

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**  
**SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**IDENTIFICACIÓN DE REGIONES MOLECULARES EN  
METALOPROTEINASAS HEMORRÁGICAS TIPO PI Y PIII DE VENENOS  
DE SERPIENTES QUE INTERACCIONAN CON PROTEÍNAS DE LA  
MEMBRANA BASAL**

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado  
en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología para optar al grado y  
título de Maestría Académica en Microbiología

**NAVILLA APÚ LEITÓN**

**Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica**

**Mayo, 2024**

## **DEDICATORIA**

A mi papá, por su esfuerzo en aprender cada día más para poder responder todas mis preguntas, y a mi mamá, por enseñarme a nunca dejar de estudiar.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi comité asesor, Dra. Cristina Herrera, Dra. Teresa Escalante y Dra. Alexandra Rucavado por toda su guía durante este proceso, por abrirme las puertas del Instituto y confiar en mí, y porque han sido un gran ejemplo, no solo desde un punto de vista científico-académico, sino también personal.

Al Dr. José María Gutiérrez y a la Dra. Erika Camacho, así como a todo mi grupo de investigación en el Instituto Clodomiro Picado, por su apoyo y ayuda en la realización de este proyecto.

A todos los compañeros del Instituto, que de una u otra manera me han ayudado y me han hecho sentir parte del Instituto, son un ejemplo de trabajo en equipo y excelencia científica, pero sobre todo calidad humana. Especialmente a la Dra. Verónica Madrigal por acompañarme durante todo este proceso.

A mi familia y a Andrés, Neno, Andrés Mauricio, Aly y Kem por el apoyo incondicional durante todos estos años.

Al Dr. Aldo Rodríguez da Silva y Dr. Konstantinos Kalogeropoulos, por su ayuda y participación en este trabajo como pasantes del instituto.

A los compañeros de la Facultad de Farmacia y el INIFAR por el apoyo y el tiempo brindado para la realización de este proyecto.

Al Centro de Investigación en Ciencia e Ingeniería de Materiales (CICIMA) por permitirme usar el microscopio confocal.

A la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, así como al Consejo Nacional de Rectores (CONARE), por el financiamiento de este proyecto.

Esta Tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Microbiología

---

PhD. Carlos Quesada Gómez  
**Representante de la Decana del Sistema de Estudios de Posgrado**

---

PhD. Cristina Herrera Arias  
**Directora de Tesis**

---

PhD. Teresa Escalante Muñoz  
**Asesora**

---

PhD. Alexandra Rucavado Romero  
**Asesora**

---

PhD. Laura Monturiol Gross  
**Representante Programa de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología**

---

Navilla Apú Leitón  
**Sustentante**

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>i</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>ii</b>
<b>TABLA DE CONTENIDOS .....</b>	<b>iv</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1    Venenos de serpiente .....	1
1.2    Metaloproteinasas de venenos de serpientes .....	1
1.3    Membrana basal .....	4
1.4    Estudios de interacción de las regiones de MPVS con proteínas de la membrana basal y otras proteínas circundantes .....	5
<b>2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>10</b>
3.1    Objetivo General.....	10
3.2    Objetivos específicos .....	10
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>11</b>
4.1    Obtención de las MPVS.....	11
4.2    Animales de experimentación.....	11
4.3    Evaluación de la unión de las MPVS a colágeno IV y laminina .....	12
4.4    Evaluación del papel de la actividad proteolítica de las MPVS en la interacción con colágeno IV y laminina .....	14
4.5    Evaluación de la interacción de péptidos de diferentes regiones de MPVS con colágeno IV .....	16
4.6    Evaluación del efecto de la unión a colágeno IV, laminina y matrigel sobre la actividad proteolítica de las MPVS .....	18
4.7    Evaluación del efecto de la unión a colágeno IV y matrigel sobre la actividad hemorrágica de las MPVS .....	18
4.8    Localización de las MPVS sobre la MB de la microvasculatura de músculo cremáster de ratón <i>ex vivo</i> .....	19
4.9    Análisis estadístico .....	20
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>21</b>
5.1    Evaluación de la unión de las MPVS a colágeno IV y laminina .....	21

5.2	Evaluación del papel de la actividad proteolítica de las MPVS en la interacción con colágeno IV y laminina .....	25
5.3	Evaluación de la interacción de péptidos de diferentes regiones de MPVS con colágeno IV .....	28
5.4	Evaluación del efecto de la unión a colágeno IV, laminina y matrigel sobre la actividad proteolítica de las MPVS .....	29
5.5	Evaluación del efecto de la unión a colágeno IV y matrigel sobre la actividad hemorrágica de las MPVS .....	30
5.6	Distribución de la CsH1 y el fragmento DC sobre la microvasculatura del músculo cremáster de ratón <i>ex vivo</i> . .....	33
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>35</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>42</b>
<b>8.</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>43</b>
<b>9.</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>44</b>

## RESUMEN

Las metaloproteinasas de venenos de serpientes (MPVS) son enzimas dependientes de zinc presentes en los venenos de la familia Viperidae, que se caracterizan por provocar hemorragia local y sistémica. Se ha propuesto que la degradación de componentes de la membrana basal (MB) es un paso esencial en el mecanismo de hemorragia inducido por MPVS, ya que debilita la microvasculatura. Dentro de las proteínas de la MB involucradas se puede encontrar el colágeno IV y laminina, cuya degradación por parte de las MPVS se ha demostrado que posee un papel importante en el desarrollo de hemorragia. Sin embargo, aún no se conocen los exositos de las MPVS que podrían mediar la interacción con proteínas de la MB, y en cuales dominios de las MPVS podrían estar presentes estos exositos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la interacción del colágeno IV y la laminina con metaloproteinasas hemorrágicas de venenos de serpientes tipo PI, PIII y el fragmento DC con el fin de identificar regiones moleculares que participan en esta interacción. Se demostró mediante ensayos *in vitro* que la CsH1, una MPVS de tipo PIII, es capaz de unirse al colágeno IV y la laminina, siendo esta interacción independiente de su actividad proteolítica pero dependiente de su estructura terciaria. En contraste, la BaP1, una MPVS tipo PI, mostró muy leve interacción con estas proteínas de la MB. En el caso del fragmento DC de la CsH1 no se observó interacción con el colágeno IV y la laminina en las condiciones estudiadas, lo que sugiere que esta interacción puede estar dada principalmente por el dominio metaloproteinasa. Además, se encontró que la unión previa del colágeno IV a la CsH1 o a la BaP1 reduce la actividad proteolítica y la capacidad de causar hemorragia de estas toxinas, indicando que el sitio de unión del colágeno a las MPVS es cercano a su sitio catalítico. Por otro lado, en ensayos *ex vivo* la CsH1 se distribuyó en la MB de los vasos sanguíneos, mientras que el fragmento DC se localiza de manera más difusa en el tejido, respaldando los resultados obtenidos en los ensayos de unión *in vitro*. Finalmente, los estudios de interacción mediante péptidos sintéticos derivados de regiones moleculares de la CsH1 y la BaP1 no arrojaron conclusiones definitivas, principalmente debido a limitaciones del diseño del estudio de docking y la falta de estructura tridimensional en los péptidos sintetizados. Estos resultados aportan nuevo conocimiento acerca de las regiones de las MPVS que interactúan con el colágeno IV y la laminina, así como las diferencias en la unión de las MPVS de tipo PI y PIII a estas proteínas.

## ABSTRACT

Snake venom metalloproteinases (SVMP) are zinc-dependent enzymes present in the venoms of the Viperidae family, characterized by causing local and systemic hemorrhage. The degradation of basement membrane (BM) components has been proposed as a key step in the hemorrhage mechanism induced by SVMP, as it weakens the microvasculature. Among the BM proteins involved are type IV collagen and laminin, whose degradation by SVMP plays a significant role in the development of hemorrhage. However, the exosites of SVMP that mediate interaction with BM proteins and the domains in which these exosites might be present are still unknown. Therefore, the aim of this work was to evaluate the interaction of type IV collagen and laminin with hemorrhagic PI and PIII SVMP, and the DC fragment to identify molecular regions involved in this interaction. In vitro assays demonstrated that CsH1, a PIII SVMP, can bind to type IV collagen and laminin, with this interaction being independent of its proteolytic activity but dependent on its tertiary structure. In contrast, BaP1, a PI SVMP, showed very slight interaction with these BM proteins. The DC fragment of CsH1 did not show interaction with type IV collagen and laminin under the conditions studied, suggesting that this interaction is primarily mediated by the metalloproteinase domain. Furthermore, the pre-binding of type IV collagen to CsH1 or BaP1 reduced the proteolytic activity and hemorrhagic capacity of these toxins, indicating that the collagen binding site on SVMP is close to their catalytic site. Ex vivo assays revealed that CsH1 localized to the BM of blood vessels, while the DC fragment was more diffusely distributed in the tissue, supporting the results obtained in the in vitro binding assays. Finally, interaction studies using synthetic peptides derived from molecular regions of CsH1 and BaP1 did not yield definitive conclusions, mainly due to limitations in the docking study design and the lack of three-dimensional structure in the synthesized peptides. These results provide new insights into the regions of SVMPs that interact with type IV collagen and laminin, as well as the differences in binding between PI and PIII SVMP to these proteins.

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Péptidos de las MPVS CsH1 y BaP1 seleccionados y sintetizados a partir del estudio de docking. ....	17
---	----

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructuras de una MPVS de tipo PI y una de tipo PIII. ....	2
<b>Figura 2.</b> Componentes de la MB .....	5
<b>Figura 3.</b> Acoplamiento in silico entre la CsH1 y el péptido de colágeno I .....	16
<b>Figura 4.</b> Evaluación de la unión de las MPVS al colágeno IV y la laminina mediante Dot Blot.....	21
<b>Figura 5.</b> Evaluación de la unión de las MPVS al colágeno IV y la laminina mediante Western Blot en condiciones no reductoras.....	22
<b>Figura 6.</b> Evaluación de la unión de la CsH1 al colágeno IV y la laminina mediante Western Blot en condiciones reductoras.....	23
<b>Figura 7.</b> Evaluación de la unión de la CsH1, BaP1 y el fragmento DC al colágeno IV, la laminina y el matrigel mediante un ensayo de unión en fase sólida.....	24
<b>Figura 8.</b> Evaluación del papel del fragmento DC en la unión de la CsH1 al colágeno IV, la laminina y el matrigel, mediante un ensayo de competencia en ensayos de fase sólida .....	25
<b>Figura 9.</b> Evaluación del papel de la actividad proteolítica de las MPVS en la unión al colágeno IV utilizando Batimastat.....	26
<b>Figura 10.</b> Evaluación del papel la actividad proteolítica de la CsH1 purificada por HPLC en la unión al colágeno IV o la laminina .....	27
<b>Figura 11.</b> Evaluación de la unión de la CsH1 purificada por HPLC al colágeno IV, la laminina y el matrigel mediante un ensayo de unión en fase sólida.....	28
<b>Figura 12.</b> Evaluación de la unión de péptidos de MPVS al colágeno IV mediante Dot Blot.....	29
<b>Figura 13.</b> Evaluación del papel de la unión a laminina, colágeno IV o matrigel en la actividad proteolítica de la CsH1 y la BaP1 .....	30
<b>Figura 14.</b> Evaluación del efecto de la unión a colágeno IV y matrigel sobre la actividad hemorrágica de las MPVS. ....	32
<b>Figura 15.</b> Distribución de la CsH1 y el fragmento DC sobre la microvasculatura del músculo cremáster de ratón <i>ex vivo</i> .. ....	34

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ADAMs: Enzimas con un dominio tipo disintegrina, un dominio rico en cisteína y un dominio metaloproteínasa

DC: Dominios tipo disintegrina y rico en cisteína

DEAE: Dietilaminoetil

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

MB: Membrana basal

MEC: matriz extracelular

MPVS: Metaloproteínasas de venenos de serpiente

OMS: Organización Mundial de la Salud

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Venenos de serpiente

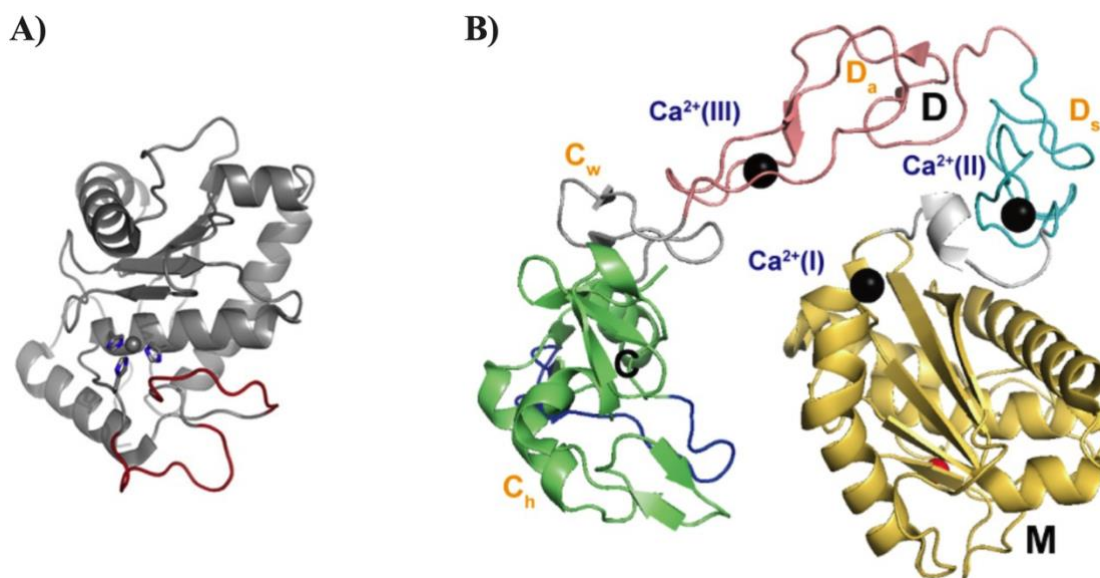
El accidente ofídico es considerado una enfermedad tropical desatendida y constituye un importante problema de salud pública principalmente en los países tropicales y subtropicales (1). En América Latina y el Caribe, las serpientes responsables de dichas mordeduras pertenecen a las familias Viperidae y Elapidae; sin embargo, los accidentes más comunes en la región son los ocasionados por serpientes de la familia Viperidae de los géneros *Bothrops* y *Crotalus* (2–4).

Las mordeduras por serpientes de la familia Viperidae se caracterizan por la presencia de efectos patológicos a nivel local y sistémico (3). A nivel local suele ocurrir edema, dolor, hemorragia y mionecrosis, y a nivel sistémico se puede presentar coagulopatías, hemorragia, hipovolemia, alteraciones renales y choque cardiovascular (1,3). Los diferentes efectos clínicos son el resultado de la acción de distintas proteínas presentes en los venenos de estas serpientes, como por ejemplo fosfolipasas A<sub>2</sub>, serinoproteinasas, proteínas tipo lectinas tipo C, disintegrinas y metaloproteinasas (3,5,6).

### 1.2 Metaloproteinasas de venenos de serpientes

Las metaloproteinasas de venenos de serpientes (MPVS) son enzimas dependientes de zinc. Estructuralmente se pueden clasificar en metaloproteinasas de tipo PI, tipo PII y tipo PIII de acuerdo con los dominios que las conforman (7,8). Las MPVS de tipo PI están compuestas únicamente por el dominio metaloproteinasa (**Figura 1A**) y poseen un peso molecular de aproximadamente 25 kDa (8). Algunos ejemplos de estas proteínas son la adamalisina II de *Crotalus adamanteus*, la atrolisina C de *Crotalus atrox* y la BaP1 de *Bothrops asper* (9–12). En el caso de las MPVS de tipo PII, estas se caracterizan por tener un peso molecular de entre 30 kDa a 60 kDa y estar formadas por el dominio metaloproteinasa y el dominio disintegrina, además, pueden encontrarse como dímeros o monómeros y en algunos casos el dominio disintegrina es liberado al ser procesado proteolíticamente (13,14). Uno de los representantes de esta familia es la metaloproteinasa BlatH1 aislada de la serpiente *Bothriechis lateralis* de Costa Rica (15). Por otro lado, las MPVS de tipo PIII son aquellas formadas por el dominio metaloproteinasa, el dominio “tipo disintegrina” y el dominio rico en cisteína (**Figura 1B**); adicionalmente algunas pueden tener una subunidad similar a lectina tipo-C unida

por puentes disulfuro (9,13,16). Estas MPVS son las de mayor tamaño, debido a que su peso molecular oscila entre los 60 kDa a los 100 kDa (13). Algunos ejemplos de este tipo de proteínas son la CsH1 de *Crotalus simus*, la jararagina de *Bothrops jararaca*, la atrolisina A y la VAP1 de *C. atrox* (16,17)



**Figura 1. Estructuras de una MPVS de tipo PI y una de tipo PIII.** A) Estructura tridimensional de la BaP1, una MPVS de tipo PI suministrada por T. Lingott (18). B) Estructura tridimensional de la catrocollastatin/VAP2B, una MPVS de tipo PIII (7). Se observa el dominio metaloproteinasas (M) en amarillo, el dominio tipo disintegrina (D) con subdominio  $D_s$  (celeste) y  $D_a$  (rosado), y el dominio rico en cisteína (C) con sus subdominios  $C_w$  (gris) y  $C_h$  (verde).

El dominio metaloproteinasas se caracteriza por estar compuesto por aproximadamente 200-210 residuos de aminoácidos y por presentar el sitio catalítico y la secuencia consensuada HEXXHXXGXXH, la cual es responsable de la coordinación del zinc y es seguida por el giro de metionina que es el responsable de formar una base hidrofóbica para la unión del zinc (13,19). Este dominio posee una forma elipsoidal y se divide en una región inferior y la región superior, donde se encuentra el sitio activo (16). El dominio metaloproteinasas en las diferentes MPVS presenta diferencias en un asa que conecta las hélices en la región inferior; se ha demostrado que la secuencia de aminoácidos de esta zona es variable y esto podría afectar el reconocimiento de sustratos debido a que forma parte de los bolsillos (*pockets*) de unión al sustrato (19). A nivel biológico este dominio es muy importante para la producción de hemorragia, debido a que se ha demostrado que

mutaciones en el sitio catalítico de las MPVS provocan pérdida de la actividad hemorrágica de las mismas (14).

Los dominios disintegrina y “tipo disintegrina” son dominios no catalíticos que poseen una secuencia específica para la unión a integrinas (7,13). Mediante estudios de cristalografía se ha determinado que en algunas metaloproteinasas estos dominios tienen una forma de C y se suelen dividir en los subdominios D hombro (D<sub>S</sub> por sus siglas en inglés) y D brazo (D<sub>A</sub> por sus siglas en inglés) del dominio disintegrina (7). Los subdominios D<sub>S</sub> y D<sub>A</sub> consisten en una serie de giros que forman la estructura del brazo y se unen con la región N-terminal del subdominio C muñeca (C<sub>W</sub> por sus siglas en inglés) del dominio rico en cisteína para darle origen a la forma de C (19). Estos subdominios poseen tres enlaces disulfuro cada uno mientras que el subdominio C<sub>W</sub> posee únicamente uno; además, entre ellos se encuentran unidos por enlaces de este tipo lo que le da estabilidad a la forma de C (7). Por otro lado, en el caso de las MPVS de tipo PIII se ha propuesto que el dominio “tipo disintegrina” cumple un papel en la hemorragia causada por estas MPVS (13,18).

El dominio rico en cisteína está compuesto por aproximadamente 120 residuos de aminoácidos de los cuales 13-15 son residuos de cisteína (19). Dichos residuos forman 2 hélices alfa, 4 láminas beta y un asa, la cual es estabilizada por enlaces disulfuro (13,16). Este dominio se divide estructuralmente en los subdominios C muñeca (C<sub>W</sub> por sus siglas en inglés) y C mano (C<sub>H</sub> por sus siglas en inglés), donde el C<sub>W</sub> está asociado el dominio disintegrina como se mencionó anteriormente y el subdominio C<sub>H</sub> consiste en asas plegadas irregularmente unidas por enlaces disulfuro (19). En este dominio se encuentra la región hipervariable (HVR por sus siglas en inglés), la cual se ubica cerca del sitio catalítico, por lo que podría ser importante para la interacción de las MPVS con otras proteínas, como por ejemplo las proteínas de la membrana basal (MB) (7).

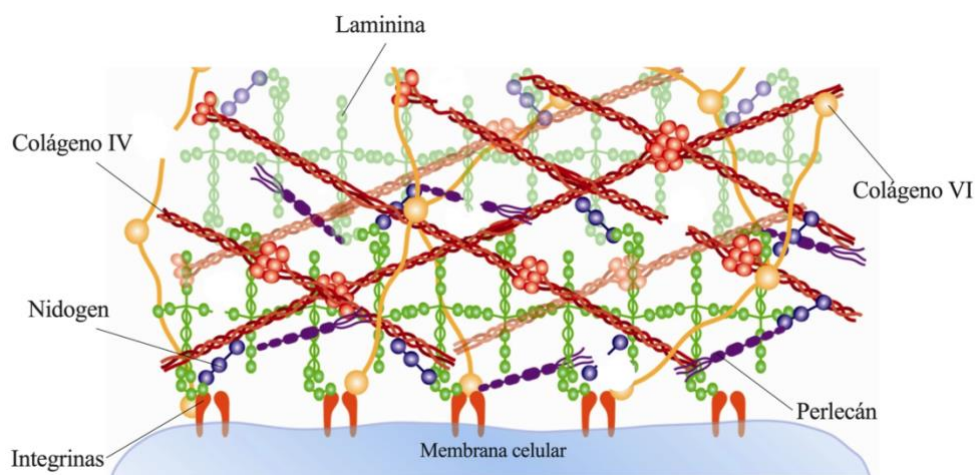
Las MPVS poseen numerosos efectos biológicos, los cuales pueden variar dependiendo de los dominios presentes en la proteína y de los sustratos que son capaces de degradar (13). Algunos de estos efectos son la participación en procesos inflamatorios, la alteración de la hemostasia, la generación de mionecrosis y dermonecrosis, y la producción de hemorragia (18,20–22).

El mecanismo por el cual las MPVS producen hemorragia aún no se ha elucidado por completo; sin embargo, se ha propuesto que la acción hemorrágica de estas proteínas ocurre en dos pasos (23). Primero, se debilita la estructura de los capilares mediante la degradación de proteínas de adhesión de las células endoteliales y componentes de la MB de la microvasculatura por parte de las MPVS (18,23). Esto debilita mecánicamente la pared vascular. Posteriormente, se pierde la integridad de los capilares debido a la acción de fuerzas hemodinámicas como la presión hidrostática y la fuerza de cizalla, que ocasionan la distensión y el adelgazamiento de las células endoteliales de la microvasculatura, lo cual lleva finalmente a la pérdida de la integridad del capilar y la extravasación de eritrocitos y otros componentes sanguíneos (23,24).

### 1.3 Membrana basal

La MB es una capa de proteínas de la matriz extracelular especializada, que se caracteriza por encontrarse en la base de las células epiteliales y endoteliales (25,26). La MB tiene funciones estructurales debido a que brinda soporte al epitelio y al endotelio y también de regulación celular al influir en su diferenciación, proliferación, migración y muerte celular (27). Además, la MB es importante en procesos de regeneración de tejidos, permeabilidad vascular, desarrollo embrionario y posee funciones muy variadas dependiendo de la zona en la que se encuentre (25–27).

La MB posee un grosor de aproximadamente 40-120 nm y está compuesta por una gran variedad de proteínas; sin embargo, los cuatro principales componentes son colágeno IV, laminina, nidogén y perlecan (**Figura 2**) (26,27). El colágeno IV y la laminina forman redes independientes, las cuales se interconectan por nidogén, el cual actúa como puente entre ambas moléculas teniendo un rol crítico en el ensamblaje de la MB, y proteoglicanos de heparán sulfato como el perlecan, que se caracteriza por ser importante para el ensamblaje de la MB (28).



**Figura 2. Componentes de la MB.** Representación de las proteínas presentes en la MB, adaptado de Gutiérrez *et al* 2016 (29).

La laminina es una glicoproteína compuesta por tres cadenas polipeptídicas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) unidas mediante enlaces disulfuro (27). Se han encontrado al menos 15 isoformas de laminina en animales y su diferenciación depende de la composición de sus cadenas (30,31). Además, dicha proteína posee la capacidad de formar redes y unirse a receptores celulares (31). La laminina participa en una gran cantidad de procesos celulares como la adhesión, diferenciación y migración celular (32).

Por otro lado, el colágeno IV es una proteína fibrosa que se encuentra únicamente en la MB de los animales y forma parte de la superfamilia de colágenos (33). Este colágeno está formado por protómeros compuestos por tres hélices alfa, las cuales son codificadas por diferentes genes (33,34). El colágeno IV se clasifica como una proteína formadora de redes, siendo la única proteína de la MB que forma una red unida covalentemente, por lo que se encarga de proveer soporte estructural y organización a la MB (33,35). Posee gran cantidad de sitios de unión a proteínas, como por ejemplo a integrinas y el factor de Von Willebrand, así como al glicosaminoglicano heparina (33,36). La alteración del colágeno IV puede generar diferentes enfermedades como trastornos a nivel renal o en la piel (35–37). Además, se ha visto que mutaciones en algunos de los genes que codifican para el colágeno IV como el *COL4A1* y *COL4A2* se asocian con la presencia de hemorragia intracerebral (38).

#### **1.4 Estudios de interacción de las regiones de MPVS con proteínas de la membrana basal y otras proteínas circundantes**

Al estudiar el mecanismo de la hemorragia producida por las MPVS mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* se ha observado que la degradación de componentes de la MB cumple un papel importante dentro del mismo (39). Sobre todo, se destaca la importancia de la hidrólisis del colágeno IV para la desestabilización de la microvasculatura en la hemorragia causada por MPVS, debido a que se ha observado que el colágeno IV es degradado por las MPVS hemorrágicas, pero no por las MPVS no hemorrágicas (17,20,39,40). Por otro lado, se ha propuesto que metaloproteinasas hemorrágicas de los grupos PII y PIII, además de degradar las proteínas de la MB son capaces de unirse a ellas: estudios *in vivo* mediante el uso de microscopía confocal han demostrado que MPVS hemorrágicas de tipo PII y PIII colocalizan con el colágeno IV en la MB de la microvasculatura mientras que una PI no muestra una colocalización tan clara (17,41).

Se han estudiado las interacciones específicas de MPVS con proteínas de la MB y otras proteínas de la matriz extracelular, y se ha encontrado que el dominio disintegrina podría ser importante en esta interacción y para la actividad hemorrágica de la toxina. Un estudio realizado por Tanjoni *et al.* 2003 que utiliza anticuerpos monoclonales contra la jararagina, una MPVS de tipo PIII hemorrágica, encontró que el anticuerpo MAJars3 que reconoce la región C terminal del dominio disintegrina neutralizó la actividad hemorrágica de la jararagina y la unión al colágeno I, por lo que se sugirió que este dominio podría ser importante para la actividad hemorrágica de la toxina (42). En otro estudio se comparó la jararagina con la beritrativasa, una MPVS de tipo PIII procoagulante y no hemorrágica, en su capacidad de unión a colágeno. Se observó que la jararagina, a diferencia de la beritrativasa, se une a los colágenos I y IV mediante un motivo localizado en el subdominio D<sub>A</sub> del dominio disintegrina (43). En adición, la jararagina es capaz de unirse al colágeno I por una secuencia distinta a la que se une a la integrina  $\alpha_2\beta_1$ , debido a que se unió al colágeno I mediante el dominio disintegrina (44). En otros ensayos se estudiaron MPVS presentes en el veneno de *B. jararaca* como la HF3 y la bothropasina (PIII), la BJ-PI (PI) y el fragmento DC de la bothropasina; se encontró que tanto HF3 y bothropasina interactúan con fibrinógeno, fibronectina, laminina, colágeno I y colágeno VI, sin embargo, no se detectó unión de BJ-PI, una MPVS de tipo PI, a estas proteínas. Por su parte, el fragmento DC solo se unió al colágeno I y colágeno VI, lo cual evidencia que el dominio DC podría cumplir un rol clave en la unión a los colágenos mencionados (45).

Por otro lado, algunos estudios han demostrado que el dominio rico en cisteína también podría participar en la interacción de las MPVS con proteínas de la MB y de otros componentes de la matriz extracelular. Por ejemplo, la jararagina ha demostrado en ensayos *in vitro* unión a la integrina  $\alpha_2\beta_1$  por medio de una secuencia presente en el dominio rico en cisteína (44). También, mediante ensayos *in vitro*, se demostró que la atrolisina A, una MPVS de tipo PIII, se une al colágeno I y al factor de Von Willebrand por medio de exositos ubicados en el dominio rico en cisteína (46). Además, se ha demostrado en ensayos *in vitro* que la atragina, una MPVS de tipo PIII del veneno de una cobra de Taiwan, se une a otras proteínas como las integrinas, específicamente la  $\alpha\nu\beta_3$ , mediante una secuencia ubicada en la región hipervariable del dominio rico en cisteína (47).

En cuanto al dominio metaloproteinasa, existen algunos estudios que han demostrado su participación en la interacción de las MPVS con proteínas de la MB y otros componentes de la matriz extracelular. Por ejemplo, un estudio que utiliza ensayos *in silico* e *in vitro* encontró que anticuerpos específicos contra el epítipo BotEp1 ubicado en el sitio catalítico de la toxina bothropasina, una MPVS de tipo PIII hemorrágica, neutralizaron por completo la hemorragia producida por el veneno de *B. jararaca* (48). Además, por medio de un estudio de docking se evaluó el modo de interacción de MPVS de tipo PI hemorrágicas y no hemorrágicas con el colágeno IV y el perlecan y se observó que las toxinas hemorrágicas se unen al dominio triple hélice del colágeno IV y el dominio IG3 del perlecan formando complejos catalíticos, a diferencia de las no hemorrágicas en donde el sitio catalítico de la enzima no participa en la interacción con estos dominios (49). Finalmente, en otros estudios *in silico* aún no publicados por el grupo de investigación de metaloproteinasas del Instituto Clodomiro Picado se observaron los principales sitios de unión de una metaloproteinasa hemorrágica de tipo PIII al colágeno IV. Esta unión se dio mediante exositos presentes en los dominios metaloproteinasa y rico en cisteína.

Por lo tanto, ante este panorama, la presente propuesta de investigación pretende realizar ensayos *in vitro* para evaluar la interacción de los distintos dominios presentes en MPVS de tipo PI y PIII con proteínas de la MB, como el colágeno IV y la laminina, con el fin identificar las regiones moleculares que participan en dicha interacción.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Los accidentes ofídicos por mordedura de serpiente son considerados una enfermedad tropical desatendida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (50). Los envenenamientos por serpientes de la familia Viperidae pueden provocar daños tanto a nivel sistémico como local, donde destaca la presencia de edema, dolor, mionecrosis y hemorragia, los cuales pueden dejar secuelas físicas que afectan la calidad de vida de las personas. A pesar de que existen tratamientos contra las mordeduras de serpiente como los sueros antiofídicos, muchas veces la inhibición de los efectos locales se logra sólo parcialmente. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevos tratamientos que prevengan los efectos locales. Para esto es necesario la comprensión del mecanismo de acción de las toxinas responsables de dichos efectos. Dentro de estas toxinas, las MPVS hemorrágicas son unas de las más relevantes ya que participan en varios de los efectos patológicos citados.

Consecuentemente, se ha estudiado el mecanismo de producción de hemorragia causado por proteínas como las MPVS con el fin de identificar posibles blancos terapéuticos; sin embargo, este no ha sido elucidado por completo. Se ha propuesto que la acción hemorrágica de las MPVS involucra la degradación de componentes de la MB (18,23). Dentro de las proteínas de la MB involucradas se puede encontrar el colágeno IV, cuya degradación por parte de las MPVS se ha demostrado que posee un papel importante en el desarrollo de hemorragia; además, se ha demostrado que MPVS de tipo PII y PIII colocalizan con proteínas de la membrana basal de la microvasculatura (17); sin embargo, aún no se conoce los exositos de las MPVS que podrían mediar la interacción con proteínas de la MB, y en cuales dominios de las MPVS podrían estar presentes estos exositos.

Por otra parte, se han realizado estudios *in silico* aún no publicados por nuestro grupo de investigación, donde se encontró que los principales sitios de unión de una MPVS de tipo PIII al colágeno IV se encuentran en los dominios metaloproteínasa y rico en cisteína. Por lo tanto, es importante verificar estos resultados mediante pruebas *in vitro* y profundizar en el estudio de la interacción de los distintos dominios de las MPVS con proteínas de la MB para poder identificar de manera más precisa las regiones moleculares que participan en dicha interacción. Lo anterior resulta importante en la búsqueda de moléculas capaces de inhibir esta interacción, con el fin de inhibir la hemorragia

producida por el envenenamiento. El conocimiento generado podría llevar a largo plazo al desarrollo de un medicamento que complemente el tratamiento con suero antiofídico, el cual se base en la interferencia con la unión de estas toxinas a sus blancos en la MB; además, debido a la similitud de las MPVS con las metaloproteinasas de matriz y las ADAMs, que son metaloproteinasas endógenas que participan en diversos fenómenos patológicos, también puede contribuir al estudio de la fisiología y patología de estas metaloproteinasas en mamíferos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General

Evaluar la interacción del colágeno IV y laminina con metaloproteinasas hemorrágicas de venenos de serpientes tipo PI, PIII y el fragmento DC con el fin de identificar regiones moleculares que participan en la interacción.

#### 3.2 Objetivos específicos

- 3.2.1 Comparar la unión de una metaloproteinasa tipo PI, una metaloproteinasa tipo PIII y el fragmento DC a las proteínas colágeno IV, laminina y MB mediante ensayos *in vitro* y *ex vivo*.
- 3.2.2 Evaluar el papel de la actividad proteolítica en la interacción de una metaloproteinasa tipo PI y una metaloproteinasa tipo PIII con las proteínas colágeno IV y laminina mediante ensayos *in vitro*.
- 3.2.3 Identificar exositos en las metaloproteinasas de venenos de serpientes que participan en la unión a las proteínas colágeno IV y laminina por medio de estudios de la interacción entre estas proteínas con péptidos sintéticos diseñados a partir de distintas regiones moleculares de las metaloproteinasas.
- 3.2.4 Evaluar el efecto de la interacción entre metaloproteinasas de venenos de serpiente de tipo PI y PIII con las proteínas colágeno IV, laminina y matrigel sobre la actividad proteolítica y hemorrágica de estas toxinas mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Obtención de las MPVS

Los venenos utilizados fueron suministrados por el serpentario del Instituto Clodomiro Picado y están compuestos por un liofilizado de un pool de veneno obtenido de al menos 20 especímenes adultos colectados en diversas regiones del país. La metaloproteinasa de tipo PI utilizada fue la BaP1, la cual se aisló a partir del veneno de la serpiente *Bothrops asper* mediante cromatografía de intercambio iónico en CM-Sephadex C-50, seguido de una cromatografía de afinidad en Affi Gel Blue, de acuerdo con la metodología descrita anteriormente por el grupo de investigación del Instituto Clodomiro Picado (51).

La metaloproteinasa de tipo PIII fue la CsH1, la cual se obtuvo del veneno de la serpiente *Crotalus simus* mediante cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Shepharose (17). El dominio DC de la toxina CsH1 se purificó mediante cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC, por sus siglas en inglés). Brevemente, se incubó la CsH1 purificada en un buffer Tris HCl 0,015 M a pH 8 durante 3 días a temperatura ambiente para permitir su autoproteólisis. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 13000 RPM durante 5 minutos y se inyectó en un sistema HPLC Agilent 1200 acoplado a un detector de índice de refracción utilizando un loop de 500 µl y una columna de C8. La elución se llevó a cabo con un flujo de 1 ml/min y un gradiente de solución A (agua) y B (acetonitrilo), comenzando con 5% de B durante 2 minutos, aumentando a 18% durante 18 minutos, luego a 50% durante 2 minutos y finalmente alcanzando 80% durante 4 minutos. Después, se mantuvo a 80% durante 4 minutos más y se restableció al 5%. Se monitoreó la absorbancia a 215 nm y se recolectaron manualmente las fracciones, que luego se secaron en un concentrador al vacío. Para algunos experimentos se trabajó con una preparación de CsH1 purificada mediante HPLC siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente para el DC.

### 4.2 Animales de experimentación

Los animales se obtuvieron del Bioterio del Instituto Clodomiro Picado de la Universidad de Costa Rica. En todas las pruebas se utilizaron ratones CD1 con un peso entre 18-20 g. Para las pruebas de hemorragia los ratones fueron de ambos sexos y para la obtención del musculo cremáster se utilizaron únicamente machos. El uso de animales en este trabajo fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuido y Uso de Animales, de la

Universidad de Costa Rica, bajo el número CICUA-21-2023. Los animales se mantuvieron en ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, suministro de comida *ad libitum* y condiciones estándar de temperatura y humedad controlada.

### **4.3 Evaluación de la unión de las MPVS a colágeno IV y laminina**

#### **4.3.1 Dot blot**

Se colocó BaP1 (4 µg), CsH1 (4 µg) y DC (4 µg) en una membrana de nitrocelulosa hasta su secado. Posteriormente, se bloqueó la membrana con leche descremada al 2% y se incubó con colágeno IV (Cultrex®) a una dilución 1:100 o laminina (Invitrogen®) a una dilución 1:200 a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, se incubó con un anticuerpo de anti-colágeno IV (Abcam 6586) a una dilución 1:1000 o anti-laminina (Abcam 11575) a una dilución 1:1000, por 1 hora, a temperatura ambiente, para detectar el colágeno IV o la laminina unida a las diferentes MPVS. Luego se agregó un anticuerpo anti-inmunoglobulina conjugado con peroxidasa (Sigma A6154) a una dilución 1:6000 y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Los lavados se realizaron con TBS-Tween 20 al 0,05%. Finalmente, se reveló mediante quimioluminiscencia utilizando el kit comercial Pierce™ ECL Plus Western y el sistema de imágenes ChemiDoc XRS+ (BioRad).

#### **4.3.2 Western Blot**

Se realizó una electroforesis de 16 µg BaP1 (0,8 µg/µL), 16 µg CsH1 (0,8 µg/µL) y 16 µg del fragmento DC (0,8 µg/µL) en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras y no reductoras. Posteriormente, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa, se bloqueó la membrana con leche descremada al 2% y se incubó con colágeno IV (Cultrex®) a una dilución 1:100 o laminina (Invitrogen®) a una dilución 1:200 a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, se incubó con un anticuerpo de anti-colágeno IV (Abcam 6586) a una dilución 1:1000 o anti-laminina (Abcam 11575) a una dilución 1:1000, por 1 hora, a temperatura ambiente, para detectar el colágeno IV o la laminina unida a las diferentes metaloproteinasas. Luego se agregó un anticuerpo anti-inmunoglobulina conjugado con peroxidasa (Sigma A6154) a una dilución 1:6000 y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Los lavados se realizaron con TBS-Tween 20 al 0,05%. Finalmente, se reveló mediante quimioluminiscencia utilizando el kit comercial Pierce™ ECL Plus Western y el sistema de imágenes ChemiDoc XRS+ (BioRad).

#### 4.3.3 Ensayos de unión en fase sólida

Para la realización de los ensayos se llevó a cabo un proceso previo de biotinylación de las MPVS. Para esto, se utilizó el kit "Biotin-XX Microscale Protein Labeling Kit" (Invitrogen B30010). Brevemente, se disolvieron cada una de las metaloproteinasas o el fragmento DC en PBS y se mezcló 100  $\mu\text{L}$  de la solución con 10  $\mu\text{L}$  de bicarbonato de sodio 1 M. Luego, se agregó biotina a la solución y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se eliminó el exceso de biotina mediante filtración en gel y se determinó la concentración de toxina biotinilada utilizando un espectrofotómetro. En adición, se determinó el grado de biotinylación de las toxinas utilizando el kit "FluoReporter Biotin Quantitation Assay Kit \*for biotinylated proteins\*" (F30751 Invitrogen).

Para los ensayos se prepararon tres placas de 96 pocillos de fondo plano, una se recubrió con colágeno IV (Cultrex®) a una dilución 1:100, otra con laminina (Invitrogen®) a una dilución 1:200 y la otra con matrigel (Cultrex®) a una dilución 1:200, y se dejaron incubando durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se realizó un bloqueo con leche descremada al 2% y se añadieron cantidades equimolares de los diferentes tipos de MPVS biotiniladas: CsH1 (1 $\mu\text{g}$ ), CsH1 (1 $\mu\text{g}$ ) purificada por HPLC (CsH1<sub>HPLC</sub>), DC (0,5 $\mu\text{g}$ ) y BaP1 (0,5 $\mu\text{g}$ ) en los pocillos, por triplicado, y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se agregó un conjugado de estreptavidina-peroxidasa (Thermo Scientific™) a una dilución 1:15000 y se incubó la placa durante 1 hora, a temperatura ambiente. Los lavados se realizaron con PBS. Finalmente, se reveló con el sustrato para peroxidasa o-feniléndiamina (2 mg/ml) y se midió la absorbancia a 492 nm con el espectrofotómetro Multiskan SkyHigh Thermo Scientific™. Los análisis se realizaron por triplicado.

#### 4.3.4 Ensayos de unión en fase sólida de competencia

Para evaluar el papel del fragmento DC en la unión de la CsH1 con el colágeno IV y la laminina, se llevaron a cabo ensayos de unión en fase sólida de competencia entre el fragmento DC y la CsH1. Para esto se prepararon tres placas de 96 pocillos de fondo plano, una se recubrió con colágeno IV (Cultrex®) a una dilución 1:100, otra con laminina (Invitrogen®) a una dilución 1:200 y la otra con matrigel (Cultrex®) a una dilución 1:200, y se dejaron incubando durante toda la noche a temperatura ambiente. Al

día siguiente, se bloquearon con leche descremada al 2%. Luego, se añadió a la placa el fragmento DC (5 µg) sin biotinilar y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente, se agregó la CsH1 biotinilada (0,5 µg) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó un conjugado estreptavidina-peroxidasa (Thermo Scientific™) a una dilución 1:15000 y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Los lavados se realizaron con PBS. Finalmente, se reveló con el sustrato para peroxidasa o-feniléndiamina (2 mg/ml) y se midió la absorbancia a 492 nm con el espectrofotómetro Multiskan SkyHigh Thermo Scientific™. Los análisis se realizaron por triplicado.

#### **4.4 Evaluación del papel de la actividad proteolítica de las MPVS en la interacción con colágeno IV y laminina**

##### 4.4.1 Western Blot

Para evaluar el efecto de la actividad proteolítica de las MPVS en la unión, se utilizó el inhibidor de metaloproteinasas batimastat, que es un hidroxamato peptidomimético. Se llevó a cabo en condiciones no reductoras el mismo protocolo descrito anteriormente en la sección 4.3.2, sin embargo, en este caso la membrana se incubó con colágeno IV (Cultrex®) a una dilución 1:100 junto con Batimastat (100 µM) a 4°C, durante toda la noche. Posteriormente, se incubó con un anticuerpo de anti-colágeno IV (Abcam 6586) a una dilución 1:1000 por 1 hora, a temperatura ambiente, para detectar el colágeno IV unido a las diferentes metaloproteinasas, luego se agregó un anticuerpo anti-inmunoglobulina conjugado con peroxidasa (Sigma A6154) a una dilución 1:6000 y se incubó por 1 hora, a temperatura ambiente. Los lavados se realizaron con TBS-tween 20 al 0,05%. Finalmente, se hizo el revelado mediante quimioluminiscencia utilizando el kit comercial Pierce™ ECL Plus Western y el transiluminador ChemiDoc XRS+ (BioRad).

En adición se realizaron ensayos de Western Blot en condiciones no reductoras siguiendo el protocolo descrito en la sección 4.3.2 utilizando CsH1 sin actividad proteolítica, la cual se obtuvo durante la purificación del DC por HPLC utilizando un gradiente de polaridad con acetonitrilo que ocasionó la pérdida de su actividad proteolítica. Para confirmar la pérdida de actividad enzimática de la CsH1 se evaluó la actividad proteolítica de la metaloproteinasas sobre un sustrato de gelatina-FITC, el cual es un sustrato común de las MPVS. Se utilizó el kit EnzCheck Gelatinase/Collagenase Assay Kit de Molecular Probes

(E-12055). Brevemente, se colocó en una placa de 96 pocillos buffer de reacción en cada pocillo, luego se adicionó la solución de gelatina-FITC en cada pocillo seguido de las soluciones de MPVS. Posteriormente, se midió la intensidad de fluorescencia a las 4 horas a una longitud de onda de absorción de 495 nm y a una longitud de onda de emisión de 415 nm.

#### 4.4.2 Ensayos de unión en fase sólida

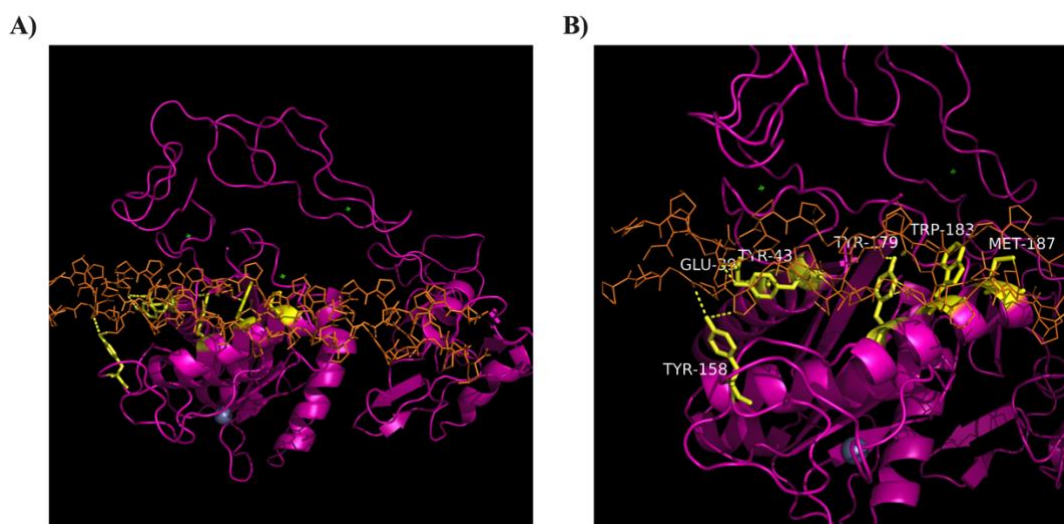
Se recubrió una placa de 96 pocillos de fondo plano con 100  $\mu$ L por pocillo de colágeno IV (Cultrex®) a una dilución de 1:50 y se dejó incubando durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se realizó un bloqueo con leche descremada al 2% y se añadieron cantidades equimolares de las MPVS en los pocillos por triplicado: CsH1 (10  $\mu$ g) y BaP1 (5  $\mu$ g) previamente incubadas con Batimastat (10  $\mu$ M) durante 30 min a temperatura ambiente, además, como control se utilizaron las mismas toxinas previamente incubada con PBS por 30 min. Las MPVS se incubaron durante un periodo de 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, para detectar las MPVS unidas, se agregó suero antiofídico polivalente liofilizado (ICP) a una dilución de 1:400 y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente, se agregó un anticuerpo anti-inmunoglobulina conjugado con peroxidasa (Sigma A6917) a una dilución de 1:5000 y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Los lavados se realizaron con PBS luego de cada período de incubación. Finalmente, se reveló con el sustrato para peroxidasa o-feniléndiamina (2 mg/ml) y se midió la absorbancia a 492 nm en el espectrofotómetro Multiskan SkyHigh Thermo Scientific™. Los análisis se realizaron por triplicado.

En adición se realizaron ensayos de unión en fase sólida siguiendo el protocolo descrito en la sección 7.3.3 utilizando CsH1 sin actividad proteolítica. Esta toxina se obtuvo de manera similar a la descrita en la sección anterior. Para esto se evaluó previamente la actividad proteolítica de la metaloproteinasas sobre un sustrato de gelatina-FITC, utilizando el kit EnzCheck Gelatinase/Collagenase Assay Kit de Molecular Probes (E-12055).

## 4.5 Evaluación de la interacción de péptidos de diferentes regiones de MPVS con colágeno IV

### 4.5.1 Obtención de los péptidos

La selección de los péptidos a sintetizar se realizó a partir de un estudio de docking por parte del PhD Kostas Kostas Kalogeropoulos de la “Technical University of Denmark”, Lyngby, Denmark. Para el estudio de docking se eligió un péptido del colágeno I que corresponde a la región que se une a la integrina  $\alpha 2\beta 1$  (PDB 1Q7D) y se construyó un modelo de homología para la CsH1. Se utilizó Swiss-model (<https://swissmodel.expasy.org/>) con el fin de llevar a cabo la construcción del modelo de CsH1, el cual se basó en la estructura resuelta de la Bothropasina (PDB 3DSL), una MPVS hemorrágica de tipo PIII presente en el veneno de *B. jararaca*. Posteriormente, se utilizaron los softwares ZDOCK (<http://zdock.umassmed.edu/>) y Rosetta 3.5 (<https://www.rosettacommons.org/>) para los experimentos de acoplamiento *in silico* entre la CsH1 y el péptido de colágeno I. Según estos ensayos, los sitios de mayor interacción de la CsH1 con el péptido de colágeno I se encuentran en el dominio metaloproteínico, específicamente en un loop cercano al sitio catalítico, y en la región hipervariable del dominio rico en cisteína (**Figura 3**). Por otro lado, en el dominio tipo disintegrina no se encontró una interacción fuerte. Además, se observaron valores de interacción superiores del péptido de colágeno I con la CsH1 en comparación con la BaP1.



**Figura 3.** Acoplamiento *in silico* entre la CsH1 y el péptido de colágeno I. A) Interacción entre la CsH1 (magenta) y el péptido del colágeno I que se une a la integrina

$\alpha 2\beta 1$  (anaranjado). **B)** Residuos (amarillo) del dominio metaloproteinasa de la CsH1 que interaccionan con el péptido del colágeno I.

Teniendo en cuenta lo anterior, se encargó a la empresa Peptide 2.0 (VA, EU) la síntesis de tres péptidos de la CsH1, uno correspondiente al dominio metaloproteinasa, uno al dominio tipo disintegrina y otro al dominio rico en cisteína (**Tabla 1**). Además, se solicitó la síntesis de un péptido del dominio metaloproteinasa de la BaP1. Estos péptidos tenían una longitud entre los 17 a 25 residuos de aminoácidos según la región y se sintetizaron de manera cíclica y biotinilados para facilitar su detección.

**Tabla 1.** Péptidos de las MPVS CsH1 y BaP1 seleccionados y sintetizados a partir del estudio de docking.

Péptido	Secuencia	Región
Péptido 1 CsH1	MRPEISPEPSTFFS	Dominio metaloproteinasa
Péptido 2 CsH1	ECRASMSECDPAEHCTGQS	Dominio tipo disintegrina
Péptido 3 CsH1	RKENGNKIPCAPED	Dominio rico en cisteína
Péptido 1 BaP1	SGSGCSQNQYETYLTNHNPQC	Dominio metaloproteinasa

#### 4.5.2 Dot Blot de los péptidos seleccionados

Se colocaron cantidades iguales (1  $\mu\text{g}$ ) de péptido 1 de CsH1 (P1-CsH1), péptido 2 de CsH1 (P2-CsH1), péptido 3 de CsH1 (P3-CsH1), péptido 1 de BaP1 (P1-BaP1) disueltos en agua desionizada e hidróxido de amonio de 0,1% en una proporción 1:1 y CsH1 en una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) hasta su secado. Posteriormente, se siguió el protocolo descrito anteriormente en la sección 7.5.1 para la detección de unión al colágeno IV.

#### 4.5.3 Ensayos de unión en fase sólida de los péptidos seleccionados

Se recubrió una placa de 96 pocillos de fondo plano con 100  $\mu\text{L}$  por pocillo de colágeno IV (Cultrex®) a una dilución de 1:50 y se dejó incubando durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se realizó un bloqueo con leche descremada al

2% y se añadieron cantidades iguales de los péptidos (0,5 µg) disueltos en agua desionizada e hidróxido de amonio de 0,1% en una proporción 1:1 y se incubaron durante un periodo de 15 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se agregó un conjugado de estreptavidina-peroxidasa (Thermo Scientific™) a una dilución 1:15000 y se incubó la placa durante 1 hora, a temperatura ambiente. Los lavados se realizaron con PBS. Finalmente, se reveló con el sustrato para peroxidasa o-feniléndiamina (2 mg/ml) y se midió la absorbancia a 492 nm con el espectrofotómetro Multiskan SkyHigh Thermo Scientific™. Los análisis se realizaron por triplicado.

#### **4.6 Evaluación del efecto de la unión a colágeno IV, laminina y matrigel sobre la actividad proteolítica de las MPVS**

Para la realización de los ensayos, se llevó a cabo un proceso previo de dialización del colágeno IV utilizando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer™. Brevemente, se inyectó la solución de colágeno IV en el casete y se incubó con agitación en un buffer de reacción proteolítica (Tris HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M, CaCl<sub>2</sub> 50 mM a pH 7,6) durante toda la noche a 4 °C. Este procedimiento fue necesario debido a la incompatibilidad del kit para medir actividad proteolítica con el pH de la solución de colágeno IV.

Posteriormente, con el fin de evaluar el papel de la unión a proteínas de la membrana basal y matriz extracelular sobre la actividad proteolítica de las MPVS se pre-incubaron soluciones de CsH1 (2 µg) y BaP1 (1 µg) con 50 µg colágeno IV (Cultrex®), 100 µg laminina (Invitrogen®) o 100 µg de matrigel (Cultrex®) por 30 min a 37 °C. Como control se pre-incubó la misma cantidad de toxina con el buffer de reacción proteolítica. Posterior a la incubación, se evaluó la actividad proteolítica de las MPVS sobre un sustrato de gelatina-FITC, utilizando el kit EnzCheck Gelatinase/Collagenase Assay Kit de Molecular Probes (E-12055). Brevemente, se colocó en una placa de 96 pocillos buffer de reacción en cada pocillo, luego se adicionó la solución de gelatina-FITC en cada pocillo seguido de las soluciones de MPVS. Posteriormente, se midió la intensidad de fluorescencia a las 4 horas. Los análisis se realizaron por triplicado.

#### **4.7 Evaluación del efecto de la unión a colágeno IV y matrigel sobre la actividad hemorrágica de las MPVS**

Para la realización de los ensayos, se llevó a cabo un proceso previo de dialización del colágeno IV utilizando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer como se describió en la sección

anterior. Luego se pre-incubó por 30 min a 37 °C las siguientes soluciones: CsH1 (2,5µg) con 50 µg de colágeno IV (Cultrex®), CsH1 (2,5µg) con 100 µg de matrigel (Cultrex®), BaP1 (20µg) con 50 µg de colágeno IV (Cultrex®) o BaP1 (20 µg) 100 µg de matrigel (Cultrex®). La cantidad de toxina utilizada corresponde a las dosis hemorrágicas mínimas reportadas (17,51). Como control se pre-incubó la misma cantidad de toxina con PBS. Posteriormente, se siguió el protocolo descrito por Jenkins et al. (2017) (52) con algunas modificaciones. Se utilizaron grupos de 5 ratones con un peso entre 18-20 g por cada tratamiento. Los animales se trataron con tramadol 50 mg/kg por vía subcutánea, 15 minutos después se aplicaron los tratamientos anteriormente mencionados por vía intradérmica en la parte ventral. Una hora después de la administración de los tratamientos los animales se sacrificaron por cámara de CO<sub>2</sub>, se les removió la piel y se tomaron fotografías del área de la hemorragia siguiendo el protocolo descrito por Jenkins et al. (2022) (53). Las imágenes fueron analizadas para determinar el área de hemorragia utilizando la herramienta de inteligencia artificial AHA.

#### **4.8 Localización de las MPVS sobre la MB de la microvasculatura de músculo cremáster de ratón *ex vivo*.**

##### 4.8.1 Modelo *ex vivo*

Para la realización de los ensayos se llevó a cabo un proceso previo de marcaje de las MPVS. Para esto, se utilizó el kit comercial Microscale Protein Labeling Kit (Molecular Probes A30009). Este marcaje no afecta la actividad proteolítica de las MPVS, lo cual ya había sido demostrado en estudios anteriores (17). Brevemente, se disolvió la CsH1 o el fragmento DC en PBS y se mezcló 100 µL de la solución con 10 µL de bicarbonato de sodio 1 M. Luego, se agregó el fluorocromo Alexa 647 a cada una de las soluciones y se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se eliminó el exceso del fluorocromo mediante filtración en gel y se determinó la concentración de toxina marcada mediante un espectrofotómetro.

Para la realización del ensayo, grupos de tres ratones macho (peso) se sacrificaron por dislocación cervical. Se removió el músculo cremáster y se incubó *ex vivo* a temperatura ambiente por 15 min con los siguientes tratamientos: 5 µg de CsH1 marcada con el fluorocromo Alexa 647, 2.5 µg de fragmento DC de CsH1 marcado con el fluorocromo Alexa 647, CsH1 sin marcar y fragmento DC sin marcar como control negativo. Las

toxinas se aplicaron en la superficie del tejido por medio de una micropipeta. Luego del período de incubación, se realizaron lavados de los tejidos con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% disuelto en PBS, por 30 min.

#### 4.8.1 Inmunotinción del músculo cremáster

Posterior a la fijación se siguió el protocolo de montaje descrito por Wang *et al.* (54) con algunas modificaciones. Se incubaron los tejidos con la solución bloqueadora (25% suero fetal bovino y 0,5% de Tritón X-100, disuelto en PBS) a temperatura ambiente por 4 horas. Seguidamente se agregó un anticuerpo anti-colágeno IV (Abcam ab19808) a una dilución 1:100 y un anticuerpo anti-actina  $\alpha$  del músculo liso ( $\alpha$ SMA, por sus siglas en inglés) marcado con el flurocromo Cy3 (Clone 1A4, Sigma C6198) a una dilución 1:100 y se incubaron los tejidos por 72 horas a 4°C. Posteriormente, se incubaron por 4 horas con un anticuerpo anti-inmunoglobulina marcado con Alexa 488 (Invitrogen A11034) a una dilución 1:200. Los lavados se realizaron con PBS. Finalmente, el tejido completo se montó en un portaobjetos con PBS y fue observado en un microscopio confocal de alta resolución Nikon Eclipse Ti2 incorporando un lente 40X.

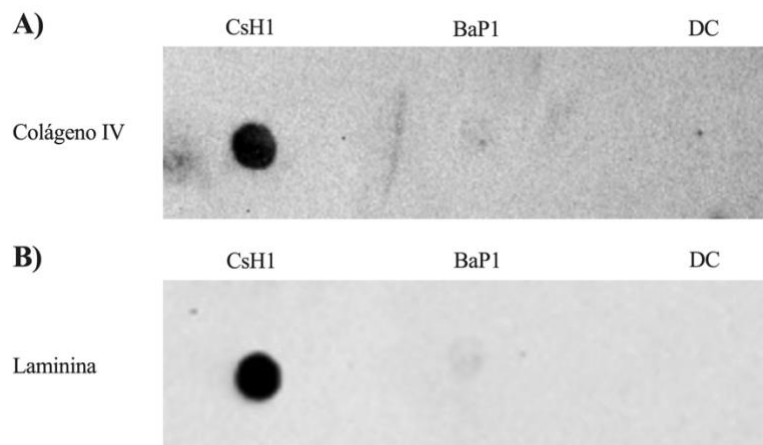
### 4.9 Análisis estadístico

Los resultados se presentaron como promedios  $\pm$  la desviación estándar. Para evaluar las diferencias significativas entre las medias de los grupos, se utilizaron pruebas de t-Student cuando se compararon dos grupos y análisis de varianza de una vía, seguido de la prueba post-hoc de Tukey cuando se compararon más de dos grupos. Se consideraron significativos aquellos valores de p inferiores a 0,05.

## 5. RESULTADOS

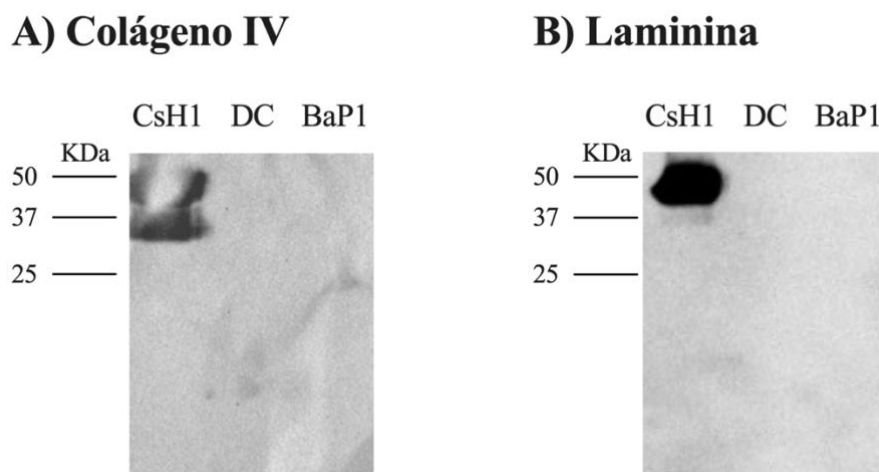
### 5.1 Evaluación de la unión de las MPVS a colágeno IV y laminina

Al evaluar la capacidad de unión de las MPVS al colágeno IV y la laminina mediante un Dot Blot, donde se fijó CsH1, DC y BaP1 a la membrana, y posteriormente se incubaron esas membranas con colágeno IV o laminina, se encontraron diferencias en la capacidad de unión de la CsH1 respecto a la BaP1 y al fragmento DC. En esta técnica donde las toxinas no sufren un proceso de desnaturalización se pudo observar que la CsH1 posee mayor capacidad de unirse a ambas proteínas de la MB, mientras que para la BaP1 se observó muy poca unión y para el DC no se encontró ninguna unión (**Figura 4**).



**Figura 4. Evaluación de la unión de las MPVS al colágeno IV y la laminina mediante Dot Blot.** Cantidades equimolares de CsH1, BaP1 y DC se fijaron en una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, se bloqueó la membrana con leche descremada al 2% y se incubó con A) colágeno IV (Cultrex®) o B) laminina (Invitrogen®) durante toda la noche. Luego, se incubó con un anticuerpo anti-colágeno IV (Abcam 6586) o anti-laminina (Abcam 11575), para detectar el colágeno IV o la laminina unida a las diferentes MPVS, luego se agregó un anticuerpo anti-inmunoglobulina conjugado con peroxidasa (Sigma A6154). Finalmente, se reveló mediante quimioluminiscencia utilizando el kit comercial Pierce™ ECL Plus Western.

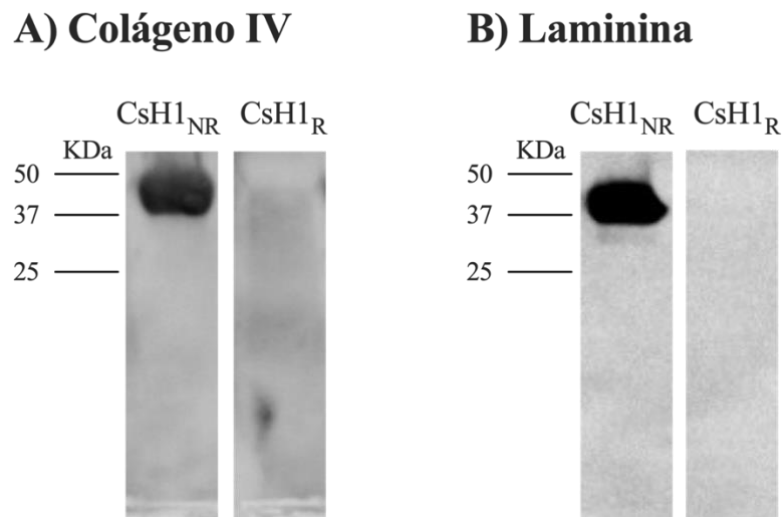
Posteriormente, al observar la unión de la CsH1 a las proteínas de MB en el ensayo de Dot Blot, se decidió evaluar la capacidad de unión de las MPVS mediante un ensayo de Western Blot, en donde las proteínas sufren un proceso de desnaturalización. En este caso se transfirieron las MPVS en condiciones no reductoras a membranas de nitrocelulosa para su posterior incubación con colágeno IV o laminina de manera similar al procedimiento del Dot Blot. En condiciones no reductoras se observó que la CsH1 aún mantiene la capacidad de unirse al colágeno IV y a la laminina, a pesar de la desnaturalización que sufre la CsH1 por el SDS. En el caso de la BaP1 y el DC, nuevamente no se observa ninguna unión a las proteínas de la MB bajo las condiciones del ensayo (**Figura 5**).



**Figura 5. Evaluación de la unión de las MPVS al colágeno IV y la laminina mediante Western Blot en condiciones no reductoras.** Cantidades equimolares de CsH1, BaP1 y DC se corrieron en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones no reductoras. Posteriormente, se bloqueó la membrana con leche descremada y se incubó con **A)** colágeno IV (Cultrex®) o **B)** laminina (Invitrogen®) durante toda la noche. Luego, se incubó con un anticuerpo anti-colágeno IV (Abcam 6586) o anti-laminina (Abcam 11575), para detectar el colágeno IV o la laminina unida a las diferentes MPVS, luego se agregó un anticuerpo anti-inmunoglobulina conjugado con peroxidasa (Sigma A6154). Finalmente, se reveló mediante quimioluminiscencia utilizando el kit comercial Pierce™ ECL Plus Western.

Al encontrar unión de la CsH1 en condiciones no reductoras, se realizaron ensayos de Western Blot en condiciones reductoras, en los cuales se observó que la CsH1 pierde su capacidad de unirse al colágeno IV y a la laminina luego de la ruptura de los enlaces

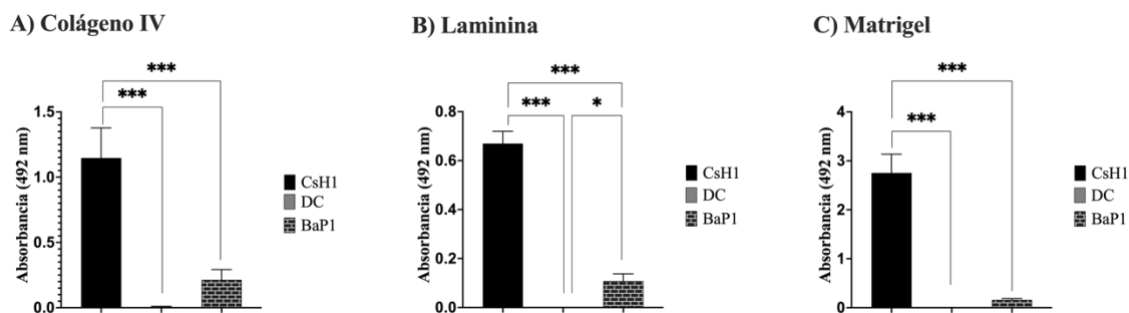
disulfuro. Estos hallazgos sugieren que los exositos responsables de la unión al colágeno IV y la laminina son dependientes de la estructura terciaria de la proteína CsH1 (**Figura 6**).



**Figura 6. Evaluación de la unión de la CsH1 al colágeno IV y la laminina mediante Western Blot en condiciones reductoras.** Se realizó una electroforesis de 16  $\mu$ g de CsH1 en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras. Posteriormente, se bloqueó la membrana con leche descremada y se incubó con **A)** colágeno IV (Cultrex®) o **B)** laminina (Invitrogen®) a 4°C durante toda la noche. Luego, se incubó con un anticuerpo anti-colágeno IV (Abcam 6586) o anti-laminina (Abcam 11575), para detectar el colágeno IV o la laminina unida a la CsH1, luego se agregó un anticuerpo anti-inmunoglobulina conjugado con peroxidasa (Sigma A6154). Finalmente, se reveló mediante quimioluminiscencia utilizando el kit comercial Pierce™ ECL Plus Western y el sistema de imágenes ChemiDoc XRS+ (BioRad).

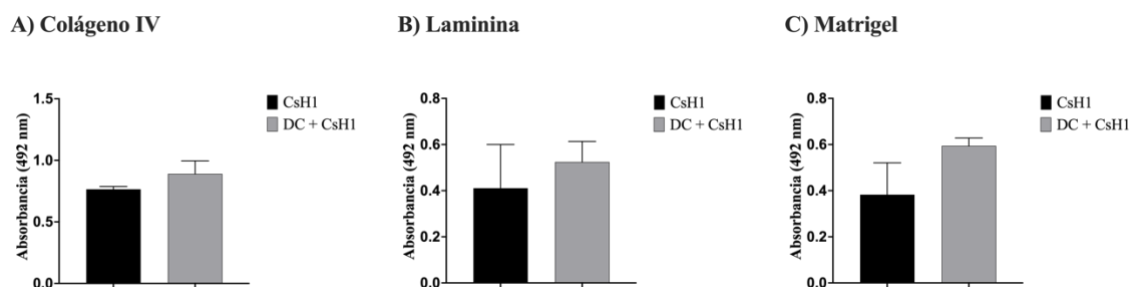
Por otro lado, con el fin de evitar la desnaturalización de las proteínas y evaluar de manera cuantitativa la capacidad de unión de las MPVS, se utilizaron ensayos de unión en fase sólida, en donde se fijaron a una placa de 96 pocillos colágeno IV, laminina o matrigel y posteriormente se incubó con CsH1, BaP1 o DC. Las toxinas utilizadas fueron previamente biotiniladas con el fin de facilitar la detección y se obtuvo que el grado de biotinilación para la CsH1, BaP1 y DC fue de 1,83, 3,16 y 1,06, respectivamente. En estos ensayos, se pudo observar que la CsH1 presentó una interacción significativa con el colágeno IV y la laminina en comparación con la BaP1 y el fragmento DC, como se muestra en la (**Figura 7 A y B**). Además, en estos ensayos se decidió utilizar matrigel

como sustrato debido a su alto contenido de laminina y la presencia de otras proteínas de la MB y MEC, los resultados obtenidos son consistentes con los previamente descritos (**Figura 7C**). Cabe destacar que el fragmento DC presentó la menor unión en los tres sustratos utilizados.



**Figura 7. Evaluación de la unión de la CsH1, BaP1 y el fragmento DC al colágeno IV, la laminina y el matrigel mediante un ensayo de unión en fase sólida.** Placas de 96 pocillos de fondo plano se recubrieron con **A)** colágeno IV (Cultrex®), **B)** laminina (Invitrogen®) o **C)** matrigel (Cultrex®) y se dejaron incubando durante toda la noche. Se realizó un bloqueo con leche descremada y se incubó cantidades equimolares de CsH1, BaP1 y DC previamente biotiniladas con el kit "Biotin-XX Microscale Protein Labeling Kit" (Invitrogen B30010). Seguidamente, se agregó un conjugado de estreptavidina-peroxidasa (Thermo Scientific™). Finalmente, se reveló con o-feniléndiamina y se midió la absorbancia a 492 nm. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar (n=3), \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

Por otro lado, se evaluó la participación del fragmento DC en la unión de la CsH1 a las proteínas de MB mediante ensayos de competencia en los ensayos en fase sólida, en donde se fijó a la placa el colágeno IV, laminina o matrigel y posteriormente se incubó con DC sin biotinar durante 15 min y luego con CsH1 previamente biotinilada. Los resultados, indican que la presencia del fragmento DC no afecta significativamente la unión de la CsH1 a los diferentes sustratos utilizados (**Figura 8**). Esto sugiere que los exositos responsables de la unión al colágeno IV y la laminina parece no encontrarse en el fragmento DC.



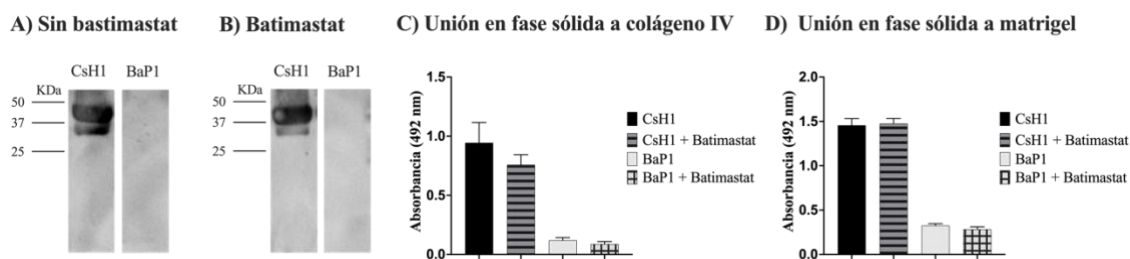
**Figura 8. Evaluación del papel del fragmento DC en la unión de la CsH1 al colágeno IV, la laminina y el matrigel, mediante un ensayo de competencia en ensayos de fase sólida.** Placas de 96 pocillos de fondo plano se recubrieron con **A)** colágeno IV (Cultrex®), **B)** laminina (Invitrogen®) y **C)** matrigel (Cultrex®) y se dejaron incubando durante toda la noche. Se realizó un bloqueo con leche descremada y se añadió DC sin biotínica, posteriormente se agregó CsH1 previamente biotinilada y se incubó. Seguidamente, se agregó un conjugado de estreptavidina-peroxidasa (Thermo Scientific™). Finalmente, se reveló con o-feniléndiamina y se midió la absorbancia a 492 nm con el espectrofotómetro Multiskan SkyHigh Thermo Scientific™. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar (n=3), \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

## 5.2 Evaluación del papel de la actividad proteolítica de las MPVS en la interacción con colágeno IV y laminina

Con el fin de evaluar el papel de la actividad proteolítica en la capacidad de unión de la CsH1 y la BaP1 al colágeno IV, se realizó un ensayo de Western Blot luego de inhibir la actividad proteolítica de las toxinas utilizando Batimastat, un inhibidor de metaloproteinasas. Al igual que en los Western Blot anteriores, se transfirieron las MPVS en condiciones no reductoras a membranas de nitrocelulosa para su posterior incubación con colágeno IV, sin embargo, en este caso una de las membranas se incubó con colágeno IV junto con Batimastat. En estos ensayos se observó que la CsH1 sin actividad proteolítica conserva la capacidad de unirse al colágeno IV, lo que sugiere que la unión al colágeno IV no ocurre en el sitio catalítico (**Figura 9 A y B**). De igual manera se encontró que en ninguno de los casos la BaP1 se unió al colágeno IV.

En adición, con el fin de evitar la desnaturalización de las toxinas y evaluar de manera cuantitativa el papel de la actividad proteolítica en la capacidad de unión de las MPVS se realizó un ensayo de unión en fase sólida. En este ensayo se recubrió una placa de 96

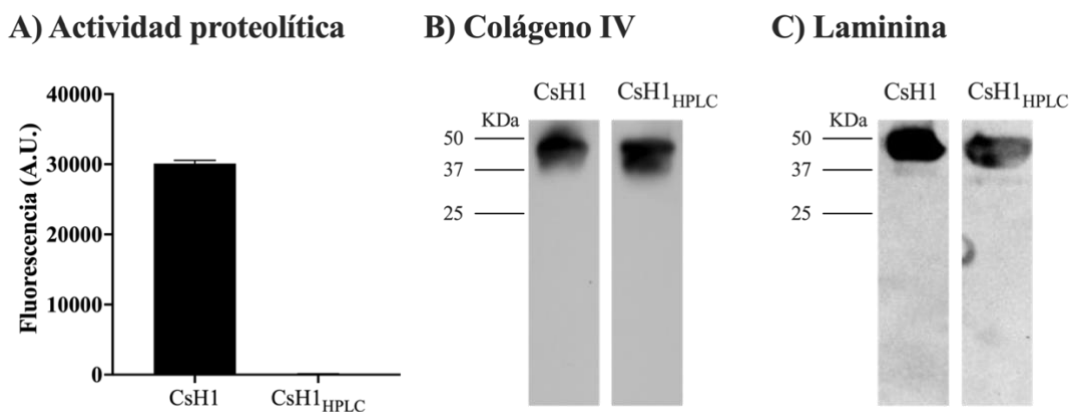
pocillos de fondo plano con colágeno IV y se incubó posteriormente con CsH1 y BaP1 previamente inhibidas con Batimastat. En los resultados obtenidos, de manera similar al Western Blot, no se encontraron diferencias en la unión de las toxinas al colágeno IV, a pesar de estar inactivas (**Figura 9C**).



**Figura 9. Evaluación del papel de la actividad proteolítica de las MPVS en la unión al colágeno IV y al matrigel utilizando Batimastat.** Se realizó una electroforesis SDS-PAGE con cantidades equimolares de CsH1 y BaP1 en condiciones no reductoras. Posteriormente, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se incubó con **A**) colágeno IV (Cultrex®) o **B**) colágeno IV (Cultrex®) + Batimastat durante toda la noche. Luego, se incubó con anti-colágeno IV (Abcam 6586). Posteriormente, se agregó un anticuerpo anti-inmunoglobulina conjugado con peroxidasa (Sigma A6154) y se incubó. Finalmente, se reveló mediante quimioluminiscencia utilizando el kit comercial Pierce™ ECL Plus Western. **C**) Se recubrió una placa de 96 pocillos con colágeno IV (Cultrex®) o **D**) matrigel (Cultrex®), y se dejó incubando durante toda la noche. Posteriormente, se añadieron cantidades equimolares de CsH1, BaP1 como control, y CsH1 y BaP1 previamente incubadas con Batimastat y se incubaron. Seguidamente, se agregó suero antiofídico polivalente liofilizado (ICP) anticuerpo anti-inmunoglobulina conjugado con peroxidasa (Sigma A6917). Finalmente, se reveló con o-feniléndiamina y se midió la absorbancia a 492 nm. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar (n=3), \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

En otro experimento se evaluó el efecto de la actividad proteolítica en la unión de la CsH1 mediante la utilización de la toxina purificada por HPLC. Esta toxina se obtuvo como resultado de la purificación del DC, sin embargo, al utilizar un gradiente de polaridad con acetonitrilo la proteína sufrió un proceso de desnaturalización por lo que perdió su actividad proteolítica, lo cual fue confirmado por medio de la evaluación de esta actividad sobre un sustrato de gelatina-FITC utilizando el kit comercial. (**Figura 10A**). Por lo tanto,

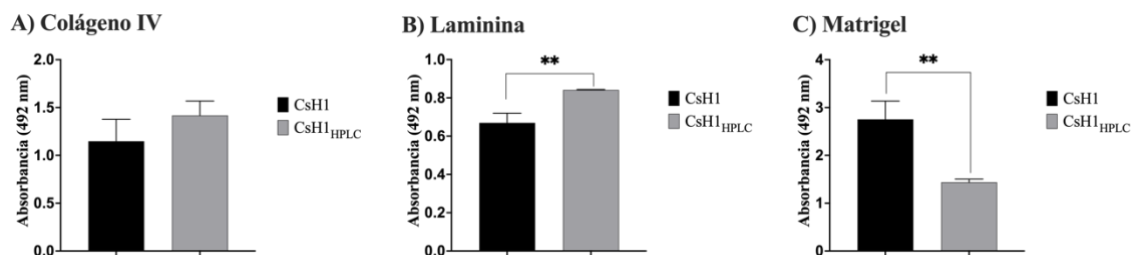
se realizaron ensayos de Western Blot utilizando la toxina purificada por HPLC y se observó que la CsH1 obtenida por HPLC mantuvo su capacidad de interacción con el colágeno IV y la laminina a pesar de perder la actividad proteolítica (**Figura 10 B y C**). Estos resultados son consistentes con los encontrados utilizando Batimastat, por lo que sugieren que la capacidad de unión al colágeno IV y la laminina por parte de CsH1 es independiente de su actividad proteolítica.



**Figura 10. Evaluación del papel la actividad proteolítica de la CsH1 purificada por HPLC en la unión al colágeno IV o la laminina.** **A)** Se evaluó la actividad proteolítica de la CsH1 purificar por HPLC sobre un sustrato de gelatina-FITC utilizando el kit EnzCheck Gelatinase/Collagenase Assay Kit de Molecular Probes (E-12055). Además, se realizó una electroforesis de cantidades equimolares de CsH1 y CsH1 purificada por HPLC en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones no reductoras. Posteriormente, se bloqueó la membrana con leche descremada y se incubó con **A)** colágeno IV (Cultrex®) o **B)** laminina (Invitrogen®) durante toda la noche. Luego, se incubó con un anticuerpo anti-colágeno IV (Abcam 6586) o anti-laminina (Abcam 11575), para detectar el colágeno IV o la laminina unida a las diferentes MPVS, luego se agregó un anticuerpo anti-inmunoglobulina conjugado con peroxidasa (Sigma A6154) y se incubó. Finalmente, se reveló mediante quimioluminiscencia utilizando el kit comercial Pierce™ ECL Plus Western.

Adicionalmente, se realizaron ensayos de unión en fase sólida utilizado la CsH1 purificada por HPLC. Estos ensayos permitieron observar que la CsH1 purificada por HPLC, a pesar de no tener actividad proteolítica, conserva su capacidad de interactuar con el colágeno IV, la laminina y el matrigel. Sin embargo, se encontraron diferencias

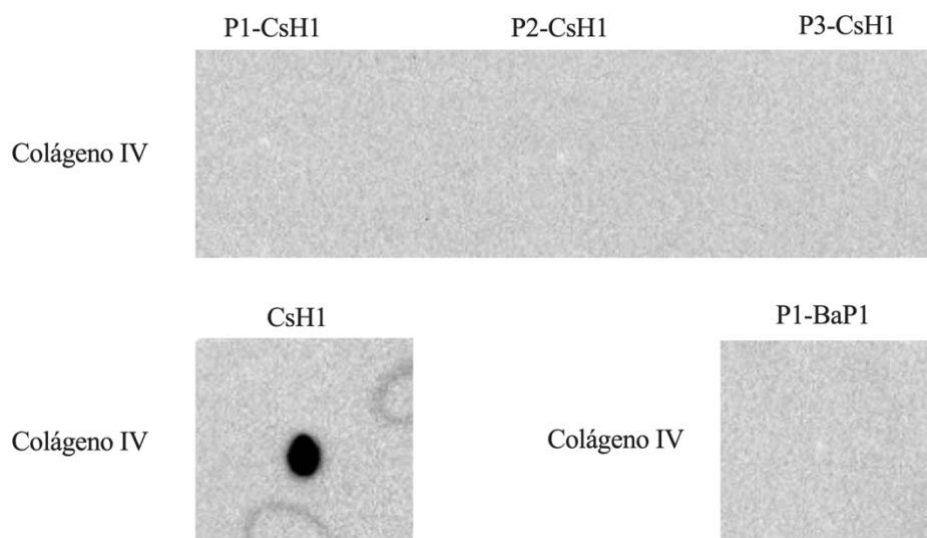
significativas en la unión con laminina y matrigel en comparación con la CsH1 no purificada por HPLC, como se ilustra en la **Figura 11**.



**Figura 11. Evaluación de la unión de la CsH1 purificada por HPLC al colágeno IV, la laminina y el matrigel mediante un ensayo de unión en fase sólida.** Placas de 96 pocillos se recubrieron con **A)** colágeno IV (Cultrex®), **B)** laminina (Invitrogen®) y **C)** matrigel (Cultrex®) y se dejaron incubando durante toda la noche. Se realizó un bloqueo con leche descremada y se incubaron cantidades equimolares de CsH1 y CsH1 purificada por HPLC previamente biotiniladas. Seguidamente, se agregó un conjugado de estreptavidina-peroxidasa (Thermo Scientific™) y finalmente, se reveló con o-feniléndiamina y se midió la absorbancia a 492 nm. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar (n=3), \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

### 5.3 Evaluación de la interacción de péptidos de diferentes regiones de MPVS con colágeno IV

Los péptidos sintetizados se utilizaron en ensayos de Dot Blot de manera similar a los ensayos realizados con las toxinas. Por lo tanto, para evaluar la capacidad de unión de los péptidos 1,2 y 3 de la CsH1 y el péptido 1 de la BaP1 al colágeno IV, se fijaron los péptidos en una membrana de PVDF. Posteriormente se incubó la membrana con colágeno IV, utilizando la CsH1 como control positivo. Además, se verificó la fijación de los péptidos por medio de un conjugado de estreptavidina-peroxidasa como control adicional (resultados no mostrados). En estos ensayos, no se observó ninguna interacción de los péptidos con el colágeno IV (**Figura 12**). En adición, se realizaron ensayos de unión en fase sólida para evaluar la interacción de los péptidos con el colágeno IV, en donde se fijó colágeno IV a una placa de 96 pocillos y posteriormente se incubó con cantidades iguales de los péptidos sintetizados. Estos ensayos fueron consistentes con los de los experimentos de Dot Blot debido a que no se observó interacción de los péptidos con el colágeno IV (resultados no mostrados).

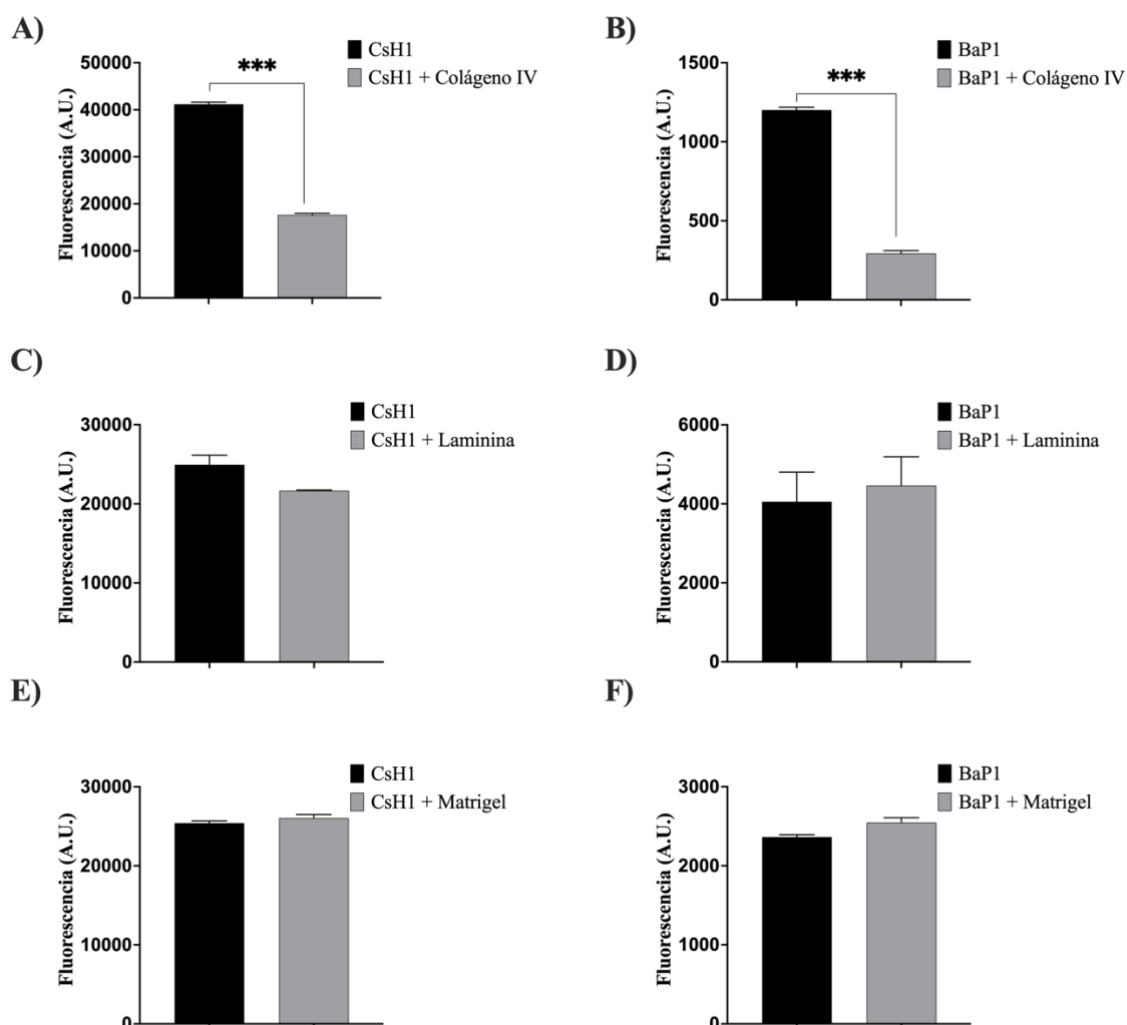


**Figura 12. Evaluación de la unión de péptidos de MPVS al colágeno IV mediante Dot Blot.** Se fijaron cantidades equimolares de los péptidos 1,2 y 3 de la CsH1 y el péptido 1 de la BaP1 en una membrana de PVDF. Posteriormente, se bloqueó la membrana con leche descremada y se incubó con colágeno IV (Cultrex®) durante toda la noche. Luego, se incubó con un anticuerpo anti-colágeno IV (Abcam 6586), para detectar el colágeno IV unido a los péptidos, luego se agregó un anticuerpo anti-inmunoglobulina conjugado con peroxidasa (Sigma A6154) y se incubó. Finalmente, se reveló mediante quimioluminiscencia utilizando el kit comercial Pierce™ ECL Plus Western.

#### 5.4 Evaluación del efecto de la unión a colágeno IV, laminina y matrigel sobre la actividad proteolítica de las MPVS

En estudios sin publicar realizados por el grupo de investigación se encontró que *in silico* la interacción de las MPVS con componentes de la MEC ocurría en regiones presentes en el dominio metaloproteinasa cercano al sitio catalítico, por lo que esta unión podría tener un impacto en la actividad proteolítica de las toxinas. Por lo que se decidió evaluar el efecto de la unión a proteínas de la MEC sobre la actividad proteolítica de las toxinas con el objetivo de observar si esta unión afectaba su actividad. Para esto se pre-incubaron las MPVS con colágeno IV, laminina y matrigel y posteriormente se midió su actividad proteolítica sobre gelatina fluorescente. Se observó que la pre-incubación de las toxinas con colágeno IV produjo diferencias significativas en la actividad proteolítica sobre gelatina de la CsH1 y la BaP1 (**Figura 13 A y B**). En contraste, en los experimentos

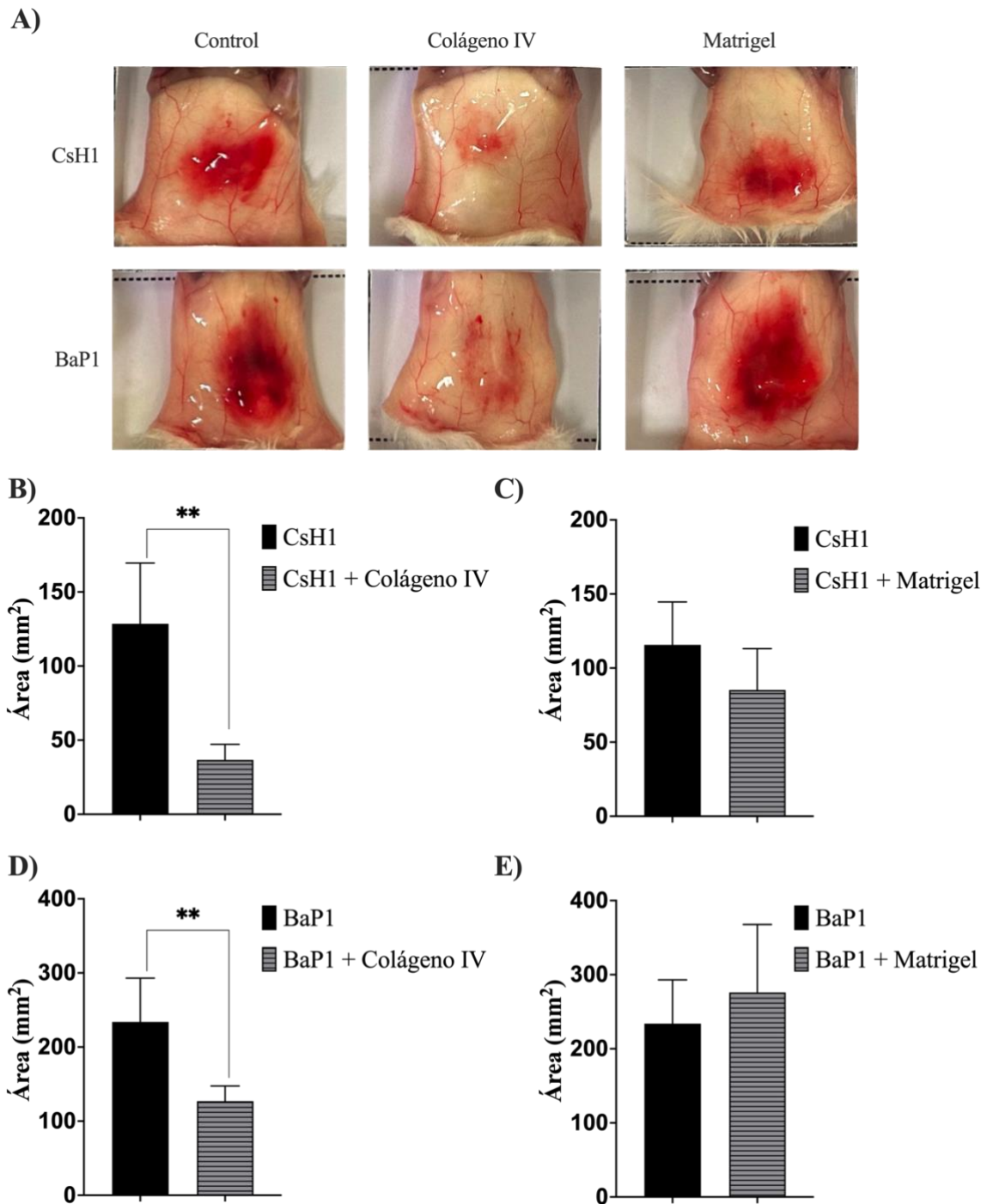
realizados con laminina y matrigel, no se observó una disminución significativa de la actividad proteolítica de ambas toxinas (**Figura 13 C, D, E y F**).



**Figura 13. Evaluación del papel de la unión a laminina, colágeno IV o matrigel en la actividad proteolítica de la CsH1 y la BaP1.** Cantidades equimolares de CsH1 y BaP1 se pre-incubaron con **A), B)** colágeno IV (Cultrex®), **C) y D)** laminina (Invitrogen) o **E) y F)** matrigel (Cultrex®) por 30 min a 37 °C y se evaluó la actividad proteolítica de las MPVS sobre un sustrato de gelatina-FITC utilizando el kit EnzCheck Gelatinase/Collagenase Assay Kit de Molecular Probes (E-12055). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar (n=3), \*\*\*p<0,001.

### 5.5 Evaluación del efecto de la unión a colágeno IV y matrigel sobre la actividad hemorrágica de las MPVS

Dado los resultados de la prueba anterior *in vitro*, se decidió evaluar si la actividad hemorrágica también se ve afectada en un modelo *in vivo* al pre-incubar las MPVS con colágeno IV y matrigel como fuente de laminina. Para esto se pre-incubaron las MPVS con colágeno IV y matrigel y posteriormente se administró la solución vía intradérmica a ratones con el fin de evaluar la actividad hemorrágica de las toxinas. En estos ensayos se observó que la pre-incubación de las toxinas con colágeno IV produjo una disminución significativa en la actividad hemorrágica de la CsH1 y la BaP1 (**Figura 14 B y D**). En contraste, en los experimentos en donde las toxinas se pre-incubaron con matrigel, no hubo una diferencia significativa en la actividad hemorrágica para ambas toxinas (**Figura 14 C y E**). Estos resultados concuerdan con los experimentos realizados *in vitro* que sugieren que los sitios de unión a colágeno IV podrían estar cercanos al sitio catalítico de las MPVS.

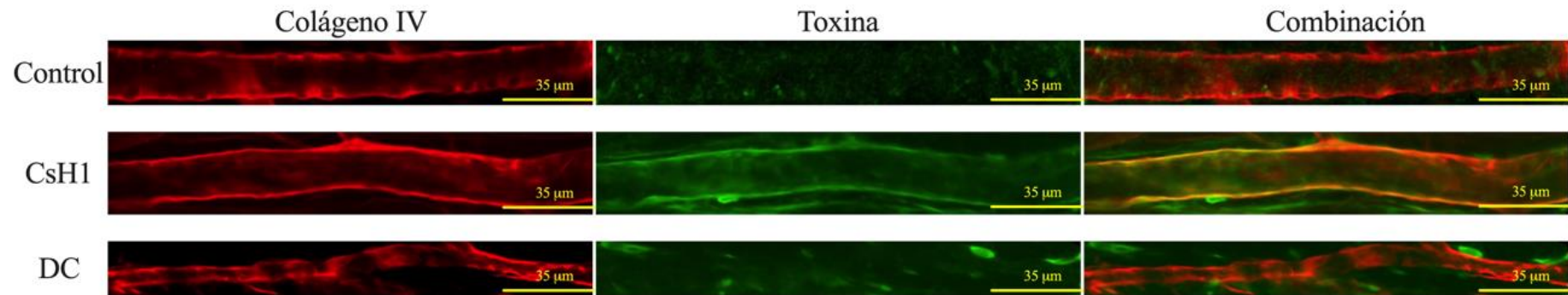


**Figura 14. Evaluación del efecto de la unión a colágeno IV y matrigel sobre la actividad hemorrágica de las MPVS.** Grupos de 4-5 ratones se les aplicó por vía ID una dosis cercana a la DHM de cada una de las MPVS CsH1 y BaP1, pre-incubadas por 30 min a 37 °C con **B)** y **D)** colágeno IV (Cultrex®), o **C)** y **D)** matrigel (Cultrex®), y sus respectivos controles de toxina sola. Una hora después de la administración los animales se sacrificaron, se les removió la piel y se determinó el área de hemorragia utilizando la herramienta AHA. **A)** Imágenes representativas de lesiones de hemorragia con uno de los

tratamientos Los resultados se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar (n=4-5), \*\*p<0,01.

### **5.6 Distribución de la CsH1 y el fragmento DC sobre la microvasculatura del músculo cremáster de ratón *ex vivo*.**

Según investigaciones previas realizadas por el grupo, se identificó una colocación de la CsH1 con el colágeno IV en la MB de los vasos sanguíneos (17). Por lo que se decidió observar la distribución del fragmento DC en los vasos sanguíneos para determinar si mantenía una distribución similar a la proteína completa. Para esto se marcaron con el fluorocromo Alexa 647 cantidades equimolares de CsH1 y DC; previamente se había demostrado que la unión de este fluorocromo a la CsH1 no afectaba su actividad proteolítica (17). Luego, se aplicaron las proteínas marcadas en los músculos cremáster aislados de ratones, los cuales fueron posteriormente fijados para su análisis. En estos ensayos se observó que la CsH1 se localizó en la MB de los vasos sanguíneos, en contraste con el DC que se distribuyó de manera más difusa en el tejido como se observa en la **Figura 15**.



**Figura 15. Distribución de la CsH1 y el fragmento DC sobre la microvasculatura del músculo cremáster de ratón *ex vivo*.** Cantidades equimolares de CsH1 (5  $\mu\text{g}$ ) y DC (2,5  $\mu\text{g}$ ) marcadas con el fluorocromo Alexa 647 (verde), fueron aplicadas durante 15 min en los músculos cremáster aislados de ratón. Los tejidos se fijaron con paraformaldehído al 4% y se realizó una inmunotinción con anticuerpo contra colágeno IV (Abcam19808) y anticuerpo secundario marcado con el fluorocromo Alexa 488 (rojo). Los tejidos se visualizaron en un microscopio confocal Nikon Eclipse Ti2. La barra de escala representa 35  $\mu\text{m}$ .

## 6. DISCUSIÓN

La degradación de los componentes de la MB por las MPVS es un paso esencial del mecanismo de acción de la hemorragia inducida por estas toxinas, ya que debilita la pared vascular (18,23). Sin embargo, se ha propuesto que las MPVS de tipo PIII, además de degradar proteínas de la MB como el colágeno IV y la laminina, también tienen la capacidad de unirse a ellas, lo que podría explicar en parte por qué las MPVS tipo PIII tienen mayor actividad hemorrágica que las MPVS de tipo PI (17,41). En adición, se ha planteado la hipótesis de que la presencia de los dominios tipo disintegrina y rico en cisteína podría tener un papel en esta unión, lo que podría contribuir a las diferencias observadas en la actividad hemorrágica entre los distintos tipos de MPVS (17). Por esta razón se decidió evaluar la interacción de metaloproteinasas hemorrágicas de venenos de serpientes tipo PI, PIII y el fragmento DC de una PIII, con proteínas de la MB, con el fin de identificar regiones moleculares que participan en dicha interacción.

Por lo tanto, en este estudio se evaluó la unión de tres toxinas: BaP1, una MPVS hemorrágica de tipo PI; CsH1, una MPVS hemorrágica de tipo PIII; y el fragmento DC de la CsH1, con el colágeno IV, la laminina y el matrigel, mediante técnicas como Dot Blot, Western Blot y ensayos de unión en fase sólida. En estos ensayos se observaron diferencias en la capacidad de unión de las toxinas a las proteínas de la MB. En los ensayos de unión en fase sólida y el Dot Blot, donde las toxinas conservaron su estructura nativa, la CsH1 mostró una mayor capacidad de unión al colágeno IV, la laminina y el matrigel que la BaP1, mientras que para el fragmento DC no se detectó ninguna interacción. Además, al evaluar la unión mediante Western Blot en condiciones no reductoras, donde hay desnaturalización de las proteínas debido al SDS, pero aún se conservan los puentes disulfuro, y por lo tanto gran parte de la conformación terciaria de las proteínas, se observó que la CsH1 mantiene la capacidad de unión a la laminina y colágeno IV, lo cual coincide con los hallazgos obtenidos en las otras técnicas. En adición, se observó que en condiciones reductoras la CsH1 perdió su capacidad de unirse a las proteínas de MB.

La estructura terciaria de la CsH1 aún no ha sido elucidada, aunque se han desarrollado modelos homólogos basados en la bothropasina, una MPVS tipo PIII que se caracteriza por poseer tres enlaces disulfuro en el dominio metaloproteínasa, siete en el dominio tipo disintegrina, seis en el dominio rico en cisteína y un enlace disulfuro inter-dominio que

conecta el dominio tipo disintegrina con el dominio rico en cisteína (55). Por lo tanto, la pérdida de estos enlaces en la CsH1 resulta en la pérdida de su capacidad de interactuar con las proteínas de MB, lo que sugiere que la estructura terciaria es necesaria para mantener la conformación de los exositos que participan de la unión. Estos resultados también concuerdan con estudios *in silico* realizados por el grupo de investigación (datos no publicados), en los cuales se observó que la interacción entre la CsH1 y el colágeno I tiene lugar en un sitio donde se producen interacciones simultáneas con el dominio metaloproteinasas y la región hipervariable del dominio rico en cisteína debido a la forma de C que tiene la proteína al ser una MPVS de tipo PIII (19).

La interacción de la CsH1 con las proteínas de la MB coincide con investigaciones previas que han documentado la unión del subdominio Da de la jararagina, una MPVS de tipo PIII, a proteínas de MB como el colágeno IV (42) y el colágeno I (41), mediante ensayos de unión en fase sólida. Además, estudios previos demostraron que la CsH1 (17) y la jararagina (41) se unen a componentes de la MB y co-localizan con el colágeno IV. Estos resultados también concuerdan con hallazgos de investigaciones anteriores donde se ha observado que otras MPVS de tipo PIII, como la bothropasina y la HF3, presentan afinidades similares de unión al colágeno VI y a la laminina, sin embargo, se desconoce la región en particular donde se da esta interacción (45). Además, se ha observado unión a otros sustratos de la MEC, como por ejemplo en un estudio previo se observó que la atragina, una MPVS de tipo PIII, se unió a la integrina  $\alpha\beta_3$  mediante una secuencia ubicada en la región hipervariable del dominio rico en cisteína (47). Lo cual concuerda con lo demostrado anteriormente donde se observó que la jararagina se unió a la integrina  $\alpha_2\beta_1$  mediante secuencias ubicadas en este dominio (44).

Por otra parte, en los estudios realizados se observó que la BaP1 presentó una unión leve al colágeno IV, la laminina y el matrigel en los ensayos de unión en fase sólida y el Dot Blot, pero no se detectó interacción mediante Western Blot. Este resultado coincide con estudios previos relacionados con la BJ-PI, una MPVS de tipo PI, en los cuales no se evidenció unión de la toxina al colágeno VI ni a la laminina (45). Además, concuerda con estudios previos en ensayos *in vivo* mediante microscopía confocal, donde la BaP1 no mostró una colocalización clara con el colágeno IV, en contraste con la CsH1 (17,41).

En cuanto al fragmento DC de la CsH1, no parece estar involucrado en la interacción con las proteínas de MB, ya que todos los resultados obtenidos en los ensayos de unión *in*

*vitro* para esta proteína resultaron negativos. Además, se realizaron ensayos de competencia con la CsH1 y se observó que la presencia del fragmento DC no afectó significativamente la unión de la CsH1 a las proteínas de MB. Estos hallazgos concuerdan con lo observado en los experimentos de microscopía confocal realizados con el fin de identificar la distribución del fragmento DC en los vasos sanguíneos en un tejido *ex vivo*. En estos ensayos se observó que el fragmento DC se distribuyó de manera más difusa en el tejido, a diferencia de la CsH1, que se localizó en la MB de los vasos sanguíneos como había sido demostrado previamente (17). Por lo tanto, parece que el fragmento DC de la CsH1 no se une a componentes de la MB en la microvasculatura del músculo cremáster.

En contraste con nuestros resultados, en estudios previos se ha demostrado que el fragmento DC de la bothropasina se une al colágeno VI y al colágeno I, aunque con una afinidad menor en comparación con la bothropasina, y no presenta interacción con la laminina, el fibrinógeno y la fibronectina, lo cual sugiere que la interacción con las proteínas de la MB no se produce solo en estos dominios, sino que se requiere la presencia del dominio metaloproteinasas (45). En otra investigación, se observó que la jararagina, una metaloproteinasas de tipo PIII, se une al colágeno I y IV en un sitio localizado en el subdominio Da del dominio tipo disintegrina de la toxina, ya que se demostró que el uso de un anticuerpo monoclonal específico para esa región bloquea tanto la capacidad de unión al colágeno como su actividad hemorrágica (43). No obstante, es importante tener en cuenta que, al utilizar un anticuerpo, su tamaño puede influir en las interacciones con otros sitios de unión, ya que podría ocasionar impedimentos estéricos. Además, en este estudio, se utilizó la toxina completa en lugar del fragmento DC por sí solo, como se hizo en los ensayos realizados, lo que pudo influir en los resultados debido a la presencia del dominio metaloproteinasas.

Por otro lado, en los estudios de docking realizados por el grupo de investigación (datos no publicados) se observó interacción del dominio rico en cisteína y el dominio metaloproteinasas de la CsH1 con el péptido del colágeno I, pero no se observó interacción del dominio tipo disintegrina. Por lo tanto, no se puede descartar la posibilidad de que se requiera la conformación tridimensional en forma de C de la proteína para que ocurra la interacción del dominio DC, ya que estos estudios indican que la interacción de la toxina con la proteína de MB ocurre de manera simultánea con el dominio metaloproteinasas y el dominio rico en cisteína; sobre todo, teniendo en cuenta que en el dominio rico en cisteína

se encuentra la región hipervariable, la cual es importante para la interacción de las MPVS con proteínas de la MB y MEC (7).

Luego de verificar la unión de la CsH1 al colágeno IV y la laminina, surge la pregunta sobre si esta unión ocurre en el sitio catalítico y si es dependiente de la actividad catalítica. Por lo tanto, se decidió evaluar el papel de la actividad proteolítica en dicha interacción. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de unión en fase sólida y Western Blot utilizando Batimastat, un péptido sintético que se une al sitio catalítico de las metaloproteinasas e inhibe su actividad proteolítica (56,57). En estos ensayos, se observó que, al perder su actividad proteolítica, la CsH1 no perdía su capacidad de unirse al colágeno IV. Adicionalmente, se realizaron ensayos de unión en fase sólida y Western Blot utilizando una CsH1 que había perdido su actividad proteolítica tras su purificación mediante HPLC, y nuevamente se observó que esto no afectaba su capacidad de unirse al colágeno IV o a la laminina. Estos resultados sugieren que la unión de la CsH1 al colágeno IV y la laminina ocurre en sitios diferentes al sitio catalítico, y que esta unión es independiente de su actividad proteolítica. Estos hallazgos son consistentes con los resultados de los estudios *in silico* (datos no publicados), donde las regiones de unión al colágeno I se encontraban en un loop cercano al sitio catalítico y en la región hipervariable del dominio rico en cisteína.

Posteriormente, como se demostró que la unión al colágeno IV y laminina es independiente de la actividad proteolítica, se decidió evaluar si la unión a estas proteínas afectaba la actividad proteolítica de las toxinas sobre un sustrato de gelatina fluorescente luego de su incubación con colágeno IV, laminina y matrigel. En estos ensayos se observaron diferencias significativas en la actividad proteolítica de la CsH1 y la BaP1 tras su incubación previa con colágeno IV, ya que se produjo una disminución significativa en su capacidad para degradar la gelatina, a diferencia de lo que sucedió al pre-incubarlas con laminina y matrigel, donde no se observaron cambios apreciables. Estos resultados sugieren que el sitio de unión al colágeno IV es cercano al sitio catalítico, lo que concuerda con lo que se observó en los estudios *in silico* realizados por el grupo de investigación. Así, al unirse el colágeno IV a las MPVS, es probable que se bloquee el sitio activo por impedimento estérico, lo que lleva a una reducción de la actividad proteolítica de las MPVS. Estos hallazgos contrastan con investigaciones previas donde se pre-incubó una MPVS de tipo PIII con colágeno I y posteriormente se midió la

actividad proteolítica de la toxina utilizando fibrina como sustrato, y se demostró que la unión previa del colágeno I a la toxina no afectaba la capacidad de la MPVS para hidrolizar la fibrina (43). Sin embargo, es importante tener en cuenta que en ese caso se utilizó colágeno I, el cual es un tipo de colágeno fibrilar, mientras que el colágeno IV es un formador de redes que contiene una mayor cantidad de dominios no colágeno, por lo tanto, presentan diferencias estructurales significativas.

En contraste, en el caso de la laminina, podría ser que los sitios de unión a las MPVS estén más alejados del sitio catalítico, lo que explicaría que no se hayan observado cambios en su actividad proteolítica, lo que sugiere que esta MPVS posee distintos exositos que le permiten unirse a proteínas de la membrana basal. Respecto al matrigel, los resultados coinciden con los de la laminina, posiblemente debido a la menor proporción de colágeno IV en comparación con la laminina presente en el matrigel (58). Adicionalmente, es posible que las diferencias observadas entre los sustratos se deban a que las MPVS se unen con menor afinidad a la laminina y al matrigel, lo que posteriormente les lleva a preferir la unión con el colágeno IV.

Dado que se vio afectada la actividad proteolítica de la CsH1 y la BaP1 al pre-incubarlas con el colágeno IV, se decidió evaluar si se veía afectada la actividad hemorrágica *in vivo*. En estos ensayos se observaron diferencias significativas en la actividad hemorrágica de la CsH1 y la BaP1 tras su incubación con colágeno IV, lo que provocó una disminución en su actividad hemorrágica. En contraste, al pre-incubarlas con matrigel como fuente rica en laminina, no se observaron cambios en su actividad hemorrágica, lo cual coincide con los resultados *in vitro*. Estos hallazgos respaldan la idea de que la unión previa del colágeno IV a las MPVS bloquea su sitio catalítico, lo que conlleva a una disminución en su actividad proteolítica y en su capacidad para acceder a los sustratos de la MB. La actividad proteolítica de las MPVS es importante para la degradación de componentes de la MB, ya que es un paso esencial en el mecanismo de hemorragia provocado por estas toxinas (18,23). Por lo tanto, al disminuir su actividad proteolítica, se reduce la capacidad hemorrágica de las MPVS.

Por otra parte, resulta destacable que en estos experimentos se pudo observar una reducción en la actividad proteolítica y hemorrágica de la BaP1 después de su pre-incubación con colágeno IV, a pesar de que en los ensayos de unión mostró una leve interacción con esta proteína. Esta diferencia podría atribuirse a que la interacción entre

la BaP1 y el colágeno IV podría no ser tan fuerte, y según la metodología utilizada, esta interacción podría perderse. Por lo tanto, en los ensayos de unión en fase sólida y Dot Blot, donde la toxina demostró una ligera unión al colágeno IV, se llevaron a cabo múltiples lavados, lo que pudo resultar en un debilitamiento de la unión entre la BaP1 y las proteínas de la MB. Sin embargo, al evaluar la actividad proteolítica y hemorrágica de la MPVS, no se realizaron lavados, si no que se administraron ambas proteínas juntas. Por lo tanto, es posible que la interacción entre la BaP1 y el colágeno IV *ex vivo* no se viera afectada, y por lo tanto, la BaP1 actuara en menor medida sobre sustratos de la MB y MEC de la microvasculatura del tejido, lo cual influyó en una menor actividad hemorrágica.

Finalmente, después de llevar a cabo varios ensayos de unión con las MPVS, se buscó respaldar los resultados obtenidos, y al mismo tiempo, evaluar regiones específicas de las MPVS donde se podría dar la interacción con las proteínas de la MB. Con este propósito, se realizaron ensayos de unión en fase sólida y Dot Blot utilizando los péptidos sintetizados (**Tabla 1**) a partir de los hallazgos obtenidos en los ensayos de docking. En el ensayo de docking se observó que la CsH1 interactúa con el péptido de colágeno I en regiones que se encuentran en un loop cercano al sitio catalítico y en la región hipervariable del dominio rico en cisteína, y no se encontró una interacción fuerte en el dominio tipo disintegrina. Por lo que los péptidos utilizados fueron dos del dominio metaloproteinasas, cerca del sitio catalítico, y uno del dominio rico en cisteína, en la región hipervariable. Sin embargo, los resultados observados en estos ensayos *in vitro* mostraron que no hubo interacción de los péptidos con el colágeno IV bajo las condiciones estudiadas. Este resultado es importante ya que los ensayos con la CsH1 sugirieron que su interacción con las proteínas de la MB depende de su estructura terciaria y de la presencia de puentes disulfuro. Sin embargo, a pesar de que los péptidos fueron sintetizados de manera cíclica carecían de una estructura tridimensional similar a la presente en la CsH1 nativa. Por lo que, los resultados obtenidos concuerdan con lo encontrado en los ensayos realizados con la CsH1 donde se sugiere que la estructura terciaria es necesaria para mantener la conformación de los exositos que participan de la unión de la toxina con las proteínas de MB.

Adicionalmente, es importante tener en cuenta que la proteína CsH1 aún no ha sido cristalizada, lo que significa que su estructura tridimensional completa no ha sido

determinada. Por lo tanto, se tuvo que construir un modelo homólogo basado en la bothropasina (PDB 1Q7D) para realizar el estudio de docking. Además, el estudio de docking utilizó un fragmento del colágeno I en lugar de colágeno IV, que fue el sustrato empleado en los ensayos *in vitro*. Estas limitaciones pudieron haber influido en la elección de los péptidos y por lo tanto en los resultados obtenidos.

## 7. CONCLUSIONES

La CsH1, una MPVS hemorrágica tipo PIII, es capaz de unirse al colágeno IV y la laminina, mientras que la BaP1, una MPVS hemorrágica tipo PI, mostró una interacción más débil con estas proteínas de la MB.

La unión de la CsH1 al colágeno IV y la laminina es una interacción dependiente de su estructura terciaria, pero independiente de su actividad proteolítica.

El fragmento DC de la CsH1 no se une por sí solo a las proteínas de MB, tanto en los modelos *in vitro* como *ex vivo*; sino que parece requerir del dominio metaloproteinasa para que ocurra la interacción, de acuerdo con los estudios de docking.

La unión de la CsH1 y la BaP1 al colágeno IV provoca una disminución de la actividad proteolítica y hemorrágica de las MPVS, lo cual sugiere que el sitio de unión de las MPVS al colágeno IV es cercano al sitio catalítico.

La unión de la CsH1 y la BaP1 a la laminina no afecta la actividad proteolítica de las MPVS. Esto podría deberse a que el sitio de unión de las MPVS a la laminina es diferente del de colágeno IV y no está cerca del sitio catalítico, o a la existencia de diferentes afinidades hacia estas proteínas.

Los estudios de interacción mediante péptidos sintéticos derivados de regiones moleculares de la CsH1 refuerzan que los exositos de interacción de la toxina con las proteínas de MB depende de la estructura tridimensional de la proteína, la cual está ausente en los péptidos.

## **8. RECOMENDACIONES**

En el futuro, se podría realizar la expresión recombinante del dominio metaloproteinasa de la CsH1 para examinar únicamente la interacción de este dominio.

Además, se podría considerar realizar ensayos de unión con MPVS de tipo PII para examinar la interacción en ausencia del dominio rico en cisteína.

Finalmente, es importante llevar a cabo el proceso de cristalización de la CsH1. Debido a que conocer la estructura tridimensional de la toxina permitiría obtener una mayor comprensión de las interacciones de la MPVS con otras proteínas.

## 9. REFERENCIAS

1. Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA. Snakebite envenoming. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17063.
2. Cardoso J, França F, Wen F, Málaque C, Haddad J. Venomous animals in Brazil: biology, clinic and therapeutics of envenomations. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003;45(6):338.
3. Gutiérrez JM. Snakebite Envenoming in Latin America and the Caribbean. En: Gopalakrishnakone P, Vogel C, Seifert S, Tambourgi D, editores. *Clinical Toxinology in Australia, Europe, and Americas*. Springer, Dordrecht; 2018. p. 51–72.
4. Sasa M, Segura Cano SE. New insights into snakebite epidemiology in Costa Rica: A retrospective evaluation of medical records. *Toxicon X*. 2020;7:100055.
5. Calvete JJ. Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. *Expert Rev Proteomics*. 2011;8(6):739–58.
6. Gutiérrez JM, Lomonte B, León G, Alape-Girón A, Flores-Díaz M, Sanz L, et al. Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *J Proteomics*. 2009;72(2):165–82.
7. Takeda S. ADAM and ADAMTS family proteins and snake venom metalloproteinases: A structural overview. *Toxins (Basel)*. 2016;8(5):155.
8. Oyama E, Takahashi H. Structures and functions of snake venom metalloproteinases (SVMP) from protobothrops venom collected in Japan. *Molecules*. 2017;22(8):1305.
9. Fox JW, Serrano SMT. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon*. 2005;45(8):969–85.
10. Zhang D, Botos I, Gomis-Rüth FX, Doll R, Blood C, Njoroge FG, et al. Structural interaction of natural and synthetic inhibitors with the venom metalloproteinase, atrolysin C (form d). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(18):8447–51.
11. Gomis-Ruth FX, Kress LF, Kellermann J, Mayr I, Lee X, Huber R, et al. Refined 2.0 Å X-ray crystal structure of the snake venom zinc-endopeptidase adamalysin II. Primary and tertiary structure determination, refinement, molecular structure ad

- comparison with astacin, collagenase and thermolysin. *J Mol Biol.* 1994;239(4):513–44.
12. Rucavado A, Lomonte B, Ovadia M, Gutiérrez JM. Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. *Exp Mol Pathol.* 1995;63(3):186–99.
  13. Olaoba OT, Karina dos Santos P, Selistre-de-Araujo HS, Ferreira de Souza DH. Snake Venom Metalloproteinases (SVMPs): A structure-function update. *Toxicon X.* 2020;7:100052.
  14. Camacho E, Sanz L, Escalante T, Pérez A, Villalta F, Lomonte B, et al. Novel catalytically-inactive PII metalloproteinases from a viperid snake venom with substitutions in the canonical zinc-binding motif. *Toxins (Basel).* 2016;8(10):292.
  15. Camacho E, Villalobos E, Sanz L, Pérez A, Escalante T, Lomonte B, et al. Understanding structural and functional aspects of PII snake venom metalloproteinases: Characterization of BlatH1, a hemorrhagic dimeric enzyme from the venom of *Bothriechis lateralis*. *Biochimie.* 2014;101(1):145–55.
  16. Takeda S, Takeya H, Iwanaga S. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 2012;1824(1):164–76.
  17. Herrera C, Escalante T, Voisin MB, Rucavado A, Morazán D, Macêdo JKA, et al. Tissue Localization and Extracellular Matrix Degradation by PI, PII and PIII Snake Venom Metalloproteinases: Clues on the Mechanisms of Venom-Induced Hemorrhage. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(4):e0003731.
  18. Escalante T, Rucavado A, Fox JW, Gutiérrez JM. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *J Proteomics.* 2011;74(9):1781–94.
  19. Takeda S. Structure-Function Relationship of Modular Domains of P-III Class Snake Venom Metalloproteinases. En: Gopalakrishnakone P, Calvete J, editores. *Venom Genomics and Proteomics.* Dordrecht: Springer; 2016. p. 185–209.
  20. Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Herrera C, Fernández J, Lomonte B, et al. Unresolved issues in the understanding of the pathogenesis of local tissue damage induced by snake venoms. *Toxicon.* 2018;148:123–31.
  21. Kini RM, Koh CY. Metalloproteases affecting blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation from snake venoms: Definition and nomenclature of interaction sites. *Toxins (Basel).* 2016;8(10):284.

22. Teixeira CDFP, Fernandes CM, Zuliani JP, Zamuner SF. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(1):181–4.
23. Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Díaz C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: Biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*. 2005;45(8):997–1011.
24. Gutiérrez JM, Núñez J, Escalante T, Rucavado A. Blood flow is required for rapid endothelial cell damage induced by a snake venom hemorrhagic metalloproteinase. *Microvasc Res*. 2006;71(1):55–63.
25. Mak KM, Mei R. Basement Membrane Type IV Collagen and Laminin: An Overview of Their Biology and Value as Fibrosis Biomarkers of Liver Disease. *Anatomical Record*. 2017;300(8):1371–90.
26. Jayadev R, Sherwood DR. Basement membranes. *Current Biology*. 2017;27(6):207–11.
27. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, et al. *Molecular biology of the cell*. 6th ed. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group; 2015.
28. Olsen BR. Matrix Molecules and Their Ligands. En: Lanza R, Langer R, Vacanti J, editores. *Principles of Tissue Engineering*. Academic Press; 2014. p. 189–208.
29. Gutiérrez JM, Escalante T, Rucavado A, Herrera C, Fox JW. A Comprehensive View of the Structural and Functional Alterations of Extracellular Matrix by Snake Venom Metalloproteinases (SVMPs): Novel Perspectives on the Pathophysiology of Envenoming. *Toxins (Basel)*. 2016;8(10).
30. Aumailley M. The laminin family. *Cell Adh Migr*. 2013;7(1):48–55.
31. Hohenester E. Structural biology of laminins. *Essays Biochem*. 2019;63(3):285–95.
32. Domogatskaya A, Rodin S, Tryggvason K. Functional diversity of laminins. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012;28:523–53.
33. Brown KL, Cummings CF, Vanacore RM, Hudson BG. Building collagen IV smart scaffolds on the outside of cells. *Protein Science*. 2017;26(11):2151–61.
34. Fidler AL, Boudko SP, Rokas A, Hudson BG. The triple helix of collagens - An ancient protein structure that enabled animal multicellularity and tissue evolution. *J Cell Sci*. 2018;131(7):jcs203950.
35. Theocharis AD, Manou D, Karamanos NK. The extracellular matrix as a multitasking player in disease. *FEBS Journal*. 2019;286(15):2830–69.

36. Parkin J Des, San Antonio JD, Pedchenko V, Hudson B, Jensen ST, Savige J. Mapping structural landmarks, ligand binding sites, and missense mutations to the collagen IV heterotrimers predicts major functional domains, novel interactions, and variation in phenotypes in inherited diseases affecting basement membranes. *Hum Mutat.* 2011;32(2):127–43.
37. Cosgrove D, Liu S. Collagen IV diseases: A focus on the glomerular basement membrane in Alport syndrome. *Matrix Biology.* 2017;57–58:45–54.
38. Kuo DS, Labelle-Dumais C, Gould DB. Col4a1 and col4a2 mutations and disease: Insights into pathogenic mechanisms and potential therapeutic targets. *Hum Mol Genet.* 2012;21(1):97–110.
39. Gutiérrez JM, Escalante T, Rucavado A, Herrera C. Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: A journey of discovery and understanding. *Toxins (Basel).* 2016;8(4):93.
40. Escalante T, Ortiz N, Rucavado A, Sanchez EF, Richardson M, Fox JW, et al. Role of collagens and perlecan in microvascular stability: Exploring the mechanism of capillary vessel damage by snake venom metalloproteinases. *PLoS One.* 2011;6(12):e28017.
41. Baldo C, Jamora C, Yamanouye N, Zorn TM, Moura-da-Silva AM. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: Tissue distribution and in Situ hydrolysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(6):e727.
42. Tanjoni I, Butera D, Bento L, Della-Casa MS, Marques-Porto R, Takehara HA, et al. Snake venom metalloproteinases: Structure/function relationships studies using monoclonal antibodies. *Toxicon.* 2003;42(7):801–8.
43. Moura-da-Silva AM, Ramos OHP, Baldo C, Niland S, Hansen U, Ventura JS, et al. Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. *Biochimie.* 2008;90(3):484–92.
44. Tanjoni I, Evangelista K, Della-Casa MS, Butera D, Magalhães GS, Baldo C, et al. Different regions of the class P-III snake venom metalloproteinase jararhagin are involved in binding to  $\alpha 2\beta 1$  integrin and collagen. *Toxicon.* 2010;55(6):1093–9.
45. Oliveira AK, Paes Leme AF, Asega AF, Camargo ACM, Fox JW, Serrano SMT. New insights into the structural elements involved in the skin haemorrhage induced by snake venom metalloproteinases. *Thromb Haemost.* 2010;104(3):485–97.
46. Serrano SMT, Jia LG, Wang D, Shannon JD, Fox JW. Function of the cysteine-rich domain of the haemorrhagic metalloproteinase atrolysin A: Targeting

- adhesion proteins collagen I and von Willebrand factor. *Biochemical Journal*. 2005;391(1):69–76.
47. Wu PL, Lin CC, Lin TH, Lee MS, Wu WG. Distal M domain of cobra ADAM-like metalloproteinase mediates the binding of positively charged cysteine-rich domain to  $\alpha v \beta 3$  integrin in the suppression of cell migration. *Toxicon*. 2016;118:1–12.
  48. Molina Molina DA, Guerra-Duarte C, Naves de Souza DL, Costal-Oliveira F, Ávila GR de, Soccol VT, et al. Identification of a linear B-cell epitope in the catalytic domain of bothropasin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* snake venom. *Mol Immunol*. 2018;104:20–6.
  49. Pereanez A, Patiño AC, Gutiérrez JM, Preciadov LM. Preliminary studies on different modes of interaction between hemorrhagic and non-hemorrhagic p-i snake venom metalloproteinases with basement membrane substrates: insights from an In silico approach. *Med Res Arch*. 2018;6(10):1–20.
  50. World Health Organization (WHO). Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. *Biol Aujourd'hui*. 2010;204(1):87–91.
  51. Gutiérrez J, Romero M, Díaz C, Borkow G, Ovadia M. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon*. 1995;33(1):19–29.
  52. Jenkins TP, Sánchez A, Segura Á, Vargas M, Herrera M, Stewart TK, et al. An improved technique for the assessment of venom-induced haemorrhage in a murine model. *Toxicon*. 2017;139:87–93.
  53. Jenkins TP, Laprade WM, Sánchez A, Tulika T, O'Brien C, Sørensen C V., et al. AHA: AI-guided tool for the quantification of venom-induced haemorrhage in mice. *Frontiers in Tropical Diseases*. 2022;3:1063640.
  54. Wang S, Voisin MB, Larbi KY, Dangerfield J, Scheiermann C, Tran M, et al. Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils. *J Exp Med*. 2006;203(6):1519–32.
  55. Muniz JRC, Ambrosio ALB, Selistre-de-Araujo HS, Cominetti MR, Moura-da-Silva AM, Oliva G, et al. The three-dimensional structure of bothropasin, the main hemorrhagic factor from *Bothrops jararaca* venom: Insights for a new classification of snake venom metalloprotease subgroups. *Toxicon*. 2008;52(7):807–16.

56. Low JA, Johnson MD, Bone EA, Dickson RB, J IM D. The Matrix Metalloproteinase Inhibitor Batimastat (BB-94) Retards Human Breast Cancer Solid Tumor Growth but not Ascites Formation in Nude Mice. *Clinical Cancer Research*. 1996;2:1207–14.
57. Escalante T, Núñez J, Moura Da Silva AM, Rucavado A, Theakston RDG, Gutiérrez JM. Pulmonary hemorrhage induced by jararhagin, a metalloproteinase from Bothrops jararaca snake venom. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003;193(1):17–28.
58. R&D Systems. 2024. [citado el 16 de abril de 2024]. Cultrex Basement Membrane Extract, PathClear. Frequently Asked Questions. Disponible en: [https://www.rndsystems.com/products/cultrex-basement-membrane-extract-pathclear\\_3432-010-01#:~:text=Cultrex%20Basement%20Membrane%20Extract,which%20makes%20up%20%2010%25](https://www.rndsystems.com/products/cultrex-basement-membrane-extract-pathclear_3432-010-01#:~:text=Cultrex%20Basement%20Membrane%20Extract,which%20makes%20up%20%2010%25).