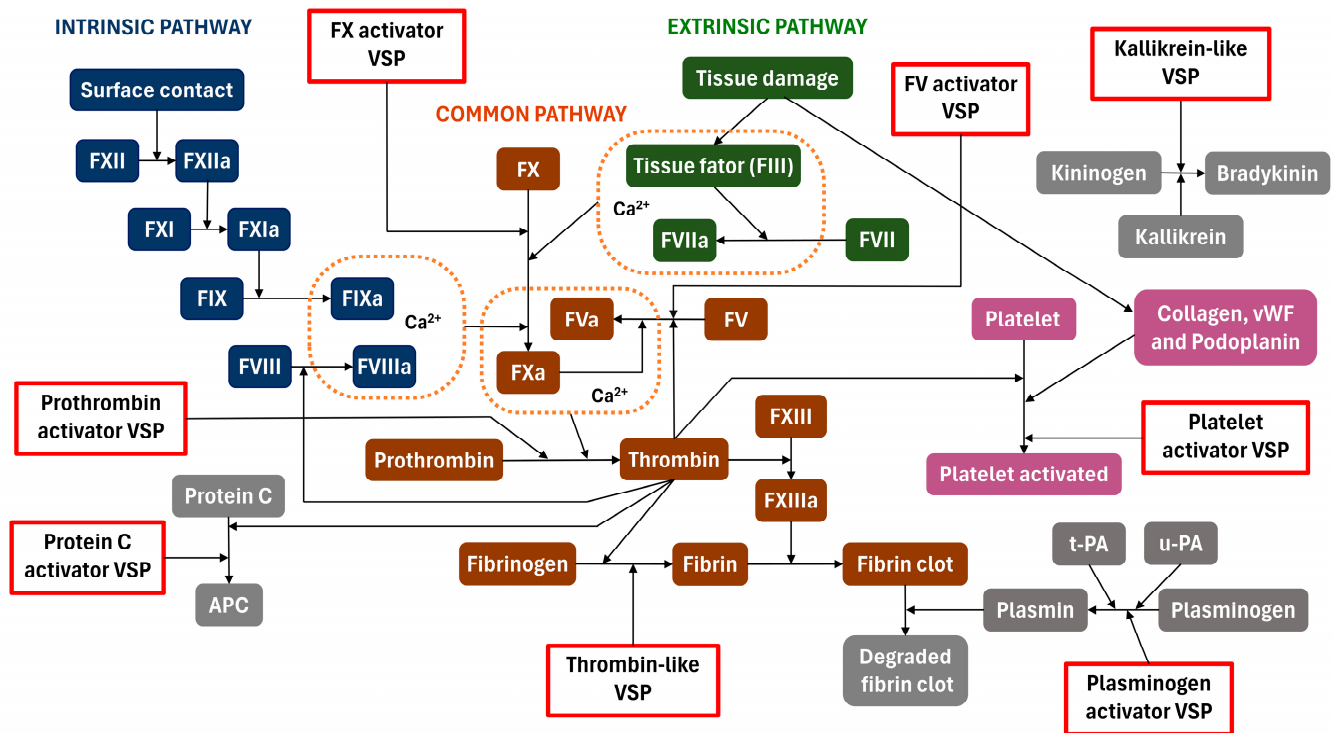


Figure 3. Scheme of the homeostatic system including blood coagulation, fibrinogen–fibrin clot formation, kininogen–bradykinin pathways, and platelet aggregation. Red rectangles represent venom serine proteases (VSPs) that act on the specific conversion process indicated by the arrow departing the rectangles. The complexes formed by FVa-FXa- Ca^{2+} (prothrombinase complex), FIII-FVIIa- Ca^{2+} (extrinsic tenase complex), and FVIIIa-FIXa- Ca^{2+} (intrinsic tenase complex) are shown surrounded by an orange dotted line.

Factor X activators from snake venom can be categorized as metalloproteases or serine proteases. SVSPs that activate FX act similarly to tenase complexes by cleaving the Arg194–Ile195 peptide bond. As in tenase complexes, with rare exceptions, FX activation by SVSPs depends significantly on the presence of Ca^{2+} [28]. SVSPs' FX activators have been described in the venom of snakes belonging to the Viperidae and Elapidae families (Table 1). An FX activator with a low molecular mass of 12.5 kDa was isolated from the venom of the viper *Cerastes vipera*, unlike most FX activators with much higher molecular mass (62–70 kDa) identified so far [29]. Similarly to previously purified serine protease FX activators, its activity was potentiated by the addition of FIII and Ca^{2+} and was inhibited by PMSF and leupeptin. Another viper SVSP with lower molecular mass was isolated from the snake *Vipera ammodytes ammodytes* with FV- and FX-activating capabilities (VaaSP-VX) [30]. The incubation of human FX with VaaSP-VX resulted in the activation of FX by two cleavage events. First, FX was fragmented into light and heavy chains, which were subsequently cleaved at the Arg194–Ile195 bond. The observed FX activation was very similar to physiological activators of FX, such as tenase complexes.

Table 1. Toxicoferans venom serine proteases isolated and characterized. The enzyme names are shown when a specific name has been given, while n.a. (not available) is used when there is no specific name given and its activity associated with the species is used, e.g., “Factor X activator from *Cerastes vipera*”. For SVSPs with unreported cleavage sites, n.a. is used. The cleavage sites indicated in parentheses refer to known reported sites of SVSPs indicated to have a similar manner of cleavage.

Activity	Specific Enzyme Name	Species	Mass (kDa)	Cleavage Site	Uniprot	Reference
Factor X activator	n.a.	<i>Walterinnesia aegyptia</i>	60	(Arg194-Ile195)	n.a.	2015, [17]
	n.a.	<i>Bungarus fasciatus</i>	70	(Arg194-Ile195)	n.a.	1995, [31]
	n.a.	<i>Cerastes vipera</i>	12.5	n.a.	n.a.	1993, [29]
	n.a.	<i>Ophiophagus hannah</i>	64.5	n.a.	n.a.	1995, [32]
	VaaSP-VX	<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	34	Arg194-Ile195	n.a.	2020, [30]
Factor V activator	Contortrioxobin	<i>Agkistrodon contortrix</i>	26	n.a.	P82981	2000, [33]
	n.a.	<i>Naja oxiana</i>	48	n.a.	n.a.	1992, [34]
	RV-FVP α	<i>Daboia russelii</i>	38	n.a.	n.a.	2014, [18]
	RVV-V	<i>Daboia russelii</i>	28	Arg1545-Ser1546	P86530	1988, [35–37]
	UVV-V	<i>Vipera ursini</i>	34	n.a.	n.a.	2002, [38]
	VaaSP-VX	<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	34	Arg348, Arg1753 (bovine FV)	n.a.	2020, [30]
	VLFVA (LVV-V)	<i>Macrovipera lebetina</i>	28.4	n.a.	n.a.	1998, [39]
Prothrombin activators	Hopsarin D	<i>Hoplocephalus stephensi</i>	46.1	Arg274-Thr275, Arg323-Ile324	P83370	2003, [40]
	Notanarin D	<i>Notechis ater</i>	46	n.a.	P0CY52	2003, [40]
	Notecarin D	<i>Notechis scutatus</i>	54	n.a.	P82807	2003, [40]
	Oscutarin C	<i>Oxyuranus scutellatus</i>	300	Arg274-Thr275, Arg323-Ile324	Q58L96	1986, [41]
	PLIPA	<i>Pseudonaja textilis</i>	nr	(Arg363-Ile364)	n.a.	1994, [42]
	Pseutarin C	<i>Pseudonaja textilis</i>	nr	Arg273-Thr274, Arg322-Ile323 (bovine prothrombin)	Q56VR3	2002, [43]
	Textarin D	<i>Pseudonaja textilis</i>	50–53	(Arg363-Ile364)	n.a.	1994, [42]
	Trocarin D	<i>Tropidechis carinatus</i>	46.5	Arg274-Thr275, Arg323-Ile324	P81428	1999, [44]
Thrombin-like α -chain fibrinogenolytic	Acutobin (Acutin/Acuthrombin)	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	40	n.a.	Q9I8X2	1999, [45–47]
	Agacutase	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	31	n.a.	n.a.	2013, [48]
	Ancrod (Viprinex TM , Arvin TM , Arwin TM)	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	nr	Arg23-His24, Arg16-Gly17	P26324	1976, [49–51]
	Batroxobin (Defibrase [®])	<i>Bothrops atrox</i>	43	Arg16-Gly17	P04971	1976, [52,53]
	Bhalternin	<i>Bothrops alternatus</i>	31.5	n.a.	P0CG03	2010, [54]
	Rhombeobin	<i>Lachesis muta rhombeata</i>	47	n.a.	n.a.	2013, [55]
	Barnettobin (Bb-TLE)	<i>Bothrops barnetti</i>	52	n.a.	K4LLQ2	2013, [56]
	Bothrombin (Reptilase [®])	<i>Bothrops jararaca</i>	35	Arg16-Gly17	P81661	1994, [57]
	BpSP-I	<i>Bothrops pauloensis</i>	34	n.a.	P0DJF1	2009, [58]
	Calobin	<i>Gloydius ussuriensis</i>	34	n.a.	Q91053	1996, [59]
	CDC SI	<i>Crotalus durissus cumanensis</i>	28.5	n.a.	P0DKX2	2013, [60]
	CDC SII	<i>Crotalus durissus cumanensis</i>	28.8	n.a.	P0DKX3	2013, [60]
	Cerastotin	<i>Cerastes cerastes</i>	40	n.a.	P81038	1997, [61]
	Crotalase	<i>Crotalus adamanteus</i>	33	n.a.	F8S114	1971, [21,62]

Table 1. Cont.

Activity	Specific Enzyme Name	Species	Mass (kDa)	Cleavage Site	Uniprot	Reference
	Cerastocytin	<i>Cerastes cerastes</i>	38	n.a.	Q7SYF1	1995, [15]
	Moojase	<i>Bothrops moojeni</i>	30.3	n.a.	n.a.	2018, [63]
	Elegaxobin II	<i>Protobothrops elegans</i>	35	n.a.	P84787	2003, [64]
	Flavoxobin	<i>Protobothrops flavoviridis</i>	26.7	Arg16-Gly17	P05620	1988, [65]
	Gyroxin	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	28	n.a.	B0FXM1	1988, [66]
	Jerdonobin	<i>Protobothrops jerdonii</i>	38	(Arg16-Gly17)	P0DM43	2000, [67]
	Jerdonobin-II	<i>Protobothrops jerdonii</i>	32	(Arg16-Gly17)	n.a.	2005, [68]
	KN-BJ	<i>Bothrops jararaca</i>	38	n.a.	O13069	1998, [69]
	Leucurobin	<i>Bothrops leucurus</i>	35	(Arg16-Gly17)	P0DJ86	2007, [70]
	LM-TL	<i>Lachesis muta</i>	41–47	n.a.	P33589	1989, [71]
	Thrombocytin	<i>Bothrops atrox</i>	36	n.a.	n.a.	1979, [72,73]
	RP-34	<i>Cerastes cerastes</i>	97	n.a.	n.a.	1992, [74]
Thrombin-like β -chain fibrinogenolytic	Contortrixobin	<i>Agkistrodon contortrix</i>	26	n.a.	P86530	2000, [33]
	Halystase	<i>Gloydius blomhoffi</i>	38	Arg42 (fibrinogen B β chain)	P81176	1998, [75]
	Mucrosobin	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	28	n.a.	n.a.	2001, [76]
	BpirSP27	<i>Bothrops pirajai</i>	27.1	n.a.	P0DL26	2012, [77]
	BJ-48	<i>Bothrops jararacussu</i>	48	n.a.	P0DJF0	2007, [78,79]
	Brevinase	<i>Gloydius brevicaudus</i>	33.5	n.a.	Q9PT51	1999, [80]
	Pallabin	<i>Gloydius halys</i>	26	n.a.	Q9YGJ2	1999, [81]
Thrombin-like α/β -chain fibrinogenolytic	Afaâcytin (RP34)	<i>Cerastes cerastes</i>	40	n.a.	Q9PRM8	1995, [82]
	Agkihipin	<i>Gloydius halys</i>	25.46	n.a.	N0AAE6	2016, [83]
	Bilineobin	<i>Gloydius bilineatus</i>	57	Arg19-Gly20 (fibrinogen A α chain), Arg21-Gly22 (fibrinogen B β chain)	Q9PSN3	1993, [84,85]
	BmooSP	<i>Bothrops moojeni</i>	36	n.a.	n.a.	2016, [86]
	BpirSP-39	<i>Bothrops pirajai</i>	39.4	n.a.	n.a.	2014, [87]
	BpirSP41	<i>Bothrops pirajai</i>	40.6	n.a.	P0DL27	2012, [77]
	FC-Bj	<i>Bothrops jararacussu</i>	nr	n.a.	n.a.	1996, [88]
	Gabonase	<i>Bitis gabonica</i>	30.6	n.a.	P0C577	1986, [89]
	Russelobin	<i>Daboia russelii</i>	51.3	n.a.	n.a.	2013, [90]
	Cerastobin	<i>Cerastes vipera</i>	38	n.a.	P18692	1989, [91]
	Jararacussin-I	<i>Bothrops jararacussu</i>	28	n.a.	n.a.	2002, [92]
	VLCV	<i>Macrovipera lebetina</i>	45	n.a.	n.a.	2020, [93]
	VLCII	<i>Macrovipera lebetina</i>	60	n.a.	n.a.	2015, [94]
Protein C activator	n.a.	<i>Gloydius ussuriensis</i>	nr	n.a.	n.a.	1993, [95]
	n.a.	<i>Gloydius halys halys</i>	36	n.a.	n.a.	1993, [96]
	n.a.	<i>Agkistrodon contortrix</i>	20	n.a.	n.a.	1986, [97]
	n.a.	<i>Gloydius bilineatus</i>	38	n.a.	P33588	1990, [98]
Kallikrein-like	AHP-Ka	<i>Gloydius halys</i>	34	n.a.	P0DJG5	2012, [14]
	Harobin	<i>Hydrophis hardwickii</i>	25	n.a.	Q5MCS0	2007, [99]
	Kn-Ba	<i>Bitis arietans</i>	33	n.a.	n.a.	2018, [100]

Table 1. Cont.

Activity	Specific Enzyme Name	Species	Mass (kDa)	Cleavage Site	Uniprot	Reference
	LV-Ka	<i>Lachesis muta</i>	33	n.a.	n.a.	2003, [101]
	Rhinocerase	<i>Bitis rhinoceros</i>	36	n.a.	P86497	2010, [102]
	Tm-VIG	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	nr	n.a.	n.a.	2001, [103]
	Tm-IIG			n.a.	n.a.	
	Gilatoxin	<i>Heloderma horridum</i> and <i>Heloderma suspectum</i>	35–37.5	n.a.	P43685	1981, [104]
	Helodermatine	<i>Heloderma horridum</i>	63	n.a.	n.a.	1986, [9]
Plasminogen activator	TSV-PA	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	33	Arg561-Val562	Q91516	1995, [105]
	LV-PA	<i>Lachesis muta muta</i>	33	(Arg561-Val562)	Q27J47	2000, [106]
	Haly-PA	<i>Gloydius halys</i>	32	(Arg561-Val562)	Q9YGJ8	1998, [107]
Platelet activator	Crotalocytin	<i>Crotalus horridus</i>	64	n.a.	n.a.	1980, [108]
	Cerastocytin	<i>Cerastes cerastes</i>	38	n.a.	Q7SYF1	1995, [15]
	PA-BJ	<i>Bothrops jararaca</i>	30	n.a.	P81824	1995, [109]
	MSP 1	<i>Bothrops moojeni</i>	32.5–34	n.a.	n.a.	1993, [110]
	BJV-VIIIcp	<i>Bothrops jararacussu</i>	28	n.a.	n.a.	1989, [111]
	Thrombocytin	<i>Bothrops atrox</i>	36	n.a.	n.a.	1979, [72,73,112]
	Cerastotin	<i>Cerastes vipera</i>	38	n.a.	P81038	1989, [91]

A few FX activators were isolated from Elapid venoms. One was purified from the snake *Bungarus fasciatus* with ~70 kDa and a Ca^{2+} -dependent catalytic cleavage of the FX heavy chain. Its specific activity was observed to be 200 to 250-fold lower than that of RVV-X, a potent metalloprotease FX activator. The authors proposed that the low specific activity could be due to the activator isolated being a pro-enzyme subject to activation by proteases present in the blood. The activator was inhibited by DFP, PMSF, benzamidine, and soybean trypsin inhibitor [31]. Another FX activator was also isolated from *Ophiophagus hannah* venom, whose molecular structure consists of a single polypeptide chain of 64.5 kDa. It was similar to the FX activator isolated from *Bungarus fasciatus*, also a single-chain protein from Elapidae venom. Until then, previously isolated FX activators were composed of a heavy chain and light chains linked by disulfide bonds. The FX activator from *O. hannah* also required calcium ions to activate FX and was inhibited by PMSF, TPCK and soybean trypsin inhibitor [32].

2.2. Factor V Activators

Factor V (FV) is a large multidomain (A1, A2, B, A3, C1, and C2) glycoprotein precursor of FVa with a molecular mass of 330 kDa. FV activation is achieved by the proteolytic action of thrombin after residues Arg709, Arg1018, and Arg1545, releasing the full domain B (Ser710-Arg1545) and converting FV into its activated form, FVa. This activated form is structurally composed of the A1–A2 heavy chain (105 kDa) and the A3–C1–C2 light chain (74 kDa). The Arg709 and Arg1545 bonds can also be cleaved by FXa, although less efficiently [113]. FVa acts as a cofactor for FXa protease by forming the prothrombinase complex on the negatively charged phospholipid membrane of platelets in the presence of Ca^{2+} ions (Figure 3), increasing by five orders of magnitude the conversion of prothrombin to thrombin by FXa [114].

SVSPs with FV-activating activity working by a single cleavage event were found mainly in Viperidae venom. However, unlike the three-step activation by thrombin, SVSP FV activators do not lead to the full release of the B domain, or in some cases, generate an FVa with heavy and light chains of different molecular weights than FVa activated by thrombin [34]. This results in an activated FV with a lower cofactor activity in the prothrombinase complex [38]. Albeit less effective in their cofactor activity, SVSPs' FV

activators are considered a useful tool in the study of FV activation for diagnostic and therapeutic purposes [36].

RVV-V is a FV activator isolated from *Daboia russelii* venom and consists of 236 amino acids and 28 kDa. The RVV-V-mediated activation of FV occurs by a single cleavage at the Arg1545–Ser1546 bond and does not lead to the release of the B domain. FV activated by RVV-V can bind to FXa and shows similar cofactor activity to FV activated by thrombin [35]. However, unlike thrombin, RVV-V does not affect FVIII, FXIII, fibrinogen, and prothrombin. Owing to its selective activation of FV, RVV-V is considered a useful tool in the study of FV activation and for diagnostic purposes [36]. RVV-V was purified in multiple isoforms, RVV-V α , RVV-V β , and RVV-V γ , and complete amino acid sequences of RVV-V α and RVV-V β were determined, which differed from each other by six amino acid residues [37].

Another FV activator from Viperidae, VLFVA, also called LVV-V, is a single-chain glycoprotein with a molecular mass of 28.4 kDa isolated from *Macrovipera lebetina* [38]. It has homology with RVV-V γ at the N-terminal region (90% sequence identity) and similar carbohydrate content, about 6% of the molecular mass. Additionally, in a similar fashion to RVV-V, LVV-V mediates FV activation by cleavage after Arg1545. In addition, LVV-V was shown to inactivate FVa, although only at a much higher concentration than under normal activation conditions. Finally, a third FV activator from Viperidae called UVV-V was purified from *Vipera ursini* venom. UVV-V has a molecular mass of 34 kDa and it was shown to be equally capable of activating FV as RVV-V and LVV-V.

More recently, four protease isoenzymes were isolated from *Daboia russelii* and characterized as FV-activating proteases with non-fibrinolytic activity [18]. RV-FVP α , RV-FVP β , RV-FVP γ , and RV-FVP δ exhibit distinct characteristics compared with FV activators reported previously from *D. russelii*. They contain a much higher N-linked carbohydrate content, 42% to 44% of the total molecular mass, which was linked to the higher catalytic activity. Furthermore, fibrinogen hydrolysis activity was observed. The isoenzymes were evaluated for toxicity and lethality through experiments involving animals and in vitro hemolytic activity assays. Given the absence of lethality or toxicity in these assessments, the authors proposed that these isoenzymes could be considered suitable for clinical use as cardiovascular drugs.

A thrombin-like SVSP of 26 kDa with FV-activating activity named contortrixobin was purified from the venom of the viper *Agkistrodon contortrix* [33]. Contrary to previously characterized FV activators, contortrixobin contains no carbohydrates in its molecule. The FV activation observed by contortrixobin was 250–500-fold lower than activation by human α -thrombin.

A FV activator from the elapid *Naja oxiana* with an apparent molecular mass of 48 kDa was purified, and its ability to activate FV was assessed and compared with FV activation by thrombin [34]. FV activated by the venom activator differs from thrombin-activated FV, primarily due to the removal of a 4 kDa peptide from the heavy chain domain of FV. The authors proposed that the observed eight-fold decrease in the cofactor activity of activated FV, compared with FV–thrombin activation, indicates that the cleavage event occurs in or near the region responsible for the formation of the prothrombinase complex.

2.3. Prothrombin Activators

Prothrombin, or factor II (FII), is a glycoprotein of 72 kDa consisting of an N-terminal Gla domain, two kringle domains, and a serine protease domain with a catalytic site occluded prior to activation. Prothrombin is converted to thrombin (activated factor II-FIIa) primarily by the prothrombinase complex. This complex includes FXa, FVa (as a cofactor), and Ca²⁺ ions bound to negatively charged phospholipid membranes found on activated platelets. FXa alone can convert prothrombin to thrombin, but at a much lower rate (~300,000-fold lower) [114]. The activation of prothrombin by the prothrombinase complex is accomplished by the cleavage of two peptide bonds at Arg314–Thr315 and Arg363–Ile364. There are two potential activation pathways depending on the order of the cleavage. Each pathway leads to a different intermediate form; in one pathway, where the cleavage

between Arg314–Thr315 occurs first, the inactive intermediate product prothrombin-2 is formed. In the other pathway, where the cleavage between Arg363 and Ile364 takes place first, the active intermediate meizothrombin is formed. α -thrombin, the activated form of thrombin, is produced after the second cleavage in both pathways. Cleavage at Arg363–Ile364 is necessary for full activation because it exposes the active site in the C-terminal serine protease domain [115–118].

Snake venom prothrombin activators are procoagulant proteases that activate prothrombin. Based on their structure and cofactor requirements, they are classified into four groups [119,120]. Group A activators are metalloproteinases that do not require cofactors, such as Ca^{2+} ions and phospholipids, and convert prothrombin to meizothrombin [121,122]. Group B activators are metalloproteinases dependent on Ca^{2+} ions that also convert prothrombin into meizothrombin [123]. As proteases belonging to these groups are metalloproteases, they will not be addressed in this review. Group C activators are large serine proteases (>250 kDa) consisting of multiple subunits that resemble the FXa–FVa complex and require Ca^{2+} ions and phospholipids for maximal activity [124,125]. Group D activators are serine proteases that share a strong structural similarity, cofactor requirements (FVa, Ca^{2+} ions, and phospholipids), and molecular mass (~50 kDa) to factor Xa [126]. Both group C and D activators convert prothrombin to thrombin and are found exclusively in Australian elapid snakes [44].

Group C prothrombin activators have been isolated and characterized from *Oxyuranus scutellatus* (Oscutarin) and *Pseudonaja textilis* (Pseutarin C) venoms [41,127]. Both activators require Ca^{2+} ions and negatively charged phospholipids for optimal prothrombin activation activity and are multimeric complexes of ~300 kDa. They are composed of a catalytic unit with serine proteinase activity (~60 kDa), similar to factor Xa, and a cofactor unit (~220 kDa), homologous to FVa [41,128]. They activate prothrombin to mature thrombin by the cleavage of both Arg314–Thr315 and Arg363–Ile364 bonds [41,129]. However, unlike the FXa–FVa complex, pseutarin C is not affected by activated protein C (APC), since it lacks the APC cleavage sites at Arg306, Arg506, Arg679, and Arg316 [128–131].

Group D prothrombin activators show homology to FXa. The majority of SVSPs from this group convert prothrombin to thrombin. Their activity is enhanced in the presence of FVa, Ca^{2+} ions, and negatively charged phospholipids, such as Trocarin D (46.5 kDa), Hopsarin D (46.1 kDa), Notanarin D (46.0 kDa) and Notecarin D (54 kDa), isolated from *Tropidechis carinatus*, *Hoplocephalus stephensi*, *Notechis ater*, and *Notechis scutatus* venoms, respectively [40,42,44]. From *Pseudonaja textilis* venom, Textarin (~52 kDa) and PLIPA were purified and characterized. Unlike most group D activators, both appear to act on prothrombin activation virtually independent of FVa [42].

2.4. Thrombin-like

Thrombin plays many roles in the coagulation and fibrinolysis pathways as a procoagulant or an anticoagulant enzyme. As a procoagulant, thrombin cleaves N-terminal fibrinopeptides A and B of fibrinogen, which leads to the formation of insoluble fibrin monomers [132–134]. The subsequent polymerization of fibrin monomers forms fibrin clots, ultimately stemming blood flow. In addition to its important role in fibrinogen lysis, thrombin also activates FXIII, which acts in the cross-linking of fibrin monomers and facilitates the formation of stable fibrin clots (Figure 3) [135]. Through the activation of FV, FXI, and FVIII by thrombin, active thrombin generation is exacerbated by a positive feedback mechanism due to the formation of prothrombinase complexes [136,137]. The role of thrombin as an anticoagulant is mediated by the formation of the thrombin–thrombomodulin complex. This interaction captures previously active and available thrombin and leads to the binding of protein C and its activation. Active protein C (APC) inactivates FVa and FVIIIa and activates plasminogen activator (t-PA), leading to the conversion of plasminogen to plasmin, a major enzyme in the fibrinolysis pathway [138,139].

Snake venom thrombin-like enzymes (SVTLEs) constitute the second-most-prevalent enzymes present in crude snake venom [13]. They are functionally similar to thrombin

due to their ability to convert fibrinogen to fibrin by predominantly releasing either fibrinopeptide A or B [11,49,140,141]. However, unlike thrombin, they rarely activate other coagulation factors, such as FXIII, which leads to the formation of non-cross-linked and unstable fibrin monomers [141,142]. Depending on their observed capability to hydrolyze A, B, or both fibrinopeptide chains, they are classified as SVTLE-A, SVTLE-B, or SVLTE-AB, respectively (also known as Venombins A, B, or AB) [49,87,143]. They are mostly glycosylated (0–30% carbohydrate content) with molecular mass ranging from 26 to 60 kDa [13,144]. Furthermore, fibrinogen hydrolysis activity in a way that makes it impossible for fibrin to form is also observed. In this case, the enzyme cannot release the α and β -chains of fibrinogen, leading to defibrinogenation and incoagulable blood in vivo due to the aberrant fibrin monomers formation [18].

SVTLEs are widely distributed within the Viperidae family and several genera, such as *Agkistrodon* [45,59,75,81,85], *Bitis* [89], *Bothrops* [53,54,57,58,63,70,72,78,86–88], *Cerastes* [74,91], *Crotalus* [21,60,66], *Daboia* [90], *Gloydius* [83,145], *Lachesis* [71], *Protobothrops* [65,146], and *Macrovipera* [93,94] (Table 1).

2.5. Protein C Activator

Protein C is a vitamin-K-dependent plasma zymogen, and its activation is crucial in clotting regulation by inactivating FVa and FVIIIa [147,148]. The activation and action of protein C occur on the surface of endothelial cells through a three-step process [149,150]: (i) activation of protein C initiated by the thrombin–thrombomodulin complex; (ii) inhibition of coagulation by inactivating FVa and FVIIIa by activated protein C (APC), and (iii) inhibition of APC by plasma protease inhibitors specific to this enzyme [148,149]. The proteolytic activation of protein C involves a single cleavage performed by thrombin in a complex with thrombomodulin proteoglycan [150,151]. Thrombomodulin diminishes thrombin procoagulant effects while significantly enhancing its ability to activate protein C [152]. Protein C exerts a potent antithrombotic effect through the proteolytic inactivation of factors Va and FVIIIa, performing one or more cleavages assisted by various lipid and protein cofactors [149]. This process effectively limits the generation of thrombin [153]. The reduction in thrombin levels, in turn, attenuates the inflammatory, procoagulant, and antifibrinolytic responses triggered by thrombin. Consequently, a physiologically crucial function of APC is to decrease the risk of venous thrombosis.

Various SVSPs exhibit an ability to rapidly convert the zymogen protein C into its activated form, independent of thrombomodulin [150,154]. The majority of SVSPs that function as protein C activators have been isolated and characterized from vipers belonging to the genera *Gloydius*, *Deinagkistrodon*, and *Agkistrodon* (Table 1). Those species are *A. contortrix*, *A. contortrix mokasen*, *A. contortrix pictigaster*, *A. piscivorus*, *A. piscivorus leucostoma*, *G. halys halys*, *Gloydius ussuriensis*, and *G. bilineatus*. Other species that contain protein C activator include *Bothrops moojeni*, *Bothrops pradoi*, *Macrovipera lebetina*, *Daboia russelii*, *Cerastes cerastes*, and *Protobothrops mucrosquamatus* [150,151,154]. A comparative study classified SVSP protein C activators into two distinct groups [150,155], those derived from *Gloydius* and *Deinagkistrodon* genera and those found in species of the genus *Agkistrodon*.

The distinction between protein C activators found in *Agkistrodon* and those found in *Gloydius* and *Deinagkistrodon* snake venoms lies in several key characteristics. Protein C activators from *Agkistrodon* species exhibit a molecular mass of less than 40 kDa and an optimal pH range of 7.0–8.5. Moreover, they activate protein C from rat plasma to a lesser extent compared with their effect on protein C from human plasma. On the other hand, protein C activators derived from *Gloydius* and *Deinagkistrodon* species have molecular masses exceeding 40 kDa, with an optimal pH range of 5.0–6.5. Notably, these activators exhibit a greater degree of activation for protein C from rat plasma compared with protein C from human plasma [150,154].

2.6. Kallikrein-like

The kallikrein–kinin system involves blood proteins that play roles in inflammation, blood pressure regulation, coagulation, and pain. Bradykinin, a crucial nonapeptide (Arg-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) of the system, is produced from the high-molecular-weight kininogen precursor through kallikrein proteolytic cleavage (Figure 3). Bradykinin has potent vasodilatory and diuretic functions, leading to a potent reduction in blood pressure. Bradykinin interacts with G-protein-coupled B2 receptors and exerts its effects through PLC, PLA2, prostaglandins, and protein kinases, causing changes in intracellular Ca^{2+} concentration [156]. The stimulation of the bradykinin receptor B2 induces the release of nitric oxide and prostacyclin, both contributing to vasodilation [157,158].

SVSPs with kallikrein-like activity contribute to the reduction of blood pressure by liberating bradykinin from kininogen [103]. According to Péterfi et al. [158], for over a decade, the hypotensive effects and mechanisms of action of SVSP have been extensively studied in various snake genera, such as *Agkistrodon* [14], *Bitis* [100,102], *Lapemis* [99], *Protobothrops* [103], and *Lachesis* [101,159]. Furthermore, serine proteases with kallikrein-like activity were also isolated from *Heloderma* lizard venoms [9,10].

Notably, certain kallikrein-like SVSPs, such as Tm-VIG and Tm-IIG from *Protobothrops mucrosquamatus* venom, as well as harobin from *Hydrophis hardwickii* venom, exhibit an additional capacity to decrease blood pressure. They achieve this by degrading angiotensin I into angiotensin II and the latter into two inactive peptides [99,103]. Moreover, a synergistic interaction between kallikrein-like SVSPs and bradykinin-enhancing peptides has been proposed, suggesting an elevation in bradykinin concentration through distinct pathways [100]. This multifaceted interaction underscores the intricate and complementary roles of these venom components in modulating blood pressure.

2.7. Plasminogen Activator

The fibrinolytic system plays a pivotal role not only in the dissolution of blood clots, but also in various physiological and pathological processes [16,160–163]. A crucial event in the fibrinolytic cascade involves the activation of plasminogen, converting it into the active fibrinolysin, plasmin [164]. Plasminogen can be activated by specific plasminogen activation enzymes. Plasmin generation is highly localized in the fibrin clot, leading to clot lysis through the protease activity of plasmin [16,106]. In addition to its role in fibrinolysis, plasmin exhibits diverse substrates, including blood coagulation factors, cell surface receptors, metalloproteinases, and structural components of the extracellular matrix [165,166]. Consequently, plasminogen activation is a pivotal process that influences not only fibrinolysis, but also various biological phenomena, particularly those related to cell adhesion and migration [164,167,168].

Two key physiological human plasminogen activators exist, tissue-type plasminogen activator (t-PA) and urokinase-type plasminogen activator (u-PA or urokinase), which binds to the cellular u-PA receptor (u-PAR) [106]. Both plasminogen activators share a common ability to activate plasminogen by cleaving the Arg561–Val562 bond [160]. Consequently, the generated plasmin degrades fibrinogen and other extracellular matrix components [16,106]. The formation of plasmin is tightly regulated by inhibitors of plasminogen activators, which inhibit t-PA and u-PA, with a notable example being plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) [169]. Additionally, plasmin is directly inhibited by α 2-antiplasmin and α 2-macroglobulin, which are present in the plasma [16,164].

Plasminogen activators from snake venom have been identified as serine proteases capable of converting plasminogen into active plasmin by specifically cleaving the peptide bond between Arg561 and Val562 in plasminogen, thereby indirectly causing fibrin degradation [170]. So far, only three specific plasminogen activators have been isolated from snake venoms, TSV-PA (*Protobothrops stejnegeri*) [105], Haly-PA (*Gloydius brevicaudus*) [107], and LV-PA (*Lachesis muta muta* or *bushmaster*) [16,106,171]. The best characterized, TSV-PA, is a single-chain SVSP that cleaves plasminogen at the same site as u-PA and t-PA (after Arg561) to generate two-chain plasmin, a key enzyme in fibrinolysis [172].

2.8. Platelet Activator

Platelets, crucial for hemostasis, originate from nucleated precursor cells or megakaryocytes in the bone marrow and enter the bloodstream without nuclei. Despite lacking nuclei, platelets are metabolically active, with organelles such as endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, and mitochondria. They have surface receptors, adhesion molecules, and granules. Platelets exhibit a restricted ability to synthesize proteins; however, a multitude of preformed molecules inherited from megakaryocytes within platelets can be released upon activation [173–177].

The basic function of platelets is rapidly binding to damaged blood vessels, aggregating to form thrombi to prevent excessive bleeding. However, their activation at sites of atherosclerotic plaque rupture or endothelial cell erosion can lead to thrombus formation, and promote atherothrombotic disease [176–179]. Platelet activity is primarily associated with initiating coagulation cascades. The initial step in primary hemostasis involves platelet adhesion to the extracellular matrix, facilitated by von Willebrand factor (vWF) bridging between exposed collagen and the platelet glycoprotein (GP) Ib-IX-V receptor complex [176,178,180].

Platelet activation is induced by various factors, including bound platelet secretion products and local prothrombotic factors, such as tissue factors. The principal platelets activating pathways involve the membrane receptors C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2) and the glycoproteins GP Ib-IX-V and GP VI. After a vascular injury, CLEC-2 receptor binds to podoplanin, GP VI is a receptor for collagen, and GP Ib-IX-V interacts with vWF and plays a role in platelet adhesion [176,178,180–182]. Thrombin is the strongest platelet agonist, for it not only activates platelets through protease-activated receptors (PARs), PAR 1 and PAR 4, and GP Ib via G protein-coupled receptors (GPCR), but also converts fibrinogen into fibrin, stabilizing platelet plugs [176–178,182–184].

Several SVSPs with platelet pro-aggregant activities, such as crotalocytin from *Crotalus horridus* [108], MSP 1 from *Bothrops moojeni* [110], BJV-VIIIcp from *Bothrops jararacussu* [111], thrombocytin from the South American pit viper *Bothrops atrox* [72,73,112], PA-BJ from *Bothrops jararaca* [109], cerastotin from *Cerastes vipera* [61,91], and cerastocytin from the Tunisian desert viper *Cerastes cerastes* [15], have been identified [183,185,186]. PA-BJ and thrombocytin activate platelets through PAR 1 and PAR 4 [186], similar to thrombin. *Cerastes cerastes* venom contains proteins such as cerastocytin and cerastotin, which, like thrombin, exhibit platelet pro-aggregant action and weak procoagulant activity. Cerastocytin, a thrombin-like enzyme, induces platelet aggregation at nanomolar concentrations, similar to thrombin, but with different sensitivities to selective inhibitors, like hirudin or antithrombin III and heparin [15]. MSP 1 exhibits direct platelet-aggregating activity and enhances ADP-induced platelet aggregation [109].

The enzymes above induce the aggregation of washed platelets, indicating platelet-activating activity, like thrombin [187–189]. The platelet activation mechanism of Cerastocytin is very similar to that of thrombocytin. Both enzymes exhibit pro-aggregant activity inhibited by serine proteinase inhibitors, ADP scavengers (apyrase, CP/CPK), and AMP, but are not affected by indomethacin, PAF antagonists, and hirudin. The activation mechanisms also share sensitivity to theophylline, mepacrine, and chlorpromazine. Additionally, cerastocytin can activate platelets by inducing the release of ADP, as its pro-aggregant activity is inhibited by ADP scavengers [15].

3. Structural Features

Currently, the Protein Data Bank contains a total of 13 structures representing venom serine proteases from seven distinct snake species (Table 2). The first structure was the *Trimeresurus stejnegeri* venom plasminogen activator, deposited in 1998, and obtained from heterologous expression in *E. coli* as inclusion bodies. All others were purified from snake venom, which, in some cases, allowed the identification of the glycosylated residues and the chemical nature of their carbohydrate moieties. Each structure contains 12 cysteine residues forming 6 disulfide bonds [20,35,145,188,190–192].

Table 2. Crystal structures of snake venom serine proteinases.

PDB Code	Resolution	Glycosylation	Ligand	Organism	Reference
1BQY	2.50	-	Glu-Gly-Arg-chloromethylketone	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	[188]
1OP0	2.00	Asn35	-	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	[190]
1OP2	2.10	Asn35			
5XRF	2.20	Asn81, Asn124	-	<i>Agkistrodon contortrix</i>	To be published
2AIQ	1.54	Asn37, Asn96A, Asn148	Benzamidine		[20]
2AIP	1.65		-		
3S69	1.43	-	-	<i>Goydius intermedius</i>	[145]
3S9A	1.90	Asn245	-	<i>Daboia siamensis</i>	[35]
3S9B	1.90	Asn245	-		
3S9C	1.80	Asn245	Factor V 14 peptide		
3SBK	2.55	Asn245	D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketone	<i>Gloydius halys</i>	[191]
4E7N	1.75	Asn95A	-		
4GSO	2.60	-	-	<i>Bothrops jararacussu</i>	[192]

These proteins exhibit the classical chymotrypsin fold, and the majority of authors adopted the numbering and naming convention of the chymotrypsin A, established in the 1970s by Hartley [193]. In this nomenclature, the catalytic triad residues are His57, Asp102, and Ser195, and each loop is assigned a number based on a residue near its midpoint.

The fold consists of two six-stranded β -barrels, each with an α -helix by its side (Figure 4). The elongated active site groove is positioned between the barrels and delimited by eight loops [145]. The first β -barrel contains a minor helical segment with His57 of the catalytic triad positioned within it. This helical segment is located between the strands β 3 and β 4 and is linked by a disulfide bond to the β 2-strand. In the second β -barrel, an α -helix is found between the β 8 and β 9 strands, located close to the β 9-strand and connected to it by a disulfide bond.

The β -barrels are connected by only three trans elements. The first is the N-terminus that surrounds part of the second barrel and is connected to its outer side by a disulfide bond (Figure 4). It forms a small β -strand and positions its first residue in a small hydrophobic pocket, where its α -ammonium group forms an internal salt bridge to the side chain of Asp194. The second trans feature is an extensive loop on the opposite side of the active site connecting the end of the first barrel to the beginning of the second, and the third trans element is formed by the C-terminal region and comprises an α -helix followed by a brief loop that is connected by a disulfide bond to the 99-loop. The last residue is usually a proline, and a salt bridge is formed between its C-terminal acidic carboxyl group and the amino group of the side chain of the conserved Lys101 or the guanidinium group of Arg179. In summary, the fold can be described as two β -barrels connected by a lengthy loop. The N-terminus originates in the first barrel and is wrapped around the second β -barrel, while the C-terminus begins on the second barrel, but is positioned alongside the first β -barrel.

The functional diversity of SVSPs is closely related to the eight surface loops surrounding the active site (Figure 5A). Some regions displaying the lowest sequence conservation in SVSPs lie within these loops, notably the 37-loop, the 60-loop, the 99-loop, and the 174-loop exhibit low conservation. Conversely, the 70-, 148-, 189- and 218-loops present a high degree of conservation. The variations in the sequences of these loops result in differences in shape and charge within the environment surrounding the active site of SVSPs (Figure 5B). Consequently, differences in selectivity toward macromolecular substrates and spatial

hindrance for the binding of inhibitors emerge. Furthermore, the majority of glycosylations take place within these loops, increasing the diversity of the chemical characteristics of these regions.

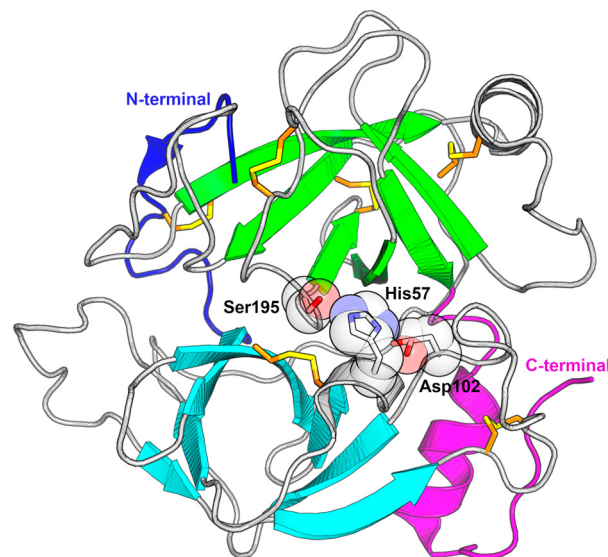


Figure 4. Fold and catalytic triad of snake venom serine proteinases. The fold can be summarized as two β -barrels connected by a lengthy loop. The N-terminus (blue) originates in the first barrel (cyan) and is wrapped around the second β -barrel (green), while the C-terminus (magenta) begins on the second barrel, but is positioned alongside the first barrel. The representative structure of saxthrombin from *Gloydius intermedius* is shown as a cartoon and the side chains of the catalytic triad residues, His57, Asp102, and Ser195, are labeled and depicted as sticks with transparent spheres. The disulfide bonds are represented as sticks and colored in orange and yellow. The N-terminal region is colored in blue, the C-terminal region is colored in magenta, the first β -barrel is colored in cyan, and the second β -barrel is colored in green (PDB ID 3S69).

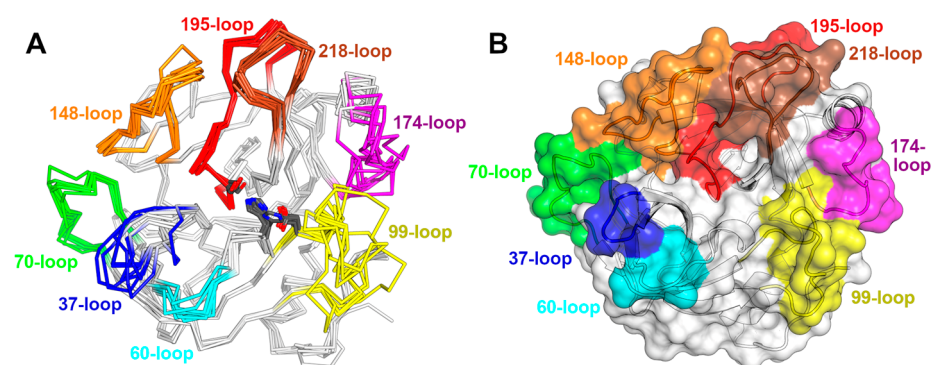


Figure 5. Snake venom serine proteinases' active sites and the loops surrounding them. (A) The superposition of eight crystal structures of snake venom serine proteases from different snakes highlights the varying levels of structural diversity in different loops (PDB IDs 1BQY, 1OP0, 2AIQ, 3S69, 3S9A, 4E7N, 4GSO, and 5XRF). Each structure is represented as a ribbon; the catalytic triad residues, His57, Asp102, and Ser195, are close to the center of the figure, represented as sticks and colored in grey. Each loop is shaded using a distinct color and labeled. Carbohydrate moieties are not represented. (B) Cartoon and transparent surface representation of the structure of saxthrombin from *Gloydius intermedius* in the same orientation of A, illustrating how the labeled and colored loops shape the vicinity of the active site (PDB ID 3S69).

SVSPs are endopeptidases, enzymes that cleave a peptide bond in the middle of a polypeptide chain. During the substrate binding process, which antecedes catalysis, they

have to accommodate the side chains of the substrate. To achieve this, the active site region is surrounded by subsites named S1 to S3 and S1' to S3' disposed in the following order: S3, S2, S1, S1', S2', S3'. The cleavage happens between the subsites S1 and S1' [194]. Each subsite can accommodate the side chain of different substrates. The shape and electrostatic characteristics of the subsites within each SVSP are contingent on the residues forming the loops that surround the active site.

3.1. Catalytic Triad Modification

As explained, serine proteases from snake and lizard venoms have the catalytic triad formed by residues Ser195, His57, and Asp102 [8]. However, not all toxins follow this pattern. Wu and colleagues [195] detected, in the venom of the viper *Protobothrops jerdonii*, an SVSP that had an arginine in place of the histidine in the active site, which led to the loss of enzyme activity. The phylogeny of this enzyme indicated that it was in a different group from the rest of the SVSPs. A following study also detected two others of these enzymes without proteolytic or sterolytic activity, where the His57Arg and Ser195Asn substitutions were observed [196]. Years later, another enzyme with a catalytic triad was detected in the venom of the viper *Vipera ammodytes*. However, although this enzyme also had the His57Arg substitution, it showed activity against several substrates [197]. It is proposed that enzymes with modification of the triad and which do not present activity are expressed because they act, in some way, affecting the physiology of the prey, possibly binding to substrates involved in blood clotting and preventing their normal activity [196].

3.2. Glycosylation in SVSPs

Most of the available crystal structures of SVSPs exhibit one or more glycosylations. They can influence enzyme stability, substrate preference, and the ability to evade inhibitors. These are N-linked glycosylations and consist of the attachment of carbohydrate moieties to the side chain nitrogen atom of asparagines. This post-translational modification is contingent on the presence of the consensus sequence Asn-X-Thr/Ser, where X represents any amino acid, except for proline. Since the specific location of these modifications depends on the sequence, it is possible to anticipate N-linked modification sites [198]. Each glycosylation site can host from one to over ten carbohydrate residues, arranged in various branching patterns [199].

N-linked glycans are hydrophilic modifications that can be substantial in size, contributing to alterations in the immediate chemical surroundings. Several sources indicate that glycosylation in SVSPs might have the general effect of increasing stability toward proteolysis, temperature, and pH variations. For example, the *Bothrops* protease A from *Bothrops jararaca* is a highly glycosylated SVSP, with a molecular mass determined by SDS-PAGE of 67 kDa [200]. However, the molecular mass estimated from its sequence is 25.4 kDa. This suggests that over 60% of its total mass can be attributed to carbohydrate moieties distributed throughout eight predicted potential N-glycosylation sites. Given that this enzyme is stable under pH values ranging from 3 to 9 and its resistance to heating at 86 °C for 10 min, the authors propose that glycosylation plays a role in its unusually high stability.

Glycosylations in SVSPs might introduce steric characteristics that contribute to selectivity interactions with both substrates and inhibitors [20,190]. Despite their substantial influence on biological activity, determining the exact composition of each glycosylation in SVSPs is a challenging task. Crystal structures may serve as valuable indicators for this information, but, while the currently available crystal structures exhibit a limited number of carbohydrate moieties per glycosylated residue, in some cases, their actual quantity might be higher [20]. This is due to the flexibility of these groups, which might render their electron density unlikely to be well defined. All glycosylated crystal structures present N-acetylglucosamine, and some of these moieties also feature decorations of fucose or mannose, displaying a variety of ramifications [20,35,145,190]. Additional N-linked glycans, such as N-acetylneuraminic acid and N-acetylgalactosamine, have been identified in

SVSPs [201]. The extent of glycosylation in these enzymes might account for over 25% of their weight in carbohydrates [202], and they might be heterogeneously glycosylated with differing degrees of branching [201,203,204].

The general impact of glycosylation in SVSPs is typically evaluated by assessing enzyme activity across a range of substrates and examining inhibitor effects. Subsequently, these assays are repeated using either deglycosylated or partially deglycosylated enzymes. Comparing the outcomes of these experiments can provide information on enzyme selectivity toward substrates, inhibitor effects on the enzyme, and role of glycosylation in both scenarios. Nonetheless, limited research has successfully elucidated the precise chemical composition of oligosaccharides at individual N-glycosylation sites, including their branching patterns and degree of heterogeneity. This type of structural characterization is remarkably complex and underrepresented in the field. Nevertheless, a few notable examples are documented in the literature. In 1993, a pioneering study by Pfeiffer and colleagues determined the structure of the glycans at each glycosylation site of a SVTLE from the venom of the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma* [201,204]. Their findings revealed that each of the five N-linked residues exhibited several populations of carbohydrate moieties, with variable degrees of branching. Consequently, crude venom might potentially contain multiple populations of the same SVTLE with varying carbohydrate decorations.

3.3. An Overview of the Crystal Structures

Currently, crystal structures from seven snake species have been deposited, and in some cases, two or more structures from a single SVSP are available, each exhibiting distinct particularities (Table 2). The structures present notable similarities amongst themselves, ranging from 52% to 86% identity. An exceptional instance is observed in *Deinagkistrodon acutus*, where two structures with a single residue variation and 99.6% identity have been submitted (Table 3). As expected, the high sequence identity corresponds to a high degree of atomic similarity, as evidenced by the low root-mean-square deviation (RMSD) values between their coordinates (Table 3).

Table 3. Identity and RMSD between the deposited crystal structures.

RMSD (Å)									
	3S9A	4E7N	1OP0	1OP2	4GSO	3S69	1BQY	2AIQ	5XRF
3S9A	-	0.559	0.582	0.699	0.878	0.723	0.729	0.671	0.882
4E7N	67.09%	-	0.377	0.380	0.738	0.443	0.550	0.517	0.621
1OP0	57.69%	69.65%	-	0.197	0.696	0.289	0.534	0.514	0.553
1OP2	58.11%	70.08%	99.57%	-	0.690	0.313	0.458	0.566	0.562
4GSO	58.62%	68.53%	85.77%	86.2%	-	0.625	0.538	0.817	0.806
3S69	61.96%	70.51%	84.18%	84.61%	76.72%	-	0.538	0.566	0.553
1BQY	61.11%	67.94%	71.79%	72.22%	68.96%	73.07%	-	0.622	0.626
2AIQ	61.47%	72.72%	68.83%	69.26%	70.56%	67.96%	67.09%	-	0.710
5XRF	52.13%	58.4%	56.83%	56.83%	54.74%	56.83%	53.41%	58.87%	-
	3S9A	4E7N	1OP0	1OP2	4GSO	3S69	1BQY	2AIQ	5XRF
Percentage of identity									

Despite the high identity and low RMSD values, each structure contributes novel data and distinctive features to the collective understanding of these SVSPs. The novelty might concern variations in key residues, loop conformations, glycosylation extent and quality, as well as the presence of complexed inhibitors or substrates, variations in activity results, and beyond. Hence, a brief recollection of the structures from each snake is warranted and provided below.

The first structures from chymotrypsinogen date from the early 1970s and were succeeded by the structures of trypsinogen and elastase, laying the foundation for the molecular homology modeling of serine proteases. Almost thirty years later, in 1998, the *Trimeresurus stejnegeri* venom plasminogen activator (TSV-PA) was resolved by molecular replacement (PDB ID 1BQY). As the adage goes, the first structure unveils the most novelty. At 2.5 Å resolution, the structure exhibits the inhibitor Glu–Gly–Arg–chloromethylketone covalently bound to the active site [188]. The arginine side chain engages in several polar contacts within the hydrophobic pocket at the S1 subsite, notably with the conserved Asp189. Differing from typical SVSPs, TSV-PA features, as a key participant in the oxyanion hole, a phenylalanine instead of a glycine at position 193. The authors propose that Phe193 contributes to the notable substrate specificity of TSV-PA and its ability to withstand certain inhibitors. Only Asn178 is predicted to be glycosylated *in vivo*; however, as the TSV-PA crystal is obtained from heterologous expression in *Escherichia coli*, it lacks carbohydrate moieties. A shared trait with the subsequently resolved structures of SPSVs, but absent in trypsinogen or chymotrypsinogen, is the presence of a disulfide bond between the 99-loop and the C-terminal loop.

The publication of the succeeding structures took several years. It is reasonable to consider that the challenges related to purifying these proteins from snake venom might have contributed to the prolonged delay, given that all the subsequent SVSP structures were obtained from snake venom. This approach offers the benefit of producing glycosylated protein, although some of these molecules could exhibit variations in glycosylation levels, adding complexity to both the purification and crystallization procedures.

Then, two closely resembling structures of SVSPs from *Deinagkistrodon acutus* were published, with a single amino acid substitution: Asp62 replaced by Asn62 (PDB IDs 1OP0 and 1OP2) [190]. At the reasonable resolution of 2.0 and 2.1 Å, both proteins are glycosylated at the same residue, but one features only N-acetylglucosamine, while the other displays a trisaccharide comprising two N-acetyl glucosamine and a fucose. Located at Asn35 within the 37-loop, these carbohydrate moieties are close to the active site, and the authors discuss their potential impact on inhibitor binding and substrate specificity.

Later in the same year, 2005, an article was published detailing the native and inhibited crystal structures of the glycosylated protein C activator (ACC-C) found in *Agkistrodon contortrix* (PDB IDs 2AIP and 2AIQ). The glycosylated residues are Asn38, Asn96a, and Asn148, located at the 37-, 99-, and 148-loops, respectively. They surround the active site and influence the selectivity toward macromolecular substrates [20]. While the authors mention that ACC-C comprised 16% carbohydrates, the electron density maps for both structures revealed only the presence of one N-acetylglucosamine in each of the glycosylated residues. This serves as a notable illustration of the complexities associated with researching the structural biology of SVSPs, particularly their glycosylations. Another indication of the heterogeneity in the carbohydrate moieties is the fact that ACC-C is commercialized by Pentapharm under the brand name Protac®, and their website states that its molecular mass ranges from 36,000 to 42,000 Da. The structure featuring the bound benzamidine exhibits a resolution of 1.54 Å, and the inhibitor is positioned within the S1 subsite, where it interacts with Asp189. In ACC-C the catalytic site is encircled by a positively charged surface, and the surface charge distribution varies in each SVSP, thereby affecting substrate and inhibitor binding (Figure 6A).

A few years later, in 2011, the first snake venom thrombin-like enzyme (SVTLE) was crystallized and resolved by molecular replacement. Saxthrombin was purified from the crude venom of *Gloydius intermedius*, and its crystals diffracted to a resolution of 1.43 Å, marking the highest-resolution SVSP structure to date (PDB ID 3S69) [145]. While the primary sequence of saxthrombin contains predicted N-linked glycosylation sites [198], the structure, in contrast, lacks any observable carbohydrate moieties (Figure 5B). Moreover, the molecular mass estimated through SDS-PAGE closely aligns with the prediction derived from its sequence. The authors note that the main chain of saxthrombin is very similar to those of other available SVSPs. However, saxthrombin differs from thrombin in that it

possesses a notable abundance of negative charge, not only on its surface, but also within the catalytic center and the surrounding surface area near the active site.

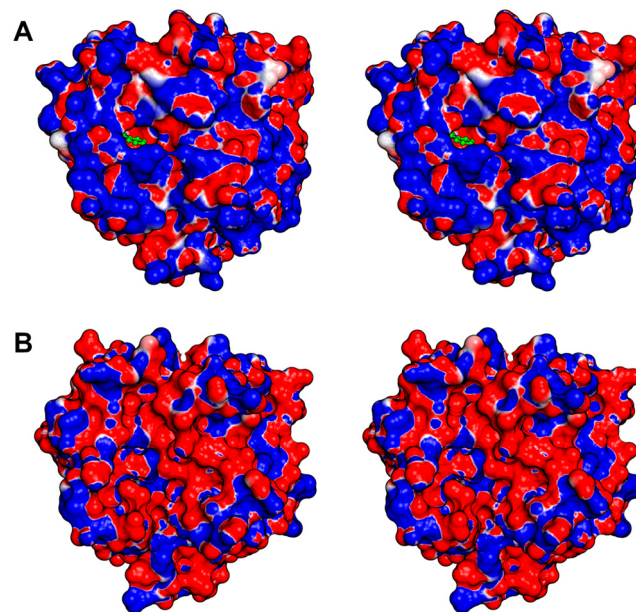


Figure 6. Stereo view of the surface electrostatic potential in ACC-C and Jararacussin-I. The surface charge differences in these SVSPs are striking. Both proteins are depicted in identical orientations and colored with a red (negative) to blue (positive) gradient. **(A)** ACC-C (PDB ID 2AIQ). The benzamidinium molecule is colored in green and positioned with the S1 subsite, which is surrounded by a positive electrostatic potential. **(B)** Jararacussin-I (PDB ID 4GSO). The areas around the catalytic site and subsites S1 to S3 are marked by a negative charge. A negative surface electrostatic potential characterizes the region encompassing the catalytic site and subsites S1 to S3.

During that very year, another article was released detailing the Russell's viper venom FV activator (RVV-V) [35]. This publication presented a comprehensive structural analysis of RVV-V, offering insights into four distinct states, two in its free form, one covalently bound to D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketone (PPACK), and the most relevant, a complex with a fragment of its macromolecular substrate, FV (PDB ID 3S9C). At 1.8 Å resolution, the electron density is clear for seven residues of FV, and the most significant impact of this crucial structural analysis was the precise mapping of the substrate to the specific subsites within the enzyme (Figure 7A). Several polar interactions were observed in the S1 subsite, while in the remaining subsites, the predominant form of interaction is van der Waals contacts. In three of the structures, Asn245 residue in the C-terminal loop of the protein is N-linked to a single N-acetylglucosamine. However, the complex with FV differs, and a linear arrangement of two N-acetyl glucosamine and a D-mannose is observed. Asn245 is at a considerable distance from the active site, and the influence of these carbohydrate moieties on enzyme behavior remains unknown.

A couple of years later, a publication describing the isolation, activity, and crystal structure of a SVTLE from *Gloydius halys* named AhV_TL-I was published (PDB ID 4E7N). Notably, there was a distinct divergence of 3 kDa between the theoretically predicted molecular mass and the one determined by MALDI-TOF [191]. However, in the structure determined at a 1.75 Å resolution, the sole glycosylated residue identified was Asn95A within the 99-loop, which exhibited two N-acetylglucosamine residues (Figure 7B). This modification contributes to the unusual conformation of the 99-loop in this enzyme. Furthermore, the authors discovered that the presence of carbohydrate moieties is crucial for activating ryanodine receptors, as deglycosylation rendered AhV_TL-I unable to induce Ca^{2+} release. Once more, these findings underscore the challenges inherent in researching glycosylated SVSPs and highlight the diverse effects of carbohydrate moieties in these enzymes.

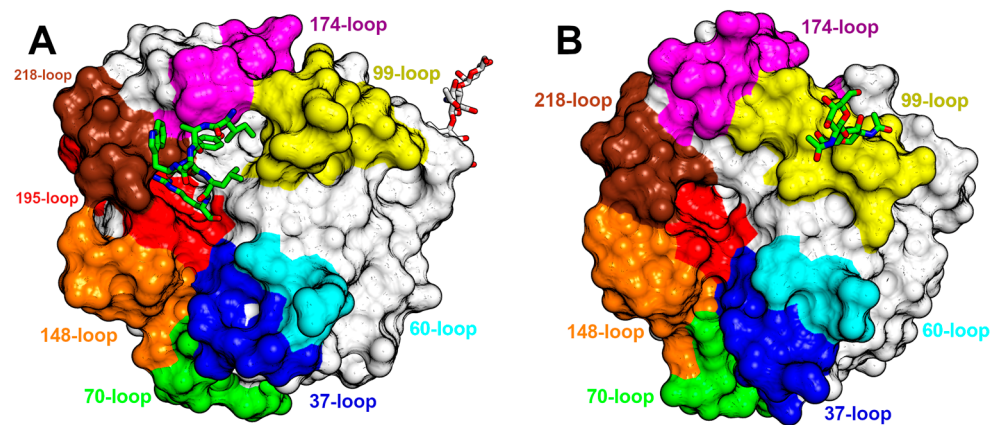


Figure 7. Comparison of the surfaces of RVV-V and AhV_TL-I. Surface representations in which the loops delimiting the active site are shaded in the same color scheme of Figure 5. The same orientation is depicted in both illustrations. (A) RVV-V bound to factor V, which is represented as sticks and colored in green. The carbohydrate moieties are situated away from the active site and illustrated as white sticks. PDB ID 3S9C. (B) AhV_TL-I from *Gloydius halys*. The pair of N-acetylglucosamine residues are depicted as green sticks, and they induce changes in the conformation of the 99-loop to which they are attached. PDB ID 4E7N.

The structure of Jararacussin-I, an SVTLE isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*, was determined with a resolution of 2.6 Å (PDB ID 4GSO) [192]. Despite predictions of two potential glycosylation sites, no carbohydrates were discernible in the electron density at this resolution [198]. The surface around the catalytic site is negatively charged contributing to the particularities in the activity of this enzyme (Figure 6B).

The summary provided above concerns SVSP crystal structures, which currently have an associated article. Nevertheless, there is a deposited SVTLE structure from *Deinagkistrodon acutus* for which no accompanying article has been published at this time (PDB ID 5XRF). Out of all the structures mentioned here, this enzyme displays the lowest identity to each of the others, and consequently, the RMSD values of the other structures are typically higher (Table 3). A notable feature of the structure is the presence of two larger carbohydrate moieties. These groups contain N-acetylglucosamine, fucose, and D-mannose. The first is situated within the 70-loop and comprises four carbohydrate residues, while the other is positioned on the opposite side of the active site and is decorated with five carbohydrate moieties. Additionally, in the current structure, the cysteine within the 99-loop is located two residues after its usual position, leading to a significant alteration in the conformation of both the 99-loop and the C-terminal loop, to which it forms a disulfide bond.

4. Emergence and Evolution

4.1. Evolution from Salivary Enzyme

It has been demonstrated by Fry [205] that most of the proteins present in reptile venom have evolved through gene duplication followed by gene recruitment. However, it was assumed that serine proteases would have arisen in a different way. These enzymes would have originated from the modification of kallikreins previously secreted by the salivary gland, which later would become the venomous gland. The arguments for this hypothesis were based on the similarity between snake venom serine proteases and those present in the venom of helodermatids (at that time, it was believed that both venoms appeared separately) and the identification by phylogeny that reptile venom serine proteases formed sister groups to mammalian tissue kallikreins. In reptiles, these enzymes have preserved their initial physiological function, like kallikreins found in the venom of some species, but have also developed distinct activities as new isoforms [206]. Kallikreins are secreted serine proteases that act in blood plasma or tissues promoting the cleavage of kininogen and the release of bradykinin. They are classified as either plasmatic or tissue based on a

phylogenetic criterion, with both classes belonging to the same family of serine proteases and exhibiting high similarity considering the probable emergence of plasma kallikreins prior to that of tissue [207]. Tissue kallikreins are known to be expressed in mammalian saliva [208,209].

In addition to toxicoferans, mammals with venomous saliva, such as solenodons and shrews, also express kallikreins in their venoms [210]. Barua et al. [211] demonstrated the existence of a so-called ‘metavenomic’ network conserved among amniotes formed by genes of non-secreted proteins that are expressed together with venom and saliva genes. This network functions as a core that is conserved among species and can be used by different evolutionary mechanisms for the development of venom. Using this common molecular basis as a starting point, snakes have diversified their venom systems by recruiting a variety of toxins, while mammals have developed simpler venom systems very similar to those of saliva. Kallikreins, which are enzymes abundant in the saliva of many amniotes, would have been important for these developing venoms because they lead to hypotensive shock when injected into prey. In the following work, Barua et al. [212] managed to bring more understanding about this enzyme origins by resolving the phylogeny of all kallikreins. They demonstrated that the tetrapod kallikrein lineage evolved from a serine protease that also gave rise to the anionic trypsin present in vertebrates. This initial kallikrein then diverged into two groups: the one that gave rise to kallikreins 4–15 and the one that gave rise to kallikrein 1 (present in saliva), which gave rise to the toxic serine proteases present in the venom of reptiles and mammals.

4.2. Serine Proteases in Toxicoferans

The venom systems of venomous snakes and lizards are considered homologous, although they have undergone great differentiation during the evolutionary process [2,3]. Their basal structures would be composed of incipient mandibular and maxillary glands, with snakes secondarily losing the mandibular glands and anguimorphic lizards (varanids, anguids, and helodermatids) following the opposite path [213]. Only anguimorphic lizards, iguanas, and snakes among the squamates have these protein-secreting mandibular/maxillary glands, making this structure a characteristic shared by the entire Toxicofera clade. cDNA data from the glands of toxicoferans species revealed that several known toxins are expressed by them, including serine proteases. Phylogenetic analyses proposed that these serine proteases were monophyletic, indicating a single recruitment event before the separation of iguanas, anguimorphs, and snakes [3] (Figure 1). Although the non-monophyly of these enzymes was found in a parallel phylogenetic study, it was interpreted that the presence of non-venomous enzymes in the toxin clades would be due to reverse recruitment, i.e., original toxic enzymes that gained a new physiological function [214]. This mechanism was perceived by verifying the co-expression of some toxins homologous in other animal tissues [215].

In a study that questioned the verity of the Toxicofera clade, Hargreaves and colleagues [216] assembled the transcriptome of the venom/salivary glands, skin, and cloacal scent glands of three non-venomous snakes (*Pantherophis guttatus*, *Opheodrys aestivus* and *Python regius*) and a venomous one (*Echis coloratus*). That study aimed to identify whether the venom proteins were expressed in other tissues and whether they were produced by snakes that, as it was assumed, had lost the ability to produce venom. The authors found six serine protease transcripts specifically expressed only in the venom of *Echis coloratus*, but it was shown that they were not monophyletic based on the constructed phylogenetic tree. The authors believed that the idea of reverse recruitment was unlikely. This, added to the available data on other toxins, would cast doubt on the cooption of venom toxin genes in the ancestor of toxicoferans. In subsequent work with transcripts from the oral gland of *Python regius*, a snake with origins prior to the caenophidian snakes (recognizably venomous snakes), serine proteases were not found to be expressed in this structure, but rather in other organs of the animal. The authors reiterated that classifying proteins as toxic solely based on their homology, without considering their effect on prey, would be incor-

rect [217]. The results found by Koludorov et al. [218] contradicted these studies. In their work, the authors constructed the phylogeny of serine proteases from the mandibular and maxillary glands of toxicoferans. They found that the glandular versions are monophyletic when compared with other enzymes expressed in the rest of the body, and that they have undergone extensive diversification and gene duplication during the venom evolutionary trajectory. Additionally, the authors showed that the enzymes originating from kallikreins are the only ones consistently expressed in the venom, suggesting an ancestral venom system dominated by it.

4.3. Gene Evolution and Enzyme Diversification

Genomic scaffold analysis of venom serine proteases has provided valuable information about the gene evolution of this class of enzymes. From the sequencing of the *Bothrops jararaca* (Viperidae) genome, it was found that SVSPs genes were grouped in tandem and that some of these genes were preceded by the cytochrome c oxidase 6B1 gene (cox 6B1) or its pseudogene. This result indicates that the duplication of SVSPs, at least in viperids, involved a genomic segment that comprised cox 6B1, or that cox 6B1 facilitated the duplication process. When compared with genomes of other toxicoferan reptiles, it was found that the same locus that contained the SVSPs in vipers was present in elapids having, however, only a single SVSP gene. In lizards, this same locus contains the gilatoxin-like serine protease gene [12]. Gilatoxin is an important component of the venom of the *Heloderma* lizard species [10]. Such findings are yet another indication of the orthology between the toxic serine proteases of snakes and lizards. As a non-toxic paralogous serine protease gene was not found close to the toxin genes, these genes would have evolved through the hijacking/modification mechanism of the ancestral gene, which was recruited for venomous specialization [12].

Barua and Mikheyev [219] identified changes in the evolutionary rates of SVSPs, a parameter to evaluate protein innovation, using venom transcriptome data. The evolutionary rates of gene expression in the three families of venomous snakes (Viperidae, Colubridae, and Elapidae) were shown to be higher than that of other proteins present in the venom, with rates increasing following the divergence of the viperid lineage. The evolutionary pattern of these enzymes demonstrates that their evolution occurred quickly and in accordance with the ecological opportunities faced by these animals. In the phylogenetic analyses carried out by Xie et al. [220], it was found that viperid sequences presented ten times more sites under selection compared with non-viper snakes, and that non-viper snake sequences grouped together, confirming that the great diversification found in vipers arose after the divergence of this lineage.

In an attempt to understand how the diversification of substrates cleaved by serine proteases occurred, Wang et al. [46] generated a phylogenetic tree with 43 sequences of SVSPs from viperid venom and identified three separate groups that would be related to the physiological functions performed by these enzymes. The authors named these groups kininogenases (KN), coagulation enzymes (CL), and plasminogen activators (PA). In a study published years later, it was not possible to identify the same division. Vaiyapuri et al. [221] generated a tree with 196 SVSP sequences also from viper venom and showed that, although three groups were found, they did not differ based on physiological function. It was found that the SVSPs of snakes from the Viperinae subfamily (true vipers) were mainly grouped into two of these groups, indicating that they evolved differently from the rest of the vipers. In contrast to what was found by Wang, Vaiyapuri's findings showed that classifying SVSPs based on their function is difficult. In this context, SVSPs can have more than one function and the biochemical screening carried out is generally biased, where it does not test all possible substrates, but only those of interest. Xie et al. [220] hypothesized that fibrinogenolysis was an ancestral activity of the Viperidae enzymes, considering that this activity is found both in other venomous snakes that are not vipers and in the venom of anguimorphic lizards.

The wide variety of substrates cleaved by toxic serine proteases is a consequence of the accelerated evolution that these proteins have undergone. Serine proteases' cDNA from viperid venom glands showed that the genes of these enzymes accumulated many non-synonymous mutations in their coding regions, which led to their enormous diversification [222]. It has been proposed that diversification could also be caused by a process called ASSET (Accelerated Segment Switch in Exons to alter Targeting) [223]. In this process, there is an accelerated exchange of segments within the gene. Three segments were identified within the enzymes that would be undergoing this process, with all three located on the surface of the protein at the substrate recognition region. Those segments corresponded to the 37-loop, the 60-loop, and the 99-loop previously described and shown in Figure 5. The exchanges would occur randomly, making it impossible to relate them to phylogenetic patterns. The authors propose that the possible mechanisms leading to ASSET include splicing variation, accumulation of point mutations, independent recruitment events, and recombination.

4.4. Non-Homologous Serine Proteases

Not all serine proteases found in snake venom are homologous to the kallikrein-derived toxins described previously. Prothrombin D activators, present in the venom of Australian elapids, have characteristics that bring them closer to FXa, as described previously [40,44]. Both enzymes cleave the same peptide bonds in bovine prothrombin (Arg274–Thr275 and Arg323–Ile324), in addition to forming a complex with FVa in the presence of Ca²⁺ and phospholipids [44,224]. Prothrombin D activators and factors Xa have high sequence similarity (>50%) and identical domain architecture [40,44,225]. These venom serine proteases would have evolved from the gene duplication of FXa produced in the liver of these elapids, which participates in their hemostasis. This duplication would be followed by a specific expression in the venom gland [225,226]. The main differences between the two genes are insertions and deletions in the first intron and the promoter region [226,227]. Australian elapids also express prothrombin C activators that would also be homologous to FXa. These enzymes have a catalytic (FXa-like) and a non-catalytic (FVa-like) domain, and their phylogeny indicates that they originated independently of D activators [43,228].

5. Therapeutic and Diagnostic Application

Serine proteases are one of the most extensively researched classes of venom-derived proteins for therapeutic purposes. Whether used as drugs, reagents for diagnostic tests, or research tools, SVSPs have been explored for their capacity to interfere with the coagulation process (Table 4).

Table 4. Venom-derived serine proteases used in diagnosis or treatments.

Venom-Based Drug	Main Source	Mechanism of Action	Example of Application	References
Reptilase® (Batroxobin)	<i>Bothrops atrox</i>	Fibrinogen α -chain cleavage into fibrin	Diagnostic of coagulation disorders to assess the functionality of fibrinogen	[229]
Defibrase® (Batroxobin)	<i>Bothrops moojeni</i>		Treatment of ischemia caused by vascular occlusive diseases	[230]
Plateltex-ACT® (Batroxobin and calcium gluconate)	<i>Bothrops atrox</i>	Fibrinogen α -chain cleavage into fibrin in presence of calcium, leading to a fibrin reticulum and promoting a blood cell gelation	Topical treatment of damaged tissues	[231,232]

Table 4. Cont.

Venom-Based Drug	Main Source	Mechanism of Action	Example of Application	References
Vivostat [®] fibrin sealant (Batroxobin and citrate)	<i>Bothrops moojeni</i>	A medical device is used to prepare autologous fibrin, exploring the fibrinogen α -chain cleavage promoted by batroxobin in presence of citrate	Used as an autologous fibrin sealant in surgery	[233]
Gyroxin heterologous fibrin sealant under clinical evaluation	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Fibrinogen α -chain cleavage into fibrin	Used as a heterologous fibrin sealant in surgery, and in chronic venous ulcers	[234]
Viprinex [®] (Ancrod)	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	Fibrinogen α and β chains cleavage into fibrin degradation products	Treatment of acute ischemic stroke	[235]
Suling [®] (Hemocoagulase Agkistrodon)	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	Activation of prothrombin into thrombin, resulting in the conversion of fibrinogen into fibrin	Treatment of acute ischemic stroke	[236]
Protac [®]	<i>Agkistrodon contortrix</i>	Fast-acting protein C activator	Diagnostic of protein C pathway disorders, and assessment of the thrombosis risk	[151]
Ecarin	<i>Echis carinatus</i>	Activation of prothrombin into meizothrombin, followed by conversion of fibrinogen into fibrin	Diagnostic tool to detect thrombin and thrombin inhibitors	[237]
Russel's viper venom-Factor V (RVV-V)	<i>Daboia russelii</i>	Activation of factor V into factor Va, interfering with thrombin production	Diagnostic tool to evaluate the functionality of coagulation factors, used in diagnosis of activated protein C resistance	[238]
Russel's viper venom-Factor X (RVV-X)	<i>Daboia russelii</i>	Activation of factor X into factor Xa, interfering with thrombin production	Diagnostic tool to evaluate the functionality of coagulation factors, used in Lupus anticoagulant testing	[239]

Batroxobin, a thrombin-like serine protease obtained from *B. atrox* and *B. moojeni* snake venoms, is commercially available under several brand names, including Defibrase[®], Plateltex-ACT[®], Vivostat[®], and Reptilase[®]. Unlike thrombin, which physiologically cleaves both the α and β chains of fibrinogen and converts the FXIII into activated FXIIIa, resulting in the formation of crosslinked fibrin and clot, batroxobin selectively only cleaves the α chain of fibrinogen. This action generates fibrin that is less cross-linked compared with the fibrin produced by thrombin cleavage, interfering with the clotting process. Due to this mechanism of action, batroxobin is employed in a diverse range of applications, either as a stand-alone drug or in combination with other substances [229]. Defibrase[®], a commercial form of batroxobin, is clinically used to treat ischemia caused by vascular occlusive diseases [230]. Plateltex-ACT[®], which combines batroxobin and calcium gluconate, promotes the gelation of blood cells and is employed to accelerate tissue repair in a wide array of injuries and surgical procedures involving epithelial, muscular, bone, and cartilaginous tissues [231,232]. Similarly, a combination of batroxobin with citrate-treated autologous blood cells within the Vivostat[®] system is available for clinical use, resulting in an autologous fibrin sealant in medical and surgical applications to control bleeding [233]. Moreover, batroxobin serves as a valuable reagent in diagnostic tests, as exemplified by Reptilase[®]. The diagnostic test known as “Reptilase time with batroxobin” has been in use

for over five decades to evaluate hemostasis and blood coagulation, enabling the detection of abnormalities related to fibrinogen levels [240].

Gyroxin, another thrombin-like SVSP, has been purified from *Crotalus durissus terrificus* since 1988 [66] and has been extensively investigated ever since. Gyroxin cleaves the α -chain of fibrinogen, generating fibrin that polymerizes into a stable network. Owing to this characteristic, the potential of gyroxin as a heterologous fibrin sealant has been evaluated [234,241]. Promising results from Phase I and II clinical trials conducted in Brazil indicate its potential in the treatment of chronic venous ulcers [242].

Another therapeutically valuable serine protease is ancrod, which is purified from the venom of *Calloselasma rhodostoma* and consists of the active substance of the medicine Viprinex[®]. By cleaving both the α and β chains of fibrinogen into smaller fragments that are unable to form clots, the fibrinogenolytic activity of ancrod reduces serum fibrinogen levels, thus inhibiting blood clotting, lowering blood viscosity, and preventing platelet aggregation. Ancrod is employed in the treatment and management of conditions such as ischemic stroke and deep vein thrombosis [235].

Hemocoagulase Agkistrodon (HCA), the active component of Suling[®], is a thrombin-like enzyme derived from the *Agkistrodon acutus* venom. HCA activates prothrombin into thrombin, playing a crucial role in the conversion of fibrinogen into fibrin and promoting the formation of a stable blood clot. Approved in China for the treatment of acute ischemic stroke, HCA is known for its hemostatic efficacy and has been investigated as a valuable drug for reducing postoperative bleeding in patients undergoing cardiac or abdominal surgery [236,243,244].

SVSPs have significant importance in medical research, coagulation studies, and diseases diagnostics. Their specific substrate cleavage properties allow them to assess the coagulation status, monitor the presence of anticoagulants, and evaluate the functionality of various blood components, allowing for the differentiation of abnormalities in distinct coagulation factors. In this context, Protac[®], Ecarin, and Russel's Viper Venom Factors V (RVV-V) and X (RVV-X) exemplify the diverse applications of serine proteases as diagnostic tools.

Protac[®], a single-chain glycoprotein purified from *Agkistrodon contortrix*, consists of a fast-acting protein C (PC) activator. Unlike the PC activation promoted by thrombin, Protac[®]-induced PC activation does not require the presence of the cofactor thrombomodulin. Activated PC (APC) associates with the cofactor Protein S (PS), inactivating factors VIIIa and Va, thereby reducing thrombin formation. Given that the PC pathway is one of the most critical physiological anticoagulant mechanisms, the detection of congenital or acquired deficiencies in PC and PS, as well as APC resistance, is of great importance. In this context, Protac[®] is a valuable diagnostic tool and is also used to assess an individual risk of thrombosis through the detection of dysfunctional activity of the PC pathway [150,151].

Ecarin, one of the SVSPs used to monitor coagulation, is derived from *Echis carinatus*. Ecarin's mechanism of action involves the conversion of prothrombin into meizothrombin, consequently increasing fibrinogenolytic activity, fibrin production, and clot formation. Ecarin-based assays are employed for the detection and quantification of thrombin and thrombin inhibitors, gaining importance after the introduction of direct thrombin inhibitors for treating conditions such as deep vein thrombosis or pulmonary embolism [237].

Similarly, Russel's Viper Venom Factors V and X (RVV-V and RVV-X, respectively), are diagnostic tools used for coagulation assessments. Derived from *Daboia russelii* venom, they activate factors V (RVV-V) and X (RVV-X), leading to an increase in the conversion of prothrombin into thrombin and resulting in clot formation. The dilute Russell's venom time test (dRVVT) contains RVV-V and RVV-X and it is used to detect lupus anticoagulant (LA), one of the antiphospholipid antibodies usually associated with systemic lupus erythematosus. Owing to its high sensitivity in detecting LA, as well as its resistance to interference from inhibitors of FVIII or IX, the dRVVT has become a popular test for LA [239,245]. Furthermore, RVV-V is applied in the diagnosis of APC resistance caused by mutations on FV Leiden, a genetic mutation that increases the risk of venous thromboembolism.

6. Enzyme Acquisition

The use of venom serine proteases in the production of drugs, in the development of diagnostic tests, or in academic research, among other applications, requires the production of these enzymes at high levels of purity [5,246,247]. Traditionally, as seen in Table 5, serine proteases are obtained in their native and active forms directly from purchased or collected venom [100,248]. In these cases, the soluble and insoluble components of the venom are separated by centrifugation, and the soluble fraction (containing the proteins) is submitted to purification by chromatography [9].

Table 5. Purified venom serine proteases reported in the literature.

Origin	Expression System	Protein	Organism	Purification Method	Reference
Heterologous Expression	E. coli	rCC-PPP	Cerastes cerastes	IEC	[186]
		rGBV-PA	Gloydius brevicaudus	IMAC	[170]
				IEC	
	TSV-PA	Trimeresurus stejnegeri	SEC	[249]	
	K. phaffii	Albofibrase	Trimeresurus albolabris	IMAC	[250]
		Batroxobin	Bothrops moojeni	HIC	[251]
				AC	
		BpSP-II	Bothrops pauloensis	IMAC	[252]
		Collinein-1	Crotalus durissus	IEC	[253]
				RP-FPLC	
				IMAC	[254]
		IEC			
	Gloshedobin	Gloydius shedaoensis	IEC	[255]	
SEC					
HEK	Ancrod, Batroxobin, RVV-V	Calloselasma rhodostoma, Bothrops atrox, Daboia russelii	IMAC	[256]	
Venom Purification	ABUSV-Spase	Gloydius ussuriensis	IEC	[257]	
			SEC		
	Agkihpin	Gloydius halys	SEC	[83]	
	Bhalternin	Bothrops alternatus	IEC	[54]	
			SEC		
			AC		
			RP-HPLC		
	BjSP	Bothrops jararaca	SEC	[248]	
			IEC		
			RP-HPLC		
	BpSP-I	Bothrops pauloensis	IEC	[58]	
			HIC		
			RP-HPLC		
	BpSP-II	Bothrops pauloensis	IMAC	[252]	
	BpirSP27, BpirSP41	Bothrops pirajai	SEC	[77]	
AC					
RP-HPLC					

Table 5. Cont.

Origin	Expression System	Protein	Organism	Purification Method	Reference
		BpirSP-39	<i>Bothrops pirajai</i>	SEC AC RP-HPLC	[87]
		Collinein-1	<i>Crotalus durissus</i>	SEC IEC RP-FPLC	[253]
		Cotiarinase	<i>Bothrops cotiara</i>	SEC IEC	[19]
		Crotoxin	<i>Crotalus durissus</i>	SEC RP-HPLC	[183]
		Factor V activator	<i>Naja oxiana</i>	IEC	[34]
		Factor X activator	<i>Cerastes vipera</i>	SEC IEC	[29]
			<i>Ophiophagus hannah</i>	SEC IEC	[30]
			<i>Walterinnesia aegyptia</i>	RP-HPLC	[17]
		Horridum toxin	<i>Heloderma horridum</i>	SEC IEC	[247,258]
		Kallikrein-like	<i>Gloydius halys</i>	IEC AC RP-HPLC	[14]
		Kn-Ba	<i>Bitis arietans</i>	SEC	[100]
		Moojase	<i>Bothrops moojeni</i>	IEC RP-HPLC	[63]
		Rhinocerase	<i>Bitis rhinocerus</i>	LPIP SEC	[99]
		Rhombeobin	<i>Lachesis muta rhombeata</i>	RP-HPLC	[55]
		Protac [®]	<i>Agkistrodon contortrix</i>	IEC SEC	[259]
		RV-FVP	<i>Daboia russelii</i>	SEC IEC	[18]
		RVV-V	<i>Daboia siamensis</i>	SEC IEC RP-HPLC	[260]
		Tm-VIG	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	IEC SEC RP-HPLC	[146]
		VaaSP-VX	<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	SEC IEC	[30]

Table 5. Cont.

Origin	Expression System	Protein	Organism	Purification Method	Reference
		VLCTLP	<i>Macrovipera lebetina</i>	SEC IEC AC	[261]
		VLCV	<i>Macrovipera lebetina</i>	SEC IEC	
		VLFVA	<i>Macrovipera lebetina</i>	RP-HPLC SEC	
					[93]
					[39]

Another alternative to obtain serine proteases is to express them in a heterologous system, which can yield large amounts of protein without depending on the availability of the venom, with a lower risk of contamination by other venom components [255,262]. This approach also allows the insertion of fusion proteins or other amino acid residues into the protease that will aid in the expression, folding, and purification processes [255,263]. Serine protease genes can be obtained through cDNA libraries or through the cDNA obtained by the collection of transcriptomic data from the organism's venom gland [170,264]. These genes are then cloned into various types of vectors for expression in bacteria, yeast, and mammalian cells [262].

In most cases, the systems of heterologous expression chosen are bacteria and yeast (Table 5), specifically *Escherichia coli* and *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*), because they are known to produce large quantities of heterologous protein and are simpler to handle than mammalian cells [262]. However, the heterologous expression of venom serine proteases brings complications due to the presence of disulfide bonds and glycosylation in the native structure, causing insolubility problems—often caused by misfolding—and lowering the expression yield [256]. Difficulty in establishing disulfide bonds, which are common when expressing in *E. coli*, can lead to the appearance of inclusion bodies, making it necessary to include denaturation, dialysis, and renaturation steps in protein purification [186,263].

The expression of these enzymes in eukaryotic cells may be a solution to these problems, enabling glycosylation and the formation of disulfide bonds. However, in the case of *K. phaffii*, the glycosylation carried out has a different pattern from that found in the native enzyme, and yeasts tend to hyperglycosylate in such a way as to possibly affect enzyme activity [262]. Nevertheless, this effect was found to be minimal when Boldrini-França et al. [253] compared the activity of recombinant Collinein-1 (rCollinein-1) expressed in *K. phaffii* and native Collinein-1 purified directly from the venom. The action of both enzymes on fibrinogen chains, as well as on synthetic substrates, was similar. Specifically, in the degradation of synthetic substrates for thrombin and plasma kallikrein, the activity of the recombinant enzyme was slightly higher. In terms of enzyme kinetics, native collinein-1 showed greater affinity to the substrate, with a lower K_m value than that measured for the recombinant protease. Despite these small discrepancies, there was no significant difference between the native and recombinant enzymes in terms of substrate hydrolysis. This study shows the efficiency of the heterologous production of serine proteases from the venom in *K. phaffii*, since the difference between the enzymatic activity of the native enzyme and recombinant enzyme is not significant.

The expression system that produces recombinant enzymes most similar to native serine proteases is mammalian cells. They are capable of secreting the enzyme into the culture medium, like *K. phaffii*, facilitating the purification process by eliminating the cell lysis step [256,264]. The reason this system is not used as often is that, even though it allows for correct folding and post-translational modifications, the cell growth rate is low, and culturing them is difficult and expensive [262].

Despite advances in heterologous expression techniques, venom purification is still the most widely reported method in the literature and the method of choice for producing drugs containing venom serine proteases. The most significant example of this is the purification of baxotrobin from *Bothrops* snake venom to produce drugs, such as Defibrase[®], Plateltext-Act[®], and Vivostat[®] [246].

Regardless of their origin or destination, VSPs need to be separated from the other components present in the venom or in the cellular environment by a purification process, in which the highly efficient liquid chromatography techniques are often employed [265]. Generally, the first applied techniques separate the components of the sample by physicochemical characteristics, such as size/mass in size-exclusion chromatography (SEC) or protein surface charge in ion-exchange chromatography (IEC) [54,265]. Reversed-phase high-pressure liquid chromatography (RP-HPLC) is also widely used, mainly in the final stages of the process, as a refinement, or in single-step purifications [17,55,93].

To achieve high levels of purity, it is often necessary to combine several of these techniques due to the large number of protein components present in both the venom and the cells. Combinations may vary, but studies commonly depict a combination of less specific techniques, such as SEC and IEC, often followed by a technique with greater resolution, such as RP-HPLC [18,19,30,32,259,266]. Other combinations can be seen in Table 5.

7. Conclusions

Serine proteases found in reptile venoms are glycosylated enzymes capable of recognizing a wide range of biological substrates. They affect the prey's hemostatic system by cleaving critical targets in both the coagulation cascade and the kallikrein–kinin system, as well as by activating platelets. Except for prothrombin activators, which evolved from factor Xa, all other venom serine proteases (VSPs) originated from a salivary kallikrein co-optation event and underwent accelerated evolution. Their three-dimensional structures exhibit high similarity, indicating that the accelerated evolution primarily influenced surface loops responsible for substrate recognition, explaining the broad diversity of recognized substrates, despite high sequence similarity. The broad spectrum of substrates cleaved, particularly from Viperidae snake enzymes, positions them as valuable targets in biotechnology for modulating the hemostatic system, with many of these enzymes being currently employed in health treatments and diagnostic tools. Despite decades of research on these serine proteases, enzymes from toxicoferan lizards and colubrid snakes remain an underexplored potential source harboring promising molecules. In summary, the coevolution of toxicoferans and mammals have given VSPs from the formers unique characteristics that have permitted their exploitation in important medical applications in humans. Further studies of the VSPs have the potential to yield more precise and innovative information of substantial value.

Author Contributions: Conceptualization, J.F.D.V. and J.A.R.G.B.; Formal analysis, J.F.D.V., M.F.S., A.V.G., N.F.V., R.V.B., A.C.L.M. and J.A.R.G.B.; Funding acquisition, S.M.d.F. and J.A.R.G.B.; Project administration, J.F.D.V. and J.A.R.G.B.; Supervision, J.A.R.G.B.; Writing—original draft, J.F.D.V., M.F.S., A.V.G., N.F.V., R.V.B. and A.C.L.M.; Writing—review and editing, J.F.D.V., M.F.S., A.V.G., N.F.V., R.V.B., A.C.L.M., S.M.d.F. and J.A.R.G.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by CNPq grant number 422508/2021-7 and the APC was funded by University of Brasilia and CAPES.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: No new data were created or analyzed in this study. Data sharing is not applicable to this article.

Acknowledgments: We would like to formally express our gratitude to the very helpful inputs, surpassing usual contributions, provided by the reviewers.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Lu, Q.; Clemetson, J.M.; Clemetson, K.J. Snake Venoms and Hemostasis. *J. Thromb. Haemost.* **2005**, *3*, 1791–1799. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Vidal, N.; Hedges, S.B. The Phylogeny of Squamate Reptiles (Lizards, Snakes, and Amphisbaenians) Inferred from Nine Nuclear Protein-Coding Genes. *Comptes Rendus Biol.* **2005**, *328*, 1000–1008. [\[CrossRef\]](#)
- Fry, B.G.; Vidal, N.; Norman, J.A.; Vonk, F.J.; Scheib, H.; Ramjan, S.F.R.; Kuruppu, S.; Fung, K.; Hedges, S.B.; Richardson, M.K.; et al. Early Evolution of the Venom System in Lizards and Snakes. *Nature* **2006**, *439*, 584–588. [\[CrossRef\]](#)
- Fry, B.G.; Wroe, S.; Teeuwisse, W.; van Osch, M.J.P.; Moreno, K.; Ingle, J.; McHenry, C.; Ferrara, T.; Clausen, P.; Scheib, H.; et al. A Central Role for Venom in Predation by *Varanus komodoensis* (Komodo Dragon) and the Extinct Giant Varanus (*Megalanina*) Priscus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 8969–8974. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Serrano, S.M.T. The Long Road of Research on Snake Venom Serine Proteinases. *Toxicon* **2013**, *62*, 19–26. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Simões, T.R.; Pyron, R.A. The Squamate Tree of Life. *Bull. Mus. Comp. Zool.* **2021**, *163*, 47–95. [\[CrossRef\]](#)
- Hedstrom, L. Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4501–4524. [\[CrossRef\]](#)
- Rawlings, N.D.; Waller, M.; Barrett, A.J.; Bateman, A. MEROPS: The Database of Proteolytic Enzymes, Their Substrates and Inhibitors. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D503–D509. [\[CrossRef\]](#)
- Alagon, A.; Possani, L.D.; Smart, J.; Schleuning, W.D. Helodermatine, a Kallikrein-like, Hypotensive Enzyme from the Venom of *Heloderma horridum horridum* (Mexican Beaded Lizard). *J. Exp. Med.* **1986**, *164*, 1835–1845. [\[CrossRef\]](#)
- Utainscharoen, P.; Mackessy, S.P.; Miller, R.A.; Tu, A.T. Complete Primary Structure and Biochemical Properties of Gilatoxin, a Serine Protease with Kallikrein-like and Angiotensin-Degrading Activities. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 21975–21983. [\[CrossRef\]](#)
- Serrano, S.M.T.; Maroun, R.C. Snake Venom Serine Proteinases: Sequence Homology vs. Substrate Specificity, a Paradox to Be Solved. *Toxicon* **2005**, *45*, 1115–1132. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Almeida, D.D.; Viala, V.L.; Nachtigall, P.G.; Broe, M.; Gibbs, H.L.; Serrano, S.M.d.T.; Moura-da-Silva, A.M.; Ho, P.L.; Nishiyama-Jr, M.Y.; Junqueira-de-Azevedo, I.L.M. Tracking the Recruitment and Evolution of Snake Toxins Using the Evolutionary Context Provided by the *Bothrops jararaca* Genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*, e2015159118. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ullah, A.; Masood, R.; Ali, I.; Ullah, K.; Ali, H.; Akbar, H.; Betzel, C. Thrombin-like Enzymes from Snake Venom: Structural Characterization and Mechanism of Action. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *114*, 788–811. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Zhang, Y.; Xu, W.; Ma, B.; Huang, K.; Song, M.; Zhang, N.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Dai, Y.; Luo, Y. Isolation and Characterisation of a Kallikrein-like Enzyme from *Agkistrodon halys pallas* Snake Venom. *J. Sci. Food Agric.* **2012**, *92*, 1497–1503. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Marrakchi, N.; Zingali, R.B.; Karoui, H.; Bon, C.; el Ayeb, M. Cerastocytin, a New Thrombin-like Platelet Activator from the Venom of the Tunisian Viper *Cerastes cerastes*. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1244*, 147–156. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sanchez, E.F.; Felicori, L.F.; Chavez-Olortegui, C.; Magalhaes, H.B.P.; Hermogenes, A.L.; Diniz, M.V.; Junqueira-de-Azevedo, I.d.L.M.; Magalhaes, A.; Richardson, M. Biochemical Characterization and Molecular Cloning of a Plasminogen Activator Proteinase (LV-PA) from Bushmaster Snake Venom. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1760*, 1762–1771. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Khan, S.U.; Al-Saleh, S.S. Biochemical Characterization of a Factor X Activator Protein Purified from *Wallerinnesia aegyptia* Venom. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **2015**, *26*, 772–777. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Mukherjee, A.K. The Pro-Coagulant Fibrinolytic Serine Protease Isoenzymes Purified from *Daboia russelii russelii* Venom Coagulate the Blood through Factor V Activation: Role of Glycosylation on Enzymatic Activity. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e86823. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kitano, E.S.; Garcia, T.C.; Menezes, M.C.; Tashima, A.K.; Zelanis, A.; Serrano, S.M.T. Cotiarinase Is a Novel Prothrombin Activator from the Venom of *Bothrops* Cotiara. *Biochimie* **2013**, *95*, 1655–1659. [\[CrossRef\]](#)
- Murakami, M.T.; Arni, R.K. Crystallization and Preliminary X-Ray Crystallographic Studies of Protac, a Commercial Protein C Activator Isolated from *Agkistrodon contortrix contortrix* Venom. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1752*, 202–204. [\[CrossRef\]](#)
- Markland, F.S.; Kettner, C.; Schiffman, S.; Shaw, E.; Bajwa, S.S.; Reddy, K.N.; Kirakossian, H.; Patkos, G.B.; Theodor, I.; Pirkle, H. Kallikrein-like Activity of Crotalase, a Snake Venom Enzyme That Clots Fibrinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 1688–1692. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Matsui, T.; Fujimura, Y.; Titani, K. Snake Venom Proteases Affecting Hemostasis and Thrombosis. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1477*, 146–156. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sievers, F.; Higgins, D.G. Clustal Omega for Making Accurate Alignments of Many Protein Sequences. *Protein Sci.* **2018**, *27*, 135–145. [\[CrossRef\]](#)
- Robert, X.; Gouet, P. Deciphering Key Features in Protein Structures with the New ENDscript Server. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, W320–W324. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Brown, M.A.; Stenberg, L.M.; Stenflo, J. Chapter 642—Coagulation Factor Xa. In *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 3rd ed.; Rawlings, N.D., Salvesen, G., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2013; pp. 2908–2915. ISBN 978-0-12-382219-2.
- Hertzberg, M. Biochemistry of Factor X. *Blood Rev.* **1994**, *8*, 56–62. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

27. Grundy, J.E.; Lavigne, N.; Hirama, T.; MacKenzie, C.R.; Pryzdial, E.L. Binding of Plasminogen and Tissue Plasminogen Activator to Plasmin-Modulated Factor X and Factor Xa. *Biochemistry* **2001**, *40*, 6293–6302. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Tans, G.; Rosing, J. Snake Venom Activators of Factor X: An Overview. *Haemostasis* **2001**, *31*, 225–233. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Farid, T.; Nasser, H.; Zaki, K.; el-Asmar, M.F. Low Molecular Weight Factor X Activator from Cerastes Vipera (Sahara Sand Viper) Venom. *Toxicon* **1993**, *31*, 1007–1017. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Latinović, Z.; Leonardi, A.; Koh, C.Y.; Kini, R.M.; Trampuš Bakija, A.; Pungerčar, J.; Križaj, I. The Procoagulant Snake Venom Serine Protease Potentially Having a Dual, Blood Coagulation Factor V and X-Activating Activity. *Toxins* **2020**, *12*, 358. [\[CrossRef\]](#)
31. Zhang, Y.; Xiong, Y.L.; Bon, C. An Activator of Blood Coagulation Factor X from the Venom of *Bungarus fasciatus*. *Toxicon* **1995**, *33*, 1277–1288. [\[CrossRef\]](#)
32. Lee, W.H.; Zhang, Y.; Wang, W.Y.; Xiong, Y.L.; Gao, R. Isolation and Properties of a Blood Coagulation Factor X Activator from the Venom of King Cobra (*Ophiophagus hannah*). *Toxicon* **1995**, *33*, 1263–1276. [\[CrossRef\]](#)
33. Amiconi, G.; Amoresano, A.; Boumis, G.; Brancaccio, A.; De Cristofaro, R.; De Pascalis, A.; Di Girolamo, S.; Maras, B.; Scaloni, A. A Novel Venombin B from *Agkistrodon contortrix contortrix*: Evidence for Recognition Properties in the Surface around the Primary Specificity Pocket Different from Thrombin. *Biochemistry* **2000**, *39*, 10294–10308. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Gerads, I.; Tans, G.; Yukelson, L.; Zwaal, R.F.; Rosing, J. Activation of Bovine Factor V by an Activator Purified from the Venom of *Naja naja oxiana*. *Toxicon* **1992**, *30*, 1065–1079. [\[CrossRef\]](#)
35. Nakayama, D.; Ben Ammar, Y.; Miyata, T.; Takeda, S. Structural Basis of Coagulation Factor V Recognition for Cleavage by RVV-V. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 3020–3025. [\[CrossRef\]](#)
36. Marsh, N.; Williams, V. Practical Applications of Snake Venom Toxins in Haemostasis. *Toxicon* **2005**, *45*, 1171–1181. [\[CrossRef\]](#)
37. Tokunaga, F.; Nagasawa, K.; Tamura, S.; Miyata, T.; Iwanaga, S.; Kisiel, W. The Factor V-Activating Enzyme (RVV-V) from Russell's Viper Venom. Identification of Isoproteins RVV-V Alpha, -V Beta, and -V Gamma and Their Complete Amino Acid Sequences. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 17471–17481. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Rosing, J.; Govers-Riemslog, J.W.; Yukelson, L.; Tans, G. Factor V Activation and Inactivation by Venom Proteases. *Haemostasis* **2001**, *31*, 241–246. [\[CrossRef\]](#)
39. Siigur, E.; Samel, M.; Tõnismägi, K.; Subbi, J.; Reintamm, T.; Siigur, J. Isolation, Properties and N-Terminal Amino Acid Sequence of a Factor V Activator from *Vipera lebetina* (Levantine Viper) Snake Venom. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1429*, 239–248. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Rao, V.S.; Joseph, J.S.; Kini, R.M. Group D Prothrombin Activators from Snake Venom Are Structural Homologues of Mammalian Blood Coagulation Factor Xa. *Biochem. J.* **2003**, *369*, 635–642. [\[CrossRef\]](#)
41. Speijer, H.; Govers-Riemslog, J.W.; Zwaal, R.F.; Rosing, J. Prothrombin Activation by an Activator from the Venom of *Oxyuranus scutellatus* (Taipan Snake). *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 13258–13267. [\[CrossRef\]](#)
42. Stocker, K.; Hauer, H.; Müller, C.; Triplett, D.A. Isolation and Characterization of Textarin, a Prothrombin Activator from Eastern Brown Snake (*Pseudonaja textilis*) Venom. *Toxicon* **1994**, *32*, 1227–1236. [\[CrossRef\]](#)
43. Rao, V.S.; Kini, R.M. Pseutarin C, a Prothrombin Activator from *Pseudonaja textilis* Venom: Its Structural and Functional Similarity to Mammalian Coagulation Factor Xa-Va Complex. *Thromb. Haemost.* **2002**, *88*, 611–619. [\[CrossRef\]](#)
44. Joseph, J.S.; Chung, M.C.; Jeyaseelan, K.; Kini, R.M. Amino Acid Sequence of Trocarin, a Prothrombin Activator from *Tropidechis carinatus* Venom: Its Structural Similarity to Coagulation Factor Xa. *Blood* **1999**, *94*, 621–631. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Pan, H.; Du, X.; Yang, G.; Zhou, Y.; Wu, X. cDNA Cloning and Expression of Acutin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *255*, 412–415. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Wang, Y.M.; Wang, S.R.; Tsai, I.H. Serine Protease Isoforms of *Deinagkistrodon acutus* Venom: Cloning, Sequencing and Phylogenetic Analysis. *Biochem. J.* **2001**, *354*, 161–168. [\[CrossRef\]](#)
47. Huang, Q.Q.; Teng, M.K.; Niu, L.W. Purification and Characterization of Two Fibrinogen-Clotting Enzymes from Five-Pace Snake (*Agkistrodon acutus*) Venom. *Toxicon* **1999**, *37*, 999–1013. [\[CrossRef\]](#)
48. Tang, S.-S.; Wang, X.-H.; Zhang, J.-H.; Tang, B.-S.; Qian, L.; Li, P.-Y.; Luo, L.-W. Biochemical Properties and Comparative Pharmacology of a Coagulant from *Deinagkistrodon acutus* Snake Venom. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *49*, 90–98. [\[CrossRef\]](#)
49. Castro, H.C.; Zingali, R.B.; Albuquerque, M.G.; Pujol-Luz, M.; Rodrigues, C.R. Snake Venom Thrombin-like Enzymes: From Reptilase to Now. *Cell Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 843–856. [\[CrossRef\]](#)
50. Nolan, C.; Hall, L.S.; Barlow, G.H. Ancrod, the Coagulating Enzyme from Malayan Pit Viper (*Agkistrodon rhodostoma*) Venom. *Methods Enzymol.* **1976**, *45*, 205–213. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
51. Burkhart, W.; Smith, G.F.; Su, J.L.; Parikh, I.; LeVine, H. Amino Acid Sequence Determination of Ancrod, the Thrombin-like Alpha-Fibrinogenase from the Venom of *Akistrodon rhodostoma*. *FEBS Lett.* **1992**, *297*, 297–301. [\[CrossRef\]](#)
52. Stocker, K.; Barlow, G.H. The Coagulant Enzyme from Bothrops Atrox Venom (Batroxobin). *Methods Enzymol.* **1976**, *45*, 214–223. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Vu, T.T.; Stafford, A.R.; Leslie, B.A.; Kim, P.Y.; Fredenburgh, J.C.; Weitz, J.I. Batroxobin Binds Fibrin with Higher Affinity and Promotes Clot Expansion to a Greater Extent than Thrombin. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 16862–16871. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Costa, J.d.O.; Fonseca, K.C.; Mamede, C.C.N.; Beletti, M.E.; Santos-Filho, N.A.; Soares, A.M.; Arantes, E.C.; Hirayama, S.N.S.; Selistre-de-Araújo, H.S.; Fonseca, F.; et al. Bhalternin: Functional and Structural Characterization of a New Thrombin-like Enzyme from Bothrops Alternatus Snake Venom. *Toxicon* **2010**, *55*, 1365–1377. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

55. Torres-Huaco, F.D.; Werneck, C.C.; Vicente, C.P.; Vassequi-Silva, T.; Nery-Diez, A.C.C.; Mendes, C.B.; Antunes, E.; Marangoni, S.; Damico, D.C.S. Rapid Purification and Procoagulant and Platelet Aggregating Activities of Rhombeobin: A Thrombin-like/Gyroxin-like Enzyme from *Lachesis muta rhombeata* Snake Venom. *Biomed. Res. Int.* **2013**, *2013*, 903292. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Vivas-Ruiz, D.E.; Sandoval, G.A.; Mendoza, J.; Inga, R.R.; Gontijo, S.; Richardson, M.; Eble, J.A.; Yarleque, A.; Sanchez, E.F. Coagulant Thrombin-like Enzyme (Barnettobin) from *Bothrops barnetti* Venom: Molecular Sequence Analysis of Its cDNA and Biochemical Properties. *Biochimie* **2013**, *95*, 1476–1486. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Nishida, S.; Fujimura, Y.; Miura, S.; Ozaki, Y.; Usami, Y.; Suzuki, M.; Titani, K.; Yoshida, E.; Sugimoto, M.; Yoshioka, A. Purification and Characterization of Bothrombin, a Fibrinogen-Clotting Serine Protease from the Venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry* **1994**, *33*, 1843–1849. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Costa, F.L.S.; Rodrigues, R.S.; Izidoro, L.F.M.; Menaldo, D.L.; Hamaguchi, A.; Homs-Brandeburgo, M.I.; Fuly, A.L.; Soares, S.G.; Selistre-de-Araújo, H.S.; Barraviera, B.; et al. Biochemical and Functional Properties of a Thrombin-like Enzyme Isolated from *Bothrops pauloensis* Snake Venom. *Toxicon* **2009**, *54*, 725–735. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Hahn, B.S.; Yang, K.Y.; Park, E.M.; Chang, I.M.; Kim, Y.S. Purification and Molecular Cloning of Calobin, a Thrombin-like Enzyme from *Agkistrodon caliginosus* (Korean Viper). *J. Biochem.* **1996**, *119*, 835–843. [\[CrossRef\]](#)
60. Patiño, A.C.; Pereañez, J.A.; Gutiérrez, J.M.; Rucavado, A. Biochemical and Biological Characterization of Two Serine Proteinases from Colombian *Crotalus durissus cumanensis* Snake Venom. *Toxicon* **2013**, *63*, 32–43. [\[CrossRef\]](#)
61. Marrakchi, N.; Barbouche, R.; Guermazi, S.; Karoui, H.; Bon, C.; El Ayeb, M. Cerastotin, a Serine Protease from *Cerastes cerastes* Venom, with Platelet-Aggregating and Agglutinating Properties. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *247*, 121–128. [\[CrossRef\]](#)
62. Henschen-Edman, A.H.; Theodor, I.; Edwards, B.F.; Pirkle, H. Crotalase, a Fibrinogen-Clotting Snake Venom Enzyme: Primary Structure and Evidence for a Fibrinogen Recognition Exosite Different from Thrombin. *Thromb. Haemost.* **1999**, *81*, 81–86. [\[CrossRef\]](#)
63. Amorim, F.G.; Menaldo, D.L.; Carone, S.E.I.; Silva, T.A.; Sartim, M.A.; De Pauw, E.; Quinton, L.; Sampaio, S.V. New Insights on Moojase, a Thrombin-Like Serine Protease from *Bothrops moojeni* Snake Venom. *Toxins* **2018**, *10*, 500. [\[CrossRef\]](#)
64. Oyama, E.; Takahashi, H. Purification and Characterization of a Thrombin like Enzyme, Elegaxobin II, with Lys-Bradykinin Releasing Activity from the Venom of *Trimeresurus elegans* (Sakishima-Habu). *Toxicon* **2003**, *41*, 559–568. [\[CrossRef\]](#)
65. Yamamoto, C.; Tsuru, D.; Oda-Ueda, N.; Ohno, M.; Hattori, S.; Kim, S.-T. Flavoxobin, a Serine Protease from *Trimeresurus flavoviridis* (Habu Snake) Venom, Independently Cleaves Arg726-Ser727 of Human C3 and Acts as a Novel, Heterologous C3 Convertase. *Immunology* **2002**, *107*, 111–117. [\[CrossRef\]](#)
66. Alexander, G.; Grothusen, J.; Zepeda, H.; Schwartzman, R.J. Gyroxin, a Toxin from the Venom of *Crotalus durissus terrificus*, Is a Thrombin-like Enzyme. *Toxicon* **1988**, *26*, 953–960. [\[CrossRef\]](#)
67. Lu, Q.M.; Jin, Y.; Li, D.S.; Wang, W.Y.; Xiong, Y.L. Characterization of a Thrombin-like Enzyme from the Venom of *Trimeresurus jerdonii*. *Toxicon* **2000**, *38*, 1225–1236. [\[CrossRef\]](#)
68. Jin, Y.; Lu, Q.-M.; Chen, R.-Q.; Wu, J.-B.; Xiong, Y.-L. Molecular Characterization of a Weak Fibrinogen-Clotting Enzyme from *Trimeresurus jerdonii* Venom. *Toxicon* **2005**, *45*, 353–360. [\[CrossRef\]](#)
69. Serrano, S.M.; Hagiwara, Y.; Murayama, N.; Higuchi, S.; Mentele, R.; Sampaio, C.A.; Camargo, A.C.; Fink, E. Purification and Characterization of a Kinin-Releasing and Fibrinogen-Clotting Serine Proteinase (KN-BJ) from the Venom of *Bothrops jararaca*, and Molecular Cloning and Sequence Analysis of Its cDNA. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *251*, 845–853. [\[CrossRef\]](#)
70. Magalhães, A.; Magalhães, H.P.B.; Richardson, M.; Gontijo, S.; Ferreira, R.N.; Almeida, A.P.; Sanchez, E.F. Purification and Properties of a Coagulant Thrombin-like Enzyme from the Venom of *Bothrops leucurus*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **2007**, *146*, 565–575. [\[CrossRef\]](#)
71. Magalhaes, A.; Da Fonseca, B.C.; Diniz, C.R.; Gilroy, J.; Richardson, M. The Complete Amino Acid Sequence of a Thrombin-like Enzyme/Gyroxin Analogue from Venom of the Bushmaster Snake (*Lachesis muta muta*). *FEBS Lett.* **1993**, *329*, 116–120. [\[CrossRef\]](#)
72. Niewiarowski, S.; Kirby, E.P.; Brudzynski, T.M.; Stocker, K. Thrombocytin, a Serine Protease from *Bothrops Atrox* Venom. 2. Interaction with Platelets and Plasma-Clotting Factors. *Biochemistry* **1979**, *18*, 3570–3577. [\[CrossRef\]](#)
73. Kirby, E.P.; Niewiarowski, S.; Stocker, K.; Kettner, C.; Shaw, E.; Brudzynski, T.M. Thrombocytin, a Serine Protease from *Bothrops Atrox* Venom. 1. Purification and Characterization of the Enzyme. *Biochemistry* **1979**, *18*, 3564–3570. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Laraba-Djebbari, F.; Martin-Eauclaire, M.F.; Marchot, P. A Fibrinogen-Clotting Serine Proteinase from *Cerastes cerastes* (Horned Viper) Venom with Arginine-Esterase and Amidase Activities. Purification, Characterization and Kinetic Parameter Determination. *Toxicon* **1992**, *30*, 1399–1410. [\[CrossRef\]](#)
75. Matsui, T.; Sakurai, Y.; Fujimura, Y.; Hayashi, I.; Oh-Ishi, S.; Suzuki, M.; Hamako, J.; Yamamoto, Y.; Yamazaki, J.; Kinoshita, M.; et al. Purification and Amino Acid Sequence of Halystase from Snake Venom of *Agkistrodon halys* Blomhoffii, a Serine Protease That Cleaves Specifically Fibrinogen and Kininogen. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *252*, 569–575. [\[CrossRef\]](#)
76. Guo, Y.W.; Chang, T.Y.; Lin, K.T.; Liu, H.W.; Shih, K.C.; Cheng, S.H. Cloning and Functional Expression of the Mucrosobin Protein, a Beta-Fibrinogenase of *Trimeresurus mucrosquamatus* (Taiwan Habu). *Protein Expr. Purif.* **2001**, *23*, 483–490. [\[CrossRef\]](#)
77. Menaldo, D.L.; Bernardes, C.P.; Santos-Filho, N.A.; Moura, L.d.A.; Fuly, A.L.; Arantes, E.C.; Sampaio, S.V. Biochemical Characterization and Comparative Analysis of Two Distinct Serine Proteases from *Bothrops pirajai* Snake Venom. *Biochimie* **2012**, *94*, 2545–2558. [\[CrossRef\]](#)

78. Silva-Junior, F.P.; Guedes, H.L.M.; Garvey, L.C.; Aguiar, A.S.; Bourguignon, S.C.; Di Cera, E.; Giovanni-De-Simone, S. BJ-48, a Novel Thrombin-like Enzyme from the *Bothrops jararacussu* Venom with High Selectivity for Arg over Lys in P1: Role of N-Glycosylation in Thermostability and Active Site Accessibility. *Toxicon* **2007**, *50*, 18–31. [\[CrossRef\]](#)
79. Guedes, H.L.M.; Silva, F.P.; Netto, C.C.; de Salles, C.M.C.; Alexandre, G.; Oliveira, C.L.P.; Torriani, I.; De Simone, S.G. Structural Characterization and Low-Resolution Model of BJ-48, a Thrombin-like Enzyme from *Bothrops jararacussu* Venom. *Biophys. Chem.* **2008**, *132*, 159–164. [\[CrossRef\]](#)
80. Lee, J.W.; Seu, J.H.; Rhee, I.K.; Jin, I.; Kawamura, Y.; Park, W. Purification and Characterization of Brevinase, a Heterogeneous Two-Chain Fibrinolytic Enzyme from the Venom of Korean Snake, *Agkistrodon blomhoffii brevicaudus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *260*, 665–670. [\[CrossRef\]](#)
81. Fan, C.Y.; Qian, Y.C.; Yang, S.L.; Gong, Y. Cloning, Sequence Analysis and Expression in E. Coli of the cDNA of the Thrombin-like Enzyme (Pallabin) from the Venom of *Agkistrodon halys pallas*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1999**, *47*, 217–225. [\[CrossRef\]](#)
82. Laraba-Djebari, F.; Martin-Eauclaire, M.F.; Mauco, G.; Marchot, P. Afaâcytin, an Alpha Beta-Fibrinogenase from *Cerastes cerastes* (Horned Viper) Venom, Activates Purified Factor X and Induces Serotonin Release from Human Blood Platelets. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *233*, 756–765. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
83. Xie, H.; Huang, M.; Hu, Q.; Sun, K.; Wu, H.; Shu, W.; Li, X.; Fang, L. Agkihpin, a Novel SVTLE from *Gloydius halys pallas*, Promotes Platelet Aggregation In Vitro and Inhibits Thrombus Formation In Vivo in Murine Models of Thrombosis. *Toxicon* **2016**, *122*, 78–88. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
84. Komori, Y.; Nikai, T.; Ohara, A.; Yagihashi, S.; Sugihara, H. Effect of Bilineobin, a Thrombin-like Proteinase from the Venom of Common Cantil (*Agkistrodon bilineatus*). *Toxicon* **1993**, *31*, 257–270. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
85. Nikai, T.; Ohara, A.; Komori, Y.; Fox, J.W.; Sugihara, H. Primary Structure of a Coagulant Enzyme, Bilineobin, from *Agkistrodon bilineatus* Venom. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *318*, 89–96. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
86. de Oliveira, F.; de Sousa, B.B.; Mamede, C.C.N.; de Moraes, N.C.G.; de Queiroz, M.R.; da Cunha Pereira, D.F.; Matias, M.S.; Homi Brandeburgo, M.I. Biochemical and Functional Characterization of BmoosP, a New Serine Protease from *Bothrops moojeni* Snake Venom. *Toxicon* **2016**, *111*, 130–138. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
87. Zaqueo, K.D.; Kayano, A.M.; Simões-Silva, R.; Moreira-Dill, L.S.; Fernandes, C.F.C.; Fuly, A.L.; Maltarollo, V.G.; Honório, K.M.; da Silva, S.L.; Acosta, G.; et al. Isolation and Biochemical Characterization of a New Thrombin-like Serine Protease from *Bothrops pirajai* Snake Venom. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 595186. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
88. Zaganelli, G.L.; Zaganelli, M.G.; Magalhães, A.; Diniz, C.R.; de Lima, M.E. Purification and Characterization of a Fibrinogen-Clotting Enzyme from the Venom of Jararacuçu (*Bothrops jararacussu*). *Toxicon* **1996**, *34*, 807–819. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
89. Pirkle, H.; Theodor, I.; Miyada, D.; Simmons, G. Thrombin-like Enzyme from the Venom of Bitis Gabonica. Purification, Properties, and Coagulant Actions. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 8830–8835. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
90. Mukherjee, A.K.; Mackessy, S.P. Biochemical and Pharmacological Properties of a New Thrombin-like Serine Protease (Russelobin) from the Venom of Russell's Viper (*Daboia russelii russelii*) and Assessment of Its Therapeutic Potential. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830*, 3476–3488. [\[CrossRef\]](#)
91. Farid, T.M.; Tu, A.T.; el-Asmar, M.F. Characterization of Cerastobin, a Thrombin-like Enzyme from the Venom of *Cerastes vipera* (Sahara Sand Viper). *Biochemistry* **1989**, *28*, 371–377. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
92. Bortoleto, R.K.; Murakami, M.T.; Watanabe, L.; Soares, A.M.; Arni, R.K. Purification, Characterization and Crystallization of Jararacussin-I, a Fibrinogen-Clotting Enzyme Isolated from the Venom of *Bothrops jararacussu*. *Toxicon* **2002**, *40*, 1307–1312. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
93. Kadi-Saci, A.; Laraba-Djebari, F. Purification and Characterization of a Thrombin-like Enzyme Isolated from *Vipera lebetina* Venom: Its Interaction with Platelet Receptor. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **2020**, *31*, 1–10. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
94. Amel, K.-S.; Fatima, L.-D. Purification and Characterization of a New Serine Protease (VLCII) Isolated from *Vipera lebetina* Venom: Its Role in Hemostasis. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2015**, *29*, 388–397. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
95. Kogan, A.E.; Bashkov, G.V.; Bobruskin, I.D.; Romanova, E.P.; Makarov, V.A.; Strukova, S.M. Protein C Activator from the Venom of *Agkistrodon blomhoffii ussuriensis* Retards Thrombus Formation in the Arterio-Venous Shunt in Rats. *Thromb. Res.* **1993**, *70*, 385–393. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
96. Bakker, H.M.; Tans, G.; Yukelson, L.Y.; Janssen-Claessen, T.W.; Bertina, R.M.; Hemker, H.C.; Rosing, J. Protein C Activation by an Activator Purified from the Venom of *Agkistrodon halys halys*. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **1993**, *4*, 605–614. [\[CrossRef\]](#)
97. Klein, J.D.; Walker, F.J. Purification of a Protein C Activator from the Venom of the Southern Copperhead Snake (*Agkistrodon contortrix contortrix*). *Biochemistry* **1986**, *25*, 4175–4179. [\[CrossRef\]](#)
98. Nakagaki, T.; Kazim, A.L.; Kisiel, W. Isolation and Characterization of a Protein C Activator from Tropical Moccasin Venom. *Thromb. Res.* **1990**, *58*, 593–602. [\[CrossRef\]](#)
99. He, J.; Chen, S.; Gu, J. Identification and Characterization of Harobin, a Novel Fibrino(Geno)Lytic Serine Protease from a Sea Snake (*Lapemis hardwickii*). *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 2965–2973. [\[CrossRef\]](#)
100. Megale, Â.A.A.; Magnoli, F.C.; Kuniyoshi, A.K.; Iwai, L.K.; Tambourgi, D.V.; Portaro, F.C.V.; da Silva, W.D. Kn-Ba: A Novel Serine Protease Isolated from Bitis Arietans Snake Venom with Fibrinogenolytic and Kinin-Releasing Activities. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* **2018**, *24*, 38. [\[CrossRef\]](#)
101. Felicori, L.F.; Souza, C.T.; Velarde, D.T.; Magalhaes, A.; Almeida, A.P.; Figueiredo, S.; Richardson, M.; Diniz, C.R.; Sanchez, E.F. Kallikrein-like Proteinase from Bushmaster Snake Venom. *Protein Expr. Purif.* **2003**, *30*, 32–42. [\[CrossRef\]](#)

102. Vaiyapuri, S.; Harrison, R.A.; Bicknell, A.B.; Gibbins, J.M.; Hutchinson, G. Purification and Functional Characterisation of Rhinocerase, a Novel Serine Protease from the Venom of *Bitis gabonica rhinoceros*. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e9687. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
103. Hung, C.C.; Chiou, S.H. Fibrinogenolytic Proteases Isolated from the Snake Venom of Taiwan Habu: Serine Proteases with Kallikrein-like and Angiotensin-Degrading Activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *281*, 1012–1018. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
104. Hendon, R.A.; Tu, A.T. Biochemical Characterization of the Lizard Toxin Gilatoxin. *Biochemistry* **1981**, *20*, 3517–3522. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
105. Zhang, Y.; Wisner, A.; Xiong, Y.; Bon, C. A Novel Plasminogen Activator from Snake Venom. Purification, Characterization, and Molecular Cloning. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 10246–10255. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
106. Sanchez, E.F.; Santos, C.I.; Magalhaes, A.; Diniz, C.R.; Figueiredo, S.; Gilroy, J.; Richardson, M. Isolation of a Proteinase with Plasminogen-Activating Activity from *Lachesis muta muta* (Bushmaster) Snake Venom. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *378*, 131–141. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
107. Park, D.; Kim, H.; Chung, K.; Kim, D.S.; Yun, Y. Expression and Characterization of a Novel Plasminogen Activator from *Agkistrodon halys* Venom. *Toxicon* **1998**, *36*, 1807–1819. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
108. Schmaier, A.H.; Colman, R.W. Crotalocytin: Characterization of the Timber Rattlesnake Platelet Activating Protein. *Blood* **1980**, *56*, 1020–1028. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
109. Serrano, S.M.; Mentele, R.; Sampaio, C.A.; Fink, E. Purification, Characterization, and Amino Acid Sequence of a Serine Proteinase, PA-BJ, with Platelet-Aggregating Activity from the Venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry* **1995**, *34*, 7186–7193. [\[CrossRef\]](#)
110. Serrano, S.M.; Matos, M.F.; Mandelbaum, F.R.; Sampaio, C.A. Basic Proteinases from *Bothrops moojeni* (Caissaca) Venom—I. Isolation and Activity of Two Serine Proteinases, MSP 1 and MSP 2, on Synthetic Substrates and on Platelet Aggregation. *Toxicon* **1993**, *31*, 471–481. [\[CrossRef\]](#)
111. Hill-Eubanks, D.C.; Parker, C.G.; Lollar, P. Differential Proteolytic Activation of Factor VIII-von Willebrand Factor Complex by Thrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 6508–6512. [\[CrossRef\]](#)
112. Niewiarowski, S.; Kirby, E.P.; Stocker, K. Throbocytin-a Novel Platelet Activating Enzyme from *Bothrops Atrox* Venom. *Thromb. Res.* **1977**, *10*, 863–869. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
113. Monkovic, D.D.; Tracy, P.B. Activation of Human Factor V by Factor Xa and Thrombin. *Biochemistry* **1990**, *29*, 1118–1128. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
114. Ruben, E.A.; Rau, M.J.; Fitzpatrick, J.A.J.; Di Cera, E. Cryo-EM Structures of Human Coagulation Factors V and Va. *Blood* **2021**, *137*, 3137–3144. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
115. Carlisle, T.L.; Bock, P.E.; Jackson, C.M. Kinetic Intermediates in Prothrombin Activation. Bovine Prethrombin 1 Conversion to Thrombin by Factor X. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 22044–22055. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
116. Rosing, J.; Zwaal, R.F.; Tans, G. Formation of Meizothrombin as Intermediate in Factor Xa-Catalyzed Prothrombin Activation. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 4224–4228. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
117. Tans, G.; Janssen-Claessen, T.; Hemker, H.C.; Zwaal, R.F.; Rosing, J. Meizothrombin Formation during Factor Xa-Catalyzed Prothrombin Activation. Formation in a Purified System and in Plasma. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 21864–21873. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
118. Tijburg, P.N.; van Heerde, W.L.; Leenhouts, H.M.; Hessing, M.; Bouma, B.N.; de Groot, P.G. Formation of Meizothrombin as Intermediate in Factor Xa-Catalyzed Prothrombin Activation on Endothelial Cells. The Influence of Thrombin on the Reaction Mechanism. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 4017–4022. [\[CrossRef\]](#)
119. Rosing, J.; Tans, G. Structural and Functional Properties of Snake Venom Prothrombin Activators. *Toxicon* **1992**, *30*, 1515–1527. [\[CrossRef\]](#)
120. Manjunatha Kini, R.; Morita, T.; Rosing, J. Registry of Exogenous Hemostatic Factors of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis Classification and Nomenclature of Prothrombin Activators Isolated from Snake Venoms. *Thromb. Haemost.* **2001**, *86*, 710–711. [\[CrossRef\]](#)
121. Yamada, D.; Sekiya, F.; Morita, T. Isolation and Characterization of Carinactivase, a Novel Prothrombin Activator in *Echis carinatus* Venom with a Unique Catalytic Mechanism. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 5200–5207. [\[CrossRef\]](#)
122. Schieck, A.; Habermann, E.; Kornalik, F. The Prothrombin-Activating Principle from *Echis carinatus* Venom. II. Coagulation Studies in Vitro and in Vivo. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1972**, *274*, 7–17. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
123. Petrovan, R.J.; Govers-Riemslog, J.W.; Nowak, G.; Hemker, H.C.; Rosing, J.; Tans, G. Purification and Characterization of Multisquamase, the Prothrombin Activator Present in *Echis Multisquamatus* Venom. *Thromb. Res.* **1997**, *88*, 309–316. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
124. Walker, F.J.; Owen, W.G.; Esmon, C.T. Characterization of the Prothrombin Activator from the Venom of *Oxyuranus scutellatus* (Taipan Venom). *Biochemistry* **1980**, *19*, 1020–1023. [\[CrossRef\]](#)
125. Rao, V.S.; Swarup, S.; Manjunatha Kini, R. The Catalytic Subunit of Pseutarin C, a Group C Prothrombin Activator from the Venom of *Pseudonaja textilis*, Is Structurally Similar to Mammalian Blood Coagulation Factor Xa. *Thromb. Haemost.* **2004**, *92*, 509–521. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
126. Joseph, J.S.; Kini, R.M. Snake Venom Prothrombin Activators Homologous to Blood Coagulation Factor Xa. *Haemostasis* **2001**, *31*, 234–240. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
127. Kini, R.M. The Intriguing World of Prothrombin Activators from Snake Venom. *Toxicon* **2005**, *45*, 1133–1145. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
128. Rao, V.S.; Swarup, S.; Kini, R.M. The Nonenzymatic Subunit of Pseutarin C, a Prothrombin Activator from Eastern Brown Snake (*Pseudonaja textilis*) Venom, Shows Structural Similarity to Mammalian Coagulation Factor V. *Blood* **2003**, *102*, 1347–1354. [\[CrossRef\]](#)

129. Masci, P.P.; Whitaker, A.N.; de Jersey, J. Purification and Characterization of a Prothrombin Activator from the Venom of the Australian Brown Snake, *Pseudonaja textilis textilis*. *Biochem. Int.* **1988**, *17*, 825–835. [\[PubMed\]](#)
130. Lang, F. (Ed.) Activated Protein C Resistance. In *Encyclopedia of Molecular Mechanisms of Disease*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2009; p. 29. ISBN 978-3-540-29676-8.
131. van der Neut Kolfschoten, M.; Dirven, R.J.; Vos, H.L.; Tans, G.; Rosing, J.; Bertina, R.M. Factor Va Is Inactivated by Activated Protein C in the Absence of Cleavage Sites at Arg-306, Arg-506, and Arg-679. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 6567–6575. [\[CrossRef\]](#)
132. Furie, B. Pathogenesis of Thrombosis. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2009**, *2009*, 255–258. [\[CrossRef\]](#)
133. Wolberg, A.S. Thrombin Generation and Fibrin Clot Structure. *Blood Rev.* **2007**, *21*, 131–142. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
134. Chapin, J.C.; Hajjar, K.A. Fibrinolysis and the Control of Blood Coagulation. *Blood Rev.* **2015**, *29*, 17–24. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
135. Bagoly, Z.; Koncz, Z.; Hársfalvi, J.; Muszbek, L. Factor XIII, Clot Structure, Thrombosis. *Thromb. Res.* **2012**, *129*, 382–387. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
136. Narayanan, S. Multifunctional Roles of Thrombin. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **1999**, *29*, 275–280. [\[PubMed\]](#)
137. Al-Amer, O.M. The Role of Thrombin in Haemostasis. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **2022**, *33*, 145–148. [\[CrossRef\]](#)
138. Narayanan, S.; Hamasaki, N. Current Concepts of Coagulation and Fibrinolysis. *Adv. Clin. Chem.* **1998**, *33*, 133–168. [\[CrossRef\]](#)
139. Rezaie, A.R. Regulation of the Protein C Anticoagulant and Antiinflammatory Pathways. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 2059–2069. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
140. Pradnawit, P.; Rojnuckarin, P. Snake Venom Thrombin-like Enzymes. *Toxin Rev.* **2014**, *33*, 16–22. [\[CrossRef\]](#)
141. Phillips, D.J.; Swenson, S.D.; Markland, F.S. Thrombin-like Snake Venom Proteinases. In *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2010; pp. 139–154.
142. Mackessy, S.P. Thrombin-Like Enzymes in Snake Venoms. In *Toxins and Hemostasis: From Bench to Bedside*; Kini, R.M., Clemetson, K.J., Markland, F.S., McLane, M.A., Morita, T., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2010; pp. 519–557. ISBN 978-90-481-9295-3.
143. Markland, F.S. Snake Venoms and the Hemostatic System. *Toxicon* **1998**, *36*, 1749–1800. [\[CrossRef\]](#)
144. Soares, S.G.; Oliveira, L.L. Venom-Sweet-Venom: N-Linked Glycosylation in Snake Venom Toxins. *Protein Pept. Lett.* **2009**, *16*, 913–919. [\[CrossRef\]](#)
145. Huang, K.; Zhao, W.; Gao, Y.; Wei, W.; Teng, M.; Niu, L. Structure of Saxthrombin, a Thrombin-like Enzyme from *Gloydius saxatilis*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2011**, *67*, 862–865. [\[CrossRef\]](#)
146. Hung, C.C.; Huang, K.F.; Chiou, S.H. Characterization of One Novel Venom Protease with Beta-Fibrinogenase Activity from the Taiwan Habu (*Trimeresurus mucrosquamatus*): Purification and cDNA Sequence Analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *205*, 1707–1715. [\[CrossRef\]](#)
147. Stenflo, J. A New Vitamin K-Dependent Protein. Purification from Bovine Plasma and Preliminary Characterization. *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 355–363. [\[CrossRef\]](#)
148. Marlar, R.A.; Kleiss, A.J.; Griffin, J.H. Mechanism of Action of Human Activated Protein C, a Thrombin-Dependent Anticoagulant Enzyme. *Blood* **1982**, *59*, 1067–1072. [\[CrossRef\]](#)
149. Esmon, N.L.; DeBault, L.E.; Esmon, C.T. Proteolytic Formation and Properties of Gamma-Carboxyglutamic Acid-Domainless Protein C. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 5548–5553. [\[CrossRef\]](#)
150. Asmat, A.; Ramzan, F. Venom Protein C Activators as Diagnostic Agents for Defects of Protein C System. *Protein Pept. Lett.* **2018**, *25*, 643–651. [\[CrossRef\]](#)
151. Gempeler-Messina, P.M.; Volz, K.; Bühler, B.; Müller, C. Protein C Activators from Snake Venoms and Their Diagnostic Use. *Haemostasis* **2001**, *31*, 266–272. [\[CrossRef\]](#)
152. Gale, A.J.; Heeb, M.J.; Griffin, J.H. The Autolysis Loop of Activated Protein C Interacts with Factor Va and Differentiates between the Arg506 and Arg306 Cleavage Sites. *Blood* **2000**, *96*, 585–593. [\[CrossRef\]](#)
153. Gale, A.J.; Cramer, T.J.; Rozenshteyn, D.; Cruz, J.R. Detailed Mechanisms of the Inactivation of Factor VIIIa by Activated Protein C in the Presence of Its Cofactors, Protein S and Factor V. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 16355–16362. [\[CrossRef\]](#)
154. Kini, R.M. Anticoagulant Proteins from Snake Venoms: Structure, Function and Mechanism. *Biochem. J.* **2006**, *397*, 377–387. [\[CrossRef\]](#)
155. Kogan, A.E.; Makarov, A.N.; Bobruskin, I.D.; Strukova, S.M. Comparative Study of Protein C Activators from the Agkistrodon Snake Venoms. *Thromb. Res.* **1991**, *62*, 775–780. [\[CrossRef\]](#)
156. Golias, C.; Charalabopoulos, A.; Stagikas, D.; Charalabopoulos, K.; Batistatou, A. The Kinin System—Bradykinin: Biological Effects and Clinical Implications. Multiple Role of the Kinin System—Bradykinin. *Hippokratia* **2007**, *11*, 124–128.
157. Soares de Moura, R.; Resende, A.C.; Emiliano, A.F.; Tano, T.; Mendes-Ribeiro, A.C.; Correia, M.L.G.; de Carvalho, L.C.R.M. The Role of Bradykinin, AT2 and Angiotensin 1-7 Receptors in the EDRF-Dependent Vasodilator Effect of Angiotensin II on the Isolated Mesenteric Vascular Bed of the Rat. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *141*, 860–866. [\[CrossRef\]](#)
158. Péterfi, O.; Boda, F.; Szabó, Z.; Ferencz, E.; Bába, L. Hypotensive Snake Venom Components-A Mini-Review. *Molecules* **2019**, *24*, 2778. [\[CrossRef\]](#)
159. Pinheiro-Júnior, E.L.; Boldrini-França, J.; de Campos Araújo, L.M.P.; Santos-Filho, N.A.; Bendhack, L.M.; Cilli, E.M.; Arantes, E.C. LmrBPP9: A Synthetic Bradykinin-Potentiating Peptide from *Lachesis muta rhombeata* Venom That Inhibits the Angiotensin-Converting Enzyme Activity in Vitro and Reduces the Blood Pressure of Hypertensive Rats. *Peptides* **2018**, *102*, 1–7. [\[CrossRef\]](#)
160. Collen, D.; Lijnen, H.R. Basic and Clinical Aspects of Fibrinolysis and Thrombolysis. *Blood* **1991**, *78*, 3114–3124. [\[CrossRef\]](#)

161. Carmeliet, P.; Collen, D. Gene Targeting and Gene Transfer Studies of the Plasminogen/Plasmin System: Implications in Thrombosis, Hemostasis, Neointima Formation, and Atherosclerosis. *FASEB J.* **1995**, *9*, 934–938. [\[CrossRef\]](#)
162. Lijnen, H.R.; Collen, D. Matrix Metalloproteinase System Deficiencies and Matrix Degradation. *Thromb. Haemost.* **1999**, *82*, 837–845. [\[CrossRef\]](#)
163. Pepper, M.S. Extracellular Proteolysis and Angiogenesis. *Thromb. Haemost.* **2001**, *86*, 346–355. [\[CrossRef\]](#)
164. Fay, W.P.; Garg, N.; Sunkar, M. Vascular Functions of the Plasminogen Activation System. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2007**, *27*, 1231–1237. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
165. Myöhänen, H.; Vaheri, A. Regulation and Interactions in the Activation of Cell-Associated Plasminogen. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 2840–2858. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
166. Cesarman-Maus, G.; Hajjar, K.A. Molecular Mechanisms of Fibrinolysis. *Br. J. Haematol.* **2005**, *129*, 307–321. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
167. Plow, E.; Ploplis, V.; Carmeliet, P.; Collen, D. Plasminogen and Cell Migration in Vivo. *Fibrinolysis Proteolysis* **1999**, *13*, 49–53. [\[CrossRef\]](#)
168. Miles, L.A.; Hawley, S.B.; Baik, N.; Andronicos, N.M.; Castellino, F.J.; Parmer, R.J. Plasminogen Receptors: The Sine qua Non of Cell Surface Plasminogen Activation. *Front. Biosci.* **2005**, *10*, 1754–1762.
169. Fay, W.P. Plasminogen Activator Inhibitor 1, Fibrin, and the Vascular Response to Injury. *Trends Cardiovasc. Med.* **2004**, *14*, 196–202. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
170. Zhang, J.; Meng, W.; Wang, C.; Wu, Z.; Wu, G.; Xu, Y. Expression, Purification and Characterization of Recombinant Plasminogen Activator from Gloydus Brevicaudus Venom in Escherichia Coli. *Protein Expr. Purif.* **2013**, *91*, 85–90. [\[CrossRef\]](#)
171. Hermogenes, A.L.; Richardson, M.; Magalhaes, A.; Yarleque, A.; Rodriguez, E.; Sanchez, E.F. Interaction of a Plasminogen Activator Proteinase, LV-PA with Human Alpha2-Macroglobulin. *Toxicon* **2006**, *47*, 490–494. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
172. Sajevis, T.; Leonardi, A.; Križaj, I. Haemostatically Active Proteins in Snake Venoms. *Toxicon* **2011**, *57*, 627–645. [\[CrossRef\]](#)
173. Garraud, O.; Hamzeh-Cognasse, H.; Cognasse, F. Platelets and Cytokines: How and Why? *Transfus. Clin. Biol.* **2012**, *19*, 104–108. [\[CrossRef\]](#)
174. Ghoshal, K.; Bhattacharyya, M. Overview of Platelet Physiology: Its Hemostatic and Nonhemostatic Role in Disease Pathogenesis. *Sci. World J.* **2014**, *2014*, 781857. [\[CrossRef\]](#)
175. Freynhofer, M.K.; Gruber, S.C.; Grove, E.L.; Weiss, T.W.; Wojta, J.; Huber, K. Antiplatelet Drugs in Patients with Enhanced Platelet Turnover: Biomarkers versus Platelet Function Testing. *Thromb. Haemost.* **2015**, *114*, 459–468. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
176. Thomas, M.R.; Storey, R.F. The Role of Platelets in Inflammation. *Thromb. Haemost.* **2015**, *114*, 449–458. [\[CrossRef\]](#)
177. Yun, S.-H.; Sim, E.-H.; Goh, R.-Y.; Park, J.-I.; Han, J.-Y. Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. *Biomed. Res. Int.* **2016**, *2016*, 9060143. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
178. Jennings, L.K. Mechanisms of Platelet Activation: Need for New Strategies to Protect against Platelet-Mediated Atherothrombosis. *Thromb. Haemost.* **2009**, *102*, 248–257. [\[CrossRef\]](#)
179. Estevez, B.; Du, X. New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. *Physiology* **2017**, *32*, 162–177. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
180. Clemetson, K.J. Platelets and Primary Haemostasis. *Thromb. Res.* **2012**, *129*, 220–224. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
181. Ozaki, Y.; Suzuki-Inoue, K.; Inoue, O. Platelet Receptors Activated via Multimerization: Glycoprotein VI, GPIb-IX-V, and CLEC-2. *J. Thromb. Haemost.* **2013**, *11* (Suppl. S1), 330–339. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
182. Herter, J.M.; Rossaint, J.; Zarbock, A. Platelets in Inflammation and Immunity. *J. Thromb. Haemost.* **2014**, *12*, 1764–1775. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
183. Fonseca, F.V.; Antunes, E.; Morganti, R.P.; Monteiro, H.S.A.; Martins, A.M.C.; Toyama, D.O.; Marangoni, S.; Toyama, M.H. Characterization of a New Platelet Aggregating Factor from Crotoxin *Crotalus durissus cascavella* Venom. *Protein J.* **2006**, *25*, 183–192. [\[CrossRef\]](#)
184. Stegner, D.; Nieswandt, B. Platelet Receptor Signaling in Thrombus Formation. *J. Mol. Med.* **2011**, *89*, 109–121. [\[CrossRef\]](#)
185. Teng, C.M.; Ko, F.N. Comparison of the Platelet Aggregation Induced by Three Thrombin-like Enzymes of Snake Venoms and Thrombin. *Thromb. Haemost.* **1988**, *59*, 304–309. [\[CrossRef\]](#)
186. Dekhil, H.; Wisner, A.; Marrakchi, N.; El Ayeb, M.; Bon, C.; Karoui, H. Molecular Cloning and Expression of a Functional Snake Venom Serine Proteinase, with Platelet Aggregating Activity, from the *Cerastes cerastes* Viper. *Biochemistry* **2003**, *42*, 10609–10618. [\[CrossRef\]](#)
187. Degen, S.J.; Davie, E.W. Nucleotide Sequence of the Gene for Human Prothrombin. *Biochemistry* **1987**, *26*, 6165–6177. [\[CrossRef\]](#)
188. Parry, M.A.; Jacob, U.; Huber, R.; Wisner, A.; Bon, C.; Bode, W. The Crystal Structure of the Novel Snake Venom Plasminogen Activator TSV-PA: A Prototype Structure for Snake Venom Serine Proteinases. *Structure* **1998**, *6*, 1195–1206. [\[CrossRef\]](#)
189. Krem, M.M.; Di Cera, E. Molecular Markers of Serine Protease Evolution. *EMBO J.* **2001**, *20*, 3036–3045. [\[CrossRef\]](#)
190. Zhu, Z.; Liang, Z.; Zhang, T.; Zhu, Z.; Xu, W.; Teng, M.; Niu, L. Crystal Structures and Amidolytic Activities of Two Glycosylated Snake Venom Serine Proteinases. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 10524–10529. [\[CrossRef\]](#)
191. Zeng, F.; Shen, B.; Zhu, Z.; Zhang, P.; Ji, Y.; Niu, L.; Li, X.; Teng, M. Crystal Structure and Activating Effect on RyRs of AhV-TL-I, a Glycosylated Thrombin-like Enzyme from *Agkistrodon halys* Snake Venom. *Arch. Toxicol.* **2013**, *87*, 535–545. [\[CrossRef\]](#)
192. Ullah, A.; Souza, T.A.C.B.; Zanzporlin, L.M.; Mariutti, R.B.; Santana, V.S.; Murakami, M.T.; Arni, R.K. Crystal Structure of Jararacussin-I: The Highly Negatively Charged Catalytic Interface Contributes to Macromolecular Selectivity in Snake Venom Thrombin-like Enzymes. *Protein Sci.* **2013**, *22*, 128–132. [\[CrossRef\]](#)

193. Hartley, B.S. Homologies in Serine Proteinases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **1970**, *257*, 77–87. [\[CrossRef\]](#)
194. Schechter, I.; Berger, A. On the Active Site of Proteases. 3. Mapping the Active Site of Papain; Specific Peptide Inhibitors of Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1968**, *32*, 898–902. [\[CrossRef\]](#)
195. Wu, J.; Jin, Y.; Zhong, S.; Chen, R.; Zhu, S.; Wang, W.; Lu, Q.; Xiong, Y. A Unique Group of Inactive Serine Protease Homologues from Snake Venom. *Toxicon* **2008**, *52*, 277–284. [\[CrossRef\]](#)
196. Vaiyapuri, S.; Wagstaff, S.C.; Harrison, R.A.; Gibbins, J.M.; Hutchinson, E.G. Evolutionary Analysis of Novel Serine Proteinases in the Venom Gland Transcriptome of *Bitis gabonica rhinoceros*. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e21532. [\[CrossRef\]](#)
197. Kurtović, T.; Brgles, M.; Leonardi, A.; Lang Balija, M.; Sajevec, T.; Križaj, I.; Allmaier, G.; Marchetti-Deschmann, M.; Halassy, B. VaSP1, Catalytically Active Serine Proteinase from *Vipera ammodytes ammodytes* Venom with Unconventional Active Site Triad. *Toxicon* **2014**, *77*, 93–104. [\[CrossRef\]](#)
198. Gupta, R.; Brunak, S. Prediction of Glycosylation across the Human Proteome and the Correlation to Protein Function. *Pac. Symp. Biocomput.* **2002**, *7*, 310–322. [\[CrossRef\]](#)
199. Tanaka, N.; Nakada, H.; Itoh, N.; Mizuno, Y.; Takamishi, M.; Kawasaki, T.; Tate, S.; Inagaki, F.; Yamashina, I. Novel Structure of the N-Acetylgalactosamine Containing N-Glycosidic Carbohydrate Chain of Batroxobin, a Thrombin-like Snake Venom Enzyme. *J. Biochem.* **1992**, *112*, 68–74. [\[CrossRef\]](#)
200. Murayama, N.; Saguchi, K.; Mentele, R.; Assakura, M.T.; Ohi, H.; Fujita, Y.; Camargo, A.C.M.; Higuchi, S.; Serrano, S.M.T. The Unusual High Molecular Mass of Bothrops Protease A, a Trypsin-like Serine Peptidase from the Venom of *Bothrops jararaca*, Is Due to Its High Carbohydrate Content. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1652*, 1–6. [\[CrossRef\]](#)
201. Pfeiffer, G.; Linder, D.; Strube, K.H.; Geyer, R. Glycosylation of the Thrombin-like Serine Protease Ancrod from *Agkistrodon rhodostoma* Venom. Oligosaccharide Substitution Pattern at Each N-Glycosylation Site. *Glycoconj. J.* **1993**, *10*, 240–246. [\[CrossRef\]](#)
202. Pirkle, H. Thrombin-like Enzymes from Snake Venoms: An Updated Inventory. Scientific and Standardization Committee's Registry of Exogenous Hemostatic Factors. *Thromb. Haemost.* **1998**, *79*, 675–683. [\[CrossRef\]](#)
203. Lochnit, G.; Geyer, R. Carbohydrate Structure Analysis of Batroxobin, a Thrombin-like Serine Protease from *Bothrops moojeni* Venom. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *228*, 805–816. [\[CrossRef\]](#)
204. Pfeiffer, G.; Dabrowski, U.; Dabrowski, J.; Stirn, S.; Strube, K.H.; Geyer, R. Carbohydrate Structure of a Thrombin-like Serine Protease from *Agkistrodon rhodostoma*. Structure Elucidation of Oligosaccharides by Methylation Analysis, Liquid Secondary-Ion Mass Spectrometry and Proton Magnetic Resonance. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *205*, 961–978. [\[CrossRef\]](#)
205. Fry, B.G. From Genome to “Venome”: Molecular Origin and Evolution of the Snake Venom Proteome Inferred from Phylogenetic Analysis of Toxin Sequences and Related Body Proteins. *Genome Res.* **2005**, *15*, 403–420. [\[CrossRef\]](#)
206. Fry, B.G.; Scheib, H.; van der Weerd, L.; Young, B.; McNaughtan, J.; Ramjan, S.F.R.; Vidal, N.; Poelmann, R.E.; Norman, J.A. Evolution of an Arsenal: Structural and Functional Diversification of the Venom System in the Advanced Snakes (Caenophidia). *Mol. Cell. Proteom.* **2008**, *7*, 215–246. [\[CrossRef\]](#)
207. Koumandou, V.L.; Scorilas, A. Evolution of the Plasma and Tissue Kallikreins, and Their Alternative Splicing Isoforms. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e68074. [\[CrossRef\]](#)
208. Jenzano, J.W.; Brown, C.K.; Mauriello, S.M. Temporal Variations of Glandular Kallikrein, Protein and Amylase in Mixed Human Saliva. *Arch. Oral Biol.* **1987**, *32*, 757–759. [\[CrossRef\]](#)
209. Garrett, J.R.; Smith, R.E.; Kyriacou, K.; Kidd, A.; Liao, J. Factors Affecting the Secretion of Submandibular Salivary Kallikrein in Cats. *Q. J. Exp. Physiol.* **1987**, *72*, 357–368. [\[CrossRef\]](#)
210. Ligabue-Braun, R.; Verli, H.; Carlini, C.R. Venomous Mammals: A Review. *Toxicon* **2012**, *59*, 680–695. [\[CrossRef\]](#)
211. Barua, A.; Mikheyev, A.S. An Ancient, Conserved Gene Regulatory Network Led to the Rise of Oral Venom Systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*, e2021311118. [\[CrossRef\]](#)
212. Barua, A.; Koludarov, I.; Mikheyev, A.S. Co-Option of the Same Ancestral Gene Family Gave Rise to Mammalian and Reptilian Toxins. *BMC Biol.* **2021**, *19*, 268. [\[CrossRef\]](#)
213. Fry, B.G.; Winter, K.; Norman, J.A.; Roelants, K.; Nabuurs, R.J.A.; van Osch, M.J.P.; Teeuwisse, W.M.; van der Weerd, L.; McNaughtan, J.E.; Kwok, H.F.; et al. Functional and Structural Diversification of the Anguimorpha Lizard Venom System. *Mol. Cell. Proteom.* **2010**, *9*, 2369–2390. [\[CrossRef\]](#)
214. Casewell, N.R.; Huttley, G.A.; Wüster, W. Dynamic Evolution of Venom Proteins in Squamate Reptiles. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1066. [\[CrossRef\]](#)
215. Junqueira-de-Azevedo, I.L.M.; Bastos, C.M.V.; Ho, P.L.; Luna, M.S.; Yamanouye, N.; Casewell, N.R. Venom-Related Transcripts from *Bothrops jararaca* Tissues Provide Novel Molecular Insights into the Production and Evolution of Snake Venom. *Mol. Biol. Evol.* **2015**, *32*, 754–766. [\[CrossRef\]](#)
216. Hargreaves, A.D.; Swain, M.T.; Logan, D.W.; Mulley, J.F. Testing the Toxicofera: Comparative Transcriptomics Casts Doubt on the Single, Early Evolution of the Reptile Venom System. *Toxicon* **2014**, *92*, 140–156. [\[CrossRef\]](#)
217. Reyes-Velasco, J.; Card, D.C.; Andrew, A.L.; Shaney, K.J.; Adams, R.H.; Schield, D.R.; Casewell, N.R.; Mackessy, S.P.; Castoe, T.A. Expression of Venom Gene Homologs in Diverse Python Tissues Suggests a New Model for the Evolution of Snake Venom. *Mol. Biol. Evol.* **2015**, *32*, 173–183. [\[CrossRef\]](#)
218. Koludarov, I.; Jackson, T.N.; Brouw, B.O.d.; Dobson, J.; Dashevsky, D.; Arbuckle, K.; Clemente, C.J.; Stockdale, E.J.; Cochran, C.; Debono, J.; et al. Enter the Dragon: The Dynamic and Multifunctional Evolution of Anguimorpha Lizard Venoms. *Toxins* **2017**, *9*, 242. [\[CrossRef\]](#)

219. Barua, A.; Mikheyev, A.S. Toxin Expression in Snake Venom Evolves Rapidly with Constant Shifts in Evolutionary Rates. *Proc. Biol. Sci.* **2020**, *287*, 20200613. [CrossRef]
220. Xie, B.; Dashevsky, D.; Rokyta, D.; Ghezellou, P.; Fathinia, B.; Shi, Q.; Richardson, M.K.; Fry, B.G. Dynamic Genetic Differentiation Drives the Widespread Structural and Functional Convergent Evolution of Snake Venom Proteinaceous Toxins. *BMC Biol.* **2022**, *20*, 4. [CrossRef]
221. Vaiyapuri, S.; Thiagarajan, N.; Hutchinson, E.G.; Gibbins, J.M. Sequence and Phylogenetic Analysis of Viper Venom Serine Proteases. *Bioinformation* **2012**, *8*, 763–772. [CrossRef]
222. Deshimaru, M.; Ogawa, T.; Nakashima, K.; Nobuhisa, I.; Chijiwa, T.; Shimohigashi, Y.; Fukumaki, Y.; Niwa, M.; Yamashina, I.; Hattori, S.; et al. Accelerated Evolution of Crotalinae Snake Venom Gland Serine Proteases. *FEBS Lett.* **1996**, *397*, 83–88. [CrossRef]
223. Doley, R.; Mackessy, S.P.; Kini, R.M. Role of Accelerated Segment Switch in Exons to Alter Targeting (ASSET) in the Molecular Evolution of Snake Venom Proteins. *BMC Evol. Biol.* **2009**, *9*, 146. [CrossRef] [PubMed]
224. Tans, G.; Govers-Riemslog, J.W.; van Rijn, J.L.; Rosing, J. Purification and Properties of a Prothrombin Activator from the Venom of *Notechis Scutatus Scutatus*. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 9366–9372. [CrossRef]
225. Reza, A.; Swarup, S.; Manjunatha Kini, R. Two Parallel Prothrombin Activator Systems in Australian Rough-Scaled Snake, *Tropidechis Carinatus*. Structural Comparison of Venom Prothrombin Activator with Blood Coagulation Factor X. *Thromb. Haemost.* **2005**, *93*, 40–47. [CrossRef]
226. Reza, M.A.; Swarup, S.; Kini, R.M. Structure of Two Genes Encoding Parallel Prothrombin Activators in *Tropidechis Carinatus* Snake: Gene Duplication and Recruitment of Factor X Gene to the Venom Gland. *J. Thromb. Haemost.* **2007**, *5*, 117–126. [CrossRef]
227. Kwong, S.; Woods, A.E.; Mirtschin, P.J.; Ge, R.; Kini, R.M. The Recruitment of Blood Coagulation Factor X into Snake Venom Gland as a Toxin: The Role of Promoter Cis-Elements in Its Expression. *Thromb. Haemost.* **2009**, *102*, 469–478. [CrossRef] [PubMed]
228. Reza, M.A.; Minh Le, T.N.; Swarup, S.; Manjunatha Kini, R. Molecular Evolution Caught in Action: Gene Duplication and Evolution of Molecular Isoforms of Prothrombin Activators in *Pseudonaja textilis* (Brown Snake). *J. Thromb. Haemost.* **2006**, *4*, 1346–1353. [CrossRef]
229. Lan, D.; Song, S.; Liu, Y.; Jiao, B.; Meng, R. Use of Batroxobin in Central and Peripheral Ischemic Vascular Diseases: A Systematic Review. *Front. Neurol.* **2021**, *12*, 716778. [CrossRef] [PubMed]
230. Song, S.; Wu, H.; Ji, X.; Meng, R. The BE COOL Treatments (Batroxobin, oxygEn, Conditioning, and cOOLing): Emerging Adjunct Therapies for Ischemic Cerebrovascular Disease. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 6193. [CrossRef]
231. Mazzucco, L.; Balbo, V.; Cattana, E.; Borzini, P. Platelet-Rich Plasma and Platelet Gel Preparation Using Plateltex. *Vox Sang.* **2008**, *94*, 202–208. [CrossRef] [PubMed]
232. Plateltex® Device for the Activation (Gelification) of Blood Components Destined to the Topical Non-Transfusional Use. Available online: www.plateltex.com/data/pdf/IFU4.3plateltexACTJUNE2016ENG.pdf (accessed on 7 July 2024).
233. Kjaergard, H.K.; Trumbull, H.R. Vivostat System Autologous Fibrin Sealant: Preliminary Study in Elective Coronary Bypass Grafting. *Ann. Thorac. Surg.* **1998**, *66*, 482–486. [CrossRef]
234. Ferreira, R.S.; de Barros, L.C.; Abbade, L.P.F.; Barraviera, S.R.C.S.; Silveiras, M.R.C.; de Pontes, L.G.; Dos Santos, L.D.; Barraviera, B. Heterologous Fibrin Sealant Derived from Snake Venom: From Bench to Bedside—An Overview. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* **2017**, *23*, 21. [CrossRef]
235. Levy, D.E.; del Zoppo, G.J.; Demaerschalk, B.M.; Demchuk, A.M.; Diener, H.-C.; Howard, G.; Kaste, M.; Pancioli, A.M.; Ringelstein, E.B.; Spatareanu, C.; et al. Ancrod in Acute Ischemic Stroke: Results of 500 Subjects Beginning Treatment within 6 Hours of Stroke Onset in the Ancrod Stroke Program. *Stroke* **2009**, *40*, 3796–3803. [CrossRef]
236. Wei, J.; Zhu, M.; Zhang, Z.; Jia, Z.; He, X.; Wan, Y.; Wang, S.; Xiu, D.; Tang, Y.; Li, J.; et al. A Multicenter, Phase III Trial of Hemocoagulase Agkistrodon: Hemostasis, Coagulation, and Safety in Patients Undergoing Abdominal Surgery. *Chin. Med. J.* **2010**, *123*, 589–593. [CrossRef] [PubMed]
237. Gosselin, R.C.; Douxfils, J. Ecarin Based Coagulation Testing. *Am. J. Hematol.* **2020**, *95*, 863–869. [CrossRef]
238. Quehenberger, P.; Handler, S.; Mannhalter, C.; Kyrle, P.A.; Speiser, W. The Factor V (Leiden) Test: Evaluation of an Assay Based on Dilute Russell Viper Venom Time for the Detection of the Factor V Leiden Mutation. *Thromb. Res.* **1999**, *96*, 125–133. [CrossRef] [PubMed]
239. Pengo, V.; Bison, E.; Banzato, A.; Zoppellaro, G.; Jose, S.P.; Denas, G. Lupus Anticoagulant Testing: Diluted Russell Viper Venom Time (dRVVT). *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1646*, 169–176. [CrossRef]
240. Funk, C.; Gmür, J.; Herold, R.; Straub, P.W. Reptilase-R—A New Reagent in Blood Coagulation. *Br. J. Haematol.* **1971**, *21*, 43–52. [CrossRef] [PubMed]
241. Barros, L.C.; Ferreira, R.S.; Barraviera, S.R.C.S.; Stolf, H.O.; Thomazini-Santos, I.A.; Mendes-Giannini, M.J.S.; Toscano, E.; Barraviera, B. A New Fibrin Sealant from *Crotalus durissus terrificus* Venom: Applications in Medicine. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* **2009**, *12*, 553–571. [CrossRef]
242. Hayashi, M.A.F.; Campeiro, J.D.; Yonamine, C.M. Revisiting the Potential of South American Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* Toxins as Therapeutic, Theranostic and/or Biotechnological Agents. *Toxicon* **2022**, *206*, 1–13. [CrossRef]
243. Li, H.; Huang, Y.; Wu, X.; Wu, T.; Cao, Y.; Wang, Q.; Qiu, Y.; Fu, W.; Zhang, Q.; Pang, J. Effects of Hemocoagulase Agkistrodon on the Coagulation Factors and Its Procoagulant Activities. *Drug Des. Devel Ther.* **2018**, *12*, 1385–1398. [CrossRef]
244. Yao, Y.-T.; Yuan, X.; Fang, N.-X. Hemocoagulase Reduces Postoperative Bleeding and Blood Transfusion in Cardiac Surgical Patients: A PRISMA-Compliant Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicine* **2019**, *98*, e18534. [CrossRef]

245. Thiagarajan, P.; Pengo, V.; Shapiro, S.S. The Use of the Dilute Russell Viper Venom Time for the Diagnosis of Lupus Anticoagulants. *Blood* **1986**, *68*, 869–874. [\[CrossRef\]](#)
246. Bordon, K.d.C.F.; Cologna, C.T.; Fornari-Baldo, E.C.; Pinheiro-Júnior, E.L.; Cerni, F.A.; Amorim, F.G.; Anjolette, F.A.P.; Cordeiro, F.A.; Wiesel, G.A.; Cardoso, I.A.; et al. From Animal Poisons and Venoms to Medicines: Achievements, Challenges and Perspectives in Drug Discovery. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 1132. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
247. Datta, G.; Tu, A.T. Structure and Other Chemical Characterizations of Gila Toxin, a Lethal Toxin from Lizard Venom. *J. Pept. Res.* **1997**, *50*, 443–450. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
248. Carone, S.E.I.; Menaldo, D.L.; Sartim, M.A.; Bernardes, C.P.; Caetano, R.C.; da Silva, R.R.; Cabral, H.; Barraviera, B.; Ferreira Junior, R.S.; Sampaio, S.V. BJSF, a Novel Serine Protease from *Bothrops jararaca* Snake Venom That Degrades Fibrinogen without Forming Fibrin Clots. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2018**, *357*, 50–61. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
249. Zhang, Y.; Wisner, A.; Maroun, R.C.; Choumet, V.; Xiong, Y.; Bon, C. Trimeresurus Stejnegeri Snake Venom Plasminogen Activator Site-Directed Mutagenesis and Molecular Modeling. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 20531–20537. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
250. Muanpasitporn, C.; Rojnuckarin, P. Expression and Characterization of a Recombinant Fibrinogenolytic Serine Protease from Green Pit Viper (*Trimeresurus albolabris*) Venom. *Toxicon* **2007**, *49*, 1083–1089. [\[CrossRef\]](#)
251. You, W.-K.; Choi, W.-S.; Koh, Y.-S.; Shin, H.-C.; Jang, Y.; Chung, K.-H. Functional Characterization of Recombinant Batroxobin, a Snake Venom Thrombin-like Enzyme, Expressed from *Pichia pastoris*. *FEBS Lett.* **2004**, *571*, 67–73. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
252. Isabel, T.F.; Costa, G.N.M.; Pacheco, I.B.; Barbosa, L.G.; Santos-Junior, C.D.; Fonseca, F.P.P.; Boldrini França, J.; Henrique-Silva, F.; Yoneyama, K.A.G.; Rodrigues, R.S.; et al. Expression and Partial Biochemical Characterization of a Recombinant Serine Protease from *Bothrops pauloensis* Snake Venom. *Toxicon* **2016**, *115*, 49–54. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
253. Boldrini-França, J.; Santos Rodrigues, R.; Santos-Silva, L.K.; de Souza, D.L.N.; Gomes, M.S.R.; Cologna, C.T.; de Pauw, E.; Quinton, L.; Henrique-Silva, F.; de Melo Rodrigues, V.; et al. Expression of a New Serine Protease from *Crotalus durissus collilineatus* Venom in *Pichia pastoris* and Functional Comparison with the Native Enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 9971–9986. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
254. Boldrini-França, J.; Pinheiro-Junior, E.L.; Arantes, E.C. Functional and Biological Insights of rCollinein-1, a Recombinant Serine Protease from *Crotalus durissus collilineatus*. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* **2019**, *25*, e147118. [\[CrossRef\]](#)
255. Yang, D.; Peng, M.; Yang, H.; Yang, Q.; Xu, J. Expression, Purification and Characterization of *Gloydius shedaoensis* Venom Glosheobin as Hsp70 Fusion Protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **2009**, *66*, 138–142. [\[CrossRef\]](#)
256. Alomran, N.; Blundell, P.; Alsolaiss, J.; Crittenden, E.; Ainsworth, S.; Dawson, C.A.; Edge, R.J.; Hall, S.R.; Harrison, R.A.; Wilkinson, M.C.; et al. Exploring the Utility of Recombinant Snake Venom Serine Protease Toxins as Immunogens for Generating Experimental Snakebite Antivenoms. *Toxins* **2022**, *14*, 443. [\[CrossRef\]](#)
257. Liu, S.; Sun, M.-Z.; Sun, C.; Zhao, B.; Greenaway, F.T.; Zheng, Q. A Novel Serine Protease from the Snake Venom of *Agkistrodon Blomhoffii ussurensis*. *Toxicon* **2008**, *52*, 760–768. [\[CrossRef\]](#)
258. Nikai, T.; Imai, K.; Sugihara, H.; Tu, A.T. Isolation and Characterization of Horridum Toxin with Arginine Ester Hydrolase Activity from *Heloderma horridum* (Beaded Lizard) Venom. *Arch. Biochem. Biophys.* **1988**, *264*, 270–280. [\[CrossRef\]](#)
259. Stocker, K.; Fischer, H.; Meier, J.; Brogli, M.; Svendsen, L. Characterization of the Protein C Activator Protac from the Venom of the Southern Copperhead (*Agkistrodon contortrix*) Snake. *Toxicon* **1987**, *25*, 239–252. [\[CrossRef\]](#)
260. Nakayama, D.; Ben Ammar, Y.; Takeda, S. Crystallization and Preliminary X-Ray Crystallographic Analysis of Blood Coagulation Factor V-Activating Proteinase (RVV-V) from Russell's Viper Venom. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2009**, *65*, 1306–1308. [\[CrossRef\]](#)
261. Siigur, E.; Tõnismägi, K.; Trummal, K.; Samel, M.; Vija, H.; Aaspõllu, A.; Rönholm, G.; Subbi, J.; Kalkkinen, N.; Siigur, J. A New Tyrosine-Specific Chymotrypsin-like and Angiotensin-Degrading Serine Proteinase from *Vipera lebetina* Snake Venom. *Biochimie* **2011**, *93*, 321–330. [\[CrossRef\]](#)
262. Rivera-de-Torre, E.; Rimbault, C.; Jenkins, T.P.; Sørensen, C.V.; Damsbo, A.; Saez, N.J.; Duhoo, Y.; Hackney, C.M.; Ellgaard, L.; Laustsen, A.H. Strategies for Heterologous Expression, Synthesis, and Purification of Animal Venom Toxins. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *9*, 811905. [\[CrossRef\]](#)
263. Hung, C.C.; Chiou, S.H. Expression of a Kallikrein-like Protease from the Snake Venom: Engineering of Autocatalytic Site in the Fusion Protein to Facilitate Protein Refolding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *275*, 924–930. [\[CrossRef\]](#)
264. Yonamine, C.M.; Prieto-da-Silva, A.R.B.; Magalhães, G.S.; Rádis-Baptista, G.; Morganti, L.; Ambiel, F.C.; Chura-Chambi, R.M.; Yamane, T.; Camillo, M.a.P. Cloning of Serine Protease cDNAs from *Crotalus durissus terrificus* Venom Gland and Expression of a Functional Gyroxin Homologue in COS-7 Cells. *Toxicon* **2009**, *54*, 110–120. [\[CrossRef\]](#)
265. Sahyoun, C.; Rima, M.; Mattei, C.; Sabatier, J.M.; Fajloun, Z.; Legros, C. Separation and Analytical Techniques Used in Snake Venomics: A Review Article. *Processes* **2022**, *10*, 1380. [\[CrossRef\]](#)
266. Vander Dos Santos, R.; Villalta-Romero, F.; Stanisic, D.; Borro, L.; Neshich, G.; Tasic, L. Citrus Bioflavonoid, Hesperetin, as Inhibitor of Two Thrombin-like Snake Venom Serine Proteases Isolated from *Crotalus simus*. *Toxicon* **2018**, *143*, 36–43. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.