



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Isolamento e caracterização de serinopeptidases de *Pseudechis australis*

SAMUEL DE BRITO LEVINDO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações.

Orientador:

Prof. Dr. Patrick Jack Spencer

SÃO PAULO

2016

*Dedico este trabalho a Deus, à
minha esposa, à minha família e
à minha "anja" Tamara. Muito
obrigado!*

Agradecimentos

Agradeço a Deus por todas as horas que não me julguei capaz ele me veio em auxílio e pelo fôlego de vida que me deu. Toda honra e toda glória ao Senhor!

A minha esposa e família que tanto me apoiaram em todos os momentos cruciais de minha vida.

Ao meu orientador Dr. Patrick Jack Spencer pelo apoio, direcionamento e confiança.

Aos amigos e companheiros de laboratório Tamara, Marcela, Vincent, Podé, Paula, Bruno, Ed Carlos, Mariana, Marina, Dani, Rodolfo e as alunas de iniciação Fernanda e Natalia pelas horas de descontração, pelas muitas risadas na volta do almoço, pelas inúmeras vezes que me auxiliaram, pelos puxões de orelha por esquecer algo e por serem pessoas que se tornaram especiais em minha vida.

À Dra. Nanci do Nascimento pela ajuda na melhoria da organização do trabalho.

Ao Dr. Daniel Pimenta e Dra. Juliana M. Sciani pelo auxílio nas análises por espectrometria de massas.

À Dra. Regina Affonso, aos técnicos Jhonny e Zé pelo fornecimento de reagentes e por disponibilizar os laboratórios e equipamentos.

Aos alunos do setor de hormônios, que por muitas vezes me ajudaram com os equipamentos e por varias dicas úteis.

A todos os funcionários do IPEN, pela manutenção e organização dos laboratórios.

Ao IPEN pelo fornecimento de toda a estrutura necessária para a realização desse trabalho.

A CAPES pelo financiamento do projeto.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

Isolamento e caracterização de serinopeptidases de *Pseudechis australis*

Samuel de Brito Levindo

RESUMO

Os venenos de serpentes peçonhentas representam uma mistura muito rica em compostos orgânicos e inorgânicos com potencial farmacológico, clínico e médico considerável. (As propriedades de seus componentes vêm sendo pesquisadas e características que antes não eram observáveis passam a ser descobertas influenciando à obtenção de novas drogas e na otimização de terapias já existentes. A maior parte dos compostos presentes nos venenos das serpentes é formada por proteínas que representam de 90 a 95% do peso seco do veneno, dentre elas destacam-se as peptidases (serino e metalopeptidases). As serinopeptidases caracterizam-se por apresentar no sítio ativo uma tríade catalítica idêntica a presente na tripsina, a qual é formada pelo agrupamento dos aminoácidos, His 57, Asp 102 e Ser 195. Constituem um grupo de enzimas que apresentam uma ampla variedade de efeitos biológicos, com massa molecular entre 25 kDa e 35 kDa, promovendo diversos efeitos fisiológicos como, alterações no sistema hemostático, agindo nos componentes da cascata de coagulação e com ação fibrinogenolítica. Ainda que já existam enzimas de veneno de serpentes com aplicação na regulação da cascata da coagulação, vários laboratórios têm buscado novas alternativas que apresentem atividade na hemostasia a fim de obtenção de produtos farmacológicos ainda não investigados. As serpentes australianas da família *Elapidae*, destacam-se para este fim, por apresentarem proteínas pró-coagulantes e até o momento não há descrição na literatura sobre a presença de serinopeptidases no veneno de *Pseudechis australis*.

Neste trabalho conseguimos isolar e confirmar pela primeira vez a presença de uma serinopeptidase do veneno de *Pseudechis australis* através de técnicas cromatográficas e bioquímicas. Esta serinopeptidase possui atividade sobre a cadeia beta e alfa do fibrinogênio, não possui atividade gelatinolítica e possui semelhanças com o Fator X (FX) da cascata de coagulação.

Isolation and characterization of serinopeptidases *Pseudechis australis*

Samuel de Brito Levindo

ABSTRACT

Snake venoms represent a very rich mixture of organic and inorganic compounds with potential pharmacological, clinical and medical applications. This potential has not been fully exploited due to our incomplete knowledge of the properties of venoms and their components. Most of the compounds present in snake venoms are proteins that represent 90 to 95% of the dry weight, among which stand out peptidases (serine and metallopeptidases). The serinopeptidases are characterized by having a catalytic triad similar to the one present in trypsin, which is formed by, His 57, Asp 102 and Ser 195. These proteins constitute a group of enzymes that have a variety of activities, molecular mass between 25 kDa to 35 kDa, promoting many physiological effects as changes in the hemostatic system, acting on components of the clotting cascade and fibrinolytic action. Several snake venoms isolated peptidases are used for therapeutic purposes, among which serinopeptidases as Batroxobin® and Ancrod® used as anticoagulants in heart surgery. *Pseudechis australis* (King Brown or Mulga Snake) is a terrestrial species among the most poisonous of Australia and belonging to the family *Elapidae* which constitutes 57.7% of the snake species described in the Australian continent, Australian *Elapidae* are among the ten more toxic species in the world. Although there are already venom enzymes snakes with application in coagulopathies, several laboratories have sought alternatives for the treatment of hemostatic disorders in order to obtain new pharmacological products. Australian snakes from the *Elapidae* family, stand out for this purpose, because they have procoagulant proteins with properties similar to the macromolecular complex found in blood. It is worth noting that so far there is no description in the literature on the presence of serinopeptidases in *Pseudechis australis* venom and since serinopeptidases are closely linked to the hemostatic system, new serinopeptidases may have great potential in the development of drugs for the therapy of hemostatic disorders.

In this work we managed to isolate and confirm the first time a serinopeptidase the *Pseudechis australis* venom through chromatographic and biochemical techniques. This serinopeptidase have activity on alpha and beta chain of fibrinogen, has no gelatinolytic activity and has similarities to factor X of the clotting cascade.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 <i>Pseudechis australis</i>	11
1.2 O veneno Elapídico	13
1.2.1 Venenos pró-coagulantes	14
1.2.2 Venenos anticoagulantes	14
1.2.3 Fosfolipases A ₂	15
1.2.4 Metalopeptidases	16
1.2.5 Serinopeptidases.....	17
2. OBJETIVO	20
2.1 Objetivos específicos	20
3. METODOLOGIA	21
3.1 Material (Veneno).....	21
3.2 Fracionamento	21
3.2.1 Cromatografia de exclusão molecular	22
3.2.2 Cromatografia de afinidade	22
3.3 Dosagem proteica por <i>Nanodrop</i> TM	22
3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE	23
3.5 Determinação da atividade hidrolítica por zimografia.....	23
3.6 Atividade fibrinogenolítica	24
3.7 Detecção de serinoproteases por ELISA	24
4. RESULTADOS	26
4.1 Cromatografia de exclusão molecular	26
4.2 Gel de eletroforese SDS-PAGE (exclusão molecular)	26
4.3 Atividade proteolítica	27
4.4 Ensaio Imunoenzimatico (ELISA).....	31
4.5 Atividade fibrinogenolítica	31
5. Cromatografia de afinidade	32
5.1 Eletroforese em gel SDS-PAGE (afinidade).....	33
6. DISCUSSÃO	35
7. CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS:.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Composição de venenos de serpentes.....	12
Figura 2A- Distribuição geográfica da <i>Pseudechis australis</i> no continente australiano.....	13
Figura 2B- Exemplar de <i>Pseudechis australis</i>	13
Figura 3- Estrutura tridimensional de uma Fosfolipase A ₂	16
Figura 4- Esquema das classes de metalopeptidases.....	17
Figura 5- Estrutura tridimensional da tripsina.....	18
Figura 6- Esquema da metodologia utilizada no trabalho.....	21
Figura 7- Cromatografia de exclusão molecular de veneno de <i>Pseudechis australis</i>	26
Figura 8- SDS-PAGE das frações P1 a P6 da cromatografia de exclusão molecular.....	27
Figura 9- Zimografia de caseína das frações 1 a 4 da cromatografia de exclusão molecular.....	28
Figura 10- Zimografia com gelatina da cromatografia de exclusão molecular.....	28
Figura 11- Zimografia de caseína das frações 1 a 4 da exclusão molecular evidenciando a não atividade proteolítica da fração 2.....	29
Figura 12- Zimografia com caseína das frações 2 e 3 da exclusão molecular separados e “pool”.....	29
Figura 13- Zimografia de caseína das frações 1 e 2 da cromatografia de exclusão + inibidores específicos.....	30
Figura 14- Gráfico do ensaio imunoenzimático do veneno de <i>Pseudechis australis</i> – ELISA.....	31
Figura 15- Ensaio fibrinogenolítico	32
Figura 16- Cromatografia de afinidade à Benzamidina da fração 2 de exclusão molecular	32
Figura 17- Gel SDS das frações da cromatografia de afinidade à Benzamidina.....	33
Figura 18- Zimografia de caseína das frações da cromatografia de afinidade.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies com veneno pró-coagulante e anti-coagulante	14
--	----

1. INTRODUÇÃO

Os venenos de serpentes peçonhentas representam uma mistura muito rica em compostos orgânicos e inorgânicos com potencial farmacológico, clínico e médico considerável. As propriedades de seus componentes vêm sendo pesquisadas e características que antes não eram observáveis passam a ser descobertas influenciando à obtenção de novas drogas e na otimização de terapias já existentes. Ao ser fracionado encontramos carboidratos (glicoproteínas), lipídeos (fosfolipídios), aminas biogênicas, aminoácidos e nucleotídeos (Bjarnason, 1994; Markland, 1998; Georgieva *et al.*, 2008). Os venenos ofídicos são uma complexa mistura de substâncias, em sua maioria de natureza protéica (Figura 1), que podem agir também no sistema hemostático, atuando em diversos processos fisiológicos. De modo geral, são constituídos de miotoxinas, neurotoxinas, cardiotoxinas, citotoxinas e fatores que alteram a hemostasia (incluindo as hemorraginas) entre outros, usados tanto como mecanismo de defesa bem como para a predação (Mendez & Riet-Correa, 1995; Kini, 2003).

A maior parte dos compostos presentes nos venenos das serpentes é formada por proteínas que representam de 90 a 95% do peso seco do veneno (Bjarnason, 1994; Markland, 1998; Georgieva *et al.*, 2008). Dentre elas destacam-se as peptidases (metalo e serinopeptidases). Além disso, vários tipos de hidrolases são encontradas, como: Fosfolipases A_2 , fosfodiesterases, colinesterases, aminotransferases, ATPases, hialuronidases, nucleosidases e L-glicosaminidases (Matsui *et al.*, 2000). Tais peptidases, após o envenenamento podem desencadear um amplo espectro de efeitos que interferem com a manutenção e funcionamento de funções biológicas essenciais à hemostasia, agregação plaquetária e digestão de lipídios (Fernandes *et al.*, 2013).

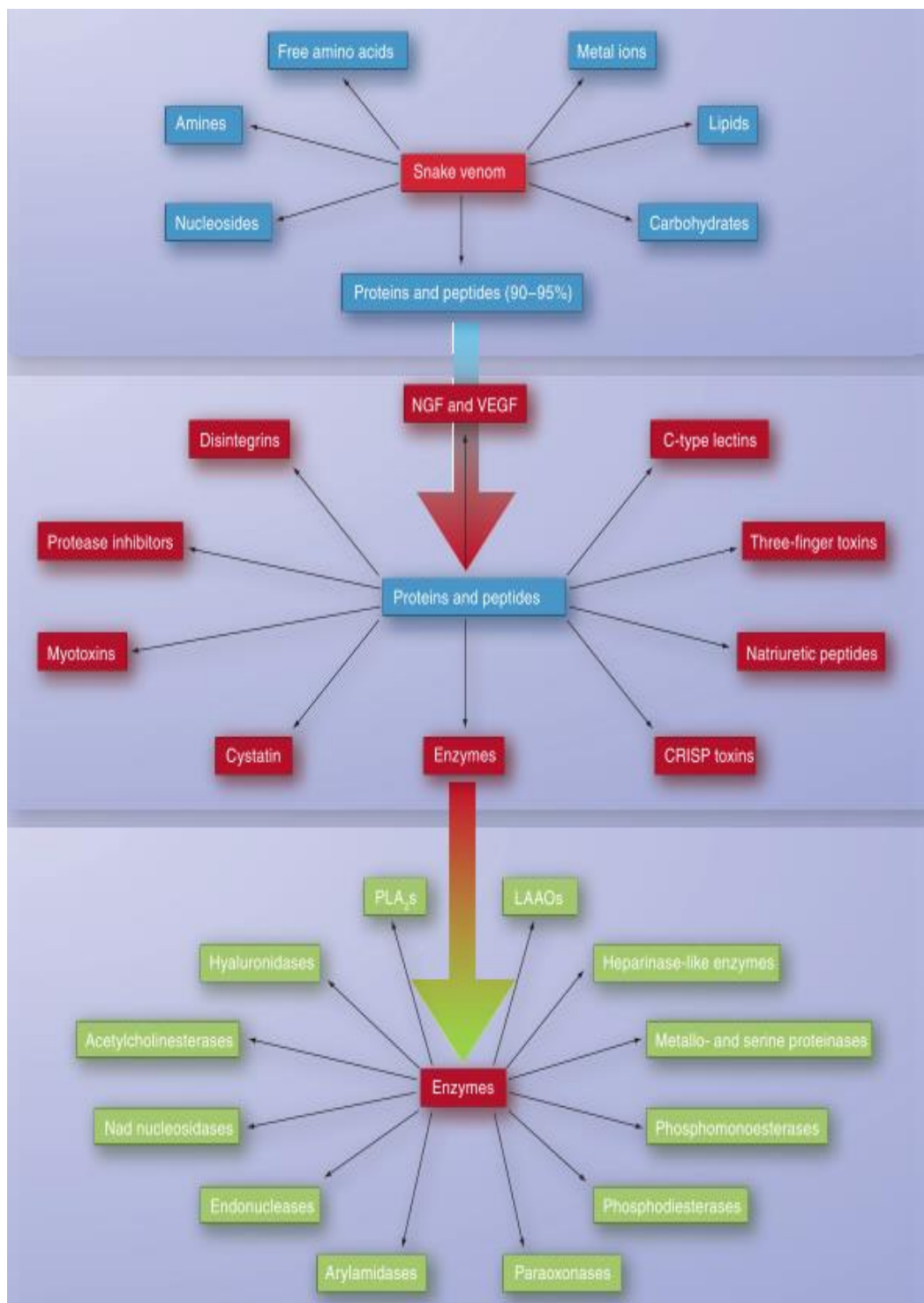


Figura 1- Composição de venenos de serpentes (Georgieva *et al*, 2008).

1.1 *Pseudechis australis*

A *Pseudechis australis* (King Brown ou Mulga Snake) (Figura 2B) é uma espécie terrestre de serpente dentre as mais peçonhentas da Austrália e pertencente à família *Elapidae* a qual constitui 57,7% das espécies de serpentes descritas no

continente australiano, contabilizando 90 espécies das 156 descritas. Está presente em quase todo território australiano (Figura 2A) exceto a região da costa leste ao extremo sul do continente. (Williams, Wuster & Fry, 2006; Birrell *et al.*, 2007).

Sua dieta consiste basicamente de répteis, incluindo outras serpentes peçonhentas, mamíferos e rãs, possui poucos inimigos naturais e muitas vezes são extremamente tolerantes à interferência humana. A variabilidade do veneno de *Pseudechis australis* é extensa bem como suas formas policromáticas e taxas de crescimento. Como consequência da variação morfológica e sua ampla distribuição na Austrália e sul da Nova Guiné, a *Pseudechis australis* se encontra numa classificação taxonômica não totalmente resolvida (Birrel *et al.*, 2005).

A *Pseudechis australis* é a serpente que injeta a maior massa média de veneno por picada (62 mg de peso seco) se comparada com outras *Elapidae* australianas medicamente importantes como a *Acanthophis antarcticus* (36 mg de peso seco) (Ravazi *et al.*, 2014).

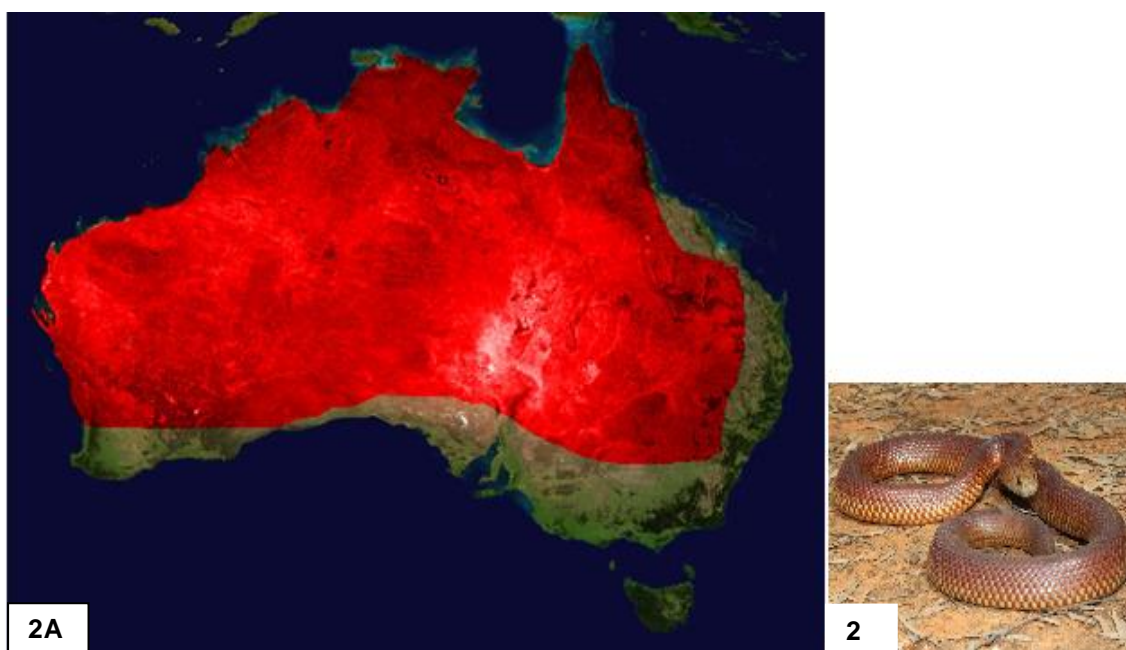


Figura 2A- Distribuição geográfica da *Pseudechis australis* no continente australiano. Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/Image:King_Brown_%28Mulga%29_Range.jpg – acesso em: 21/02/2016 17:22.

Figura 2B- Exemplar de *Pseudechis australis*. Fonte: http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?enlarge=0000+0000+1211+0458 acesso em: 21/02/2016 17:30.

As *Elapidae* australianas estão dentre as dez espécies mais tóxicas do mundo. Dezenove das 25 principais *Elapidae* de maior toxicidade conhecida residem

na Oceania (Fry, 1999), embora tenham toxicidade significativamente maior, causam muito menos mortes por envenenamentos do que outras espécies, provavelmente devido à menor densidade populacional e a maior disponibilidade de cuidados médicos adequados na Austrália (Birrell *et al.*, 2007).

1.2 O veneno Elapídico

Proteínas e peptídeos compreendem a maior parte do peso seco de venenos elapídicos e três tipos principais de componentes foram caracterizados: enzimas ativadoras de protrombina, lipases e neurotoxinas peptídicas. Muitas espécies, porém não todas, possuem enzimas de ativação de protrombina em seus venenos. A grande maioria contém fosfolipases A2 e supõe-se que todos os venenos elapídicos australianos contenham peptídeos neurotóxicos. Como resultado, estas *Elapidae* podem ser divididas em duas classes principais: espécies com veneno pró-coagulante e anticoagulante (Tan & Ponnundurai, 1990; Birrell *et al.*, 2007) (Tabela 1).

Tabela 1: Espécies com veneno Pró-coagulante e anticoagulante.

Espécies com veneno coagulante

Nome comum	Nome científico
Stephen's banded snake	<i>Hoplocephalus stephensi</i>
Tasmanian King Island tiger snake	<i>Notechis ater humphreysi</i>
Peninsula Tiger snake	<i>Notechis ater níger</i>
Island taipan	<i>Oxyuranus microlepidotus</i>
Coastal taipan	<i>Oxyuranus scutellatus</i>
Red-bellied Black snake	<i>Pseudechis porphyriacus</i>
Speckled Brown snake	<i>Pseudonaja guttata</i>
Gwardar	<i>Pseudonaja nuchalis</i>
Eastern Brown snake	<i>Pseudonaja textilis</i>
Rough-scaled snake	<i>Tropidechis carinatus</i>

Espécies com veneno anticoagulante

Nome comum	Nome científico
Common deathadder	<i>Acanthophis antarcticus</i>
Lowland copper head	<i>Austrelaps superbus</i>

Mulga snake	<i>Pseudechis australis</i>
Collett's snake	<i>Pseudechis colletti</i>
Spotted Black snake	<i>Pseudechis guttatus</i>

Adaptado de Fry (1999).

1.2.1 Venenos pró-coagulantes

Venenos Pró-coagulantes contêm enzimas que atuam ativando fatores de coagulação específicos na cascata da coagulação encurtando o processo de coagulação do sangue ou através da conversão de fibrinogênio solúvel diretamente num coagulo de fibrina insolúvel (Kini, Rao, Joseph, 2002; Kini, 2006). Podem ser classificados por seu mecanismo de ação nos fatores de coagulação incluindo ativadores de FV, ativadores de FX, ativadores de protrombina e enzimas trombinasímile (Lu *et al.*, 2005).

Espécies pró-coagulantes podem produzir além dos citados efeitos, outros similares ao envenenamento por viperídeos (efeitos neurotóxicos, causando paralisia flácida da musculatura esquelética, principalmente ocular, facial e às vezes, da respiração, com conseqüente insuficiência respiratória, efeito miotóxico, ocasionando rabdomiólise generalizada, podendo evoluir para insuficiência renal aguda e efeitos coagulantes, ocorrência de hemorragia e distúrbios da coagulação por consumo de fibrinogênio causado pela ativação do Fator-X (Pinho & Pereira, 2001; Kini, Rao & Joseph, 2002). Tais variações farmacológicas têm impacto direto sobre a patologia clínica bem como sobre o tipo e quantidade de antiveneno a ser usado no tratamento.

1.2.2 Venenos anticoagulantes

Venenos anticoagulantes podem conter fatores anticoagulantes (FIX/X), proteínas de ligação, ativadores de proteína C, inibidores de trombina e fosfolipase A2 ou componentes que agem na fibrinólise, incluindo enzimas fibrinolíticas e ativadores de plasminogênio.

Espécies com venenos anticoagulantes também produzem efeitos clássicos do envenenamento elapídico (desorientação, paralisia facial e insuficiência respiratória) e suas ações neurológicas severas ocorrem a partir do bloqueio pré-sináptico, atuando na junção neuromuscular, bloqueando a liberação de Ach (acetilcolina) pelos impulsos nervosos, impedindo a deflagração do potencial de ação

e pós-sináptico, competindo com a Ach pelos receptores colinérgicos da junção neuromuscular. Algumas destas espécies, especialmente a *Pseudechis australis*, também podem produzir um desequilíbrio hemostático, todavia a incoagulabilidade ocorre sem fibrinólise. Além disso, certos membros deste grupo podem produzir mionecrose relativamente pronunciada (Fry, 1999).

1.2.3 Fosfolipases A₂

Fosfolipases A₂ (figura 3) são enzimas ubíquas, intra e extracelulares, apresentam elevado interesse médico-científico dado seu envolvimento em várias doenças inflamatórias humanas. Estas proteínas são encontradas em vários tecidos de diferentes animais como mamíferos, serpentes, escorpiões e abelhas. Com base em sua origem, atividade catalítica, sequência de aminoácidos, comprimento da cadeia e os padrões de ligação dissulfeto, elas são divididas em 16 grupos (Murakami, *et al.*, 2011), sendo que 10 grupos são PLA₂ secretórias (sPLA₂). Fosfolipases A₂ de venenos de serpente estão classificadas no grupo I (*Elapidae* e *Colubridae*) ou II (*Viperidae*), variando sua massa molecular entre 13 e 15 kDa e possuindo 7 pontes de dissulfeto em sua constituição (Schaloske & Dennis, 2006; Burke & Dennis, 2009). Atuam hidrolisando fosfolípídeos na posição Sn-2 liberando lisofosfolípídeos e ácidos graxos, em uma reação dependente de cálcio. Desempenham papéis importantes na fertilização, proliferação celular, contração muscular e também são importantes em funções celulares como processos inflamatórios uma vez que liberam precursores de prostaglandinas (PGs) e leucotrienos além de interferirem na homeostase de membranas por meio dos lisofosfolípídeos gerados (Dennis, 1994).

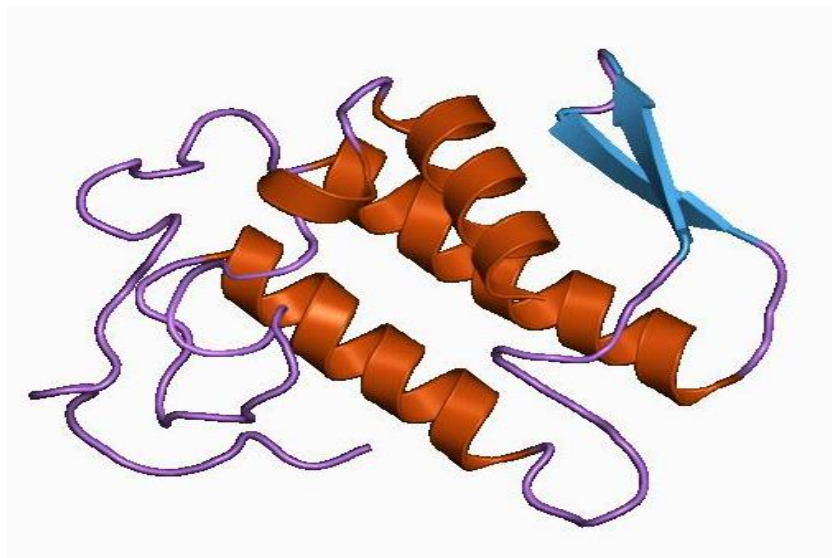


Figura3- Estrutura tridimensional de uma Fosfolipase A₂. Destaques em azul (folhas beta) e em marrom (alfa hélices). Fonte: http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry-images/1bbc_cbc600.png - Acesso em: 06/02/2016 19:56

1.2.4 Metalopeptidases

As metalopeptidases são hidrolases do tipo endopeptidases que dependem da ligação a um metal, geralmente o zinco, em seu sítio catalítico, para a manifestação de suas atividades enzimáticas. Variando amplamente quanto à filogenia e função. As metalopeptidases de veneno de serpente (SVMPs) compreendem um grupo de enzimas que compõem a superfamília das metzincinas, caracterizadas pela presença de uma metionina localizada na porção C-terminal do motivo zinco (Birkedal & Hansen, 1995). Pertencem à família M12 de peptidase e são subdivididas em classes: PI a PIIId (Figura 4).

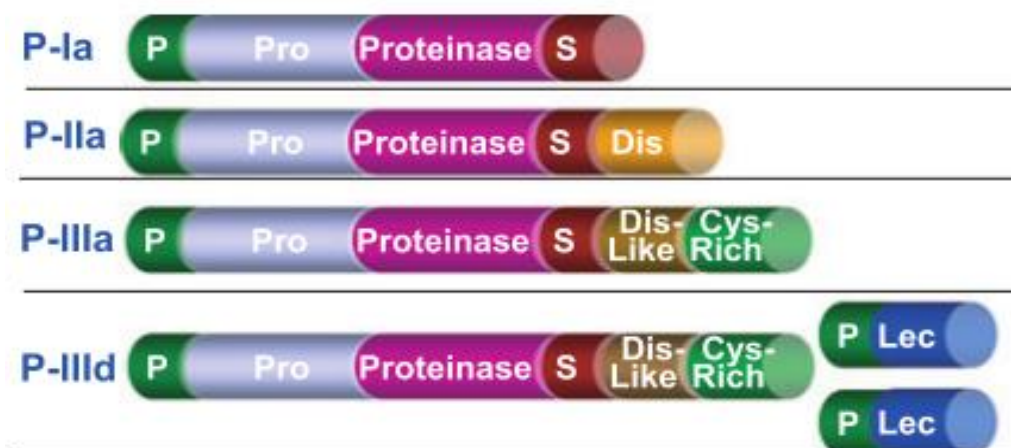


Figura 4-Esquema das classes de metalopeptidases. (P= Peptídeo sinal; Pro= Pró-domínio; Proteinase= metalopeptidase; S= Proteína de conservação de domínio; Dis= Disintegrina; Dis-Like= domínio tipo disintegrina; Cys-rich= domínio rico em cisteína e Lec= lectinas). Adaptado de Fox & Serrano (2008).

As toxinas do tipo PI consistem em proteínas que apresentam somente o domínio metalopeptidase, as PII apresentam metalopeptidase e disintegrina, PIII possuem os domínios metalopeptidase, disintegrina e um domínio rico em cisteína e as PIII_d, além da cisteína possuem lectina em sua composição (Birrell *et al.*, 2007; Fox & Serrano, 2008). O domínio metalopeptidase apresenta uma sequência de aminoácidos conservados HEXXHGXH que promove hidrofobicidade necessária para imobilizar o átomo de zinco (Escalante *et al.*, 2011).

As metalopeptidases possuem domínios de múltiplas funções e tem-se demonstrado que o sítio catalítico não é o único domínio importante dessa classe de toxina responsável por causar hemorragia e inflamação nas vítimas. Tem como alvo principal as plaquetas na perturbação da hemostase, que ocorre através da inibição da interação com o colágeno e / ou fator de Von Willebrand através de mecanismos que resultam em hemorragia sistêmica; As metalopeptidases estão presentes na maioria dos venenos elapídicos australianos (Birrell *et al.*, 2007).

1.2.5 Serinopeptidases

As serinopeptidases de veneno de serpentes são responsáveis pela digestão proteica, pela clivagem de ligações peptídicas no lado carboxila de L-aminoácidos de cadeia lateral básica ou hidrofóbica. Caracterizam-se por apresentar em seu sítio ativo uma tríade catalítica idêntica a presente na tripsina, a qual é formada pelo agrupamento dos aminoácidos His 57 e Asp 102, Ser 195 (Rawling *et al.*, 1994) (figura 5). Estas estão reunidas em clãs, sendo consideradas provindas de um ancestral comum, podendo agir em um ou mais fatores de coagulação (Andrews *et al.*, 2004). Constituem um grupo de enzimas que apresentam uma ampla variedade de atividades como exo, endo e oligopeptidases, sendo classificadas em mais de 20 famílias, organizadas em S1 a S66 de serinopeptidases, com massa molecular entre 25 kDa a 35 kDa. Estas enzimas foram agrupadas conforme sua similaridade estrutural e evidências funcionais, promovendo diversos efeitos fisiológicos como, alterações no sistema hemostático, agindo nos componentes da cascata de coagulação e com ação fibrinogenolítica (Barrett & Rawlings, 1995).

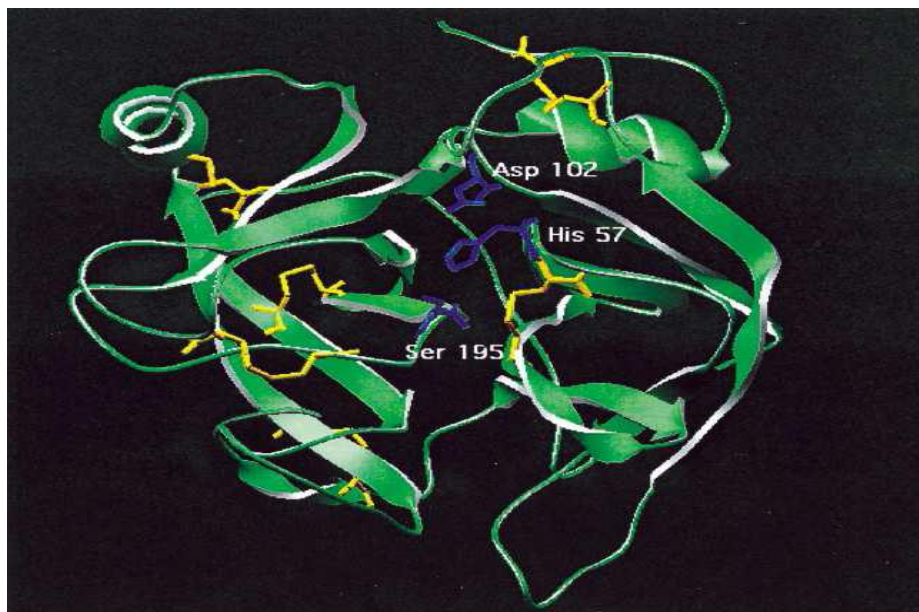


Figura 5- Estrutura tridimensional da tripsina onde se observa a tríade catalítica das serinoproteases (His 57, Asp 102, Ser 195). Fonte: www.cevap.org.br - Acesso em: 06/02/2016 21:52.

Várias peptidases isoladas de venenos ofídicos são usadas para fins terapêuticos, dentre as quais serinoproteases como o Batroxobin[®] e o Ancrod[®] utilizados como anticoagulantes em cirurgias cardíacas. A batroxobina, uma enzima trombina símile encontrada no veneno de *Bothrops atrox*, usada no tratamento de doenças trombóticas (Kisiel *et al.*, 1987). Por fim, os diferentes tipos de serinoproteases estudadas até o presente momento podem ser utilizadas como ferramentas de diagnóstico ou para a produção de medicamentos de uso clínico.

Ainda que já existam enzimas dos venenos de serpentes com aplicação na regulação da cascata da coagulação, vários laboratórios têm buscado novas alternativas de venenos que apresentem atividade na hemostasia, a fim de obtenção de produtos farmacológicos ainda não investigados. As serpentes australianas da família *Elapidae*, destacam-se para este fim, por apresentarem proteínas pró-coagulantes (5-40% do total) com propriedades similares ao complexo enzimático macromolecular encontrado no sangue (Speijer *et al.*, 1986; Lavin *et al.*, 2009).

Cabe aqui destacar que até o momento não há descrição na literatura sobre a presença de serinoproteases no veneno de *Pseudechis australis* e, uma vez que serinoproteases estão intimamente ligadas ao sistema hemostático, novas serinoproteases podem ter um grande potencial no desenvolvimento de fármacos para terapias de distúrbios hemostáticos, seja tornando o sangue incoagulável ao interferir na cascata de coagulação, vindo a ser um anticoagulante em processos

cirúrgicos ou atuando localmente para a contenção de focos hemorrágicos justamente por apresentar atividade pró-coagulante.

2. OBJETIVO

O presente estudo propôs purificar e caracterizar molecularmente, mediante testes específicos, serinopeptidases presentes no veneno de *Pseudechis australis*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização da atividade proteolítica.
- Identificação de peptidases através de ensaios com inibidores específicos.

3. METODOLOGIA

As principais etapas realizadas no trabalho estão representadas no fluxograma abaixo:

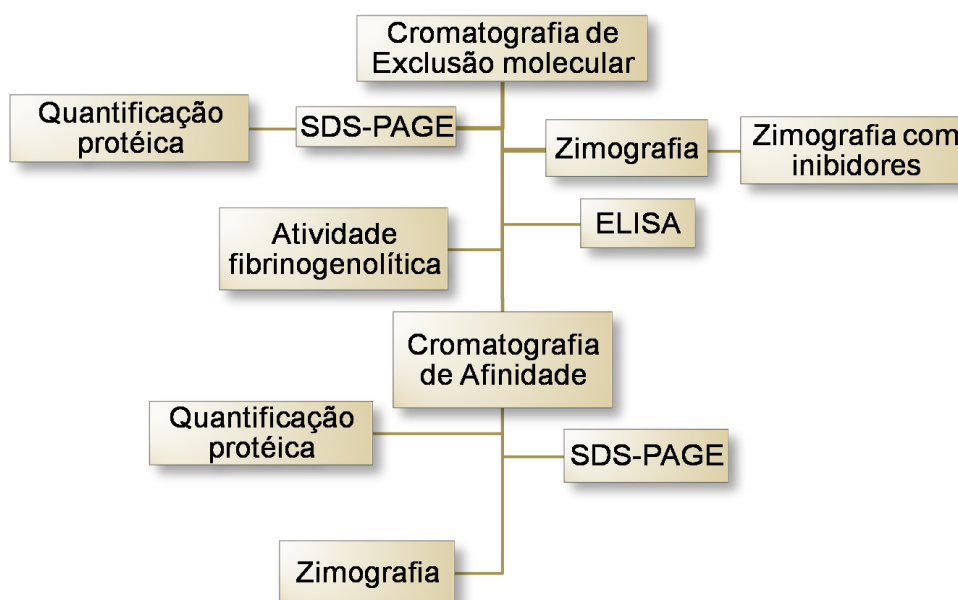


Figura 6- Esquema da metodologia utilizada no trabalho.

3.1 Material (Veneno)

O veneno utilizado neste trabalho é oriundo do banco de venenos do Centro de Biotecnologia do IPEN, ou cedidos pela empresa *Venom Supplies Pty. Ltd.* (Austrália) com a qual temos colaboração formal. As amostras de veneno liofilizado foram mantidas em freezer a -20°C e ressuspendidos em tampão adequado antes das análises.

3.2 Fracionamento

Baseado em “screening” anteriores realizados pelo grupo e também em consulta a outros trabalhos, a obtenção de serinopeptidases derivadas do veneno de *Pseudechis australis*, foi baseada em 2 etapas cromatográficas (Silveira *et al.*, 1989; Yamazaki, Brown & Morita, 2002) utilizamos nesta etapa do trabalho um sistema cromatográfico Äkta Purifier (GE Healthcare), onde as absorbâncias dos eluatos foram monitoradas em 220 e 280 nm.

3.2.1 Cromatografia de exclusão molecular

A primeira etapa realizada foi uma cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 75 10/300 GL (GE) em tampão de Bicarbonato de Amônio 100 mM com fluxo de $0,6 \text{ ml min}^{-1}$ em modo isocrático para separação de acordo com seu volume hidrodinâmico. Após a solubilização de 20 mg do veneno e centrifugação a 10000 G, durante 5 minutos, 0,5 ml do sobrenadante foi injetado e procedeu-se a eluição a $0,6 \text{ mL/min}$ sendo coletados 1 mL/tubo. A absorbância do eluato foi medida em 220 nm e 280 nm.

3.2.2 Cromatografia de afinidade

Em uma segunda etapa foi utilizada a cromatografia de afinidade onde as frações de interesse foram diluídas em 0,6 mL de tampão A (Tris 50mM + NaCl 1M pH 7,4), centrifugadas por 5 minutos a 10000 G e 0,5 mL do sobrenadante foi injetado em uma coluna de benzamidina (5 x 100 mm, GE) que é um inibidor específico reversível para serinopeptidases. O fluxo de trabalho foi de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. Após lavagem com 3 volumes de coluna para remoção da fração não adsorvida, foi realizada uma elevação repentina na concentração de 0 a 100% de tampão B (glicina 100 mM pH 3,0) para a eluição da fração adsorvida e mantida assim até que todos os componentes que interagem com a coluna fossem adsorvidos.

3.3 Dosagem proteica por *Nanodrop*TM

Foi realizada inicialmente uma curva de calibração com albumina bovina nas concentrações de (0 a 2,0 mg/ml), sendo realizadas diluições seriadas a partir de uma amostra de 2,0 mg/mL e após leitura das mesmas em *Nanodrop*TM foi criada uma curva de calibração a partir da regressão linear e sua equação da reta R^2 (0,9880). Após a padronização pela curva de calibração, alíquotas de 2 μL de amostras provenientes das cromatografias de exclusão molecular e afinidade foram adicionadas ao pedestal de leitura e lidas em triplicata para obtenção da concentração total de proteínas nas amostras. A concentração de proteína das amostras foi fornecida em mg/mL utilizado o aparelho de espectrofotometria *NanoDrop*TM 1000 (Thermo Fisher Scientific).

3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (*Sodium Dodecil Sulphate Poliacrilamide Gel Electrophoresis*)

A eficiência das etapas de fracionamento foi avaliada através de gel de eletroforese SDS-PAGE, onde alíquotas das amostras de cada fração foram diluídas em tampão não redutor (glicerol, SDS (*sodium dodecyl sulfate*) 10%, Tris 1M pH 6,8 e azul de bromofenol) ou redutor (com β -mercaptoetanol) e utilizando-se eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% para o gel de resolução segundo método descrito por Laemmli (1970) e 4% para o gel de empilhamento. Como catalisadores para polimerização dos géis foram utilizados persulfato de amônio (P.A.) e N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED).

Amostras de 30 μ L foram diluídos em 10 μ L de tampão de amostra não redutor (glicerol, SDS 10%, Tris 1M, pH 6,8 e azul de bromofenol) e aquecidas por aproximadamente 5 minutos à 70 °C. 30 μ l de amostra foram aplicadas por poço e realizada uma corrida eletroforética a 90 V, após o término, o gel foi corado com *Coomassie Blue G-250*. (*Coomassie Blue G-250*, Ácido acético e H₂O) e descorado com Ácido acético, Etanol e H₂O destilada.

3.5 Determinação da atividade hidrolítica por zimografia

Para análise da atividade proteolítica por zimografia foram utilizados dois substratos diferentes (gelatina e caseína) para uma maior caracterização da especificidade da ação de peptidases presentes no veneno de *Pseudechis australis*. Um gel de eletroforese foi preparado de forma semelhante à descrita no item 3.4, porém, como o objetivo pretendido era avaliar a atividade hidrolítica a etapa de aquecimento foi descartada e houve a adição de 2,0 mg/mL de substrato de gelatina ou caseína co-polimerizados ao gel. Após a eletroforese, o gel foi lavado três vezes por 20 minutos em uma solução de Triton x-100 2,5% para a remoção de resíduos de SDS, a seguir o gel foi lavado com água destilada para a remoção do Triton X-100 e então imerso por aproximadamente 18 horas em tampão de incubação para zimografia (Tris-HCl 50 mM + 5 mM CaCl₂ pH 8,0). A seguir, o gel foi corado com *Coomassie Blue-G 250* e após ser descorado foram observadas bandas mais claras ao “background” azul característico do gel evidenciando locais onde houve a ação de peptidases nos diferentes substratos. Também foram utilizados inibidores específicos

de metalopeptidases nos géis de zimografia (EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*) na concentração final de 2,5 mM e de serinopeptidases (PMSF - *phenylmethane sulfonyl fluoride*) na concentração final de 2,5 mM. Onde, os inibidores foram adicionados junto as amostras de veneno (40 µL) com a finalidade de interromper a atividade proteolítica, auxiliando no processo de caracterização das peptidases.

3.6 Atividade fibrinogenolítica

Para este ensaio foram diluídos 4,5 mg de fibrinogênio bovino em 1 mL de Tris-HCl 100mM pH 8,0. Uma alíquota de 20 µL desta solução foi incubada com 20 µL das frações provenientes da cromatografia de exclusão molecular. A incubação foi realizada em diferentes tempos (15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos e 24 horas) em estufa a 37 °C. Foi utilizada como controle, uma amostra sem fibrinogênio e outra apenas com o fibrinogênio no tempo de 60 minutos. Após o término da incubação a alíquota foi retirada, e foram adicionados 10 µL de tampão de amostra redutor (glicerol, SDS 10%, Tris 1M, pH 6,8 e azul de bromofenol e β-mercaptoetanol). A amostra foi incubada em banho-maria a 70°C por 5 minutos com propósito de parar a reação e romper as pontes dissulfeto entre as subunidades alfa, beta e gama. O padrão de degradação do fibrinogênio foi então analisado em gel SDS-PAGE a 15%.

3.7 Detecção de serinoproteases por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

O veneno bruto na concentração de 200 µg/mL em tampão carbonato/bicarbonato 100 mM pH 9,0 foi utilizado como antígeno para sensibilizar uma placa de 96 poços. Em cada poço foi aplicado 100 µL de amostra (20 µg) e mantido “*overnight*” em geladeira a 4°C. Em seguida, a placa foi lavada com TBS (*Tris-buffered saline*)-Tween 0,1% (2 vezes), adicionado solução de bloqueio (3% leite em pó (Molico) em TBS-Tween 0,1%) e mantido durante 1 hora em estufa a 37°C. Após lavagem com TBS-Tween 0,1% (3 vezes), aplicamos o anticorpo antigiroxina em diluições seriadas a partir da diluição de 1:500, deixando “*overnight*”. Posteriormente, procedeu-se nova lavagem com TBS-Tween 0,1% (3 vezes), e aplicação de anticorpo secundário anti-IgG de camundongo, conjugado com peroxidase, em TBS-Tween 0,1%, na diluição de 1:500, mantido durante uma hora a 37°C. Para a etapa de revelação, foi realizada nova lavagem da placa com TBS-Tween 0,1% (3 vezes) e aplicação de solução

contendo OPD (ortofenildiamina) e incubado por 20 minutos em câmara escura em temperatura ambiente. Em seguida procedemos à leitura da placa em espectrofotômetro a 450nm.

4. RESULTADOS

4.1 Cromatografia de exclusão molecular

As amostras do veneno bruto foram inicialmente separadas através de cromatografia de exclusão molecular gerando seis frações com tamanhos distintos (Figura 7). As quatro primeiras frações a serem eluídas foram selecionadas por representarem as de maior massa molecular/volumes hidrodinâmicos (acima de 20 kDa). Posteriormente, foram submetidas a ensaio eletroforético para visualização dos componentes protéicos e análise do grau de pureza.

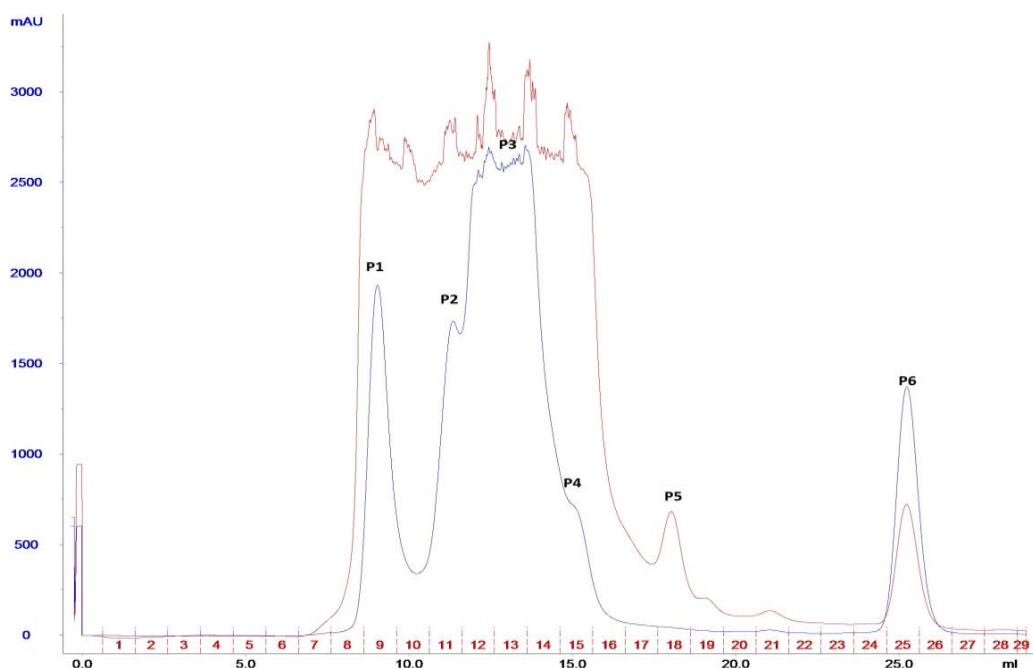


Figura 7 – Cromatografia de exclusão molecular, 20 mg de veneno de *Pseudechis australis*, diluído em 0,6 mL de bicarbonato de amônio 100 mM. Foram injetados 0,5 mL em coluna Superdex 75 10/300GL, fluxo de 0,6 mL/min. (Absorbância 280 nm em azul e 220 nm em vermelho).

4.2 Gel de eletroforese SDS-PAGE (exclusão molecular)

As frações de 1 a 6 provenientes da exclusão molecular foram analisados por SDS-PAGE a 15% de poliacrilamida (Figura 8), em condições não redutoras (adaptado de Laemmli, 1970).

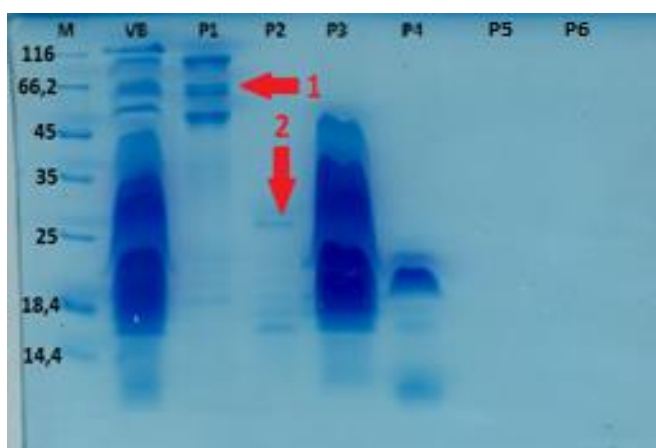


Figura 8– SDS-PAGE das frações P1 a P6 do veneno de *Pseudechis australis* provenientes da cromatografia de exclusão molecular (M = padrão de massa molecular em kDa; VB = Veneno bruto de *Pseudechis australis*).

Em trabalho realizado anteriormente pelo grupo (Chagas, 2015) observou-se que a fração 1 contém uma peptidase com características de uma metalopeptidase da classe P-III de aproximadamente 66 kDa (seta 1).

E da mesma forma foi monitorada a fração 2 por também apresentar características proteolíticas em experimentos anteriores e por se tratar de uma protease com tamanho de aproximadamente 30 kDa (seta 2). As concentrações protéicas das amostras realizadas por *NanoDrop*TM 1000 foram de: 1,306 mg/mL para a fração 1; 1,277 mg/mL para a fração 2; 1,417 mg/mL para fração 3 e 0,369 mg/mL para a fração 4.

Os frações 5 e 6 por não apresentarem bandas visíveis no gel de SDS e por possuírem baixos volumes hidrodinâmicos foram excluídos dos experimentos seguintes.

4.3 Atividade proteolítica

A próxima etapa de análise foi verificar a atividade proteolítica das frações provenientes da cromatografia de exclusão molecular (Figura 9). Foram feitos géis com caseína e gelatina em concentração de substrato de 2,0 mg/mL, para observar a seletividade quanto à atividade hidrolítica.

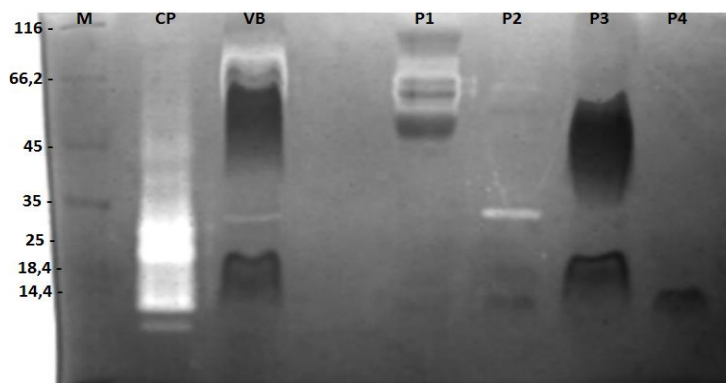


Figura 9– Gel de zimografia de caseína das frações 1 a 4 da cromatografia de exclusão molecular (M = padrão de massa molecular; CP = controle positivo *Bothrops jararaca* 2 mg/mL; VB = veneno bruto *Pseudechis australis*).

O gel de caseína apresentou um perfil de atividade proteolítica para as frações analisadas. Foram observadas as presenças de ao menos duas bandas com atividade proteolítica na fração 1 na região de 66 kDa indicando serem integrantes da classe PIII de metalopeptidases. Também se observa duas bandas com atividade proteolítica na fração 2, uma menos evidente com aproximadamente 66 kDa podendo também se tratar de uma outra metalopeptidase pertencente a família PIII e outra bem evidente ao redor de 30 kDa que não foi observada no gel contendo o substrato de gelatina (Figura 10).

Não foi observada atividade proteolítica nos frações analisados no substrato gelatina, exceto no controle positivo com veneno de *Bothrops jararaca*, indicando não seletividade dos constituintes para gelatina. Fica assim evidente que nenhum dos frações analisados possui atividade colagenásica.

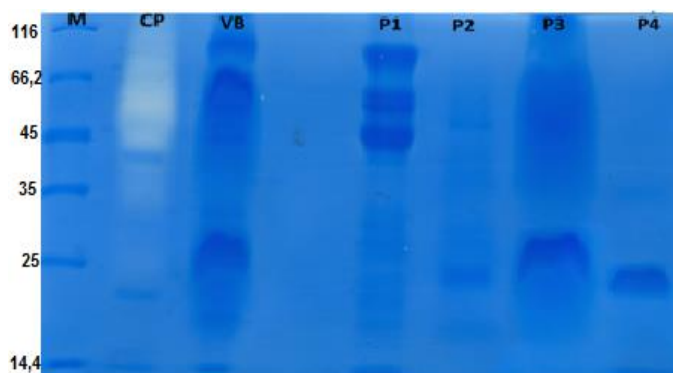


Figura 10– Gel de zimografia com gelatina da cromatografia de exclusão molecular (M= padrão de massa molecular; CP= controle positivo *B. jararaca* 2mg/mL; VB= veneno bruto *Pseudechis australis*).

Como as outras duas frações (P3 e P4) não apresentaram atividade proteolítica em nenhum dos substratos testados, estas foram então descartados para continuação dos ensaios. Porém, cabe aqui ressaltar que no decorrer do processo inicial de fracionamento do veneno neste trabalho, quando era feito o “pool” da fração 2 que continha uma parte da fração 3, nos ensaios de atividade proteolítica não era observada nenhuma atividade (Figura 11), dando assim indícios de haver no fração 3 um inibidor de serinopeptidase.

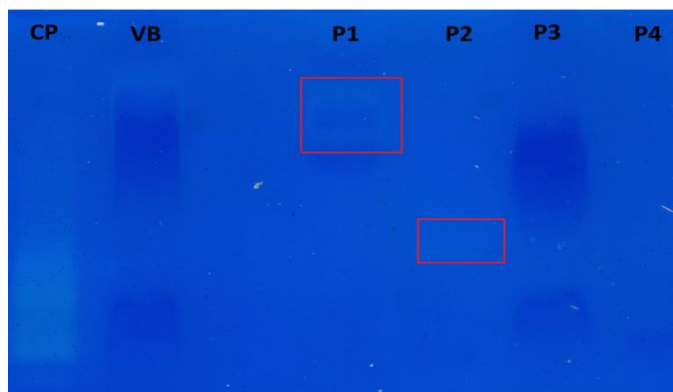


Figura 11– Zimografia de caseína dos frações 1 a 4 da exclusão molecular evidenciando a não atividade proteolítica do fração 2 em ensaios anteriores (CP= controle positivo veneno *Bothrops jararaca* 2mg/mL; VB= veneno bruto de *Pseudechis australis*).

Tendo em vista que no fração 3 poderia haver um inibidor de serinopeptidase do veneno, foi realizado um experimento para confirmar a presença ou não deste inibidor (Figura 12).

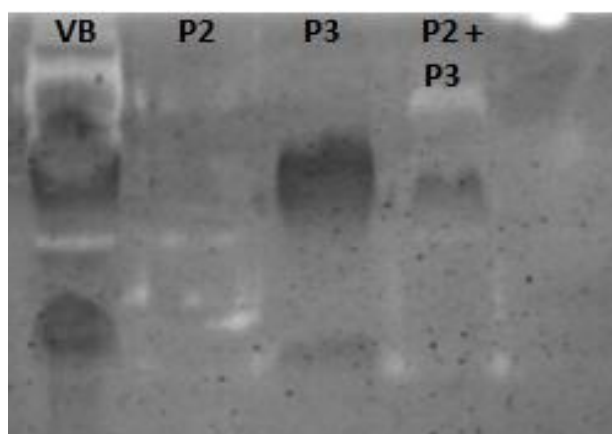


Figura 12- Gel de zimografia com caseína dos frações 2 e 3 da exclusão molecular separados e o pool para observação da inibição da atividade proteolítica da serinopeptidase contida no fração 2 (VB= veneno bruto de *Pseudechis australis*).

Pode-se claramente observar a atividade proteolítica do veneno bruto de *Pseudechis australis*, bem como a atividade na fração 2 proveniente da exclusão

molecular, o fração 3 apresenta uma grande concentração de um componente entre 30 e 50 kDa porém não se observa nenhuma atividade proteolítica no mesmo. Quando realizado o *pool* de ambos os frações pode-se observar uma diminuição considerável da concentração do componente da fração 3 entre 30 e 50 kDa bem como a quase completa inibição da atividade proteolítica da serinopeptidase de 30 kDa.

Visto que a caseína apresentou resultados positivos para atividade proteolítica o passo seguinte foi a realização de um gel (Figura 13) nas mesmas condições da figura 9, com o acréscimo de inibidores de peptidases específicos para se ter a certeza de que se tratava de uma serinopeptidase. Nesta etapa foram utilizados os inibidores: EDTA para metalopeptidases e PMSF para serinopeptidases, ambos em concentração de 10 mM.

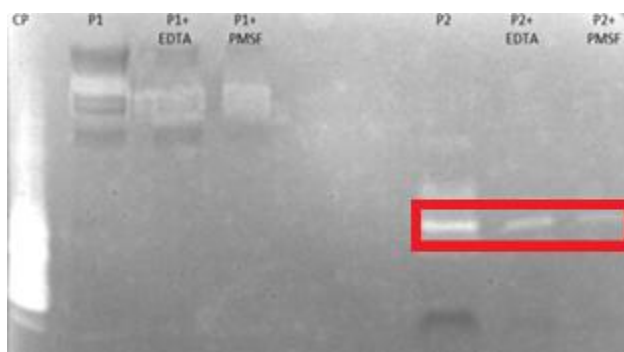


Figura 13– Gel de zimografia de caseína das frações 1 e 2 da cromatografia de exclusão + inibidores específicos para metalopeptidases (EDTA); e serinopeptidases (PMSF); (CP= Controle positivo *B. jararaca* 2 mg/mL).

Nas amostras da fração 1 observa-se uma diminuição na intensidade de atividade proteolítica no fração incubado com EDTA, um inibidor específico de metalopeptidases e até mesmo o desaparecimento da banda superior evidenciando a presença de metalopeptidases da classe P-III neste fração.

Nas amostras da fração 2 observa-se um total de 3 bandas e ao serem incubadas com EDTA 3 bandas perdem sua atividade restando apenas uma com aparente diminuição da atividade, indicando assim que as que perderam atividade são prováveis metalopeptidases PIII (45 kDa e 55 kDa) e que a banda que teve sua atividade levemente diminuída pode ser uma serinopeptidase cálcio dependente (algumas serinopeptidases ativadoras de protrombina usam cálcio como cofator) o que poderia explicar a sutil diminuição de sua intensidade. No poço contendo o

inibidor PMSF foi observado ainda que não totalmente, uma maior inibição da atividade proteolítica da amostra se comparado ao EDTA.

4.4 Ensaio Imunoenzimatico (ELISA)

Para complementar os resultados de caracterização do veneno, realizamos um teste imunoenzimatico ELISA com o veneno bruto de *Pseudechis australis* frente a um anticorpo anti-giroxina, do veneno de *Pseudechis australis* foi imunorreativa ao anticorpo anti-giroxina (Figura 14).

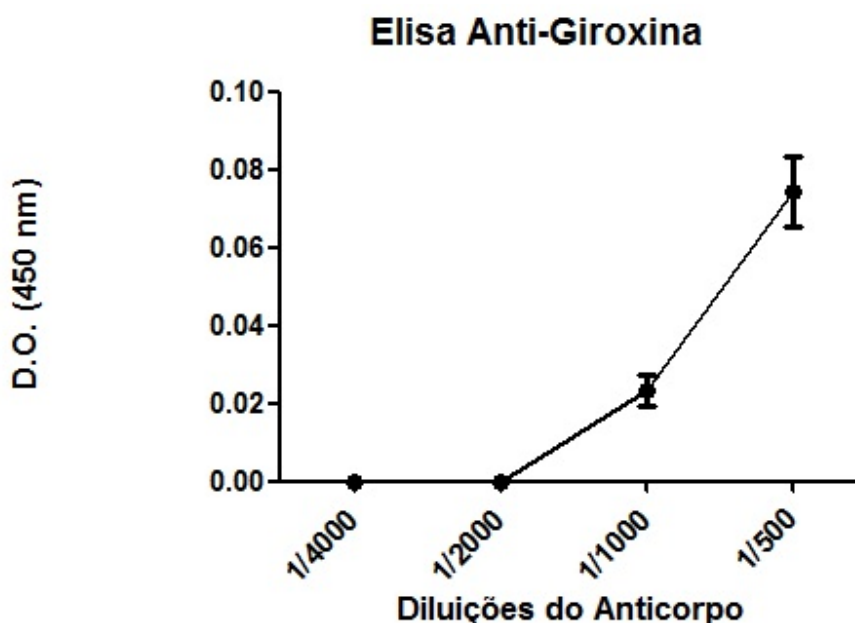


Figura 14- Gráfico de ensaio imunoenzimatico ELISA do veneno de *Pseudechis australis*

4.5 Atividade fibrinogenolítica

Este ensaio foi realizado com o objetivo de observar a clivagem das cadeias alfa, beta ou gama do fibrinogênio (Figura 15), para uma melhor caracterização da amostra.

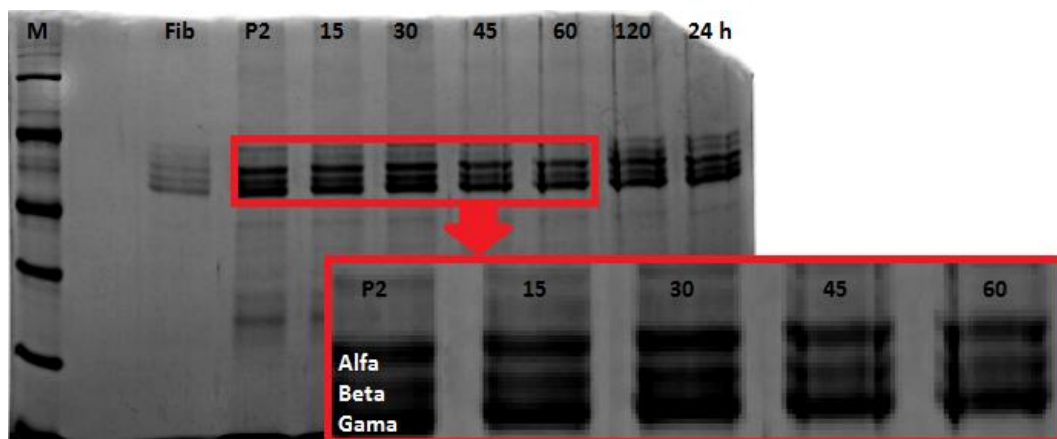


Figura 15- Ensaio fibrinolítico, com os tempos de 15 minutos a 24 horas para observação da atividade sobre o fibrinogênio na amostra da fração 2 proveniente da cromatografia de exclusão molécula. (M= padrão de massa molecular; Fib= fibrinogênio bovino puro).

Observa-se que a cadeia beta de fibrinogênio é significativamente degradada dentro de um período de apenas 60 minutos e também, que a banda correspondente à cadeia alfa diminui, ainda que de forma menos intensa.

5. CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

O segundo passo para o isolamento da serinoprotease foi a cromatografia de afinidade (Figura 16), onde o fração 2 da cromatografia de exclusão molecular foi escolhido devido a maior probabilidade de ser uma serinopeptidase.

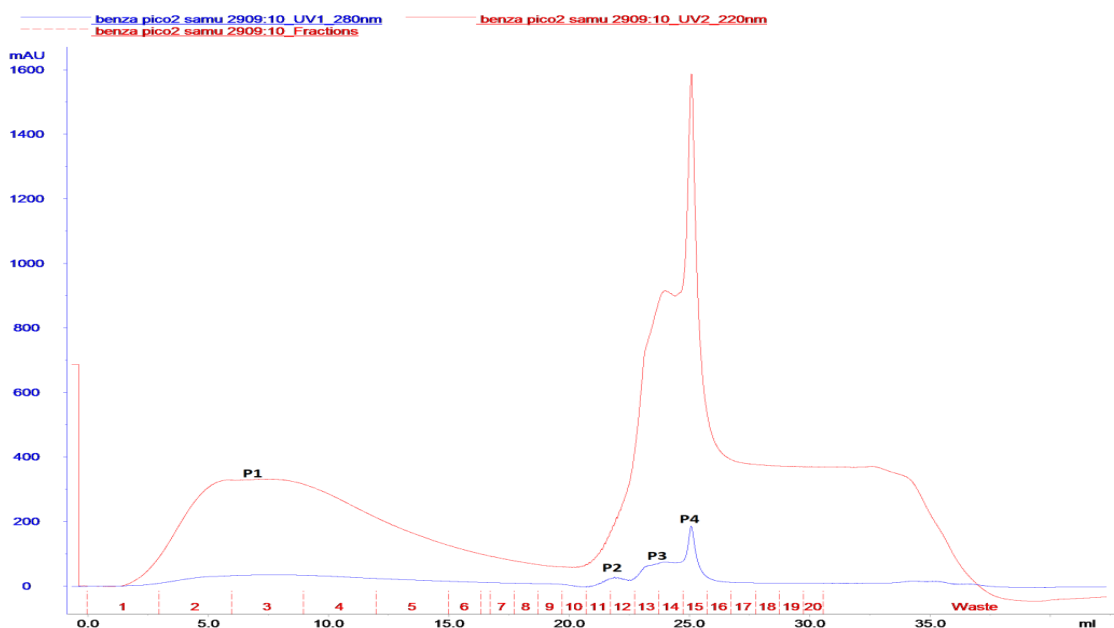


Figura 16 – Cromatografia de afinidade a Benzamidina da fração 2 de exclusão molecular de veneno de *Pseudechis australis*, diluído em 0,6mL de tampão A. Injetados 0,5mL em coluna de Benzamidina, fluxo de 1,8 mL/min.

Observamos a presença de quatro frações sendo uma fração (P1) o não retido, ou seja, que não teve afinidade com a coluna e outros três frações (P2 a P4) que interagiram com a mesma, confirmando que há mais do que uma molécula com afinidade a benzamidina na fração 2, resultado que é também observado na figura 6, onde observamos a presença de um total de 4 bandas com alguma atividade proteolítica.

5.1 Eletroforese em gel SDS-PAGE (afinidade)

As frações provenientes da cromatografia de afinidade tiveram alíquotas de 30 μ L retiradas para análise em gel de SDS-PAGE a 15% de poliacrilamida (Figura 17) para ser observada a pureza da amostra.

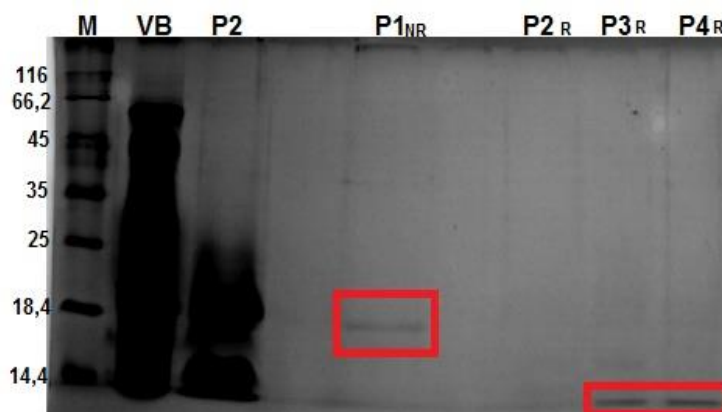


Figura 17 – Gel SDS das frações da cromatografia de afinidade à Benzamidina. (M= Padrão de massa molecular; VB= veneno bruto de *Pseudechis australis*; P2= Fração proveniente da cromatografia de exclusão molecular; NR= fração não retida na coluna cromatográfica; R= fração retida na coluna cromatográfica)

Neste ensaio foi observado que o fração 1 NR (não retido) e os frações 3 e 4 R (retido) da cromatografia de afinidade a benzamidina algum volume hidrodinâmico detectado, porém em nenhuma das 3 frações observa-se a presença de amostra em torno de 30 kDa. A quantificação realizada por *NanoDrop™ 1000* indicou que a concentração existente de proteínas não ultrapassava 40 μ g/mL em todos os frações.

Também foi realizado um gel de caseína (Figura 18) para observar se a atividade caseinolítica se mantinha na amostra após a cromatografia de afinidade.



Figura 18 – Zimografia de caseína das frações provenientes da cromatografia de afinidade (CP= controle positivo com veneno de *Bothrops jararaca* 2mg/mL VB= veneno bruto de *Pseudechis australis*, P1= Fração 1da cromatografia de exclusão molecular; P2= Fração 2 da cromatografia de exclusão molecular; NR= fração não retida na coluna cromatográfica; R= fração retida na coluna cromatográfica).

Também não foi observado resultado positivo para atividade proteolítica na zimografia, sendo o mesmo semelhante aos resultados encontrados no gel de SDS-PAGE.

6. DISCUSSÃO

O veneno da *Pseudechis australis* possui inúmeras toxinas já isoladas incluindo miotoxinas, hemotoxinas e peptídeos natriuréticos. A maioria destas toxinas causa distúrbios fisiológicos em seres humanos, entretanto a relevância clínica para desenvolvimento de protótipos terapêuticos ainda necessitam serem determinados (Kini, 2003; Johnston *et al.*, 2013).

Neste trabalho buscamos caracterizar uma serinopeptidase ainda não descrita neste gênero de serpente. No decurso da pesquisa observou-se que a molécula estudada exhibe características semelhantes ao Fator Xa (FXa) do complexo protrombinase de coagulação sanguínea (Kini & Rao, 2002).

Apesar de trabalhos como o de Birrell e colaboradores (2007) descreverem inúmeros componentes do veneno de *Pseudechis australis*, não foi encontrado nenhuma serinopeptidase e nem indícios de que o veneno em questão possuísse o Fator Xa (FXa), o fator X (FX) é uma glicoproteína que atua tanto nas vias intrínseca como extrínseca da coagulação sanguínea (Wang & Zhang, 1995). Como em seu trabalho encontrou-se um inibidor de serinopeptidase do tipo Kunitz, seria de esperar que o veneno possuísse uma serinopeptidase, com esta observação em mente este trabalho vem então complementar os achados de Birrell e colaboradores publicado em 2007.

Inicialmente, procedeu-se um fracionamento do veneno bruto, utilizando a cromatografia de exclusão molecular, sendo observada a presença de seis frações majoritários. Nesta técnica cromatográfica, ocorre a separação das moléculas com base nas diferenças de seu volume hidrodinâmico ou massa molecular. Após a separação parcial dos constituintes, as frações foram submetidas a eletroforese, sob condições desnaturantes redutoras e não-redutoras, sendo possível a identificação de seus componentes entre 116 kDa a 14 kDa.

Em trabalhos anteriores do grupo, observamos que havia indícios de atividade proteolítica nos frações 1 e 2 da cromatografia de exclusão. Em posse desses dados foi realizado para confirmação uma zimografia usando gelatina ou caseína, substratos comumente utilizados para observar atividade proteolítica e que também possuem semelhança com componentes de tecido e sangue humano. As frações do fração 1 possuem características de metalopeptidases do tipo PIII, as metalopeptidases de classe PIII tem massas moleculares entre 60 e 100 kDa e contém em sua estrutura a

pró-peptidase, uma disintegrina-símile e um domínio rico em cisteína (Fox & Serrano, 2008; Markland & Swenson, 2013).

Na fração 2 proveniente da cromatografia de exclusão molecular fica muito evidente a presença de um constituinte capaz de clivar caseína em aproximadamente 30 kDa, porém a mesma não possui atividade sobre a gelatina. Desta forma há um indício inicial de que esta seja uma serinopeptidase. Via de regra as serinopeptidases de veneno de serpentes possuem massa molecular entre 28 e 36 kDa (Serrano & Mouron, 2005), podendo ser classificadas como pertencente ao Clã A da família S1 de serinopeptidases. As serinopeptidases da família S1 têm em comum a semelhança com a quimotripsina, uma endopeptidase que hidrolisa ligações peptídicas distantes dos extremos C e N-terminal, apresentando especificidade para aminoácidos aromáticos (Perona & Craik, 1997).

O veneno total e as frações analisadas, não apresentaram atividade gelatinolítica, resultados semelhantes foram obtidos em outros trabalhos como Paixão-Cavalcante, e colaboradores (2015) e Sanchez e colaboradores (2011), onde seus espécimes de estudo eram serpentes da espécie *Bitis*, e apesar do veneno apresentar atividade hemorrágica, seus experimentos sugerem que os venenos em questão possuem baixa quantidade de collagenases. A gelatina tem como constituinte principal o colágeno, uma proteína fundamental na constituição da matriz extracelular e tecido conjuntivo. Várias metalopeptidases clivam colágeno e isso interfere em inúmeros processos fisiológicos inclusive a ruptura da microvasculatura e solubilização de tecidos (Matsui, 2005; Markland & Swenson, 2013). Nossos dados indicam que o veneno de *Pseudechis australis* não possui atividade collagenásica e que seu alvo molecular ainda é desconhecido.

A atividade da fração 2 no decorrer do trabalho sofreu interferências inicialmente devido a uma forma diferente de coleta do *pool* onde havia uma contaminação com parte do fração 3. Devido a isso nos primeiros experimentos não se observava nenhuma atividade mesmo no substrato de caseína (Figura 11). Porém, após a otimização do processo levantou-se a hipótese de haver um inibidor de serinopeptidase na fração 3 que interferia na atividade do fração 2, podendo este ser o inibidor do tipo Kunitz encontrado por Birrell, e colaboradores (2007). Vários autores (Cardle & Dulton, 1997; Harvey, 2001; Fry, 2005; Serrano, *et al.*, 2005; Calvete, 2007 e Yang, 2014;) citam em seus trabalhos que, os inibidores de serinopeptidases presentes nos venenos de serpente são do tipo Kunitz. Os inibidores tipo Kunitz de

serpentes podem ser divididos em dois grupos a partir de suas funções básicas: Inibidores de Tripsina (Ti) e Quimotripsina (Chi) (Cardle & Dufton, 1997) e, são compostos por aproximadamente 60 resíduos de aminoácidos e três pontes dissulfeto, exibindo uma ampla variedade de funções fisiológicas como inibidor de peptidase e bloqueador de canal iônico (Harvey, 2001). Desta forma confirmamos a presença de um inibidor de serinopeptidase como citado por Birrel e colaboradores (2007).

O passo seguinte para uma maior caracterização e distinção das peptidases encontradas foi a realização de zimografias contendo inibidores específicos de metalopeptidases (EDTA) e serinopeptidases (PMSF). O fração 1 continha metalopeptidases da classe P-III, que ao serem expostas ao EDTA tiveram sua atividade diminuída ou inibida. O EDTA é considerado um agente quelante de cátions divalentes, o cálcio é um exemplo de cátion divalente e quando em contato com o EDTA tem sua atividade inibida.

Metalopeptidases da classe PIII possuem massas moleculares entre 60 e 100 kDa com intensa atividade hemorrágica. As toxinas hemorrágicas são capazes de degradar proteínas da membrana basal incluindo colágeno, fibronectina e laminina. Também são capazes de degradar gelatina e fibrinogênio, porém não foi observada a ação do veneno sobre a gelatina. As PIII exercem sua atividade hemorrágica através de um mecanismo duplo que envolve tanto a inibição da agregação plaquetária por seu domínio disintegrina-simile quanto a proteólise das integrinas e proteínas adesivas por seu domínio metalopeptidase (Markand, 1998).

Ativadores de protrombina de venenos de serpente necessitam de cálcio para que possam apresentar atividade proteolítica e estão classificados em quatro grupos baseados em suas propriedades estruturais e no mecanismo de ativação da protrombina. Os grupos, grupos A e B são metalopeptidases e os grupos C e D serinopeptidases. Os grupos A e B necessitam além do cálcio fatores de coagulação como o Fator V (FV) para serem ativados, já os grupos C e D necessitam apenas de fosfolípidios e cálcio para sua ativação e foram descritos inicialmente em elapídeos australianos (Rao, Swarup & Kini, 2003; Markland & Swenson, 2013, Serrano, 2013). Por este motivo pode-se compreender por que a amostra teve sua atividade diminuída quando exposta ao EDTA, entretanto esta inibição de atividade foi inferior ao inibidor específico de serinopeptidase PMSF. De posse dessas informações podemos

considerar que a amostra possui características de uma serinopeptidase ativadora de protrombina do grupo C ou D.

Para uma maior caracterização do veneno foi realizado um ensaio de detecção imuno enzimática ELISA, frente a um anticorpo policlonal contra uma serinopeptidase trombina-símile do veneno de cascavel sul-americana *Crotalus durissus terrificus*, com massa molecular de aproximadamente 33 a 35 kDa, a giroxina. Esta toxina é uma neurotoxina que faz com que suas presas tenham síndromes convulsivas, causando movimentos rotacionais em volta do eixo central do corpo (Alexander, *et al.*, 1988; Sano & Martins, *et al.*, 2001), e por sua semelhança tanto em massa molecular bem como por ser sabidamente uma serinopeptidase, um resultado positivo de um anticorpo anti-giroxina em uma amostra de veneno não crotálico, daria ainda mais certeza de que o veneno de *Pseudechis australis* contenha uma serinopeptidase. Ao menos um dos clones foi estruturalmente similar ao encontrado na giroxina, possibilitando um resultado positivo para este ensaio, desta maneira confirma-se uma provável presença de uma serinopeptidase ainda não descrita no veneno de *P. australis*.

A fração correspondente a fração 2 da cromatografia de exclusão molecular demonstrou em ensaio fibrinogenolítico ser uma β e α -fibrinogenase tempo dependente. As fibrinogenases clivam seletivamente ou em combinação as cadeias α (alfa), β (beta), ou γ (gama) do fibrinogênio, sendo responsáveis por distúrbios na coagulação sanguínea e possuindo atividade anti ou pró-coagulantes (Assakura, *et al.*, 1994). Vários trabalhos (Saguchi, *et al.*, 2005; Vilca-Quispe, *et al.*, 2010; Fernandes de Oliveira, *et al.*, 2013) descrevem serinopeptidases com características semelhantes à encontrada neste trabalho, uma molécula capaz de causar β e α fibrinogenólise. Serrano & Maroun em 2005 trazem em seu estudo uma tabela com várias serinopeptidases que já estão caracterizadas e com suas sequências de aminoácidos completa, apresentando várias características, inclusive suas atividades sobre as cadeias fibrinogenolíticas. Visto que, serinopeptidases tem uma afinidade maior às cadeias beta se comparado as outras, esta é mais uma evidencia positiva de que a amostra em questão é uma serinopeptidase.

Depois de realizados os experimentos da primeira etapa de purificação do veneno, o fração 2 proveniente da cromatografia de exclusão molecular foi submetido a uma segunda etapa de purificação através da cromatografia de afinidade por Benzamidina, um inibidor específico reversível para serinopeptidases. A cromatografia

de afinidade também foi utilizada como estratégia de purificação de venenos de serpentes por Silveira e colaboradores (1989) e Wu e colaboradores (2008) em seus respectivos trabalhos.

Na cromatografia de afinidade é possível observar ao menos 4 componentes presentes no fração 2, desta forma ficou evidenciado que há mais do que uma molécula com afinidade a benzamidina presente na amostra. As frações obtidas na cromatografia de afinidade foram então submetidas a uma análise em gel de SDS-PAGE onde, três dos quatro frações apresentaram bandas, porém nenhuma das amostras analisadas apresentava padrão de migração eletroforético em torno dos 30 kDa, massa esta que seria a esperada para uma possível serinopeptidase. Foi realizado em conjunto a este experimento uma quantificação da amostra por *NanoDrop™ 1000* que revelou a presença de proteínas existentes abaixo de 40 ug/mL em todos os frações. Também foi realizado um zimografia com caseína para tentar observar a atividade proteolítica das bandas encontradas no SDS-PAGE, os resultados encontrados foram negativos, indicando assim uma perda completa da atividade proteolítica da amostra, ou sua autólise, ou ainda uma baixa concentração de enzima inferior ao limite detectável por zimografia.

Wu e colaboradores em 2008 estudando um homólogo de serinopeptidase da serpente *Trimeresurus jerdonii*, observou que esta serinopeptidase mesmo em uma concentração superior a 50 µg/mL perdia sua atividade proteolítica. Silveira e colaboradores em 1989 e Vila-Quispe em 2010 descrevem que a purificação de enzimas trombina-símile de veneno de *Lachesis muta muta* e *Bothrops marajoensis* em pH 5,0 tornava as enzimas inativas, em nosso trabalho utilizamos um pulso de glicina com pH 3 para que as amostras que se ligaram a benzamidina fossem eluídas, ainda que nos tubos coletores foram adicionadas alíquotas de 200 µL de tampão Tris 1M pH 8,0 para que o pH da glicina não desnaturasse as frações. Porém, após a coleta não foi realizada a aferição do pH, este pode ter sido um fator que interferiu negativamente nos resultados encontrados. Os mesmos autores citam também que a maior parte, porém não todas as enzimas que possuem atividade fibrinogenolítica são termicamente estáveis, a instabilidade térmica da amostra não chegou a ser avaliada. Por fim, o processo de diálise utilizado para se retirar o excesso de NaCl com a finalidade de analisar a amostra em espectrometria de massas, pode ser o responsável pela possível autólise das bandas e também um dos motivos para as baixas concentrações encontradas nas quantificações por *NanoDrop™ 1000* e

resultados observados nos géis de SDS-PAGE e zimografia de caseína dos frações da cromatografia de afinidade.

A caracterização desta molécula dentre outras podem torná-las uma fonte de novos agentes terapêuticos e ainda necessitam de mais estudos para sua total compreensão.

7. CONCLUSÃO

✓ Identificamos uma serinoprotease do veneno de *Pseudechis australis*, um gênero de serpente que até o momento não possui trabalhos publicados com tais características.

✓ Isolamos parcialmente a serinopeptidase com apenas uma etapa cromatográfica (Exclusão Molecular).

✓ Observamos que não há atividade desta serinopeptidase sobre gelatina e que, por outro lado, a caseína é hidrolisada por esta peptidase.

✓ Há possivelmente algum componente presente semelhante ao fator X (FX) dependente de Cálcio na fração 2 da cromatografia de exclusão molecular e sua atividade foi parcialmente inibida frente ao EDTA.

✓ A atividade sobre o fibrinogênio demonstra que a degradação da cadeia beta fica evidente já em 60 minutos e que sua ação estende-se para a cadeia alfa, dando indícios claros de que a amostra age sobre as duas cadeias ($A\alpha$ e $B\beta$) do fibrinogênio.

✓ A cromatografia de afinidade de alguma forma interfere negativamente sobre o rendimento da purificação e quantificação da amostra.

REFERÊNCIAS:

- ALEXANDER, G.; GROTHUSEN, J.; ZEPEDA, H.; ROBERT, J. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. **Toxicon**, v. 26, n. 10, p. 953–960, 1988.
- ANDREWS, R. K.; GARDINER, E. E.; BERNDT, M. C. Snake venom toxins affecting platelet function. **Methods in Molecular Biology**, v. 273 p. 335-348, 2004.
- ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; MANDELBAUM, F. R. Isolation and characterization of five fibrin(ogen)olytic enzymes from the venom of *Philodryasolfersii* (green snake). **Toxicon**, v. 32, n. 7, p. 819-831, 1994.
- BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Families of serine peptidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 318, n.2, p. 247-250, 1995.
- BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, v. 1, 2ed, 2004.
- BIRKEDAL-HANSEN, H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 7, n. 5, p. 728–735, 1995.
- BIRRELL, G W.; EARL, S. T. H.; WALLIS, T P; MASCI, P. P.; JERSEY, J.; GORMAN, J. J.; LAVIN, M. F. The diversity of bioactive proteins in Australian snake venoms. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 6, n. 6, p. 973–986, 2007.
- BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 62, n. 3, p. 325–372, 1994.
- BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. **Journal of lipid research**, v. 50, n. Supplement, p. S237-S242, 2009.
- CALVETE, J. J.; ESCOLANO, J.; SANZ, L. Snake venomomics of *Bitis* species reveals large intragenus venom toxin composition variation: application to taxonomy of congeneric taxa. **Journal of proteome research**, v. 6, n. 7, p. 2732-2745, 2007.
- CALVETE, J. J.; SANZ, L.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRRES, J. M. Venoms, venomomics, antivenomics. **FEBS Letters**, v. 583, n. 11, p. 1736–1743, 2009.
- CANTÚ, M.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Seqüenciamento De Peptídeos Usando Espectrometria De Massas: Um Guia Prático. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 669–675, 2008.
- CARDLE, L.; DUFTON, M. J. Foci of amino acid residue conservation in the 3D structures of the Kunitz BPTI proteinase inhibitors: how do variants from snake venom differ?. **Protein engineering**, v. 10, n. 2, p. 131-136, 1997.

CHAGAS, B. BRUNO. **Purificação e caracterização de inibidores peptídicos endógenos de proteases do veneno de serpentes**. São Paulo: IPEN/USP. 2015. Programa de Tecnologia Nuclear - aplicações. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 2015.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 18, p. 13057-13060, 1994.

ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; FOX, J.W.; GUTIÉRREZ, J.M. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1781-1794, 2011.

FERNANDES DE OLIVEIRA, L. M.; ULLAH, A.; MASOOD, R.; ZELANIS, A.; SPENCER, P. A.; SERRANO, S. M. T.; ARNI, R. K. Rapid purification of serine proteinases from *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* venoms. **Toxicon**, v. 76, p. 282–290, 2013.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS Journal**, v. 275, n. 12, p. 3016–3030, 2008.

FRY, B.G. Properties of components from Australian elapids. **Toxicon**, v. 37, p. 11–32, 1999.

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.

GEMPELER-MESSINA, P. M.; VOLZ, K.; BÜHLER, B.; MULLER, C. Protein C activators from snake venoms and their diagnostic use. **Haemostasis**, v. 31, n. 3-6, p. 266–72, 2002.

GEORGIEVA, D.; ARNI, R. K.; BETZEL, C. Proteome analysis of snake venom toxins: pharmacological insights. **Expert review of proteomics**, v. 5, n. 6, p. 787–797, 2008.

HARVEY, A. L. Twenty years of dendrotoxins. **Toxicon**, v. 39, n. 1, p. 15-26, 2001.

JAMES, G. T. Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers. **Analytical biochemistry**, v. 86, n. 2, p. 574–579, 1978.

JOHNSTON, C. I.; BROWN, S. G. A.; LEARY, M. A. O.; CURRIE, B. J.; GREENBERG, R.; TAYLOR, M.; BARNES, C.; WHITE, J.; ISBISTER, G. K. Mulga snake (*Pseudechis australis*) envenoming: a spectrum of myotoxicity, anticoagulant coagulopathy, haemolysis and the role of early antivenom therapy - Australian Snakebite Project (ASP-19). **Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)**, v. 51, n. 5, p. 417–24, 2013.

KINI, R. M. Excitement ahead: Structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 827–840, 2003.

KINI, R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **The Biochemical journal**, v. 397, n. 3, p. 377–387, 2006.

KINI, R. M.; RAO, V. S.; JOSEPH, J. S. Procoagulant proteins from snake venoms. **Haemostasis**, v. 31, n. 3-6, p. 218–224, 2002.

KISIEL, W.; KONDO, S.; SMITH, K. J.; McMULLEN, B. A.; SMITH, L. F. Characterization of a protein C activator from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 15, n.26 p. 607-613, 1987.

KUCH, U.; KEOGH, J. S.; LAURIE, J W.; SMITH, A.; MEBS, D. Phylogeography of Australia's king brown snake (*Pseudechisaustralis*) reveals Pliocene divergence and Pleistocene dispersal of a top predator. **Naturwissen schaften**, v. 92, n. 3, p. 121–127, 2005.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227 n. 5259 p. 680-685, 1970.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35–61, 2009.

LAVIN, M. F.; MASCI, P. P. Prothrombinase complexes with different physiological roles. **Thrombosis and Haemostasis**. v. 88, p. 611-619, 2002.

LU, Q.; CLEMETSON, J. M.; CLEMETSON, K. J. Snake venoms and hemostasis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 3, n. 8, p. 1791–1799, 2005.

MANN, K. G.; NESHEIM, M. E.; CHURCH, W. R.; HALEY, P.; KRISHNASWAMY, S. Surface dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. **Blood**, v. 76, p. 1-16, 1990.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the Haemostatic System. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1749–1800, 1998.

MARKLAND, F. S.; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 62, p. 3–18, 2013.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom peptidases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica**, v. 1477, n. 1-2, p. 146–156, 2000.

MATSUI, T.; HAMAKO, J. Structure and function of snake venom toxins interacting with human von Willebrand factor. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1075–1087, 2005.

MENDEZ, M. C.; RIET-CORREA F. Snakebite in sheep. **Veterinary and Human Toxicology**; v. 37, n. 1, p. 62-3, 1995.

MURAKAMI, M.; TAKETOMI, Y.; SATO, H.; YAMAMOTO K. Secreted phospholipase A2 revisited. **Journal of Biochemistry**, v.150 n. 2, p. 233-255, 2011.

PAIXÃO-CAVALCANTE, D.; KUNIYOSHI, A. K.; PORTARO, F. C. V.; DA SILVA, W. D.; TAMBOURGI, D. V. African Adders: Partial Characterization of Snake Venoms from Three Bitis Species of Medical Importance and Their Neutralization by Experimental Equine Antivenoms. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 2, p. 3419-3419, 2015.

PERONA, J. J.; CRAIK, C. S. Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 48, p. 29987–29990, 1997.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Rev Ass Med Brasil**, v. 47, n. 1, p. 24–29, 2001.

RAO, V. S.; SWARUP, S.; KINI, R. M. The nonenzymatic subunit of pseutarin C, a prothrombin activator from eastern brown snake (*Pseudonajatextilis*) venom, shows structural similarity to mammalian coagulation factor V. **Blood**, v. 102, n. 4, p. 1347–1354, 2003.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Families of serine peptidases. **Methods in enzymology**, v. 244, p. 19, 1994.

ROSKAMS, J.; RODGERS, L. **Lab Ref.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 1, p. 63-91, 2004.

SAGUCHI, K.; SAGUCHI, Y. H.; MURAYAMA, N.; OHI, H.; FUJITA, Y.; CAMARGO, C.M.; SERRANO, S. M. T. HIGUCHI, S. Molecular cloning of serine proteinases from *Bothropsjararaca* venom gland. **Toxicon**, v. 46, n. 1, p. 72–83, 2005.

SÁNCHEZ, E. E.; HOTLE, D.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A. Neutralization of *Bitis parviocula* (Ethiopian mountain adder) venom by the South African Institute of Medical Research (SAIMR) antivenom. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, n. 4, p. 213-217, 2011.

SANO-MARTINS, I. S.; TOMY, S. C.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M. B.; de CASTRO, S. C. B.; de SOUZA e SILVA, M. C. C.; AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A.; KAMIGUTI, A. S.; WARREL, D. A.; THEAKSTON, R. D. G. Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of humans by the South American rattlesnake (*Crotalusdurissus*) in Brazil. **QJM: monthly journal of the Association of Physicians**, v. 94, n. 10, p. 551–9, 2001.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A 2 superfamily and its group numbering system. **BiochimicaetBiophysicaActa (BBA)**, v. 1761, n. 11, p. 1246-1259, 2006.

SERRANO, S. M. T. SHANNON, J.D.; WANG, D.; CAMARGO, A. C. M. A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: An approach to understanding venom proteomics. **Proteomics**, v. 5, n. 2, p. 501–510, 2005.

SILVEIRA, A. M. V.; MAGALHÃES, A.; DINIZ, C. R.; OLIVEIRA, E. B. Purification and properties of the thrombin-like enzyme from the venom of *Lachesis mutamvta*. **International Journal of Biochemistry**, v. 21, n. 8, p. 863–871, 1989.

SPEIJER, H.; GOVERS-RIEMSLAQ, J. W.; ZWAAL, R. F.; ROSING, J. Prothrombin activation by an activator from the venom of *Oxyuranus scutellatus* (Taipan snake). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 28, p. 13258-13267, 1986.

TAN, N. H.; PONNUNDURAI, G. A comparative study of the biological properties of Australian elapid venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology**. V. 97 n. 1 p. 99-106, 1990.

TWINING, S. S. Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes. **Analytical biochemistry**, v. 143, n. 1, p. 30–34, 1984.

VILCA-QUISPE, A.; PONCE-SOTO, L. A.; WINCK, F. V.; MARANGONI, S. 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.

YAMAZAKI, Y.; BROWN, R. L.; MORITA, T. Purification and cloning of toxins from elapid venoms that target cyclic nucleotide-gated ion channels. **Biochemistry**, v. 41, n. 38, p. 11331–11337, 2002.

YANG, W.; FENG, J.; WANG, B.; CAO, Z.; LI, W.; WU, Y.; CHEN, Z. BF9, the First Functionally Characterized Snake Toxin Peptide with Kunitz-Type Protease and Potassium Channel Inhibiting Properties. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 28, n. 2, p. 76-83, 2014.

WILLIAMS, D.; WÜSTER, W.; FRY, B. G. The good, the bad and the ugly: Australian snake taxonomists and a history of the taxonomy of Australia's venomous snakes. **Toxicon**, v. 48, n. 7, p. 919–930, 2006.

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**, v. 52, n. 2, p. 277–284, 2008.

ZHANG, Y. U. N.; WANG, W. Isolation and properties of a blood coagulation factor x activator from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*) coagulation factor X activator was purified from the venom of *Ophiophagus hannah* by gel filtration and two steps of FPLC Mono-Q column i. **Science**, v. 33, n. 95, p. 1263–1276, 1995.