

Valéria Gonçalves de Alvarenga

Caracterização estrutural e funcional de uma metaloproteinase
de classe P-I do veneno de *Lachesis muta rhombeata*

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências - Toxinologia do
Instituto Butantan para obtenção do título
de doutora em Ciências.

São Paulo

2023

Valéria Gonçalves de Alvarenga

Caracterização estrutural e funcional de uma metaloproteinase
de classe P-I do veneno de *Lachesis muta rhombeata*

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências - Toxinologia do
Instituto Butantan para obtenção do título
de Doutora em Ciências.

Orientador: Eladio Oswaldo Flores
Sanchez

Coorientadora: Ana Maria Moura da Silva

São Paulo

2023

Catlogação na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)

Valéria Gonçalves de, Alvarenga

Caracterização estrutural e funcional de uma metaloproteinase de classe P-I do veneno de *Lachesis muta rhombeata* / Alvarenga Valéria Gonçalves de ; orientador(a) Eladio Oswaldo Flores Sanchez, coorientador(a): Ana Maria Moura da Silva - São Paulo, 2023.

92 p. : il.

Tese (Doutorado) - Escola Superior do Instituto Butantan, Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia. Linha de pesquisa: Toxinas e sistemas biológicos.

Versão corrigida final

1. Serpentes 2. Hemostasia. 3. Plaquetas. 4. Toxinas e sistemas biológicos I. Sanchez, Eladio Oswaldo Flores. II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela equipe da Biblioteca do Instituto Butantan

Esta monografia foi elaborada com base no **Guia prático para elaboração de trabalho acadêmico** desenvolvido pela Biblioteca do Instituto Butantan, de acordo com as normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO DO TRABALHO

Eu, Valéria Gonçalves de Alvarenga, aluna de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia do Instituto Butantan, autorizo a divulgação de minha tese por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total desta tese após publicação, para fins acadêmicos desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação da tese após a data da defesa:

- () Imediato
() 06 meses
(X) 12 meses
() Não autorizo a divulgação

Justifique: Período de embargo da revista Toxicon para a qual o trabalho foi submetido.

São Paulo, 28 de abril de 2023.


.....
Aluna: Valéria Gonçalves de Alvarenga

De acordo: 
.....
Orientador: Eladio Oswaldo Flores Sanchez

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS-TOXINOLOGIA
INSTITUTO BUTANTAN



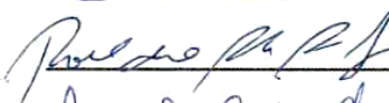
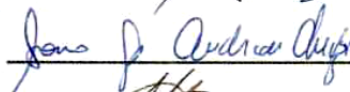

RESULTADO DA DEFESA DE TESE

DOUTORADO

NOME DA ALUNA: Valéria Gonçalves Alvarenga

DATA DO EXAME: 28/04/2023

BANCA EXAMINADORA: Profs. Drs.

NOME	Assinatura	Aprovado	Reprovado
Eládio Oswaldo Flores Sanchez (Presidente)		(X)	()
Ivo Lebrun		(X)	()
Ronaldo Alves Pinto Nagem		(X)	()
Sônia Aparecida de Andrade Chudzinski		(X)	()
Stephen Hyslop		(X)	()

DECISÃO FINAL: APROVADA (X)

REPROVADA ()

Comentários da Banca (opcional):

CERTIFICADO/PARECER DE COMISSÕES INSTITUCIONAIS REGULATÓRIAS



Participar da Construção do Sistema Único de Saúde,
Protegendo e Promovendo a Saúde

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA

**COMPROVANTE DE SUBMISSÃO- PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM
ATIVIDADES DE PESQUISA E ENSINO**


Nº CEUA: 06/2019

TÍTULO DO PROTOCOLO:

Caracterização estrutural e funcional de metaloproteínases do veneno de *Lachesis muta rhombeata*.

Pesquisador responsável: Valéria Gonçalves de Alvarenga

Recebido em: 10/04/2019


(Rubrica do coordenador da CEUA-Funed)

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização estrutural e funcional de metaloproteinases do veneno de Lachesis muta rhombeata

Pesquisador: ELADIO OSWALDO FLORES SANCHEZ

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 35329520.4.0000.9507

Instituição Proponente: Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento

Patrocinador Principal: FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS
Fundação Ezequiel Dias

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.275.136

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto intitulado de "Caracterização estrutural e funcional de metaloproteinases do veneno de Lachesis muta rhombeata", a ser executado por Valéria Gonçalves de Alvarenga, na Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias em Belo Horizonte, sob orientação de Eladio Oswaldo Flores Sanchez e co-orientação de Ana Maria Moura da Silva.

Objetivo da Pesquisa:

1. Purificação das MPs-PI e PIII do veneno de Lachesis muta rhombeata.
2. Determinação da sequência nucleotídica dos genes que codificam estas proteínas por meio de clonagem e sequenciamento de DNA.
3. Dedução da estrutura primária e da estrutura tridimensional por modelagem computacional e predição de epítomos.
4. Ensaios de atividade proteolíticas e de degradação de proteínas do plasma tais como fibrinogênio, fibrina, vitronectina, fator de von Willebrand e fibronectina.
5. Avaliar o efeito das MPs sobre as proteínas da matriz extracelular tais como colágeno tipo I e tipo IV, laminina, entre outras.
6. Avaliação do envolvimento dos domínios não enzimáticos presentes na MP-PIII sobre as proteínas da membrana de plaquetas.

Endereço: CONDE PEREIRA CARNEIRO

Bairro: GAMELEIRA

CEP: 30.510-010

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3314-4004

E-mail: cepfuned@mg.gov.br

Continuação do Parecer: 4.275.136

7. Avaliação do envolvimento das MPs na agregação plaquetária induzida por diferentes agonistas (colágeno, ADP, von Willebrand, ácido araquidônico).
8. Avaliação in vivo e da atividade trombolítica das MPs-PI purificadas em modelo de microscopia intravital.
9. Avaliação in vivo da atividade hemorrágica e demonecrotica em modelo de microscopia intravital.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores informaram sobre os riscos referentes à punção venosa, a saber: pequeno desconforto na hora da coleta do sangue, no local onde a agulha for colocada, que logo desaparecerá, e poderá surgir neste local uma área vermelha ou até mesmo roxa, que também desaparecerá depois de 2 ou 3 dias. Raramente, os riscos da coleta de sangue podem incluir desmaio. A coleta será realizada por profissional habilitado e o material coletado será descartado após o uso conforme legislação vigente.

Benefícios:

Os pesquisadores informam que o resultado desta pesquisa pode levar à melhorias no tratamento do envenenamento por serpentes e auxiliar na identificação de novos alvos moleculares de interesse biotecnológico relacionadas ao tratamento e diagnóstico de doenças tromboembólicas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto de pesquisa apresenta relevância e importância para a área de saúde pública, considerando o objeto de estudo e a elevada taxa de mortalidade por trombose no mundo. A presente proposta visa identificar, purificar e caracterizar metaloproteinasas (MPs) das classes PI e PIII do veneno das serpentes brasileiras *Lachesis muta rhombeata*, conhecidas como "surucucu". As metaloproteinasas exercem drástico efeito sobre várias proteínas do plasma envolvidas na coagulação sanguínea, fibrinólise, e função de plaquetas, assim como sobre proteínas da Matriz Extracelular, MEC (colágeno tipo I, colágeno tipo IV e laminina). De acordo com a literatura especializada algumas destas proteínas possuem potencial como modelo para o desenvolvimento biotecnológico. A purificação das MPs-PI e PIII será realizada por cromatografia de exclusão e de troca iônica em nosso laboratório, posteriormente teste biológicos e bioquímicos serão realizados para determinar as principais propriedades moleculares e elucidar o mecanismo de ação com ênfase no efeito em proteínas da MEC e sobre plaquetas.

Endereço: CONDE PEREIRA CARNEIRO

Bairro: GAMELEIRA

CEP: 30.510-010

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3314-4004

E-mail: cepfuned@mg.gov.br

Continuação do Parecer: 4.275.136

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O Termo de Consentimento Livre e esclarecido foi apresentado pela equipe pesquisadora apresenta clareza para o sujeito de pesquisa, definindo os objetivos, risco em relação à intervenção a ser efetuada, benefício principal, local de onde será realizada a punção venosa, garantia da autonomia do sujeito da pesquisa, contato do CONEP, CEP local e telefone do pesquisador.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências relacionadas ao Primeiro Parecer foram todas solucionadas, logo o projeto encontra-se apto do ponto de vista ético, segundo a avaliação deste Colegiado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Ezequiel Dias, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e complementares, e pela Norma Operacional N° 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação deste projeto. Ao término da pesquisa deve ser apresentado, via notificação na Plataforma Brasil, um Relatório Final com intuito de esclarecer que a pesquisa foi realizada em conformidade com os aspectos éticos.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_aprovado.pdf	14/09/2020 13:32:55	Heloísa Helena Marques Oliveira	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1466579.pdf	03/09/2020 17:23:32		Aceito
Outros	Resposta_ao_Parecer_Consubstanciado_CEP.docx	03/09/2020 17:20:47	VALERIA GONCALVES DE ALVARENGA	Aceito
Outros	Curriculo_ANAMOURA.pdf	03/09/2020 17:16:54	VALERIA GONCALVES DE ALVARENGA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Proposta_de_trabalho_doutorado_VALERIA_para_etica_HUMANA.docx	03/09/2020 17:06:29	VALERIA GONCALVES DE ALVARENGA	Aceito
TCLE / Termos de	TCLE_VALERIA.docx	03/09/2020	VALERIA	Aceito

Endereço: CONDE PEREIRA CARNEIRO
 Bairro: GAMELEIRA CEP: 30.510-010
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3314-4004 E-mail: cepfuned@mg.gov.br

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS -
FUNED



Continuação do Parecer: 4.275.136

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_VALERIA.docx	17:05:43	GONCALVES DE ALVARENGA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto_CEP.pdf	17/07/2020 10:46:41	VALERIA GONCALVES DE ALVARENGA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 14 de Setembro de 2020

Assinado por:

**Heloísa Helena Marques Oliveira
(Coordenador(a))**

Endereço: CONDE PEREIRA CARNEIRO

Bairro: GAMELEIRA

CEP: 30.510-010

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3314-4004

E-mail: cepfuned@mg.gov.br

Aos meus pais, marido e filhos pelo apoio, compreensão, amor incondicional e torcida.
Minha gratidão!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir começar esta jornada, pela saúde, pelo sustento, por colocar pessoas maravilhosas em meu caminho e por me trazer até aqui.

Ao meu orientador professor Dr. Eladio Oswaldo Flores Sanchez por todo apoio desde que comecei a trabalhar no Serviço de Bioquímica de Proteínas Animais/FUNED, pelo incentivo para entrar no doutorado, pela orientação e os ensinamentos, pela amizade e paciência.

A minha coorientadora professora Dra. Ana Maria Moura da Silva que amavelmente abriu as portas do seu laboratório e me recebeu com muito carinho e atenção, pelo apoio mesmo à distância e pelas aulas de toxicologia.

A minha amiga, confidente, conselheira, inspiradora e chefe, Dra. Luciana Souza de Oliveira, pela convivência, pelas experiências compartilhadas, pelos ensinamentos, por todo apoio e pela correção do texto da tese.

A Dra. Solange Serrano pelas sugestões e por dispor o seu tempo para me ouvir e me ajudar a entender algumas questões do trabalho e pelas análises de espectrometria de massas feitas em seu laboratório.

Ao maravilhoso Instituto Butantan pelo suporte e pelas portas abertas.

Aos professores da pós-graduação do Instituto Butantan pelo conhecimento passado.

A Rosana, Kimie e Debora da secretaria do programa de pós-graduação em ciências – Toxicologia, que sempre foram muito atenciosas e também ao apoio da coordenação atual, Dr. Daniel Pimenta e da coordenação anterior, Dra. Roxane Piazza.

Ao Dr. Daniel Pimenta pelas sugestões como docente de acompanhamento.

Aos amigos que fiz no Instituto Butantan no breve tempo em que estive lá, que me acolheram com muito carinho, Dra. Michelle Almeida, Dra. Sarah Gimenes, Dra. Luciana Freitas, Dra. Rafaela Mendonça, Dr. José Antonio Portes Júnior, Dra. Bruna Favoreto, Dra. Monica Colubrini, Noranathan. A secretária Cleuza por sua atenção e carinho. A Cris Caporrino (*in memoriam*). A todos os alunos e pesquisadores que tive a oportunidade de conhecer neste período.

A Fundação Ezequiel Dias, minha casa, que deu o suporte para o meu aperfeiçoamento profissional.

As minhas grandes amigas: Paula Ortolani, Lutiana Amaral e Patrícia Cota, que sempre estão por perto, apoiando, aconselhando, rindo e chorando.

Ao Alcides Neto pela presença constante, por suas sugestões e sua amizade sincera.

A Silea Gontijo pela amizade e pelo auxílio na purificação de proteínas.

Ao amigo Dário pela ajuda nos ensaios com os camundongos.

As minhas amigas Jaqueline Leal, e Dra. Márcia Helena Borges pelas sugestões e auxílio nas análises de espectrometria de massas.

A Dra. Maria Inácia que foi a primeira pessoa a me apresentar à pesquisa e me incentivar a seguir este caminho e pelo carinho mesmo estando tão longe.

A todos os amigos da Fundação Ezequiel Dias pelas experiências compartilhada, pelo apoio e pela torcida, Ana Valentin, Dra. Consuelo Latorre, Priscila Souza, Dra. Clara Guerra, Dra. Ana Luiza, Dra. Alessandra Matavel, Dra. Janete Soares, Thiago Geraldo, Cleonice Coelho, Dr. Raoni Souza, Daniel Gonçalves, Dra. Karla Evangelista e Dra. Sophie Leclercq. E também aos alunos e ex-alunos do SBVA pela agradável convivência, Lara, Marcela, Isabela, Pedro, Amanda, Débora, Gustavo, Carolina, Gabriela, Bruno, Henrique, Hugo, Lígia, Paula, Samanta, Sarah e Rafael.

Ao Dr. Rodrigo Souza, coordenador do Núcleo Serra Grande/Itacaré, pela gentil doação do veneno da serpente *Lachesis muta rhombeata*.

Ao CEFASP/USP pela análise de espectrometria de massas.

Ao amigo peruano Dr. Dan Erick pela colaboração nos trabalhos.

Ao Dr. Markus Kohlhoff pelas últimas análises de espectrometria de massas.

Aos amigos da Igreja Cristã Maranata pelas orações, pelo apoio e pela torcida.

A minha família pelo encorajamento, especialmente meus pais, Walter e Brígida, que são meu porto seguro, meus irmãos, Júlio e Sander, e minhas cunhadas, Juliane e Kelly, e minha pequena sobrinha Ayla. E também meus sogros Fátima e Milton e cunhados, Alexandre, Gilson, Patrícia e Ana Paula e suas famílias.

Ao meu querido marido Rodrigo e meus filhos amados Eloísa e Lucas que são o meu lar.

Aos membros da banca examinadora do doutorado pela disposição e pelas correções.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Este trabalho teve apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), número do processo 88882442320/19.

"Ó profundidade das riquezas, tanto da sabedoria, como da ciência de Deus! Quão insondáveis são os seus juízos, e quão inescrutáveis os seus caminhos".

Paulo aos Romanos 11:33

RESUMO

ALVARENGA, Valéria Gonçalves. **Caracterização estrutural e funcional de uma metaloproteinase de classe P-I do veneno de *Lachesis muta rhombeata***. 2023. 92 p. Tese (Doutorado em Ciências - Toxinologia) – Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

Rhomb-I, uma metaloproteinase de 23 kDa foi isolada do veneno de *L. m. rhombata*. Sua ação proteolítica sobre dimetilcaseína foi inibida por α 2-macroglobulina, quelantes de metais e por cátions Co^{2+} e Zn^{2+} e levemente estimulada por Ca^{2+} e Mg^{2+} . Em solução aquosa a 37 °C, rhomb-I sofreu autoproteólise gerando fragmentos de aproximadamente 20 e 11 kDa. A sequência de aminoácidos apresentou alta similaridade com outras SVMPs P-I. Rhomb-I causa hemorragia que pode ser atribuída à hidrólise de proteínas da membrana basal, da matriz extracelular e proteínas plasmáticas. Rhomb-I cliva, preferencialmente, as cadeias A α da fibrina e do fibrinogênio. Rhomb-I inibiu a agregação induzida por convulxina e pelo fator de von Willebrand (vWF) em plaquetas humanas, sem efeito significativo na agregação estimulada por colágeno ou outros agonistas. Ela digere vWF em multímeros de massas moleculares menores bem como o domínio A1 recombinante de vWF (rvWF-A1) gerando um fragmento de aproximadamente 27 kDa, conforme evidenciado por *western blot* com IgG anti-rvWF-A1, produzido em camundongos. Após incubar plaquetas lavadas com rhomb-I, foi possível observar por *western blot* que a proteína liga e cliva as glicoproteínas de plaquetas GPIb e GPVI, liberando as formas solúveis de 130 kDa e 55 kDa, respectivamente. Ambas glicoproteínas, GPIb α que se liga ao vWF, e GPVI que se liga ao colágeno, desempenham um papel fundamental na mediação da adesão/ativação plaquetária e podem iniciar a formação fisiológica ou patológica de trombos. Conclusões: Rhomb-I é uma metaloproteinase classe P-I, hemorrágica, fibrino(geno)lítica que degrada proteínas da matriz extracelular e interfere na função plaquetária pela clivagem de vWF, GPIb e GPVI. Estes resultados indicam que rhomb-I pode estar envolvida na fisiopatologia do envenenamento por *Lachesis*, perturbando a hemostasia e agregação plaquetária e causando danos à vasculatura.

Palavras-chave: Metaloproteinase. Serpentes. Hemostasia. Plaquetas. *Lachesis*

ABSTRACT

ALVARENGA, Valéria Gonçalves. **Structural and functional characterization of a P-I class metalloproteinase from *Lachesis muta rhombata* venom.** 2023. 92 p. Doctoral thesis (Doctorate degree in Sciences - Toxinology) – Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

Rhomb-I, a 23-kDa metalloproteinase was isolated from *L. m. rhombeata* venom. Its dimethylcasein proteolysis was abolished by metal chelators, and slightly enhanced by Ca^{2+} and Mg^{2+} ions, but inhibited by Co^{2+} , Zn^{2+} and $\alpha 2$ -macroglobulin. In aqueous solution, rhomb-I autoproteolyzed to a 20- and 11-kDa fragments at 37 °C. The amino acid sequence showed high homology with other SVMPs. Rhomb-I causes hemorrhage that may be ascribed to hydrolysis of essential BM, ECM and plasma proteins. It preferentially cleaves the α -chains of fibrin(ogen). Rhomb-I inhibited convulxin- and vWF-induced aggregation on human platelets without significant effect on collagen-stimulated aggregation or other effectors. It digests vWF into a low-molecular-mass multimers of vWF and a rvWF-A1 domain to a 27-kDa fragment as revealed by western blotting with mouse anti-rvWF A1-domain IgG. Incubation of platelets with rhomb-I resulted in adhesion to and cleavage of platelet receptors GPIIb α and GPVI to release a 130-kDa and 55-kDa soluble form. Both membrane glycoproteins, GPIIb α that binds vWF, together with GPVI which binds collagen, play a key role in mediating platelet adhesion/activation and can initiate (patho)physiological thrombus formation. Conclusions: rhomb-I is implicated in the pathophysiology of *Lachesis* envenoming by disrupting vasculature, hemostasis and platelet aggregation through impairing vWF-GPIIb axis and blocking GPVI-collagen binding.

Keywords: Metalloproteinase. Snake Venoms. Hemostasis. Blood Platelets. *Lachesis*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Metaloproteinases de Veneno de Serpentes	23
1.2	O alvo principal das SVMPs é o sistema hemostático	27
1.2.1	Proteínas do plasma e da matriz extracelular	27
1.2.2	Plaquetas	29
2	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivos gerais	32
2.2	Objetivos específicos	32
3	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1	Animais e veneno	33
3.2	Reagentes	33
3.3	Processo de purificação de rhomb-I	35
3.4	Atividade hemorrágica	35
3.5	Efeito de cátions e inibidores enzimático na atividade proteolítica	36
3.6	Caracterização estrutural	36
3.6.1	Determinação da massa molecular	36
3.6.2	Identificação de autoproteólise	37
3.6.3	Ensaio para detectar a presença de carboidratos N-ligados	38
3.6.4	Determinação da sequência de aminoácidos	38
3.6.5	Análise de similaridade com outras sequências de SVMPs.	39
3.6.6	Predição de estrutura tridimensional	39
3.7	Atividade enzimática sobre proteínas do plasma e da matriz extracelular.	40
3.7.1	Hidrólise de proteínas isoladas do plasma	40
3.7.2	Degradação da Matrigel	40
3.8	Ensaio de agregação plaquetária	41
3.9	Hidrolise do fator de von Willebrand	42
3.10	Efeito sobre os receptores plaquetários GPIb e GPVI	42
3.10.1	Ligação aos receptores plaquetários GPIb e GPVI	43
3.10.2	Clivagem de um peptídeo sintético de GPVI	43
4	RESULTADOS	45

4.1	Purificação de rhomb-I do veneno de <i>L. m. rhombeata</i>	45
4.2	Análise de autoproteólise e glicosilação de rhomb-I	47
4.3	Atividade Hemorrágica	49
4.4	Caracterização Bioquímica	49
4.5	Análise da estrutura de aminoácidos de rhomb-I	51
4.5.1	Determinação da sequência de aminoácidos	51
4.5.2	Similaridade de rhomb-I com outras SVMPs e predição de estrutura.....	53
4.6	Atividade proteolítica de rhomb-I sobre as proteínas do plasma e da MEC	56
4.7	Rhomb-I afeta a agregação plaquetária	59
4.8	Rhomb-I cliva o vWF e o domínio A1 do vWF recombinante (rvWF-A1) .	60
4.9	Ação de rhomb-I sobre os receptores plaquetários GPIb e GPVI	61
4.9.1	Rhomb-I se liga aos receptores plaquetários GPIb e GPVI	62
4.9.2	Rhomb-I cliva um fragmento de GPVI sintético	62
5	DISCUSSÃO	65
6	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	70
	APÊNDICE A - MANUSCRITO PUBLICADO NO PERIÓDICO TOXICON:	79
	ANEXO A - OUTRAS PARTICIPAÇÕES EM TRABALHOS DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO	92

1 INTRODUÇÃO

As serpentes atraem a curiosidade humana há milhares de anos. Elas são uma subordem pertencente a ordem Squamata, com mais de 3.400 espécies distribuídas na esfera terrestre entre os continentes, mares e ilhas com exceção da Antártida e do Polo Norte. No entanto, há uma maior concentração de espécies nas regiões de clima tropical e quente (CHIPPAUX J. P., 1998; GUTIÉRREZ *et al.*, 2017). As serpentes, simplificada e podem ser categorizadas em venenosas e não venenosas. Todas as espécies de serpentes venenosas causadoras de acidentes ofídicos conhecidas pertencem a superfamília Colubroidea, sendo elas as das famílias Viperidae (víboras) e Elapidae (serpentes coral, cobras najas e serpentes marinhas), algumas espécies da família Lamprophiidae (víbora-toupeira) e algumas espécies da família Colubridae (serpente-rateira) (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017; PYRON *et al.*, 2011).

Os acidentes com serpentes afligem sobretudo as populações de área rural de países em desenvolvimento, com uma estimativa de 2,7 milhões de casos sendo 81.000 a 138.000 fatais (CHIPPAUX J. P., 1998; GUTIÉRREZ *et al.*, 2017; LONGBOTTOM *et al.*, 2018). Devido à gravidade dos acidentes e o número de casos envolvendo principalmente as populações vulneráveis, em 2009 o envenenamento por serpentes passou a ser considerado pela Organização Mundial de Saúde como uma doença tropical negligenciada, e embora tenha sido removida em 2013 desta lista, em 2017 foi novamente reconhecida e elevada à categoria A da lista de Doenças Tropicais Negligenciadas (NTD-A) (CHIPPAUX, 2017; “Neglected tropical diseases – GLOBAL”, [s.d.]; SEIFERT *et al.*, 2022).

O gênero *Lachesis* (Viperidae) compreende apenas quatro espécies conhecidas, as quais estão distribuídas nas florestas tropicais das Américas do Sul e Central. Sendo consideradas uma das maiores serpentes venenosas do mundo podendo chegar a 3,5 metros, são ovíparas e possuem hábitos terrestres e noturnos. A espécie *Lachesis muta* possui duas principais subespécies: *Lachesis muta muta* e *Lachesis muta rhombeata*. A subespécie *Lachesis muta muta* habita principalmente a região amazônica do Brasil, leste do Peru e norte da Bolívia e a *Lachesis muta rhombeata* ocorre na Mata Atlântica brasileira do Rio de Janeiro até o estado do Ceará (**Figura 1**). Esta espécie é conhecida pelos nomes de surucucu, pico de jaca, surucucu

de fogo, surucutinga e urukuku (HAAD, 1998; SOUZA *et al.*, 2007; SÁNCHEZ *et al.*, 1987).

Figura 1 – Distribuição do gênero *Lachesis*



Fonte: www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases/snakebite-venomology/snakebite-information-and-data-platform, 2023.

Legenda: O gênero *Lachesis* está distribuído nas florestas tropicais do Brasil, Peru, Bolívia, Colômbia, Venezuela, Guiana, Guiana Francesa e Suriname.

Intimamente relacionada à Mata Atlântica, a subespécie *L. m. rhombeata* foi considerada ameaçada de extinção (CREMONEZ *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2007). Neste sentido, os estudos sobre o conteúdo do veneno de serpentes são relevantes não apenas pela questão médica, biológica e biotecnológica, mas também porque demonstram a importância da preservação das espécies.

O envenenamento por *Lachesis* corresponde em cerca de 3% dos acidentes reportados no Brasil, e o maior número de casos verifica-se principalmente na região nordeste e norte do país (SOUZA *et al.*, 2007). Os principais sinais e sintomas observados (**Figura 2**) evoluem rapidamente e podem ser locais como dor, inchaço e edema progressivo, bolhas, equimoses, dermonecrose; ou sistêmicos como coagulopatia de consumo, hemorragia e trombose. Alguns trabalhos também

descrevem comprometimento neurológicos como paralisia progressiva, ptose e disartria, dificuldade de deglutição, comprometimento respiratório, hipotensão, diarreia e vômito. Embora apresente sintoma hemorrágico, a plaquetopenia não está presente nos acidentes laquéticos como nos acidentes botrópicos (JORGE *et al.*, 1997; JUAN, 1981; SANCHEZ *et al.*, 1992; SEIFERT *et al.*, 2022; SOUZA *et al.*, 2007; TORRES *et al.*, 1995).

Figura 2 – Sintomas observados em vítimas de envenenamento por *Lachesis*



Fonte: Seifert *et al.* (2022) e Souza *et al.* (2007).

Legenda: Sintomas hemorrágicos locais e sistêmicos, e comprometimento neurológico são observados em vítimas de envenenamento por *Lachesis*. A foto se refere a um relato de caso feito por Souza *et al.*, 2007, no qual os sintomas apresentados pela vítima foram revertidos com uso de soroterapia antibotrópico-laquético.

A fisiopatologia do envenenamento e a evolução clínica das vítimas são efeitos da ação das proteínas que estão presentes no veneno: Metaloproteinases do Veneno de Serpentes (SVMPs), Serinoproteinases do Veneno de Serpentes (SVSPs - Enzimas *thrombin-like*, ativadores de plasminogênio, e proteinases tipo caliceína), L-aminoácido oxidases (LAAO); Fosfolipases A2 (PLA2), Hialuronidases, Lectinas tipo C, Desintegrinas, Peptídeos natriuréticos e Neurotoxinas (CALVETE, 2011; GUTIÉRREZ *et al.*, 2017; SERRANO *et al.*, 2005).

1.1 Metaloproteinases de Veneno de Serpentes

As SVMPs constituem mais de 30% do veneno das serpentes da família Viperidae (FOX; SERRANO, 2008; PIDDE-QUEIROZ *et al.*, 2013; SANCHEZ *et al.*, 2017). Estas enzimas são hidrolases (EC 3.4.24.-) classificadas no banco de dados MEROPS (merops.sanger.ac.uk) concernente a grande família das metizincinas (M12), subfamília M12B juntamente com as ADAMs (do inglês, *A Disintegrin and A Metalloproteinase*) e as MMPs (*Matrix metalloproteinases*) (FOX; SERRANO, 2005). A principal característica destas enzimas é uma região do sítio catalítico altamente conservada contendo três histidinas (HEXXHXXGXXH) que se ligam a um íon de zinco, seguida por uma região de *loop* contendo uma metionina denominada *met-turn* que serve como um eixo para efetivar o sítio catalítico (BODE *et al.*, 1993; MOURA-DA-SILVA *et al.*, 2008; SAJEVIC *et al.*, 2013).

As SVMPs são sintetizadas como pré-pro-enzimas apresentando a sequência do peptídeo sinal, o pró-domínio, o domínio metaloproteinase que contém o sítio catalítico e, dependendo da classe à qual pertence a SVMP, os domínios não catalíticos. O pró-domínio está presente na forma nascente da proteína. Após a secreção, a enzima sofre processamento proteolítico liberando o pró-domínio tornando-se ativa (MOURA-DA-SILVA *et al.*, 2016). Portanto, de acordo com os domínios existentes em sua estrutura madura, as SVMPs são classificadas em P-I, P-II ou P-III (**Figura 3**) (FOX; SERRANO, 2005, 2008).

As SVMPs da classe P-I (20 – 30 kDa) são polipeptídeos mais simples contendo apenas do domínio metaloproteinase. Substratos como caseína e dimetilcaseínas são rapidamente hidrolisados pelas P-Is. Alguns representantes desta classe são desprovidas de efeito hemorrágico (BELLO *et al.*, 2006; GREMSKI *et al.*, 2007; SANCHEZ; DINIZ; RICHARDSON, 1991) contudo são descritas proteínas P-Is que apresentam forte atividade hemorrágica tais como atroxlysin-I e atroxlysin-Ia (FREITAS-DE-SOUSA *et al.*, 2017; SANCHEZ *et al.*, 2010).

Figura 3 – Classificação de SVMP e suas funções

	Domínios	Classes			Função do domínio
		P-I	P-II	P-III	
Proteína nascente	Peptídeo sinal				Marcador de localização subcelular
	PF01562* (Pro domínio)				Maturação da metaloproteinase
Proteína Madura	PF01421* (Metaloproteinase)				Inflamação, fibrinogénólise, fibrinólise, inibição da agregação plaquetária, apoptose, hemorragia, sheddase de ectodomínio.
	PF00200* (Desintegrina)				Inibição da agregação plaquetária, Inibição da adesão celular, diminui a migração celular, acentua a atividade metaloproteinase.
	PF08516* (Rico em cisteína)				Estabiliza interação proteína-proteína, sítio de ligação célula-receptor, inibição da agregação plaquetária, hemorragia, inflamação.
Massa molecular		20 – 30 kDa	30 – 60 kDa	60 – 100 kDa	

Fonte: Próprio autor, 2023.

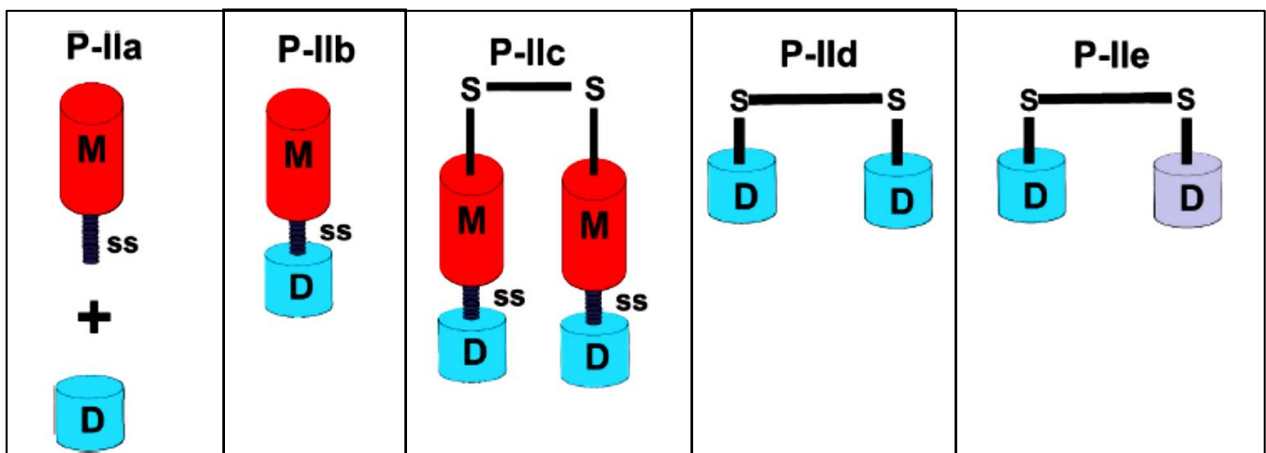
Legenda: Principais características das três classes de SVMPs descritas na literatura, de acordo com Fox e Serrano, 2008 e Olaoba *et al.*, 2020. * Código de acordo com a classificação de famílias de proteínas do banco de dados Pfam (www.ebi.ac.uk/interpro/).

A classe P-II (30-60 kDa) apresenta o domínio desintegrina além do domínio metaloproteinase. O domínio desintegrina possui um motivo RGD (arginina, glicina e ácido aspártico) ou outro motivo semelhante como KGD (lisina, glicina e ácido aspártico) ou KTS (lisina, treonina e serina) que confere a função de se ligar a receptores de integrinas na superfície de células/plaquetas podendo inibir a adesão celular e/ou a agregação plaquetária (CHEN *et al.*, 2003; FOX; SERRANO, 2008). A porção desintegrina pode ser liberada por proteólise formando assim dois polipeptídeos distintos: uma P-I com atividade proteolítica e uma desintegrina com ação sobre as integrinas de membrana (CASEWELL *et al.*, 2011). Vários rearranjos na estrutura de P-II já foram descritos (OLAoba *et al.*, 2020), o que levou a subdivisão desta classe em P-IIa, P-IIb, P-IIc, P-IId e P-IIe conforme **figura 4**.

A classe P-III (50 – 100 kDa) tem sua estrutura mais complexa pois apresenta o domínio rico em cisteína além dos domínios metaloproteinase e tipo desintegrina. O domínio semelhante a desintegrina possui funções análogas ao domínio desintegrina da classe P-II, porém o conservado motivo RGD é substituído por outros motivos como

D/ECD (ácido aspártico/ácido glutâmico, cisteína e ácido aspártico) (FOX; SERRANO, 2008). O domínio rico em cisteína na porção C-terminal contribui para o reconhecimento de alvos moleculares das P-IIIs (MAZZI *et al.*, 2007). Ademais, na literatura são descritas algumas moléculas da classe P-III que também podem incluir o domínio lectina tipo C (PF00059) ligado à sua estrutura por meio de ligação dissulfídica como a VFLXA uma P-IIId, do veneno de *Vipera amodytes amodytes* (LEONARDI *et al.*, 2008). A evidência de moléculas contendo os domínios tipo desintegrinas e rico em cisteína mas sem o domínio catalítico levou a formação de uma nova subclasse das P-IIIs, a P-IIle (LEONARDI *et al.*, 2019) (**Figura 5**), compreendendo proteínas como BaltDC (MATIAS *et al.*, 2017) e Vaa-MPIII-3 (POŽEK *et al.*, 2022). POŽEK e colaboradores (2022) confirmaram por meio de estudos genéticos com a Vaa-MPIII-3, que um gene codificante de P-III pode sofrer deleção da região do domínio catalítico metaloproteinase elevar a formação de moléculas contendo apenas os domínios não catalíticos das P-IIIs. Apesar de não apresentar o o domínio catalítico, estas proteínas afetam a agregação plaquetária (MATIAS *et al.*, 2017; POŽEK *et al.*, 2022) podendo também ter uma participação importante no envenenamento.

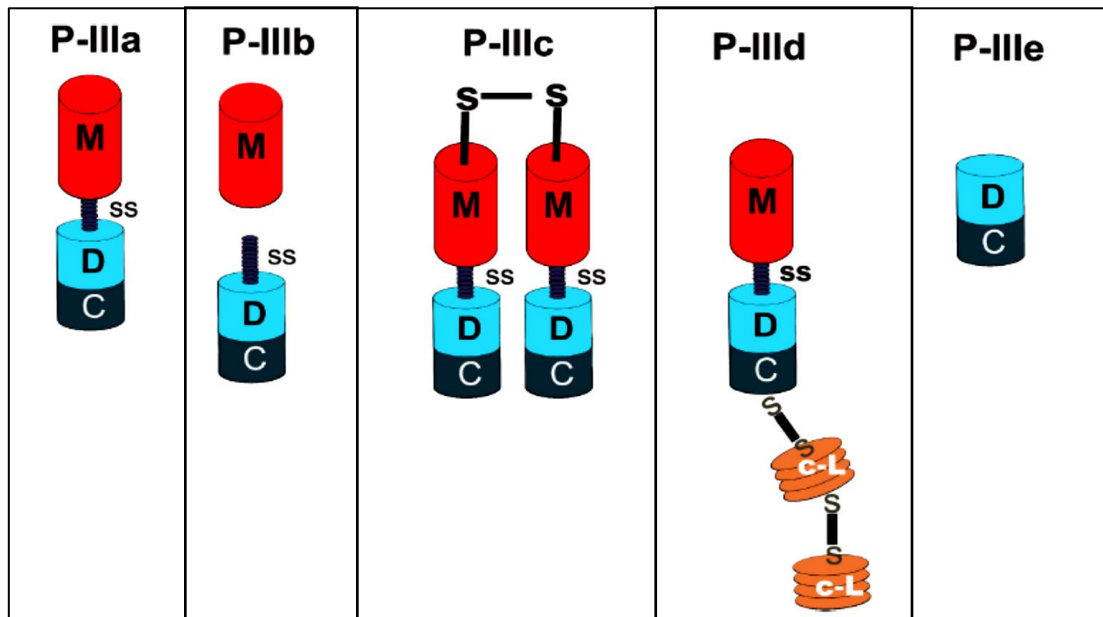
Figura 4 – Subclassificação de P-II



Fonte: Olaoba *et al.* (2020).

Legenda: M – domínio metaloproteinase, D – domínio desintegrina, ss – região espaçadora, S – formação de ligação dissulfídica entre duas moléculas de PII ou entre duas desintegrinas que podem ser homodiméricas ou heterodiméricas.

Figura 5 – Subclassificação de P-III



Fonte: Olaoba *et al.* (2020).

Legenda: M – domínio metaloproteínase, D – domínio tipo desintegrina, C – domínio rico em cisteína, c-L – domínio Lectina tipo C, ss – região espaçadora, S – formação de ligação dissulfídica entre duas moléculas de PIII, entre uma molécula de PIII e uma molécula de lectina tipo C ou entre duas moléculas de lectina. Em P-IIIe a molécula não possui o domínio catalítico.

Essa evidente variedade de SVMPs parece ter origem evolutiva em um único gene ancestral como demonstrado no trabalho de Giorgianni e colaboradores (2020), no qual foi feita uma análise robusta dos genes que codificam SVMPs no gênero *Crotalus*. Com isso mostraram que os genes que codificam SVMPs expandiram de um único gene comum que codifica uma ADAM28 ancestral e que as classes de SVMPs existentes são frutos de eventos de duplicação e deleção gênica. Certamente, os eventos evolutivos estão relacionados à abundância de isoformas que são relatadas nos estudos de genomas e transcriptomas de glândulas de veneno de serpentes (CASEWELL *et al.*, 2009; SANZ; CALVETE, 2016). Toda essa diversidade permite às SVMPs atuarem de diversas formas e em diferentes alvos (MOURA-DASILVA *et al.*, 2016).

1.2 O alvo principal das SVMs é o sistema hemostático

O maior impacto das SVMs é no sistema hemostático, hidrolisando as proteínas da matriz extracelular (FREITAS-DE-SOUSA *et al.*, 2017; HERRERA *et al.*, 2016; KURTOVIĆ *et al.*, 2011; SAJEVIC *et al.*, 2013; SANCHEZ *et al.*, 2010), ou atuando sobre os componentes da cascata da coagulação (LORÍA *et al.*, 2003; SARTIM *et al.*, 2016). Podem ainda intervir na agregação plaquetária, com uma evidente ação sobre os receptores das plaquetas (HSU *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2019; SANCHEZ *et al.*, 2021). Por isso, alguns componentes que participam da hemostasia foram usados nos ensaios *in vitro* de caracterização da metaloproteinase em estudo:

1.2.1 Proteínas do plasma e da matriz extracelular

O fibrinogênio é uma glicoproteína hepática circulante composta de três pares de cadeias polipeptídicas denominadas $A\alpha$ (66,5 kDa), $B\beta$ (52 kDa) e γ (46,5 kDa), as quais são unidas por 29 ligações dissulfídicas (WEISEL, 2005). No final da cascata de coagulação a molécula de fibrinogênio é convertida enzimaticamente em fibrina insolúvel. A clivagem da porção N-terminal das cadeias $A\alpha$ e $B\beta$ do fibrinogênio pela trombina leva a liberação dos fibrinopeptídeos A e B e permite a formação de monômeros de fibrina, os quais se polimerizam e são estabilizados por ligação covalente por meio da ação do fator XIIIa. Desta maneira, é formado um coágulo de fibrina insolúvel no local da lesão (NELSON *et al.*, 2017; WEISEL, 2005). Além de ser essencial para a hemostasia, o fibrinogênio também atua na inflamação e na angiogênese (MOSESSON, 2005).

A molécula de fibronectina é uma glicoproteína formada por dois polipeptídeos (220 kDa) unidos por ligações dissulfídicas que circula no sangue na forma solúvel e compacta, mas pode sofrer um processo celular de polimerização formando fibrilas insolúveis na matriz extracelular (GUI *et al.*, 2006). Esta macromolécula atua na adesão, propagação, migração, proliferação e apoptose celular. E, dependendo da sua conformação e sequência de aminoácidos, é capaz de se ligar a integrinas celulares, a outra subunidade de fibronectina, colágeno, heparina, fibrina,

metaloproteinases de matriz, e fatores de crescimento (FFRENCH-CONSTANT, 1995; GUI *et al.*, 2006; PANKOV; YAMADA, 2002; PATTEN; WANG, 2021).

A vitronectina é uma glicoproteína monomérica de 75 kDa contendo três sítios de glicosilação e uma sequência RGD (Arg-Gly-Asp) de reconhecimento de integrinas além de domínios com sítios de ligação para colágeno, plasminogênio, heparina, trombina, elastase, plasmina e inibidor do ativador de plasminogênio (IZUMI *et al.*, 1989; SCHVARTZ *et al.*, 1999). Assim, a vitronectina se apoia na matriz extracelular através de seu domínio de ligação ao colágeno ou à heparina, ao mesmo tempo que interage com integrinas da membrana promovendo a adesão, propagação e migração celular (SCHVARTZ *et al.*, 1999).

A matriz extracelular é uma mescla de células e componentes não celulares que formam uma rede harmonicamente organizada que proporciona estrutura para as células inseridas e também auxilia em muitos processos celulares como crescimento, migração, diferenciação e homeostasia (FRANTZ *et al.*, 2010; THEOCHARIS *et al.*, 2016). Duas principais classes de macromoléculas compõe a matriz extracelular: proteoglicanos e proteínas fibrosas as quais contribuem para a sua dinâmica de remodelamento finamente regulada e orquestrada (FRANTZ *et al.*, 2010).

A membrana basal é uma fina camada da matriz extracelular que está em contato com o lado basal das células epiteliais, endoteliais e muscular lisa (HALFTER *et al.*, 2015). Muitos modelos de membrana basal são preparados para o estudo de sua estrutura, função e interação com outros componentes moleculares. Neste trabalho, foi utilizado um modelo denominado matriz de Matrigel que é uma mistura de componentes da membrana basal secretados por células de sarcoma de camundongo Engelbreth-Holm-Swarm (KLEINMAN; MARTIN, 2005), contendo como componentes principais laminina, colágeno tipo IV, nidogênio e proteoglicanos sulfato de heparan.

A laminina é um glicoproteína de alta massa molecular contendo três polipeptídeos (α , β e γ) por meio de ligações dissulfídicas (MINER; YURCHENCO, 2004; NEGISHI; NOMIZU, 2019). A região C-terminal da laminina interage com proteínas da membrana plasmática de células ou microrganismos difundindo sinais intracelulares e extracelulares. Enquanto a porção N-terminal está implicada com outras moléculas da matriz extracelular fazendo parte do emaranhado molecular

essencial para a sustentação e funcionamento fisiológico da membrana basal (AUMAILLEY, 2013).

O colágeno tipo IV é o único tipo de colágeno que ocorre somente na membrana basal. Unidades de heterotrímeros de colágeno IV são formadas por combinação de 3 cadeias alfa dentre seis cadeias alfa geneticamente distintas ($\alpha_1\alpha_2$, $\alpha_3\alpha_4$, e $\alpha_5\alpha_6$). A forma de tripla-hélice fornece o arcabouço para a interligação com as outras moléculas da membrana basal formando assim o suporte para as células adjacentes (BROWN *et al.*, 2017; KEFALIDES, 1971; SAGE, 1982).

O nidogênio (ou entactin) possui duas isoformas: nidogênio 1 e nidogênio 2, as quais são glicoproteínas contendo três domínios globulares (KIMURA *et al.*, 1998; NEU *et al.*, 2006). As isoformas são capazes de se ligarem ao colágeno IV e à laminina e estão envolvidas na adesão e migração celular (NEU *et al.*, 2006).

Uma das maiores moléculas circulantes no sangue, presente na matriz subendotelial e peça chave na hemostasia é o Fator de von Willebrand (vWF), uma glicoproteína multimérica produzida nos megacariócitos e nas células endoteliais. Cada subunidade de vWF madura possui 2050 aminoácidos e apresenta uma massa molecular de aproximadamente 270 kDa (LENTING *et al.*, 2015; SADLER, 1991). Os domínios presentes em sua estrutura madura apresentam a seguinte ordem: D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2-CK que podem se organizar em multímeros de duas a muitas subunidades de até 15.000 kDa (RUGGERI; ZIMMERMAN, 1981; SADLER, 1991). Estes domínios auxiliam nas diversas funções do vWF, como adesão celular, ligação ao colágeno, oligomerização, associação com receptor de antígeno de células T, estabilização do fator VIII e recrutamento de plaquetas (HASSAN *et al.*, 2012). Na hemostasia primária, o vWF é como um elo entre os componentes do subendotélio e as plaquetas, ativando a formação do trombo ao se ligar, por meio do seu domínio A1, ao receptor plaquetário Glicoproteína Ib (GPIb) (REININGER, 2008).

1.2.2 Plaquetas

As plaquetas são fragmentos do citoplasma de megacariócitos sendo consideradas as menores células sanguíneas contando apenas com o conteúdo de seus grânulos e com os seus receptores de membrana para exercer suas funções. Os grânulos plaquetários como os corpos densos possuem reserva de: ADP, ATP,

serotonina, cálcio, epinefrina, histamina; fator plaquetário 4, beta-tromboglobulina, vWF e vitronectina. Os grânulos alfa possuem estoque de fatores da cascata de coagulação; e os lisossomos contêm alfa-arabinosídeos, beta-galactosidade, elastase, colagenase e catepsina (FRESON *et al.*, 2007; HARRISON; MARTIN CRAMER, 1993; VAN DER MEIJDEN; HEEMSKERK, 2019). Elas têm um tempo de vida útil de apenas 7 a 10 dias, contudo desempenham papel primordial na hemostasia e também em processos como: resposta inflamatória, desenvolvimento de vasos sanguíneos, tumorigêneses e metástase (GAY; FELDING-HABERMANN, 2011; GEORGE, 2000; KIM; JENNE, 2016; PALACIOS-ACEDO *et al.*, 2019).

Há uma infinidade de receptores moleculares na membrana plaquetária que exercem funções importantes no reconhecimento de proteínas e alvos pelas plaquetas (HUANG *et al.*, 2019). E, embora não possuam núcleo, as plaquetas conseguem responder rapidamente às mudanças de ambiente a sua volta, por meio de seus receptores, os quais, ao serem estimulados, desencadeiam vias de sinalização que culminam na mudança de forma, ativação, liberação do conteúdo dos grânulos, adesão e agregação plaquetária (HUANG *et al.*, 2019; MONTAGUE *et al.*, 2018; VAN DER MEIJDEN; HEEMSKERK, 2019).

Alguns receptores são integrinas de membrana que nas plaquetas formam 5 tipos: $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, que são receptores para colágeno, fibronectina e laminina, respectivamente; além de $\alpha v\beta 3$ (poucas cópias em plaquetas) e $\alpha IIb\beta 3$ que reconhece a sequência RGD de vários tipos de proteínas como o fibrinogênio, a fibronectina e o vWF e é fundamental para a função plaquetária (HUANG *et al.*, 2019). Além desses, a membrana de plaquetas expressa: receptores acoplados à proteína G como PAR1 e PAR4 para trombina e, os purinérgicos P2Y1 e P2Y12 para ADP (RIVERA *et al.*, 2009). Receptores *Toll-like* (SHIRAKI *et al.*, 2004) e receptor tipo lectina tipo C 2 (SUZUKI-INOUE, 2006) também são expressos na membrana plaquetária.

Algumas glicoproteínas são exclusivas de megacariócitos e plaquetas como o complexo GPIb-V-IX e a GPVI (CANOBBIO *et al.*, 2004; GARDINER; ANDREWS, 2014b; MODDERMAN *et al.*, 1992). Estes receptores desempenham um papel muito importante na hemostasia primária: o GPIb-V-IX, na microcirculação, se liga ao vWF e inicia o processo de mudança de forma, adesão e formação do trombo plaquetário (CANOBBIO *et al.*, 2004; HUIZINGA *et al.*, 2002), enquanto a glicoproteína VI (GPVI),

nos grandes vasos, é capaz de interagir com o colágeno (KEHREL *et al.*, 1998) e induzir a ativação das plaquetas.

A expressão das glicoproteínas do complexo GPIb-V-IX e a GPVI na superfície das plaquetas é passível de regulação pelas metaloproteinases de membrana (ADAM – *A disintegrin and Metalloproteinase*) que em humanos são as ADAMs 10 e 17. Este importante mecanismo de regulação das glicoproteínas plaquetárias é descrito na literatura como “*shedding*” no qual os receptores sofrem proteólise por meio das “*shedases*” (ADAMs 10 e 17) levando a liberação do seu ectodomínio solúvel, fazendo com que este receptor perca irreversivelmente sua função de ligação (GARDINER; ANDREWS, 2014; MONTAGUE *et al.*, 2018). A GPIb α sofre este processo principalmente por meio da ADAM17, enquanto que a GPVI sofre esta ação por meio da ADAM10 (GARDINER; ANDREWS, 2014; MONTAGUE *et al.*, 2018). O fragmento solúvel de GPV também pode ser liberado por meio de ambas ADAMs (MONTAGUE *et al.*, 2018).

O envenenamento por serpentes possui uma fisiopatologia complexa e as SVMPs possuem uma participação importante neste processo, principalmente no sistema hemostático. Neste estudo, o foco foi purificar e caracterizar uma SVMP P-I e analisar sua ação sobre proteínas do plasma, da matriz extracelular e sobre a função plaquetária com o propósito de contribuir para o entendimento dos distúrbios hemorrágicos causados pelos acidentes ofídicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Purificar e caracterizar uma SVMP P-I do veneno de *Lachesis muta rhombeata* e analisar sua ação sobre proteínas que atuam na hemostasia e sobre a agregação plaquetária com o objetivo de contribuir para o entendimento da fisiopatologia do envenenamento por serpentes dada a importância das SVMPs neste processo.

1.2 Objetivos específicos

- a) Purificar e caracterizar bioquimicamente uma SVMP-PI do veneno de *Lachesis muta rhombeata*.
- b) Analisar o efeito da enzima sobre as proteínas do plasma (Fibrinogênio, fibronectina, vitronectina, fator de von Willebrand) e da matriz extracelular (Laminina, Colageno IV e nidogem).
- c) Estudar a ação da proteína isolada na função de plaquetas.
- d) Contribuir para o melhor entendimento das coagulopatias descritas no envenenamento ofídico por *Lachesis*

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e veneno

O veneno de *Lachesis muta rhombeata* foi gentilmente doado pelo médico Rodrigo C.G. de Sousa, coordenador do Núcleo Serra Grande, com Autorização do Instituto do Meio Ambiente e Recursos Hídricos nº: 2016.001.002764/INEMA/Lic-02764, do Estado da Bahia. Camundongos *Swiss Webster* (fêmea, 18-22 g) obtidos do biotério da Fundação Ezequiel Dias foram utilizados para experimentos *in vivo* de acordo com as diretrizes e legislações vigentes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pelo Comitê de Ética local sob o número de protocolo CEUA/FUNED: 06/2019.

3.2 Reagentes

A expressão do domínio A1 recombinante do vWF humano (rvWF-A1) e sua purificação foi realizada conforme relatado por SANCHEZ e colaboradores (2016). A convulxina (CVX) foi purificada do veneno da cascavel sul-americana *Crotalus durissus terrificus* conforme descrito em (POLGÁR *et al.*, 1997). Os anticorpos policlonais: anti-rvWF-A1 (SANCHEZ *et al.*, 2021) e anti-mut-II (MACHADO DE AVILA *et al.*, 2011) foram produzidos no laboratório. A **Tabela 1** abaixo descreve os principais reagentes utilizados neste trabalho. E todos os outros produtos químicos usados possuem grau analítico.

Quadro 1 – Reagentes/produtos utilizados no trabalho

Reagente	Código	Empresa	Ensaio
Resina Sephacryl S-200	17-0584-01	Pharmacia Biotech (Philadelphia, EUA)	Purificação de proteínas
Resina Sephadex G-50	GE17-0042-01	Sigma Chemical (St. Louis, MO, EUA).	
Amicon Ultra 0,5	UFC5003961	Sigma Chemical (St. Louis, MO, EUA).	
Coluna Vydac C4	214TP54	Merck (Darmstadt, Alemanha)	

Alfa 2-macroglobulina	SRP6314	Sigma Chemical (St. Louis, MO, EUA).	Ensaio de inibição
Marimastat	M2699		
Batimastat	SML0041		
ADP	A2754	Sigma Chemical (St. Louis, MO, EUA).	Agregação plaquetária
Trombina	112374		
Prostaglandina E1	P5515	Helena Laboratories (Beaumont, TX, EUA).	
Colágeno tipo I	5368		
Ristocetina	001226		
Fator de von Willebrand	681300	Merck (Darmstadt, Alemanha)	Agregação plaquetária e hidrólise
Fibronectina	F2006	Sigma Chemical (St. Louis, MO, EUA).	Ensaio de hidrólise
Vitronectina	5051		
Fibrinogênio Humano livre de plasminogênio	F4129		
Matrigel	356234	Corning (Bedford, MA USA)	
Anticorpo anti-laminina	NB300-144	Novus Biologicals (Centennial CO, EUA)	Ensaio de hidrólise e Western blot
Anticorpo anti-colageno IV	70R31139	Fitzgerald (North Acton, MA)	
Anticorpo anti-Nidogênio	AF2570	R&D Systems (Minneapolis, EUA)	
Anticorpo policlonal anti-GPVI	AF3627		
Anti-CD42b/GPIIb humano	AF4067		
Proteína G conjugada à peroxidase	P21041	Thermo Scientific (Waltham, MA USA)	
Substrato de peroxidase quimioluminescente ECL	32106		
N-glicosidase F (PNGase)	F-P0704S	New England Biolabs (Massachusetts, MA, EUA)	Ensaio de Deglicosilação
Tubos para coleta de sangue a vacuo ACD BD	364606	Becton Dickinson (Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA)	Ensaio com plaquetas
N-etilmaleimida	E1271	Sigma Chemical (St. Louis, MO, EUA).	
GI-254023X	SML0789	Sigma Chemical (St. Louis, MO, EUA).	

Fonte: Próprio autor, 2023.

3.3 Processo de purificação de rhomb-I

A proteinase foi isolada do veneno de *L. m. rhombeata* por duas etapas de cromatografia de filtração em gel. Na primeira etapa, o veneno liofilizado (2400 mg) foi dissolvido em 8 mL de tampão acetato de amônio 0,05 M (pH 7,3) contendo NaCl 0,3 M e centrifugado a 6000 xg para remover o material insolúvel. A solução contendo 2160 mg de proteína foi aplicada ao sistema de duas colunas de 2,5 x 100 cm ligadas em série e empacotadas com Sephacryl S-200, as quais foram equilibradas e eluídas com o mesmo tampão. Todo o processo foi realizado sob refrigeração a 4 °C com um fluxo de 7 mL/h e as frações foram recolhidas e testadas quanto a atividade enzimática. As frações ativas de aproximadamente 23 kDa contendo atividade proteolítica sobre a caseína N,N-dimetilada (DMC) foram reunidas, dialisadas contra água destilada contendo 1 mM de CaCl₂ e liofilizadas. Na segunda etapa, o total de 471 mg de fração ativa obtida da primeira etapa, foi aplicado a uma coluna Sephadex G-50 fine (1,5 x 100 cm) equilibrada e eluída com tampão Hepes 20 mM, pH 7,5 contendo 10 mM de CaCl₂, em um fluxo de 6 mL/h a 4 °C. Ao longo de todo o processo de purificação, as proteínas foram monitoradas por meio da leitura da absorbância a 280 nm das frações e pela atividade proteolítica sobre a DMC. Também foram realizadas análises eletroforética em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) nas frações selecionadas de acordo com (LAEMMLI, 1970).

Alíquota da segunda etapa foi diluída em 1 mL de ácido trifluoroacético (0,1% TFA, V/V) e submetida a uma cromatografia em fase reversa, usando uma coluna C4 Vydac, (250 x 4,6 mm) acoplada a um cromatógrafo ÄKTA pure 25 (GE Healthcare). Inicialmente, a eluição da amostra foi feita com TFA 0,1% seguido de um gradiente linear de 0-70% de acetonitrila (ACN) em TFA 0,1% a uma vazão de 1 mL/min.

3.4 Atividade hemorrágica

Para analisar a atividade hemorrágica da metaloproteinase foram utilizados grupos de três camundongos *Swiss Webster* adultos (20-22g) para cada dose (10, 25 e 50 µg/animal) e salina. As alíquotas foram injetadas por via intradérmica na pele dorsal. Com fins comparativo, foram utilizados 50 µg de SVMP hemorrágica da classe P-I atroxlisina-I e duas SVMPs não hemorrágicas da classe P-I, mutalisina-II e

leucurolisina-a. O efeito inibitório do EDTA na atividade enzimática foi testado pré-incubando a enzima (50 µg) com EDTA (10 mM) seguido de purificação por Amicon ultra 0,5 (UFC500396, Sigma Aldrich) antes da injeção no dorso dos camundongos. Após quatro horas, os camundongos foram eutanasiados e a pele foi removida e analisada.

3.5 Efeito de cátions e inibidores enzimático na atividade proteolítica

A atividade proteolítica desta enzima foi testada usando DMC como substrato. A amostra (1 µg) foi incubada com 10 mM de CaCl₂, MgCl₂, BaCl₂, ZnCl₂ e CoCl₂ em tampão Hepes 20 mM, pH 7,4 por 30 min a 37 °C e então a atividade enzimática foi verificada. Além disso, seu desempenho enzimático foi testado na presença de vários inibidores de proteinase: batimastat (Bat), marimastat (Mar) (0,5 µM cada), inibidor de MMP-III (i-MMP-III, na proporção de 1:50), Iodoacetamida (IAA, 1 mM), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, 5 mM) e fluoreto de fenilmetanossulfonil (PMSF, 5 mM).

A estequiometria da inibição da enzima pela α2-macroglobulina (α2-M) foi determinada ao incubar a proteinase com o inibidor em diferentes proporções molares (enzima: α2-M - 1:0,25 - 1:0,5 - 1:1 - 1:2) em 250 µL de tampão Hepes 20 mM, pH 7,4 a 37 °C por 5 min. Então, a atividade residual foi testada com DMC. Em seguida, alíquotas de cada incubação foram misturadas com tampão de amostra contendo dodecilsulfato de sódio (SDS) e 2β-mercaptoetanol (2β-ME), fervidas por 5 min e analisadas em SDS-PAGE (10%).

3.6 Caracterização estrutural

3.6.1 Determinação da massa molecular

A massa molecular relativa (Mr) da metaloproteinase foi estimada por SDS-PAGE e confirmada por espectrometria de massa por tempo de voo empregando ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF/TOF) no equipamento Bruker Autoflex III SmartBeam do laboratório de Serviço de Proteômica e Aracnídeos da Diretoria de Pesquisa da Fundação Ezequiel Dias. Foi aplicado 0,5 µl da fração obtida

da cromatografia em fase reversa em uma placa do tipo “MTP AnchorChip 600/384”, cocrystalizado com 0,5 µl de solução de matriz (10 mg/mL de ácido sinapínico em 50% ACN, 0,1% TFA) e deixado para secar em temperatura ambiente. Os espectros foram adquiridos usando o modo linear positivo por meio do software FlexControl versão 3.3 e analisados com o software FlexAnalysis versão 3.3 ambos do pacote COMPASS 1.3. A potência do laser Nd-YAG (355 nm) foi ajustada manualmente para melhor visualização do sinal. Previamente, o equipamento foi calibrado com uma mistura de proteínas padrão (Bruker – 8207234).

3.6.2 Identificação de autoproteólise

Para examinar se a proteína isolada é passível de sofrer autoproteólise, uma fração de 5 µg foi incubada em meio aquoso a 37 °C por 24 horas e outra fração igual permaneceu congelada. Após 24 horas, as amostras foram misturadas a tampão de amostra contendo SDS e 2β-ME, fervidas por 5 min e analisadas em SDS-PAGE (18%).

Para certificar a presença do domínio metaloproteinase, uma alíquota de 5 µg de proteína na forma reduzida e sem redução foi aplicada a um SDS-PAGE (12,5%) e 5 µg de mutalysin-II foi aplicada como controle. As amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, que foi incubada por uma hora com anticorpo anti-mutalysin-II (anti-mut-II) 1:1000, seguido de incubação com anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado à peroxidase na diluição de 1:2000. Após isso, o western blot foi revelado com solução quimioluminescente ECL no sistema de imagem ChemiDoc (BioRad).

Recortes de bandas de SDS-PAGE foram enviados para análise por LC-MS/MS no Laboratório de Toxinologia Aplicada (*Center of Toxins, Immune-Response and Cell Signaling* - CeTICS) do Instituto Butantan. As amostras foram digeridas com tripsina e analisadas empregando o ESI (nano-spray) como fonte de ionização, no modo de fragmentação CID. Os espectros foram obtidos com o FT-ICR/Orbitrap, no modo linear Ion Trap. As análises de identificação foram realizadas com o software PEAKS X+ (10.5), com tolerância de massa de precursores de 20 ppm e tolerância de massa de MS/MS de 0,2 Da. A tripsina foi selecionada com um máximo de duas clivagens perdidas. A carbamidometilação da cisteína foi definida como modificação

estática, e a oxidação da metionina como modificação dinâmica. Com o máximo de 3 PTM variável por peptídeo, e o FDR < 1%. Os fragmentos foram identificados por meio do banco de dados construído por ANDRADE-SILVA e colaboradores (2021).

3.6.3 Ensaio para detectar a presença de carboidratos N-ligados

Para verificar a existência de carboidratos N-ligados à estrutura desta proteína, foi realizado um ensaio de deglicosilação utilizando o kit PNGase F (F-P0704S). A 10 µg de proteína (9 µL) foi adicionado 1 µL de tampão desnaturante (0,5% SDS, 1% 2β-ME). A solução foi fervida por 10 min. Após adição de 2 µL de tampão de reação (50 mM Tris HCl, pH 8,0), 2 µL de solução detergente (NP 40%) e 1 µL de PNGase F recombinante, as amostras foram incubadas por 2 h a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de tampão de amostra em condição de redução. Por fim, as amostras de proteína nativa ou deglicosilada foram analisadas por SDS-PAGE.

3.6.4 Determinação da sequência de aminoácidos

Para obtenção de informações sobre a sequência de aminoácidos, a proteína purificada foi enviada para sequenciamento por cromatografia líquida (LC)-MS/MS, em um sistema HPLC Nano LCII EASY (Thermo Scientific) acoplado a um espectrômetro de massa LTQ-Orbitrap Velos, no Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP/USP). A amostra foi submetida a redução, alquilação e digestão enzimática com tripsina, seguida de dessalinização e liofilização. Os peptídeos tripticos foram ressuspensos em 0,1% de ácido fórmico e aplicados em coluna de fase reversa C18 PicoFrit (C18 PepMap, 75 µm ID × 10 cm, tamanho de partícula de 3,5 µm, tamanho de poro de 100 Å; New Objective, Ringoes, NJ, EUA). As fases móveis utilizadas consistiram nas soluções A: 0,1% de ácido fórmico e B: 95% acetonitrila, 0,1% de ácido fórmico e a corrida ocorreu em fluxo de 300 nL/min, seguindo o gradiente de separação de 2% - 30% B - 80 min; 30% - 95% B - 5 min; 95% B durante 20 min. O espectrômetro foi operado no modo de íon positivo com aquisição dependente de dados. A varredura completa no Orbitrap foi realizada com controle automático de ganho (AGC) de 1×10^6 íons e um tempo máximo de preenchimento de 500 ms. Os espectros dos íons precursores foram adquiridos com

uma resolução de 60.000 FWHM na faixa de massa de 400 - 1500 m/z. Os 20 peptídeos mais abundantes foram selecionados para MS/MS e excluídos dinamicamente por um período de 30s. Os íons peptídicos foram fragmentados por CID MS/MS usando uma energia de colisão normalizada de 35%. Todos os dados brutos foram acessados pelo software Xcalibur (Thermo Scientific). As análises de identificação foram realizadas pelo software Thermo Proteome Discoverer 1.4.0.288 (Thermo Scientific) utilizando um banco de dados squamata do UniProt. As buscas foram realizadas com tolerância de massa de precursores de 20 ppm e tolerância de massa de MS/MS de 0,5 Da. A tripsina foi selecionada como a enzima com um máximo de duas clivagens perdidas. A carbamidometilação da cisteína foi definida como modificação estática, e a oxidação da metionina e a acetilação N-terminal da proteína foram selecionadas como modificações dinâmicas. O software PatternLab (CARVALHO *et al.*, 2016) também foi utilizado para montagem dos fragmentos, identificação da sequência de aminoácidos e anotação dos resultados.

3.6.5 Análise de similaridade com outras sequências de SVMPs.

Para análise de similaridade foram feitos alinhamentos com outras sequências de aminoácidos de SVMPs homologas usando o programa de alinhamento múltiplo de sequências CLUSTALW. A sequência da proteína foi alinhada com LHF-II (P22796) e Lmr-MP (CORDEIRO *et al.*, 2018) que são SVMPs P-I isoladas da mesma espécie. Também foi realizado um alinhamento com outras SVMPs isoladas de serpentes viperidae, obtidas do banco de dados do GenBank: LHF-II (P22796) atrolisina (P15167), neuwiedase (Q9I9R4), BaP1 (P83512), HR2A (1508216A), acutolisina (AAD51824) e atroxlisina-I (P85420).

3.6.6 Predição de estrutura tridimensional

A modelagem por homologia comparativa (ŠALI; BLUNDELL, 1993) foi usada para fazer a predição da estrutura tridimensional de rhomb-I. Moldes homólogos foram obtidos através de buscas com a ferramenta BLASTp. As referências utilizadas para a modelagem molecular foram: 3GBO (*Bothrops moojeni*), 1DTH (*Crotalus atrox*), 4AIG (*Crotalus adamanteus*), 4Q1L (*Bothrops leucurus*) e 1ND1 (*Bothrops asper*). O

modelo de estrutura para rhomb-I foi gerado com o programa Modeller v 9.16 (FISER; ŠALI, 2003) com a extensão .pdb. O melhor modelo foi selecionado com base nas pontuações de “*the least discrete optimized protein energy (DOPE) and modeler objective function (MOF) scores*”. O desvio quadrático médio (*Root Mean Square Deviation - RMSD*) foi calculado usando o programa VMD v 1.9.2 (HUMPHREY *et al.*, 1996). A análise de validação foi realizada usando SAVES Sever (<https://services.mbi.ucla.edu/SAVES/>) que inclui “PROCHECK, WHATCHECK, PROVE, ERRAT, VERIFy_3D”. Por fim, o software Pymol (DELANO, 2002) foi utilizado para visualizar a estrutura gerada.

3.7 Atividade enzimática sobre proteínas do plasma e da matriz extracelular

3.7.1 Hidrólise de proteínas isoladas do plasma

Para análise da ação desta metaloproteinase sobre o fibrinogênio humano, fibrina e fibronectina, a enzima foi incubada com o substrato em uma razão de 1:200 (Enzima: substrato) a 37 °C em solução de Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 8,0. Na análise da vitronectina a incubação com a enzima foi na proporção 1:150 (Enzima: substrato). Os intervalos de tempo foram de 5 a 60 min para o ensaio com fibrinogênio e fibrina, e de 30 min a 6 horas para o ensaio com fibronectina e vitronectina. Uma alíquota da proteína também foi pré-incubada com EDTA 10mM antes da incubação com fibrinogênio ou fibrina por 60 minutos. Alíquotas de 20 µL foram analisadas por SDS-PAGE (12%) sob condições redutoras e os produtos de degradação foram visualizados com coloração por *Coomassie Brilliant Blue*.

3.7.2 Degradação da Matrigel

Uma amostra de 5 µL (50 µg) de Matrigel Matrix (uma mistura de componentes da membrana basal secretados por células de sarcoma de camundongo *Engelbreth-Holm-Swarm*), foi incubada com 1 µg da metaloproteinase em 15 µL de solução contendo 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl e 2 mM CaCl₂, pH 8,0 a 37°C na ausência ou presença de 10 mM de EDTA. As alíquotas foram analisadas após 60 min por SDS-PAGE em um gel gradiente (7-15%) sob condições redutoras. Além disso, os

compostos de Matrigel e seus fragmentos de clivagem foram eletrotransferidos para uma membrana de nitrocelulose, analisados por *immunoblotting* e detectados com anticorpos policlonais específicos contra laminina (1:5000), colágeno-IV (1:4000) e nidogênio (1:1000) e conjugado de proteína G peroxidase (1:5000).

3.8 Ensaio de agregação plaquetária

Sangue venoso de voluntários saudáveis, que não usaram nenhuma medicação que afete a função de plaquetas no período de duas semanas anteriores, foi coletado em tubos de coleta de sangue a vácuo com anticoagulante ACD (117 mM de citrato, 78 mM de ácido cítrico e 282 mM de dextrose 6:1, v/v - BD, Franklin Lakes, New Jersey, EUA). A aprovação ética foi obtida do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da FUNED (número do protocolo: 35329520.4.0000.9507).

O sangue foi centrifugado a 800 rpm por 15 min para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). As plaquetas lavadas (WPs) foram obtidas a partir do PRP por três etapas de lavagem com tampão de Tyrode livre de cálcio pH 6,2 [NaCl (137 mM), KCl (2,7 mM), NaH₂PO₄ (3 mM), Hepes (10 mM), dextrose (5,6 mM) e NaHCO₃ (10 mM)] na presença de prostaglandina E1 (PGE1 - 1,6 µg/mL). Por fim, o *pellet* foi ressuscitado em tampão de Tyrode pH 7,4 na ausência de PGE1. O número de plaquetas foi ajustado para $2,5 \times 10^5$ plaquetas/µL e foi adicionado 2 mM de CaCl₂ e 1 mM de MgCl₂ à suspensão de plaquetas.

A agregação foi monitorada por transmissão de luz em um agregômetro plaquetário de oito canais (AggRAM aggregometer - Helena Laboratories, Beaumont, TX, EUA) a 37°C com agitação de 600 rpm. Após pré-incubação de 3 min. com a proteína em estudo em diferentes concentrações (0,3 a 2,4 µM para o PRP; ou 0,07 a 1,2 µM para plaquetas lavadas), as plaquetas ou o PRP foram estimulados pela adição de um dos agonistas: colágeno tipo I (10 µg/mL), ADP (10 µM), convulxina (50 µg), trombina (1 U/mL), ristocetina (0,5 mg/mL) ou vWF (5,5 µg/mL) na presença de ristocetina (0,5 mg/mL). Os traços relacionados à porcentagem de agregação foram registrados no software agregômetro AggRAM e a porcentagem máxima de agregação analisada estatisticamente.

3.9 Hidrolise do fator de von Willebrand

A SVMP P-I (1 µg) foi incubada com 4 µg de vWF comercial em meio aquoso por 60 min a 37 °C, a reação foi interrompida com tampão de amostra e então o produto da reação foi analisado em SDS-PAGE gradiente (5-15%). Além disso, a proteinase (5 µg) também foi incubada com rvWF-A1 (10 µg) durante 60 min a 37 °C em solução salina tamponada com fosfato, pH 7,4. A reação foi interrompida com tampão de amostra na proporção 1:1 v/v (em condições redutoras) e analisada por SDS-PAGE (12%). O rvWF-A1 (10 µg) e rhomb-I (5 µg) foram usados como controles. Os fragmentos do substrato foram detectados por *immunoblotting* com anticorpo policlonal contra o domínio rvWF-A1 de camundongo (1:400), produzido no laboratório, e conjugado de proteína G peroxidase (1:5000).

3.10 Efeito sobre os receptores plaquetários GPIb e GPVI

Para verificar se a metaloproteinase atua sobre os receptores de membrana GPIb α e GPVI, as plaquetas foram lavadas como descrito acima e o número de plaquetas foi ajustado para $5,0 \times 10^5$ plaquetas/ μ L. A suspensão de plaquetas lavadas (150 μ L) foi tratada com rhomb-I (2 µg); N-etilmaleimida (NEM, 0,1 mM); rhomb-I (2 µg) com adição do inibidor de ADAM10, GI254023X1 (GI, 100 nM); rhomb-I (2 µg) pré-incubada com Co^{2+} (10 mM); GI (100 nM); ou NEM (0,1 mM) com adição de GI (100 nM) e incubadas por 30 min a 37 °C. Depois de interrompida a reação por incubação no gelo, a suspensão foi centrifugada por 2,5 min a 15.000 xg a 4 °C para separação do *pellet* e do sobrenadante. As reações foram misturadas a tampão de amostra com redução e fervidas por 5 min. Alíquotas das reações foram aplicadas em SDS-PAGE (gradiente de 7,5 a 15%), transferidas por 16 horas para membrana de nitrocelulose, que foram incubadas com anticorpos policlonais anti-GPIb (1:1000) ou anti-GPVI (1:2000), seguida por incubação com proteína G acoplada à peroxidase (1:5000). Os blots foram analisados usando o sistema de imagem por quimioluminescência no equipamento ChemiDoc (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) na presença de substrato de quimioluminescência ECL (Thermo Scientific, Waltham, MA EUA).

3.10.1 Ligação aos receptores plaquetários GPIb e GPVI

Para investigar se a enzima se liga aos receptores GPIb e GPVI, 5 µg da amostra e 15 µL de WPs ($5,0 \times 10^5$ plaquetas/µL) (controle positivo) foram adicionados de tampão de amostra (1:1, v/v) e fervidos por 5 min. As amostras foram submetidas a eletroforese SDS-PAGE gradiente (7,5-15%) e transferida para membrana de nitrocelulose por duas horas a 80 V em banho de gelo. Após o bloqueio com BSA 0,5% em PBS-tween, a membrana de nitrocelulose foi incubada com uma suspensão de plaquetas lisadas por uma hora, seguido de incubação de 16 horas com anticorpo anti-GPIb ou anti-GPVI, e uma hora de incubação com proteína G acoplada à peroxidase. Em seguida, os blots foram analisados usando o sistema de imagem por quimioluminescência no equipamento ChemiDoc e o reagente ECL.

Para o preparo da suspensão de plaquetas lisadas, 3 mL de plaquetas lavadas ($5,0 \times 10^5$ plaquetas/µL) foram centrifugados a 15.000 xg por 2,5 min, e o *pellet* foi ressuspensionado em 3 mL de uma solução de lise contendo: HEPES (10 mM), SDS (1%), EDTA (20 mM), PMSF (10 mM) e NEM (0,1 mM), pH 7,5. Após incubação por 30 min no gelo, foi adicionado 3 mL de solução tampão fosfato com Tween 0,05%.

3.10.2 Clivagem de um peptídeo sintético de GPVI

Um fragmento correspondente a porção C-terminal da região extracelular (KSPAGPARQYYTKG – 14 aminoácidos lineares) do GPVI foi quimicamente sintetizado (GenScript, New Jersey, USA).

Para análise da clivagem do peptídeo sintético foram realizadas três etapas de cromatografia em fase reversa. Alíquota das amostras foram diluídas em 0,5 mL de ácido trifluoroacético (0,1% TFA, V/V) e submetida a cromatografia em fase reversa, usando uma coluna C4 Vydac, (250 x 4,6 mm). A eluição da amostra foi feita com TFA 0,1% seguido de um gradiente linear de 0% até 70% de acetonitrila (ACN) em TFA 0,1% a uma vazão de 1 mL/min. Na primeira cromatografia, foi aplicada apenas rhomb-I (20 µg em tampão Hepes 50 mM), enquanto na segunda cromatografia, foi aplicado o peptídeo sintético (200 µg em tampão Hepes 50 mM). Na terceira etapa de cromatografia, rhomb-I (2 µg) foi incubada com o peptídeo sintético (200 µg) em um volume final de 500 µL de tampão Hepes 50 mM e a mistura foi aplicada a coluna de

fase reversa. As frações foram analisadas por espectrometria de massas empregando o ESI (nano-spray) como fonte de ionização, no modo de fragmentação CID.

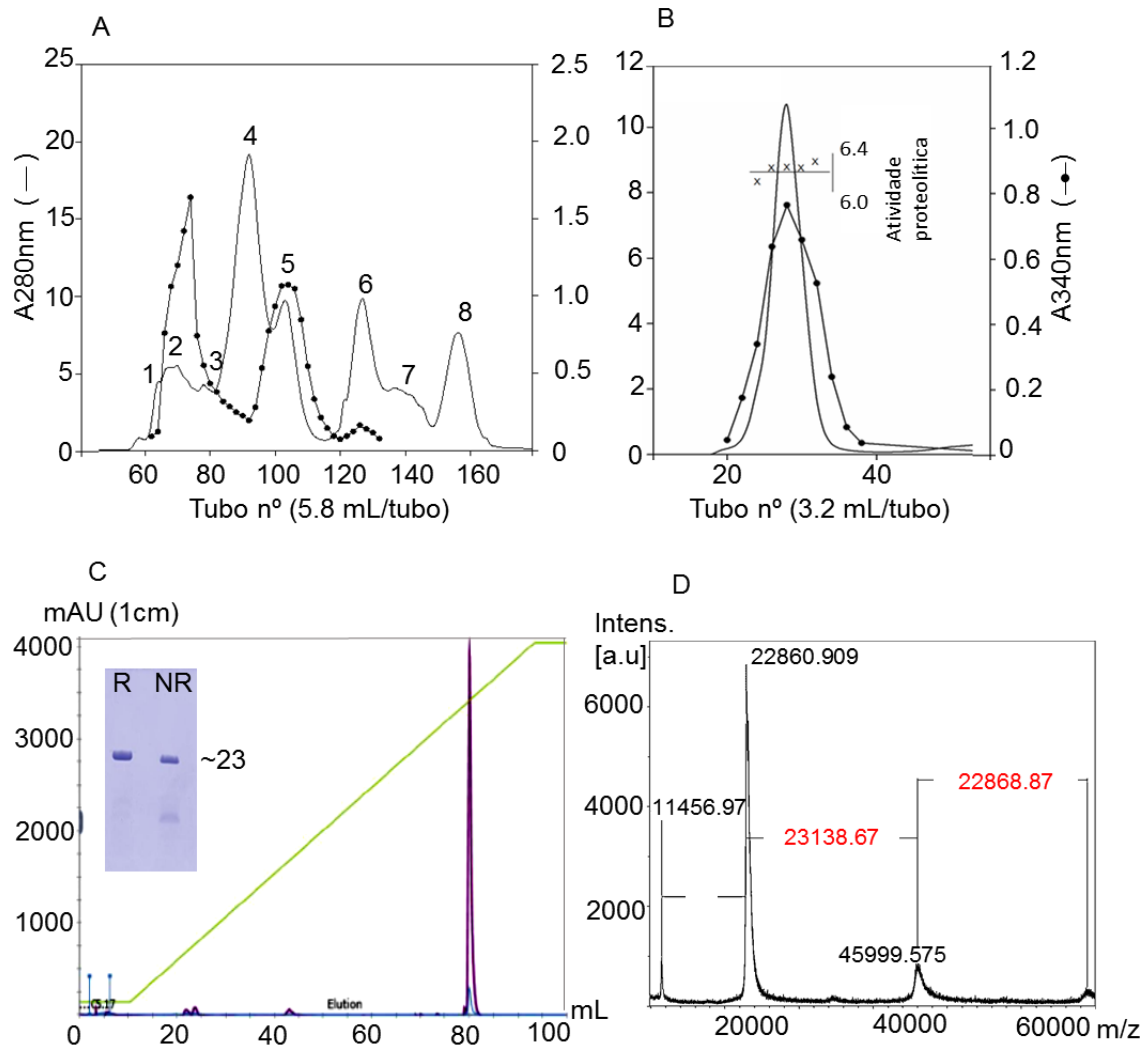
4 RESULTADOS

4.1 Purificação de rhomb-I do veneno de *L. m. rhombeata*

O fracionamento do veneno bruto de *Lachesis muta rhombeata* através da cromatografia de filtração molecular em Sephacryl S-200 gerou oito picos principais (**Figura 6 A**). Com as frações desta cromatografia foram feitos diversos ensaios de identificação: atividade proteolítica sobre a dimetilcaseína, atividade amidásica sobre o Bapna, atividade de L-amino-ácido oxidase, atividade de fosfolipase A2, atividade hemorrágica, bem como o efeito na indução ou inibição da agregação plaquetária, ação coagulante, efeito fibrinogénico e ensaio de ELISA com anticorpo anti-lectina tipo C. Com isso foi possível fazer um rastreio e conhecer o conteúdo proteico de cada fração e definir os próximos passos de purificação.

Dois picos (P2 e P5) apresentaram atividade proteolítica sobre a DMC e atividade hemorrágica na pele dorsal de camundongos. De maneira preliminar, o efeito na agregação plaquetária também foi detectada nestas duas frações. O pico 2 compreendia uma metaloproteinase com massa molecular de aproximadamente 55 kDa cuja caracterização se encontra em análise. O pico 5 que continha a proteína de interesse foi dialisado contra CaCl₂ e aplicado em uma nova cromatografia de filtração molecular em Sephadex G50 Fine gerando um pico único com atividade proteolítica sobre a DMC (**Figura 6 B**). A homogeneidade da proteína foi demonstrada em cromatografia em fase reversa no HPLC em uma coluna C4 (**Figura 6 C**). A análise eletroforética apresentou uma banda com massa molecular de aproximadamente 23 kDa, que, pela análise por espectrometria de massas MALDI -TOF/TOF, foi confirmada a massa de 22.860,909 Da (**Figura 6 D**). O processo de purificação foi resumido na **Tabela 2**. A partir de 2.160 mg de veneno seco de *L. m. rhombeata* foi possível recuperar 23,50 mg de proteína, o que correspondeu a 1,08% das proteínas totais do veneno. Considerando a origem do veneno, a metaloproteinase da classe P-I foi nomeada rhomb-I.

Figura 6 – Etapas de Purificação de rhomb-I



Fonte: Próprio autor, 2023.

Legenda: Purificação de rhomb-I. (A) Filtração em gel em Sephacryl S-200, eluição com tampão de acetato de amônio 0,05 M (pH 7,3) contendo NaCl 0,3 M. (B) filtração em gel em Sephadex G-50 da fração ativa 5 da etapa anterior, eluição com tampão Hepes 20 mM (pH 7,5) contendo CaCl₂ 1 mM. Absorbância a 280 nm representada pela linha contínua; Atividade proteolítica sobre DMC medida por absorbância a 340 nm representada pela linha com círculos fechados. (C) Análise por RP-HPLC da proteinase purificada. O SDS-PAGE (12%) de rhomb-I purificada foi inserido, R - em condições reduzidas e NR - não reduzidas. (D) Espectrometria de massa de rhomb-I nativa analisada por MALDI-TOF/TOF.

Tabela 1 – Purificação de rhomb-I

Proteína			Atividade Hemorrágica				Atividade Proteolítica(DMC)				
Etapa	mg	%	MDH* (mg)	Atividade		Total (U)	%	PF	Atividade		
				Esp.** (U/mg. 10 ³)					Esp.** (U/mg)	Total (U)	%
Veneno	2160	100	0.005	0.0023	434.8	100	1	7.45	0.13	100	1
Sephacryl S-200	471.3	21.82	0.025	0.0144	69.4	20.13	4.9	21.4	0.047	36.1	2.9
Sephadex G-50	23.5	1.08	0.043	0.02	50	11.5	8.7	25.5	0.04	30.8	3.4

Fonte: Próprio autor, 2023.

Legenda: *Uma unidade de atividade hemorrágica é a dose mínima hemorrágica (MHD).

**A atividade específica é expressa como U/mg de proteína.

PF Fator de purificação

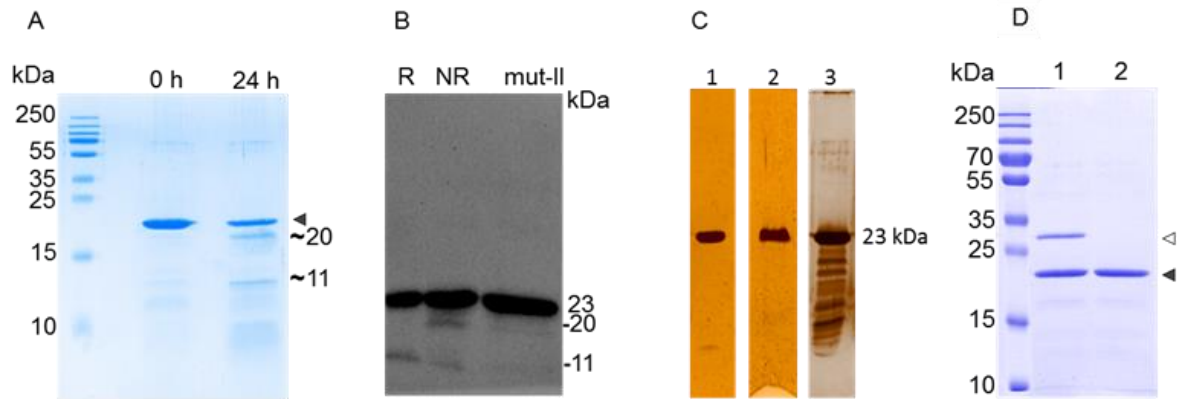
***Uma unidade é definida como $\Delta A_{340}/\text{min}$.

4.2 Análise de autoproteólise e glicosilação de rhomb-I

Esta proteína é passível de sofrer autoproteólise sendo observado três bandas de massa moleculares menores do que 23 kDa no SDS-PAGE do ensaio de autólise (**Figura 7 A**). As bandas menores (11 e 20 kDa) também foram reconhecidas por anticorpo anti-mut-II pela análise por *western blot* (**Figura 7 B**). Para maior esclarecimento, as bandas que apareceram no SDS-PAGE foram excisadas, digeridas com tripsina e analisadas por espectrometria de massas LC-MS/MS - ESI, o resultado apresentado na **Tabela 03**, mostrou que os fragmentos identificados nas bandas deram similaridade a LHF-II, SVMP homologa (P22796 de *L. m. muta*). Com a necessidade de purificação de uma maior quantidade de proteína, um novo processo cromatográfico foi realizado. Logo após o último processo de purificação, uma alíquota de 1 μg da fração correspondente a rhomb-I foi submetida a eletroforese em SDS-PAGE o qual foi corado por coloração de prata. Em seguida, esta fração foi dialisada contra CaCl_2 e liofilizada. Após a liofilização, 1 μg de proteína foi novamente submetida a eletroforese em SDS-PAGE o qual foi também corado com coloração de prata. O resultado observado na **Figura 7 C** corroborou os resultados de autoproteólise desta enzima. Além disso, não foi observado alteração da mobilidade da banda correspondente a rhomb-I (23 kDa) quando a proteína foi incubada com

PNGase F, indicando que esta proteína não possui carboidratos em sua estrutura (Figura 7 D).

Figura 7 – Análise por SDS-PAGE e Western blot de rhomb-I



Fonte: Próprio autor, 2023.

Legenda: (A) SDS-PAGE corado por *coomassie blue*, rhomb-I (5 µg) foi incubado a 37 °C em solução aquosa por 0 e 24h. A reação foi interrompida pela adição de tampão de amostra sob condições redutoras. Uma alíquota foi submetida a 18% SDS-PAGE. A presença de dois fragmentos principais de autodigestão de ~20 e de ~11kDa pode ser observada abaixo da banda que corresponde a rhomb-I (23 kDa) indicado pela seta preta. (B) análise por *western blot* de outra alíquota depois de transferida para membrana de nitrocelulose usando IgG anti-mut-II (anticorpo primário) e anti- IgG de coelho conjugado com peroxidase. Observe que o anticorpo anti-mut-II reagiu com rhomb-I sob condições redutoras (R) e não redutoras (NR) e com mut-II (23 kDa), bem como com os produtos de digestão de rhomb-I de ~20 e ~11 kDa. (C) SDS-PAGE corado pela prata: **1** – fração da última etapa de purificação de rhomb-I; **2** - fração coletada após cromatografia em fase reversa C4 Vydac; **3** – alíquota de rhomb-I após dialise e liofilização. (D) Análise por SDS-PAGE corado por *coomassie blue* do ensaio de deglicosilação, linha 1 - tratamento de rhomb-I (10 µg) com 2 unidades de PNGase F. linha 2, controle com rhomb-I não incubada com PNGase F. Rhomb-I não foi afetada pela PNGase F, a seta preta corresponde a rhomb-I e a seta aberta corresponde a PNGase F.

Tabela 2 – Peptídeos identificados nas bandas excisadas do SDS-PAGE

Accession	Peptide	Unique	Mass	Length	m/z	z	(kDa)
P22796	K.NSVGIVQDHSPK.T	Y	12.796.521	12	6.408.420	2	11
	K.YNGNLNTIR.T	Y	10.635.410	9	5.327.853	2	11
P22796	K.NSVGIVQDHSPK.T	Y	12.796.521	12	6.408.431	2	20
	K.YNGNLNTIR.T	Y	10.635.410	9	5.327.854	2	20
	R.KPQC(+57.02)ILNKP	Y	10.966.063	9	3.665.481	3	20

Fonte: Próprio autor, 2023.

Legenda: Análise por LC-MS/MS das bandas excisadas do gel SDS-PAGE. As amostras foram digeridas com tripsina e analisadas empregando o ESI (nano-spray) como fonte de ionização, no modo de fragmentação CID. Os espectros foram obtidos com o FT-ICR/Orbitrap, no modo linear Ion Trap. Os fragmentos identificados foram correspondentes a P22796, uma metaloproteinase P-I de *L. m. muta*.

4.3 Atividade Hemorrágica

A dose mínima hemorrágica (MHD) é a dose capaz de causar um halo de hemorragia de 10 mm de diâmetro na pele do dorso de camundongos. Esta MHD foi de 43 µg/por animal. Quando a enzima foi pré-incubada com 10 mM de EDTA, sua atividade hemorrágica foi anulada (**Figura 8 A**). Para fins comparativos outras SVMPs P-I, atroxlysin-I (hemorrágica), mutalysin-II e leucurolysin-a (não hemorrágicas) foram testadas juntamente com rhomb-I (**Figura 8 B**).

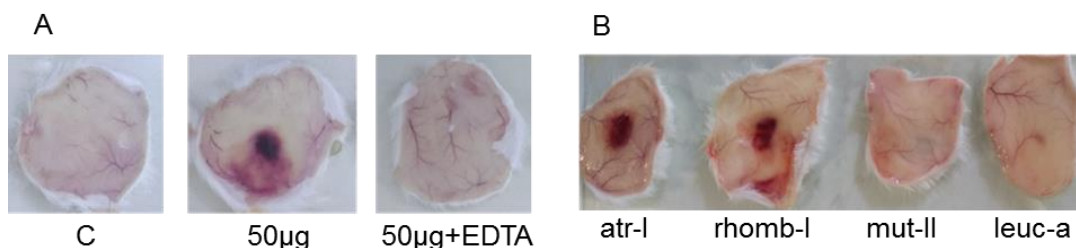
Tabela 3 – Medida dos halos hemorrágicos na pele do dorso de camundongos

Camundongos	Diâmetro/dose/camundongo		
	50 µg	25 µg	10 µg
1	11,52 mm	6,41 mm	0
2	11,61 mm	8,38 mm	0
3	11,53 mm	7,37 mm	0
Média	11,55 mm	7,38 mm	0

Fonte: Próprio autor, 2023.

Legenda: Medidas dos diâmetros hemorrágicos no lado interno da pele dorsal de camundongos. Três doses foram testadas. A dose mínima hemorrágica (MHD) foi determinada por interpolação dos dados na equação da reta.

Figura 8 – Hemorragia induzida por rhomb-I



Fonte: Próprio autor, 2023.

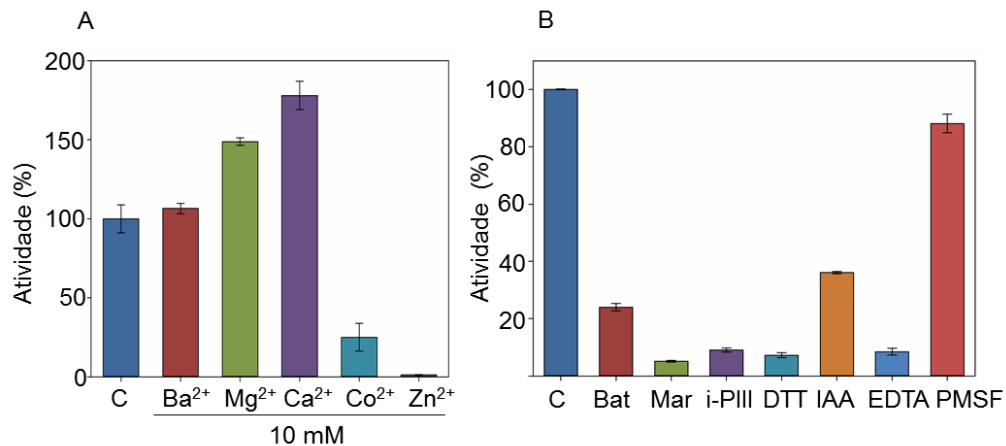
Legenda: Hemorragia induzida por rhomb-I e por outras SVMPs P-I. (A) **C**- Controle com salina, rhomb-I (50 µg) e rhomb-I (50 µg) tratada com EDTA. (B), Aplicação de 50 µg de cada proteinase: atr-I e rhomb-I são hemorrágicos; mut-II e leuc-a não são hemorrágicas. São mostradas as lâminas dorsais da pele de camundongos que foram removidas após 4 h.

4.4 Caracterização Bioquímica

A atividade enzimática de rhomb-I foi examinada na presença de alguns cátions, tendo em vista que enzimas necessitam de íons para estabilização de sua

estrutura e execução de sua função. Nas condições testadas, Ca^{2+} e Mg^{2+} aumentaram a atividade de rhomb-I sobre a DMC, enquanto que Zn^{2+} e Co^{2+} inibiram a atividade enzimática (**Figura 9 A**). Inibidores do sítio catalítico de proteinases também foram usados para caracterização de rhomb-I: batimastat, marimastat, i-MMP-III, IAA, EDTA e PMSF. A atividade proteolítica residual foi medida na absorbância de 340 nm. Com exceção de PMSF, que é um inibidor de serinoproteinases, todos os demais inibidores anularam ou reduziram a atividade de rhomb-I (**Figura 9 B**).

Figura 9 – Efeito de cátions divalentes e de inibidores de proteinase na proteólise de rhomb-I sobre DMC



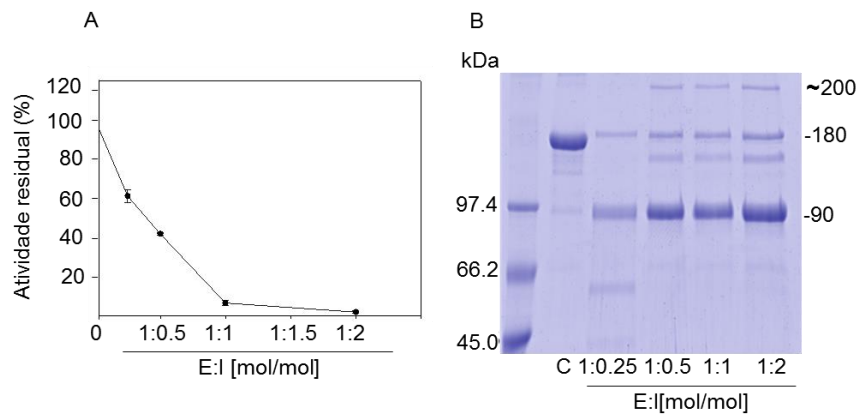
Fonte: Próprio autor, 2023.

Legenda: (A) rhomb-I (1 μg) foi incubada com 10 mM de cada cátion e a atividade sobre DMC foi medida. (B) rhomb-I foi incubada com cada um dos inibidores de proteinases: 0,5 μM de batimastat (Bat), marimastat (Mar) ou inibidor de MMP-III (i-PIII), 2 mM de DTT, 1 mM de iodoacetamida (IAA), 5 mM de EDTA ou PMSF. A atividade residual foi testada usando DMC como substrato: C, controle (apenas a enzima e DMC). Os resultados são a média \pm S.D. (n= 4).

A proteína $\alpha 2$ -macroglobulina ($\alpha 2$ -M) que é a principal inibidora de proteinases do plasma foi incubada com rhomb-I em proporções molares rhomb-I: $\alpha 2$ -M de 1:0,25 – 2. Na razão molar de 1:1 a atividade proteolítica sobre DMC de rhomb-I foi completamente inibida (**Figura 10 A**). Alíquotas do produto de incubação de rhomb-I com $\alpha 2$ -M foram analisadas em SDS-PAGE. No controle do experimento, a banda de massa molecular de 180 kDa corresponde a uma das quatro subunidades de $\alpha 2$ -M. O mecanismo de inibição envolve a formação de complexos insolúveis enzima- $\alpha 2$ -M. A banda de massa molecular em torno de 200 kDa pode indicar a formação destes

complexos. A banda de 90 kDa corresponde ao produto de degradação de α 2-M por rhomb-I (**Figura 10 B**).

Figura 10 – Interação molecular de rhomb-I e α 2-macroglobulina



Fonte: Próprio autor, 2023.

Legenda: A interação molecular de α 2-macroglobulina com a proteinase foi analisada por: (A) Estequiometria da inibição de rhomb-I por α 2-M. A rhomb-I (1 μ g) foi incubada com várias quantidades de α 2-M em proporções molares indicadas em abscissas [$E:\alpha$ 2-M = 0,25 a 2]. A atividade residual da proteinase na mistura foi testada em DMC, a ordenada indica a atividade restante de rhomb-I como uma porcentagem da atividade original. (B) Perfil SDS-PAGE reduzido (7,5%) de rhomb-I tratado com α 2-M. As proporções molares de α 2-M:rhomb-I foram de 0,25 a 2. De cima para baixo: A banda em ~200 kDa pode representar um complexo da subunidade α 2-M de 180-kDa com rhomb-I, o principal fragmento de clivagem de ~90-kDa. C, controle α 2-M.

4.5 Análise da estrutura de aminoácidos de rhomb-I

4.5.1 Determinação da sequência de aminoácidos

Para obtenção de informações sobre a sequência de aminoácidos de rhomb-I, uma amostra foi enviada para análise por espectrometria de massas na plataforma NanoLC Easy LTQ Orbitrap Velos-ETD no Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP)/USP. Os dados brutos da espectrometria de massas foram analisados usando o banco de dados Squamata do UniProt e o software Pattern lab for proteomics (CARVALHO *et al.*, 2016). Foram gerados 7013 espectros, dos quais 5.647 deram correspondência à sequência de LHF-II (P22796) de *Lachesis muta muta*. Houve espectros que também corresponderam a outras sequências de metaloproteinase de veneno de serpentes, mas a maior cobertura dos espectros foi sobre a sequência de P22796. Os principais fragmentos identificados estão descritos na **Tabela 4**. Os espectros que corresponderam a contaminantes como queratina foram removidos.

Tabela 4 – Principais peptídeos identificados através da análise por MS/MS

Sequência	PSM ^a	PEP ^b	Xcorr ^c	Charge	MH+ [Da]	ΔM [ppm] ^d	RT [min]
ERVLLNRISHDNAQLLTAIDLADNTIGIAYTGGMICYPK	4	0.0001672	5.81	5	4217.13850	-2.34	86.79
FSQKYIELVVVADHGMFTKYNGNLNLTIR	26	3.175E-05	7.29	4	3257.67788	0.05	66.99
HDENHCHCSASF CIMPPSISEGPSYEFSDCSKDYYQMFLTK	2	0.2316	2.56	6	4961.98986	-9.00	70.82
ISHDNAQLLTAIDLADNTIGIAYTGGMICYPKNSVGIVQDHSPK	6	0.0006666	5.95	4	4598.24526	-4.42	80.38
KPQCILNKP	58	0.02431	3.27	3	1097.61051	-2.84	20.18
NSVGIVQDHSPKTLIAVTMAHELGHNLGMK	332	0.0004213	6.87	3	3326.73337	-0.47	74.01
RKPQCILNKP	76	0.03715	2.84	3	1253.71094	-3.03	25.49
TFGEWRER	4	0.2759	2.06	2	1080.51836	-3.53	30.04
TLIAVTMAHELGHNLGMK	480	0.0009907	5.30	2	2065.08891	-2.17	65.62
TRVHEIVNTLNGFYR	139	0.000205	6.19	3	1818.96091	-0.05	56.99
VHEIVNTLNGFYR	480	0.0006303	4.82	2	1561.80681	-3.45	53.84
VLLNRISHDNAQLLTAIDLADNTIGIAYTGGMICYPK	23	1.387E-05	7.89	3	3932.00278	-0.47	86.35
YIELVVVADHGMFTK	819	0.0001757	6.18	2	1737.88713	-0.55	57.52
YNGNLNLTIR	112	0.04342	3.34	2	1064.54460	-3.53	27.72
YNGNLNLTIRTRVHEIVNTLNGFYR	8	0.003263	4.49	4	2864.49404	0.88	86.97

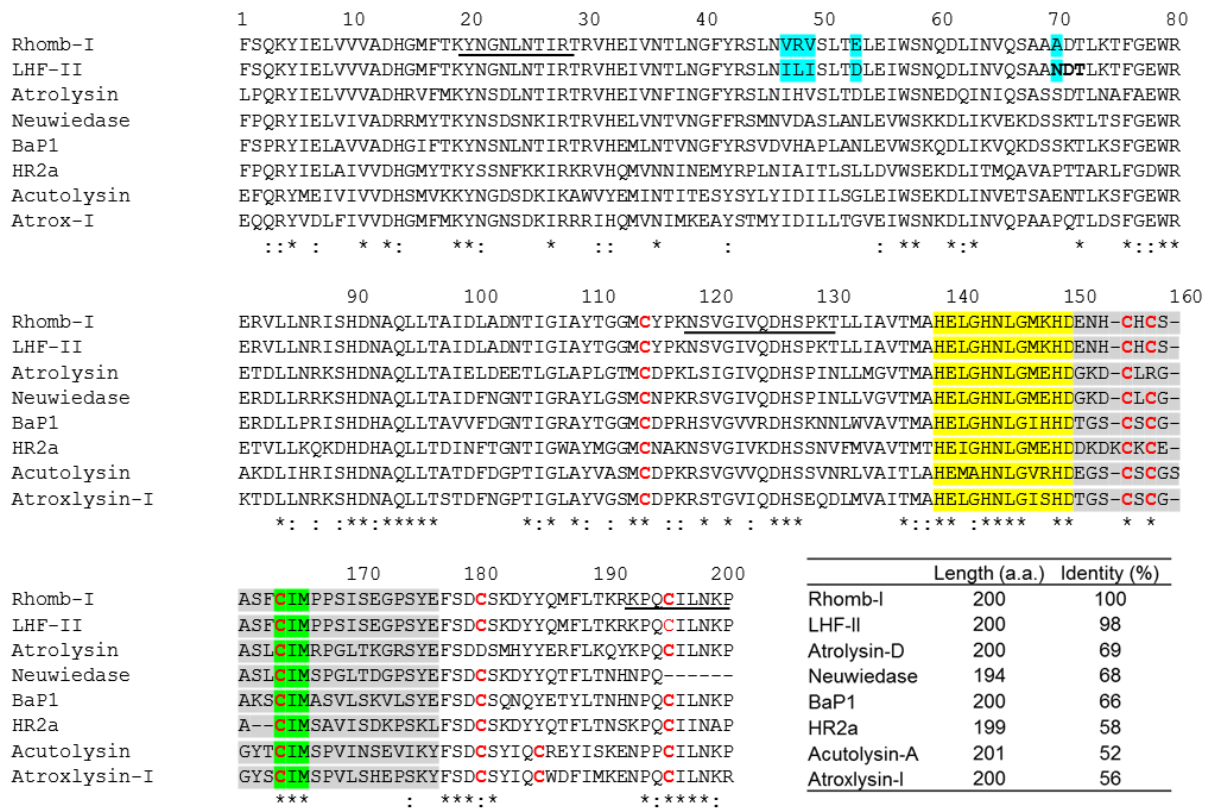
Fonte: Próprio autor, 2023

Legenda: Todos os dados brutos foram acessados pelo software Xcalibur (Thermo Scientific). As análises de identificação foram realizadas pelo software Thermo Proteome Discoverer 1.4.0.288 (Thermo Scientific) utilizando um banco de dados squamata do UniProt. ^a Número de espectros que deram correspondência com o peptídeo ^b Probabilidade de erro posterior. ^c Correlação cruzada. ^d Desvio da massa medida a partir da massa teórica do peptídeo.

Na determinação da sequência de rhomb-I foram utilizados apenas os espectros que combinavam com P22796, exceto para a sequência: SLNVRVSLTELEIWSNQDLINVQSAAADTLE, que não correspondeu a P22796 mas que tinha similaridade com Q9PVK9 (uma metaloproteínase do veneno de *Gloydus brevicaudus*) e era exatamente a única porção que não havia sido coberta em rhomb-I. Além disso, não houve nenhuma outra sequência em todos os 7013 espectros gerados que cobrissem essa região da molécula.

Os dados da sequência de rhomb-I estarão disponíveis no banco de dados UniProt Knowledge sob o número: C0HM67. O alinhamento entre rhomb-I e sequências homologas, LHF-II (P22796) e Lmr-MP (CORDEIRO *et al.*, 2018) que também é uma P-I de *Lachesis muta rhombeata* estão descritos na **Figura 11**. Rhomb-I e LHF-II compartilham uma similaridade de sequências de aminoácidos de 97,5%. A sequência de aminoácidos de Lmr-MP que foi parcialmente determinada, contém apenas um aminoácido diferente da sequência de rhomb-I na posição 185, uma glutamina em rhomb-I e em Lmr-MP um ácido glutâmico.

Figura 12 – Alinhamento com outras sequências de SVMPs P-I

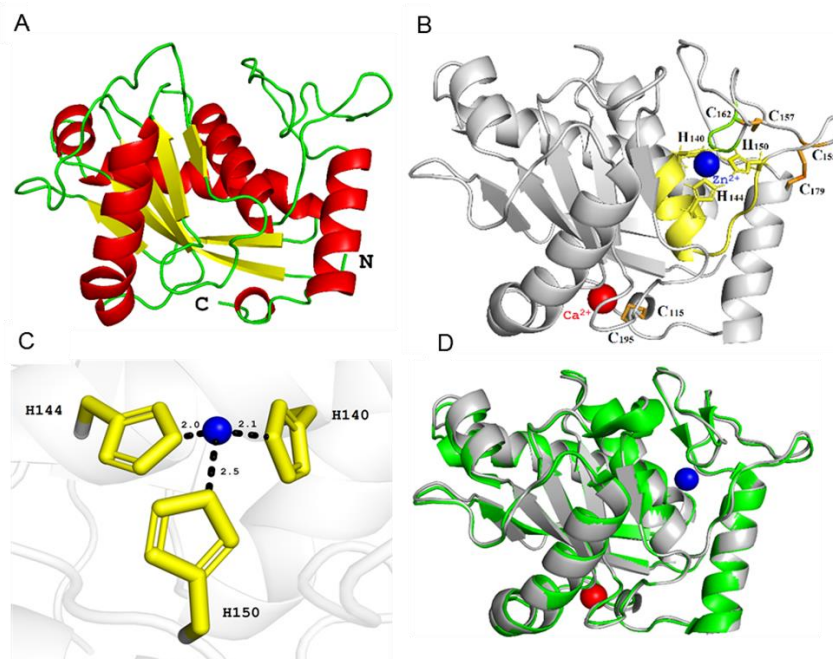


Fonte: Próprio autor, 2023.

Legenda: Alinhamento de sequências de proteínas maduras de rhomb-I com outras SVMPs P-I. O número de acesso GenBank das sequências utilizadas são: LHF-II de *Lachesis muta muta* (P22796), Atrolysin de *Crotalus atrox* (P15167), Neuwiedase de *Bothrops pauloensis* (Q919R4), BaP1 de *Bothrops asper* (P83512), HR2A de *Protobothrops flavoviridis* (P14530), Acutolisina-A de *Deinagkistrodon acutus* (Q9PW35) e Atroxlisina-I de *Bothrops atrox* (P85420). (*) resíduos idênticos; (:) resíduos fortemente semelhantes; (-) indicam lacunas inseridas. O motivo de ligação de zinco e a metionina 165 da região *Met-turn* são invariantes e destacados em amarelo e verde, respectivamente. Os resíduos de cisteína estão em negrito e destacados em vermelho. Os resíduos **NTD₇₀₋₇₂** destacados em negrito na sequência de LHF-II indica o sítio de N-glicosilação predito. A área de *loop* (Ω) que é importante para o reconhecimento do substrato está sombreado de cinza. Os resíduos destacados em ciano são os aminoácidos diferentes entre as sequências de rhomb-I e LHF-II. As sequências foram alinhadas usando o Programa CLUSTAL W.

A modelagem estrutural de rhomb-I foi predita pelo consenso de cinco moldes de estruturas cristalizadas de metaloproteinase P-I usando o Modeller v. 9.16. O molde considerado o melhor foi o 3GBO de *Bothrops moojeni* com 68% de identidade e 100% de cobertura de sequência. A modelagem comparativa é considerada bastante precisa quando se utiliza moldes com boa resolução, alta similaridade entre as sequências e boa cobertura. A pontuação de qualidade do alinhamento estrutural foi de 91,2% e 97,50% dada pelos softwares PROCHECK e VERIFY3D, respectivamente. O gráfico de Ramachandran gerado pelo PROCHECK mostrou que 91,2% dos aminoácidos estavam localizados em uma posição favorável com 8,8% na região permitida e 0% na região de baixa confiança. A modelagem estrutura mostrou a similaridade de rhomb-I com outras SVMPs P-I sendo formada por cinco folhas β e cinco α -hélices (**Figura 13 A**). A análise dos sítios de ligação de metais indicou que a estrutura apresenta sítios para ligação de Ca^{2+} e Zn^{2+} , sendo que o íon cálcio está localizado próximo a região C-terminal oposto ao sítio catalítico (**Figura 13 B**). Além disso, o sítio ativo é estabilizado por três ligações dissulfídicas (Cys₁₁₅–Cys₁₉₅, Cys₁₅₅–Cys₁₇₉ e Cys₁₅₇–Cys₁₆₂) e as histidinas do motivo de ligação ao zinco exibem a geometria de coordenação característica (**Figura 13 C**). A superposição de rhomb-I e 3GBO apresentou um RMSD de 0,3 Å (**Figura 13 D**) indicando uma alta similaridade entre as estruturas.

Figura 13 – Modelo de estrutura predita de rhomb-I



Fonte: Próprio autor, 2023.

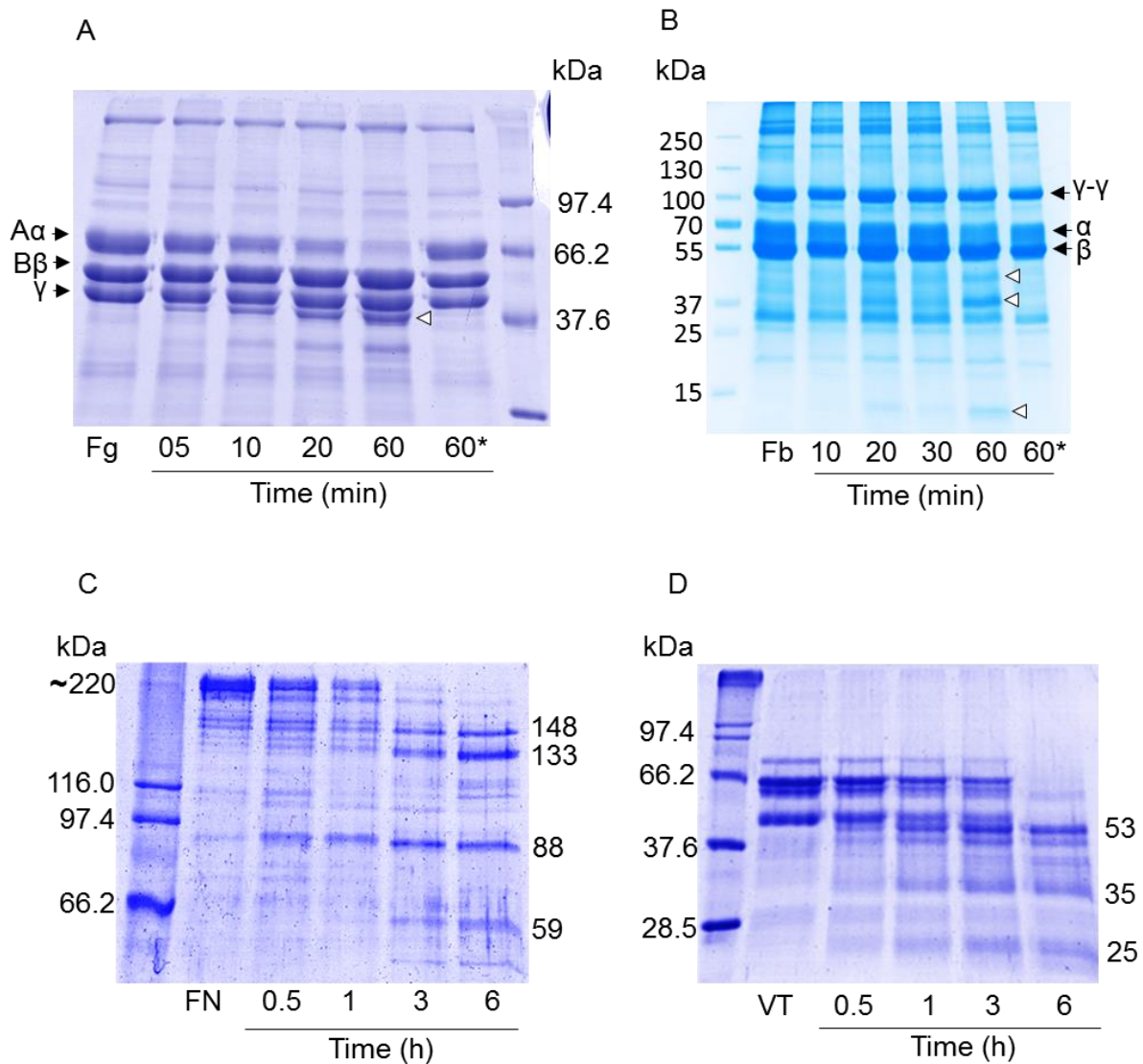
Legenda: Modelo 3D de rhomb-I. (A) Modelo teórico final de rhomb-I mostrando a alfa-hélice (vermelho), folha- β (amarelo); N e C: N-terminal e C-terminal, respectivamente. (B) motivo funcional; O motivo de ligação ao zinco conservado e a região *met-turn* são destacados em amarelo e verde brilhante, respectivamente. As ligações dissulfídicas estão destacadas em laranja, os cátions Zn^{2+} (esfera azul) e Ca^{2+} (esfera vermelha) são mostrados. (C) O motivo de ligação de zinco mostrando a geometria entre o sítio ativo da histidina e o íon de zinco é mostrado como em (B). As interações são mostradas em traços pretos. (D) Superposição de rhomb-I (cinza) com a estrutura de BmooMPa-I (PDB: 3GBO) uma metaloproteinase não hemorrágica.

4.6 Atividade proteolítica de rhomb-I sobre as proteínas do plasma e da MEC

A disfunção hemostática observada nas vítimas do envenenamento é devida principalmente à ação proteolítica das SVMPs sobre as proteínas plasmáticas e da matriz extracelular que estão ligadas à manutenção da hemostasia. Assim, a atividade de degradação de substratos macromoleculares como fibrinogênio, fibrina, fibronectina, vitronectina, bem como laminina, colágeno tipo IV, e nidogênio foi testada. Análises por SDS-PAGE demonstraram que rhomb-I é uma alfa fibrinogenase, visto que após 10 min de incubação observa-se a degradação da cadeia alfa do fibrinogênio e da fibrina, com a formação de produtos de degradação de ~37 kDa (**Figura 14 A e B**). A pré-incubação com EDTA levou a inibição da ação de rhomb-I. Além disso, a enzima também degrada fibronectina (~200 kDa) formando fragmentos de ~88 kDa em 0,5 h, e três outros fragmentos de ~59, ~133 e ~148 kDa após 3 h de incubação (**Figura 14 C**); e vitronectina (~70 kDa) em produtos menores de ~53, ~35 e ~25-kDa após 1 h (**Figura 14 D**) *in vitro*.

A capacidade de degradar as proteínas da MEC foi testada ao incubar rhomb-I com matrigel (1:50, m/m). Os principais componentes da matrigel são laminina (LM), colágeno tipo IV (Coll IV) e nidogênio (ND). *In vitro*, rhomb-I degradou todos os três componentes como demonstrado por SDS-PAGE (**Figura 15 A**) e análise por western blot com anticorpos anti-LM ou anti-Coll IV ou anti-ND. As bandas de ~400 kDa (cadeia LM α 1) e ~250 kDa (cadeias β 1 e γ 1) representam a LM que foi hidrolisada gerando fragmentos de ~101, ~72 e ~56 kDa (**Figura 15 B**). O Coll IV α -1 e α -2 representado pela banda de 190 kDa, foi hidrolisado pela rhomb-I gerando fragmentos de ~55 e 30 kDa (**Figura 15 C**). As bandas em ~150 (ND 2) e ~135 kDa (ND 1) são cadeias de ND, a banda de ~151 kDa foi completamente digerida, e foram observados três produtos de ~130, ~65 e ~55 kDa (**Figura 15 D**). Quando rhomb-I foi previamente incubada com 10 mM de EDTA, a ação da enzima foi anulada.

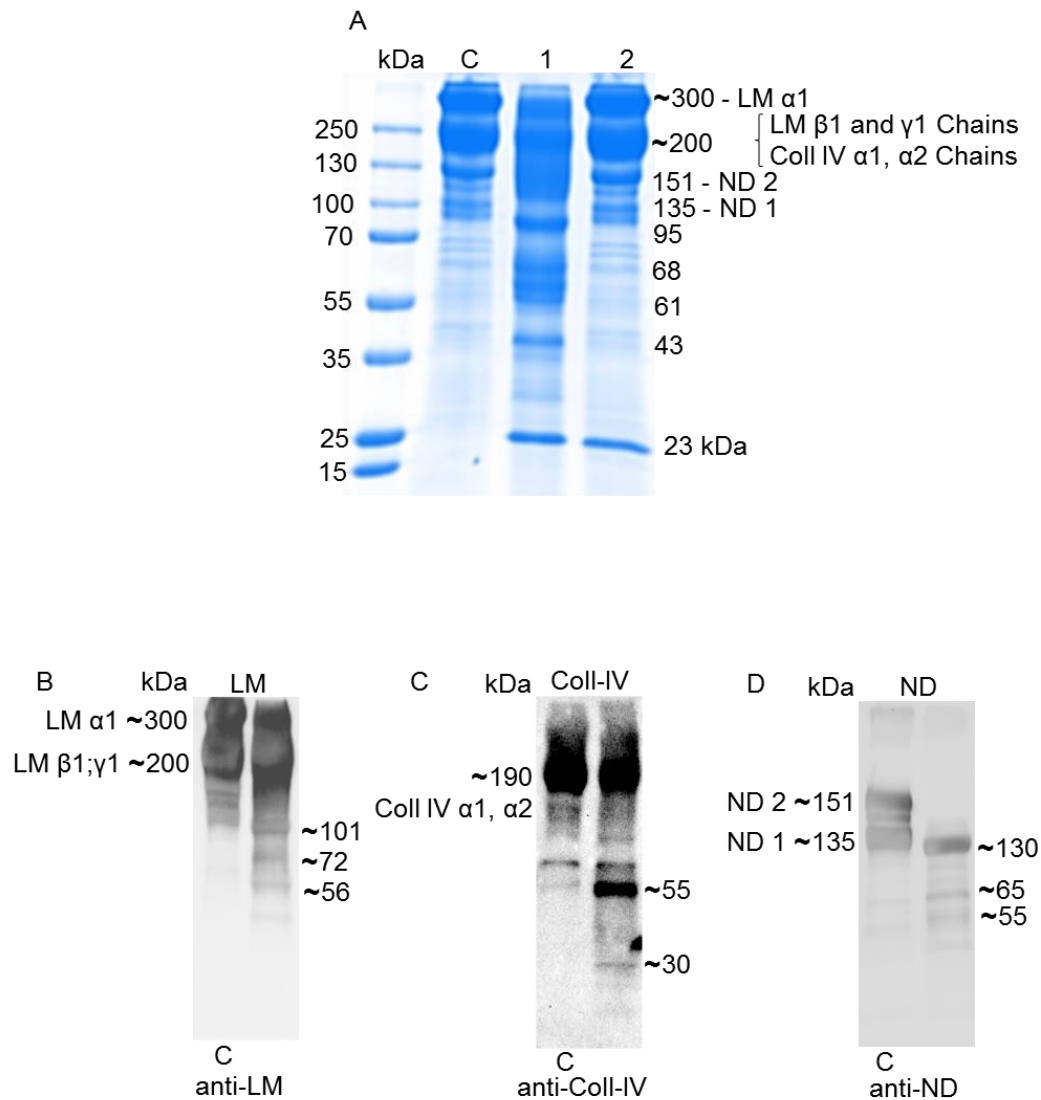
Figura 14 – Proteólise de proteínas isoladas do plasma por rhomb-I



Fonte: próprio autor, 2023.

Legenda: SDS-PAGE (12,5%) em condições redutora de (A) fibrinogênio (Fg), (B) fibrina (Fb), (C) fibronectina (FN) e (D) vitronectina (VT) após incubação com rhomb-I nos intervalos indicados a 37 °C, nas razões molares enzima:substrato de 1:200 para Fg, Fb e FN, e 1:150 para VT. Nos controles, Fg e Fb foram incubados por 60 min ou 6 h (FN e VT) sem rhomb-I. As reações foram interrompidas com tampão de amostra com redução. As cadeias polipeptídicas de fibrinogênio e fibrina são indicadas por setas pretas. Em (A) e (B) rhomb-I foi pré-incubado com EDTA (5 mM) por 15 min antes da reação com Fg/Fb. Os produtos da hidrólise são indicados por setas abertas. Em (C) e (D) os principais produtos digeridos de FN e VT são indicados à direita. * rhomb-I foi previamente incubada com EDTA 10mM.

Figura 15 – Efeito de rhomb-I sobre a matrigel



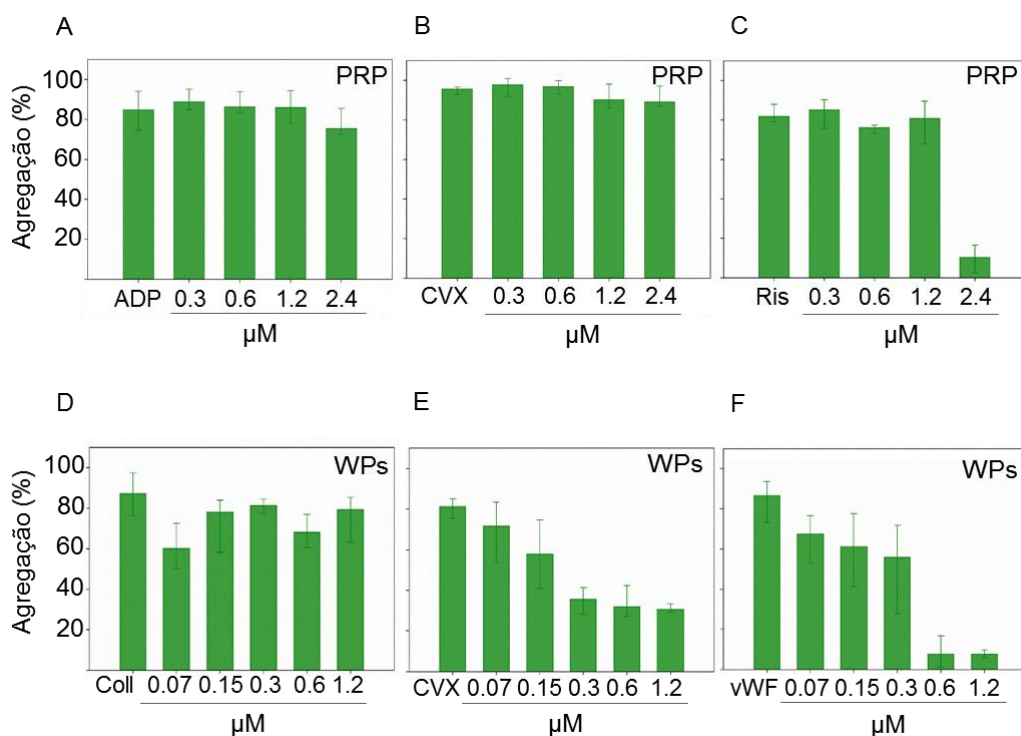
Fonte: Próprio autor, 2023.

Legenda: (A) Matrigel (50 μ g) foi incubada com rhomb-I (1 μ g) por 1 h a 37 $^{\circ}$ C em 1. Além disso, a matrigel foi incubada com rhomb-I pré-tratada com EDTA (10 mM) por 15 min em 2. O experimento de controle prosseguiu por 1 h sem rhomb-I em C. A reação foi interrompida adicionando tampão de amostra com redução e fervida por 5 min. Os fragmentos de degradação da matrigel foram submetidos a eletroforese em um gel gradiente de 7-15% sob condições redutoras, transferidos para a membrana de celulose e detectados com anticorpos (B) anti-laminina, (C) anti-colágeno IV e (D) anti-nidogênio e, posteriormente, com proteína G conjugada com peroxidase. Nos controles **C** estão indicadas as massas moleculares aproximadas das cadeias de laminina (LM α 1 ~300 kDa, LM β 1 e γ 1 ~200 kDa), colágeno IV (Coll IV α -1 e α -2 ~190 kDa) e nidogênio (ND 1 ~135 kDa, ND 2 ~151 kDa), respectivamente. Os produtos de degradação e suas massas moleculares aparentes são indicados à direita. Os resultados são representativos de três experimentos semelhantes.

4.7 Rhomb-I afeta a agregação plaquetária

Para verificar o efeito de rhomb-I sobre a função de plaquetas, ensaios de agregação plaquetária foram realizados em plasma rico em plaquetas (PRP) e plaquetas lavadas com solução de tyrode. As plaquetas foram estimuladas com ADP, colágeno tipo I (Coll), convulxina (CVX) e ristocetina (Ris), trombina e vWF na presença de ristocetina. Nos ensaios com PRP pré-tratado com rhomb-I (0,3 - 2,4 μM), não foi observada inibição da agregação induzida por ADP ou CVX (**Figura 16 A e B**). Entretanto, em concentrações maiores que 2,4 μM , a agregação induzida por ristocetina foi inibida em mais de 80% (**Figura 16 C**). Nos ensaios com plaquetas lavadas, nas concentrações testadas rhomb-I não inibiu a agregação induzida por colágeno tipo I (**Figura 16 D**), porém, foi observada inibição da agregação plaquetária induzida por CVX (**Figura 16 E**) e por vWF (**Figura 16 F**) a partir da concentração de 0,3 μM .

Figura 16 – Agregação plaquetária



Fonte: Próprio autor, 2023.

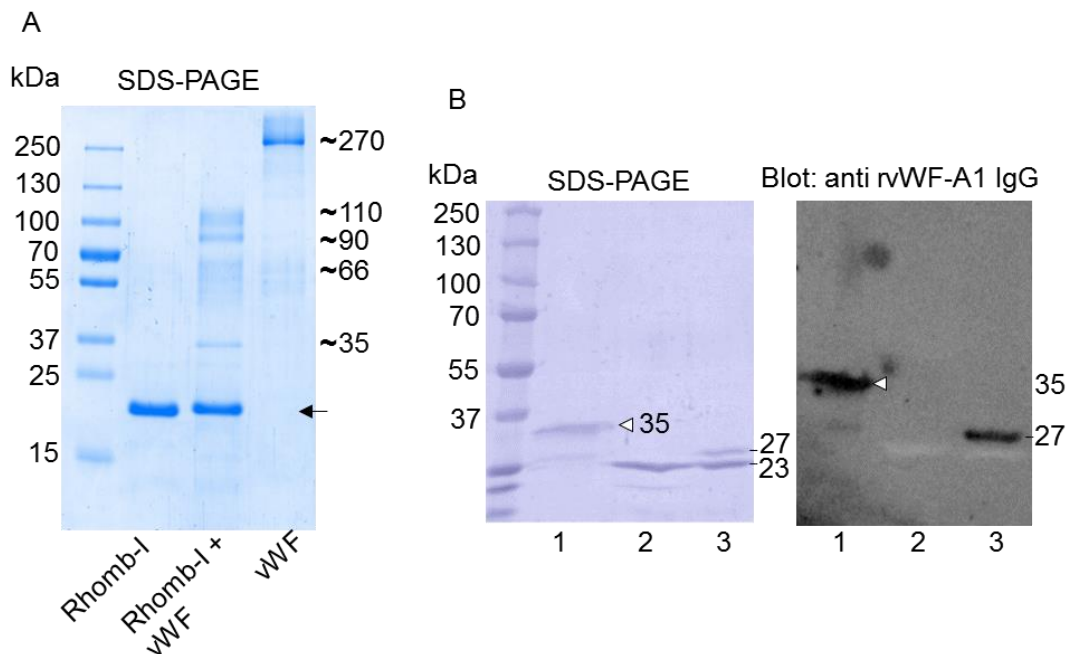
Legenda: Efeito de rhomb-I na agregação plaquetária de PRP e plaquetas lavadas (WPs). PRP (225 μL) ou WPs (225 μL , $2,5 \times 10^5/\mu\text{L}$) foram pré-incubados com rhomb-I em concentrações variáveis (0,3 a 4,8 μM usando PRP ou 0,07 a 1,2 μM com WPs), por 3 min sob agitação de 600 rpm a 37 °C, antes da adição de agonistas da agregação; (A) ADP (10 μM), (B) convulxina (CVX, 50 μg), (C) ristocetina (Ris, 0,5 mg/mL), (D) colágeno I (10 $\mu\text{g/mL}$), (E) CVX (50 μg) e (F) vWF (5,5 $\mu\text{g/mL}$) com adição de Ris (0,5 mg/mL). Média \pm desvio padrão são mostrados (n=3). Rhomb-I inibe a agregação de plaquetas em

PRP desencadeada por Ris em concentração acima de 2,4 μM . Rhomb-I também bloqueia a agregação de WPs estimuladas com CVX e vWF.

4.8 Rhomb-I cliva o vWF e o domínio A1 do vWF recombinante (rvWF-A1)

O vWF é uma macromolécula do plasma que se liga por meio do seu domínio A1 ao complexo de glicoproteínas Ib/V/IX na superfície das plaquetas. Tendo em vista a importância desta proteína na hemostasia, e o resultado do ensaio de agregação, ensaios de hidrólise com rhomb-I foram realizados. Em 60 min, a 37 °C, rhomb-I clivou completamente o vWF (270 kDa) gerando fragmentos de ~110, ~90, ~66 e 35 kDa como demonstrado por SDS-PAGE (**Figura 17 A**). Degradação do rvWF-A1 (~35 kDa) pela rhomb-I também foi observada em SDS-PAGE e por *western blot* com anticorpo anti- rvWF-A1 gerando um produto de degradação com massa molecular de ~ 27 kDa (**Figura 17 B**).

Figura 17 – Efeito de rhomb-I sobre o vWF e seu domínio A1 recombinante



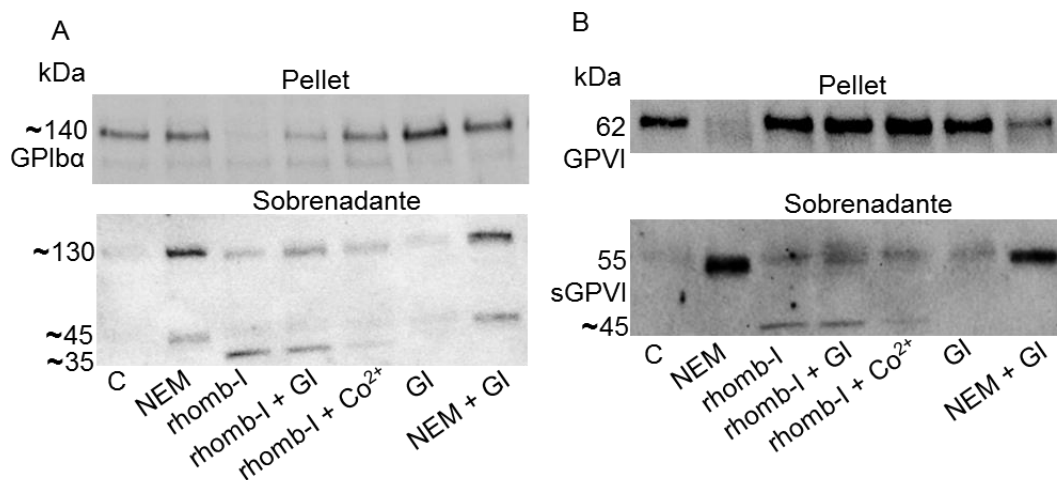
Fonte: Próprio autor, 2023.

Legenda: (A) Clivagem de vWF (4 μg) após incubação com rhomb-I (1 μg). Fragmentos da degradação foram analisados por SDS-PAGE (7,5%) sob condições redutoras. Os controles, rhomb-I indicada pela seta preta e vWF comercial (~270 kDa), são mostrados. (B) Clivagem do domínio rvWF-A1 (10 μg) incubado com rhomb-I (5 μg). O produto da clivagem e os controles foram submetidos a SDS-PAGE (12,5%) sob condições redutoras seguidas de imunotransferência com anticorpo anti-rvWF-A1 reconhecendo o domínio rvWF-A1 (seta aberta, ~35 kDa) e um produto de ~27 kDa. A banda de 23 kDa corresponde a rhomb-I (2 e 3 em B).

4.9 Ação de rhomb-I sobre os receptores plaquetários GPIb e GPVI

Com o propósito de verificar se a proteinase exerce efeito sobre os receptores exclusivos de plaquetas, plaquetas lavadas ($5 \times 10^5/\mu\text{L}$) com solução de Tyrode foram tratadas com NEM, rhomb-I ($2 \mu\text{g}$), rhomb-I com adição de GI254023X, rhomb-I pré-incubada com Co^{2+} , GI254023X e NEM com adição de GI254023X, por 30 min a 37°C e então o *pellet* foi separado do sobrenadante por centrifugação. O produto da incubação foi analisado por *western blot* com anticorpo anti-GPIb ou anti-GPVI. A análise demonstrou que a enzima clivou o GPIb ($\sim 140 \text{ kDa}$) liberando um fragmento solúvel no sobrenadante de $\sim 130 \text{ kDa}$ (Glicocalicina) e um fragmento de $\sim 35 \text{ kDa}$, e essa ação foi parcialmente inibida pela incubação de rhomb-I com Co^{2+} (**Figura 18 A**). Rhomb-I também clivou o GPVI liberando um fragmento solúvel (55 kDa) no sobrenadante e também um fragmento de $\sim 45 \text{ kDa}$ (**Figura 18 B**). O NEM que é uma agente alquilante, foi usado com controle positivo do experimento, pois induz o *shedding* de GPVI e GPIb através da ativação das ADAM10 e ADAM17 ao modificar o grupo tiol destas enzimas. O GI254023X é um inibidor de ADAM10.

Figura 18 – Rhomb-I cliva os receptores plaquetários GPIb e GPVI



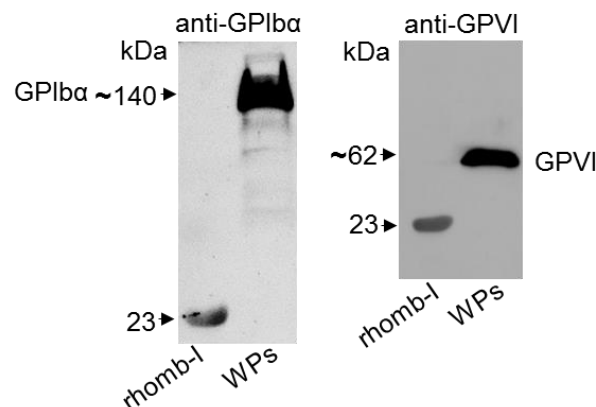
Fonte: próprio autor, 2023.

Legenda: Immunoblot com (A) anticorpo anti-GPIb α ou (B) com anticorpo anti-GPVI de pellet e sobrenadante de plaquetas lavadas ($5 \times 10^5/\mu\text{L}$) tratadas com: NEM (0,1 mM), rhomb-I ($2 \mu\text{g}$), rhomb-I com adição de GI254023X (GI, 100 nM), rhomb-I pré-incubada com Co^{2+} (10 mM), GI254023X (GI, 100 nM) e NEM (0,1 mM) com adição de GI254023X (GI, 100 nM).

4.9.1 Rhomb-I se liga aos receptores plaquetários GPIb e GPVI

Para melhor evidenciar a ação de rhomb-I nos receptores GPIb e GPVI, um ensaio de *binding* foi realizado. Para este fim, uma alíquota rhomb-I e de plaquetas lavadas foram aquecidas a 96°C e aplicadas em um gel gradiente SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Esta membrana foi incubada com suspensão de plaquetas lisadas, seguido de incubação com anticorpo anti-GPIb ou anti-GPVI. Rhomb-I se ligou ao receptor GPIb e GPVI, como demonstrado pela banda em torno de 23 kDa que corresponde a massa molecular da enzima. Nos controles do experimento, o receptor GPIb é indicado pela banda de ~140 kDa, e o receptor GPVI é indicado pela banda de ~62 kDa (**Figura 19**). Isso indicou que rhomb-I se liga a ambos receptores, GPIb α e GPVI.

Figura 19 – Rhomb-I se liga aos receptores de plaquetas GPIb α e GPVI



Fonte: Próprio autor, 2023.

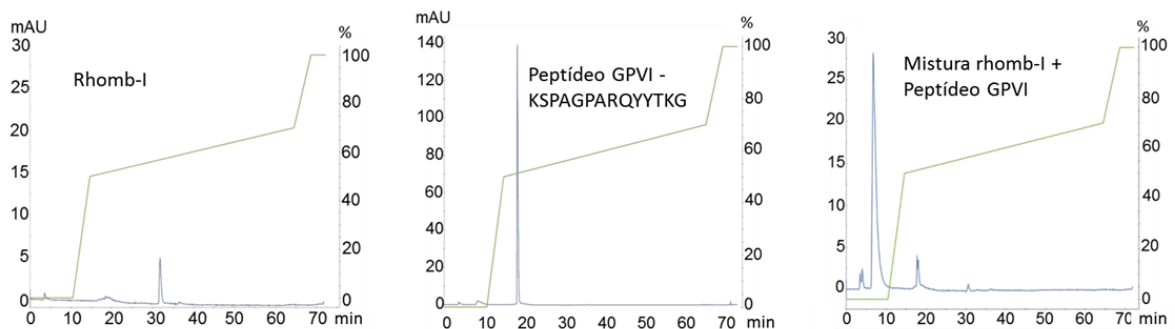
Legenda: Rhomb-I se liga aos receptores GPIb α e GPVI, rhomb-I (5 μ g) e 15 μ L de WPs (5 x10⁵/ μ L) (controle positivo) foram adicionados de tampão de amostra (1:1, v/v) e fervido por 5 minutos. As amostras foram submetidas a SDS-PAGE (7,5-15%), transferidas para membrana de nitrocelulose seguida de incubação com suspensão de plaquetas e depois com anticorpos anti-GPIb α ou anti-GPVI.

4.9.2 Rhomb-I cliva um fragmento de GPVI sintético

Um fragmento contendo 14 resíduos de aminoácidos correspondente a porção da região justa-extracelular (KSPAGPARQYYTKG) de GPVI foi quimicamente

sintetizado. De acordo com a literatura (GARDINER *et al.*, 2007) este fragmento que está localizado entre a porção transmembrana e o domínio tipo mucina, contém o sítio de clivagem para ADAM10 (PAR*QYYTKG). Três cromatografias em fase reversa foram realizadas em uma coluna Vydac C4: uma para rhomb-I, outra para o peptídeo sintético e a última para a mistura de rhomb-I incubada com o peptídeo sintético. O perfil de eluição das amostras foram registrados na **Figura 20**. O resultado demonstra que rhomb-I clivou o fragmento de GPVI. Entretanto, análise por espectrometria de massas das frações correspondentes à mistura de rhomb-I e o peptídeo sintético identificou um fragmento correspondente a KSPAGPARQY (Tabela 5), sugerindo que o sítio de clivagem de rhomb-I é entre as duas tirosinas (PARQY*YTKG) sendo diferente do sítio de clivagem de ADAM10 (**Figura 21**).

Figura 20 – Perfil de eluição da mistura de rhomb-I e de um fragmento sintético



Fonte: Próprio autor, 2023.

Legenda: Perfil de eluição em cromatografia em fase reversa de rhomb-I (20 µg) um peptídeo sintético de GPVI (200 µg) e da mistura de rhomb-I com o peptídeo sintético (2 µg : 200 µg). Três cromatografias em fase reversa foram realizadas em uma coluna Vydac C4 (250 x 4,6 mm). A eluição da amostra foi feita com TFA 0,1% seguido de um gradiente linear de 0-70% de acetonitrila (ACN) em TFA 0,1% a uma vazão de 1 mL/min.

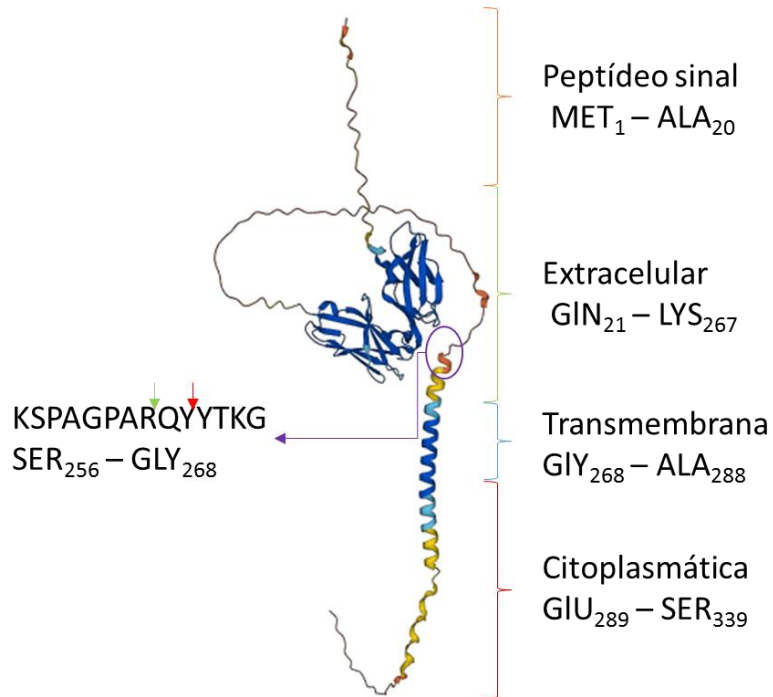
Tabela 5 – Peptídeos identificados através da análise por MS

Cromatografia	Fração correspondente	m/z	Sequência do peptídeo
Peptídeo sintético	14	1523,7983	KSPAGPARQYYTKG
rhomb-I + pep. Sintético	13	1074,5682	KSPAGPARQY

Fonte: Próprio autor, 2023.

Legenda: As frações correspondentes aos picos das cromatografias em fase reversa realizadas para o peptídeo sintético de GPVI e para a mistura de rhomb-I+Peptídeo sintético de GPVI foram enviadas para análise por espectrometria de massas empregando o ESI (nano-spray) como fonte de ionização, no modo de fragmentação CID. Duas sequências de peptídeos foram identificadas, uma com m/z correspondente ao peptídeo completo (14 aminoácidos) e uma com m/z correspondente a sequência KSPAGPARQY (10 aminoácidos).

Figure 21 – Esquema da estrutura tridimensional do receptor GPVI



Fonte: Próprio autor, 2023.

Legenda: Estrutura da GPVI depositada no banco de dados do Uniprot sob o número Q9CHN6 predita pela ferramenta AlphaFold (alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q9CHN6). Na figura estão indicadas as regiões do receptor e destacado o fragmento sintetizado que corresponde a região de clivagem por ADAM 10. A seta verde indica o sítio de clivagem por ADAM 10, a seta vermelha indica o possível sítio de clivagem por rhomb-I.

5 DISCUSSÃO

Proteinases do veneno de serpentes têm sido relacionadas a sintomas hemorrágicos nas vítimas há mais de 70 anos (DEUTSCH; DINIZ, 1955; HENRIQUES *et al.*, 1958). Para o gênero *Lachesis* já foram descritas pelo menos seis SVMPs, três da classe PIII: LHF-I ou mutalysin-I (SÁNCHEZ *et al.*, 1987) purificada do veneno de *L. m. muta* e dois transcritos do veneno de *L. m. rhombeata* (Lachestatin-1 e 2) (TAVARES *et al.*, 2008), e três da classe PI: duas isoformas isoladas de veneno de *L. m. muta*, mutalisina-IIa (LHF-II) e mutalisina-IIb (SANCHEZ *et al.*, 2003) e a Lmr-MP do veneno de *L. m. rhombeata* (CORDEIRO *et al.*, 2018). Neste trabalho, foi apresentada uma SVMP da classe P-I isolada também do veneno de *Lachesis muta rhombeata* que afeta a hemostasia e a agregação plaquetária. A análise eletroforética juntamente com os ensaios de digestão da DMC, testes hemorrágicos e ensaios com inibidores de proteinases demonstraram a natureza metaloenzimática desta proteína que foi denominada rhomb-I. A massa molecular determinada por espectrometria de massas foi de 22.860,909 Da, o que difere em 279 Da em relação a massa predita com sequência de aminoácidos que foi de 22581.74 Da. Essa diferença pode estar relacionada a resolução e acurácia do método utilizado sendo esperadas algumas pequenas variações.

A pureza de rhomb-I foi demonstrada através de eletroforese em SDS-PAGE na qual apresentou apenas uma banda, contudo, após a diálise e liofilização, outras bandas de massas moleculares menores foram evidenciadas em gel de SDS-PAGE. Após análise por meio de espectrometria de massas das bandas excisadas do gel, foi demonstrado que as sequências de aminoácidos das bandas eram correspondentes à sequência de aminoácidos de rhomb-I, indicando que rhomb-I sofre autoproteólise. Resultado semelhante foi observado por WU e colaboradores (2001), com relação a crotalin, uma SVMP P-I antagonista de GPIIb. O mecanismo de autoproteólise pode ter um papel importante em processos biológicos (KIM *et al.*, 2006). O fragmento de autoproteólise de crotalin se ligou ao vWF, indicando que esta ligação não é dependente da sua conformação (WU *et al.*, 2001). Em resultados preliminares a fração de 11 kDa de rhomb-I inibiu a agregação de plaquetas induzida por convulxina e por trombina. O estudo dos fragmentos autoproteolíticos desta enzima merece

atenção quanto a sua função no envenenamento e mesmo para a exploração de seu potencial biotecnológico como antitrombótico.

A dose mínima capaz de formar um halo hemorrágico (MHD) foi estimada em 43 µg/camundongo e sua atividade hemorrágica foi anulada na presença de EDTA o que indica que a ação hemorrágica pode estar relacionada à sua ação enzimática. Embora, rhomb-I tenha provocado hemorragia, seu efeito hemorrágico pode ser considerado fraco pois é menor do que outras SVMPs P-I hemorrágicas como a atroxlysin-I (9,7 µg) (SANCHEZ *et al.*, 2010), atroxlysin-Ia (2,2 µg) (FREITAS-DE-SOUSA *et al.*, 2017), Batroxase (10 µg) (CINTRA *et al.*, 2012), BaP1 (20 µg) (GUTIÉRREZ *et al.*, 1995), indicando que rhomb-I é fracamente hemorrágica como BMHF-1(41,14 µg) (TORRES-HUACO *et al.*, 2010) e BpirMP (50 µg) (BERNARDES *et al.*, 2013). De acordo com a literatura revisada, as SVMPs P-I podem ser consideradas fortemente hemorrágicas se o halo hemorrágico de 10 mm for causado por uma quantidade de enzima menor do que 20 µg por camundongo; e, fracamente hemorrágica se esta quantidade for entre 20 – 50 µg. As consideradas não hemorrágicas como leuc-a e mut-II foram testadas em doses de 50 µg e não causaram hemorragia (AGERO *et al.*, 2007).

Rhomb-I e LHF-II compartilham uma identidade de sequências de aminoácidos de 97,5%, e Lmr-MP (CORDEIRO *et al.*, 2018), na porção da sequência que foi determinada, contém apenas um aminoácido diferente da sequência de rhomb-I, na posição 185 há uma glutamina em rhomb-I e um ácido glutâmico em Lmr-MP. No alinhamento de sequências de rhomb-I com outras sequências de SVMPs P-I de venenos Viperidae, foi observado uma similaridade de 51,2% a 69% entre elas e uma conservada região do sítio catalítico (138-150) e região *met-turn* (164-166), além de seis resíduos de cisteína em comum. Na literatura são descritos dois tipos de estruturas do domínio metaloproteinase (FOX; SERRANO, 2005), aquelas que são estabilizadas por três ligações dissulfídicas como rhomb-I e aquelas que são estabilizadas por duas ligações dissulfídicas como a neuwiedase (Q9I9R4) e atroxlysin (P15167) . No que diz respeito aos sítios de glicosilação, a LHF-II é a única neste alinhamento que possui um sítio de N-glicosilação predito (Asn⁷⁰-Asp⁷¹-Thr⁷²), porém, de maneira geral as SVMPs P-I não são glicosiladas (CINTRA *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2009; SANCHEZ *et al.*, 2010; SANCHEZ *et al.*, 1991), de fato, rhomb-I não

apresentou alteração em sua mobilidade em SDS-PAGE após tratamento com PNGase F.

Rhomb-I apresenta ação alfa-fibrinogenolítica assim como outras SVMPs P-I tanto as hemorrágicas (CINTRA *et al.*, 2012; SANCHEZ *et al.*, 2010), como as não hemorrágicas (FERREIRA *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2000), por isso, essa ação não estaria diretamente relacionada aos sintomas hemorrágicos locais na vítima, mas poderia contribuir para a manutenção da hemorragia. As enzimas não hemorrágicas com ação fibrinogenolítica tem sido alvo de estudo como potencial agente antitrombótico (AGERO *et al.*, 2007; HSU *et al.*, 2007; SANCHEZ *et al.*, 2021). A hidrólise *in vitro* da fibronectina e da vitronectina, proteínas que promovem a adesão celular, ocorreu após algumas horas de incubação com rhomb-I, o que é um período de tempo bastante prolongado em relação a ação do veneno na vítima, que é imediata (TORRES *et al.*, 1995). Por outro lado, rhomb-I degrada completamente as proteínas da membrana basal (laminina, colágeno IV e nidogênio), assim como atroxlysin-a e atroxlysin-a1 (FREITAS-DE-SOUSA *et al.*, 2017; SANCHEZ *et al.*, 2010) que são consideradas fortemente hemorrágicas.

Rhomb-I inibe a agregação plaquetária induzida pela convulxina e pelo vWF assim como Kistomin, uma SVMP P-I isolada do veneno de *Calloselasma rhodostoma* (HSU *et al.*, 2008; HSU *et al.*, 2007). A convulxina ativa a agregação ao se ligar ao receptor GPVI (POLGÁR *et al.*, 1997) e o vWF se liga ao receptor GPIIb α . Ao investigar se rhomb-I possui ação sobre estes receptores, foi observado que rhomb-I se liga aos receptores e cliva a região do ectodomínio tanto de GPVI quanto de GPIIb α , os quais são liberados no sobrenadante. Estes dois receptores que são exclusivos de plaquetas são regulados por ADAMs (10 ou 17), as quais através de um estímulo, fisiológico ou patológico, induzem o *shedding* de GPVI ou GPIIb levando a liberação no plasma da porção solúvel destes receptores e a inativação do receptor na membrana e consequente remoção da plaqueta da circulação sanguínea (ANDREWS; GARDINER, 2017). De acordo com os resultados, rhomb-I parece atuar de maneira semelhante às ADAMs, induzindo o *shedding* dos receptores plaquetários, com a liberação de fragmentos solúveis no sobrenadante (Glicocalicina – 130 kDa e sGPVI – 55 kDa) contudo outros fragmentos de massas moleculares menores também foram detectados no sobrenadante de plaquetas lavadas nas condições experimentais testadas. Alguns estudos demonstram a importância clínica do fragmento sGPVI como

biomarcador em doenças aterotrombóticas (BIGALKE *et al.*, 2011; GARDINER; ANDREWS, 2014a e 2014b; WURSTER *et al.*, 2013). Já o nível alto de glicocalicina está relacionado a plaquetopenia (ANDREWS *et al.*, 2007).

Além de sua ação nos receptores plaquetários, rhomb-I também cliva o vWF que é crucial na ativação da hemostasia primária e, mais especificamente o domínio A1 que é o domínio que reconhece e se liga a GPIIb α . Desta maneira, rhomb-I provavelmente participa da fisiopatologia do envenenamento por um processo que parece envolver a interação vWF-GPIIb na microcirculação (alto cisalhamento) e a ligação do colágeno ao GPVI nos grandes vasos (baixo cisalhamento), logo no início da hemostasia primária.

Por fim, um fato que merece atenção é que nos acidentes com serpentes do gênero *Lachesis* não é observada plaquetopenia nas vítimas, diferentemente dos acidentes com serpentes do gênero *Bothrops*. Sabendo que as plaquetas são retiradas da circulação após o *shedding* dos receptores plaquetários, estudos mais aprofundados sobre a ligação aos receptores e do mecanismo de indução do *shedding* por enzimas envolvidas no processamento proteolítico como rhomb-I poderiam ajudar a entender melhor esta diferença nos sintomas.

6 CONCLUSÕES

- a) Relatamos uma proteína de 22,8 kDa, não glicosilada, contendo três ligações dissulfídicas, para a qual foi demonstrada sua natureza metaloenzimática. Sua estrutura é estabilizada por íons Ca^{2+} e Mg^{2+} e sua ação proteolítica é inibida por quelantes, inibidores de proteinases, íons Zn^{2+} , Co^{2+} e pela α -2-macroglobulina.
- b) A hemorragia causada por rhomb-I provavelmente está relacionada a sua ação proteolítica sobre proteínas da membrana basal levando a uma ruptura do vaso sanguíneo sendo a hemorragia mantida pela ação alfa-fibrino(geno)lítica da enzima.
- c) Além disso, a agregação plaquetária foi claramente afetada pela ação de rhomb-I sobre os receptores GPIb e GPVI e seus ligantes. Desta forma, rhomb-I contribui para a disfunção hemostática nas vítimas também por afetar a hemostasia primária, atuando nos eixos vWF- complexo GPIb-V-IX e Colágeno-GPVI os quais possuem um papel crítico na fase inicial do decurso da agregação plaquetária.
- d) Aprofundar a investigação sobre a interação de rhomb-I com os receptores plaquetários será útil para esclarecer os mecanismos que levam aos sinais e sintomas observados nas vítimas.
- e) Os dados indicam uma potencial aplicabilidade desta proteína no estudo de função de plaquetas e no entendimento da fisiopatologia do envenenamento.

REFERÊNCIAS ¹

- AGERO, U. *et al.* Effect of mutalysin II on vascular recanalization after thrombosis induction in the ear of the hairless mice model. **Toxicon**, v. 50, n. 5, p. 698–706, out. 2007.
- ANDRADE-SILVA, D. *et al.* Venom Profiling of the Insular Species *Bothrops alcatraz*: Characterization of Proteome, Glycoproteome, and N-Terminome Using Terminal Amine Isotopic Labeling of Substrates. **Journal of Proteome Research**, v. 20, n. 2, p. 1341–1358, 5 fev. 2021.
- ANDREWS, R. K.; BERNDT, M. C.; LÓPEZ, J. A. The Glycoprotein Ib-IX-V Complex. Em: **Platelets**. [s.l.] Elsevier, 2007. p. 145–163.
- ANDREWS, R. K.; GARDINER, E. E. Basic mechanisms of platelet receptor shedding. **Platelets**, v. 28, n. 4, p. 319–324, 19 maio 2017.
- AUMAILLEY, M. The laminin family. **Cell Adhesion & Migration**, v. 7, n. 1, p. 48–55, jan. 2013.
- BELLO, C. A. *et al.* Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (White-tailed jararaca) snake venom. **Biochimie**, v. 88, n. 2, p. 189–200, fev. 2006.
- BERNARDES, C. P. *et al.* Proteomic analysis of *Bothrops pirajai* snake venom and characterization of BpirMP, a new P-I metalloproteinase. **Journal of Proteomics**, v. 80, p. 250–267, mar. 2013.
- BIGALKE, B. *et al.* Platelet and Soluble Glycoprotein VI - Novel Applications in Diagnosis and Therapy. **Current Drug Targets**, v. 12, n. 12, p. 1821–1830, 1 nov. 2011.
- BODE, W.; GOMIS-RÜTH, F.-X.; STÖCKLER, W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. **FEBS Letters**, v. 331, n. 1–2, p. 134–140, set. 1993.
- BROWN, K. L. *et al.* Building collagen IV smart scaffolds on the outside of cells: Brown *et al.* **Protein Science**, v. 26, n. 11, p. 2151–2161, nov. 2017.
- CALVETE, J. J. Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. **Expert Review of Proteomics**, v. 8, n. 6, p. 739–758, dez. 2011.
- CANOBBIO, I.; BALDUINI, C.; TORTI, M. Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V–IX complex. **Cellular Signalling**, v. 16, n. 12, p. 1329–1344, dez. 2004.

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

- CARVALHO, P. C. *et al.* Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. **Nature Protocols**, v. 11, n. 1, p. 102–117, jan. 2016.
- CASEWELL, N. R. *et al.* Comparative venom gland transcriptome surveys of the saw-scaled vipers (Viperidae: echis) reveal substantial intra-family gene diversity and novel venom transcripts. **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 564, 2009.
- CASEWELL, N. R. *et al.* Domain loss facilitates accelerated evolution and neofunctionalization of duplicate snake venom metalloproteinase toxin genes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 9, p. 2637–2649, set. 2011.
- CHEN, R.-Q. *et al.* A new protein structure of P-II class snake venom metalloproteinases: it comprises metalloproteinase and disintegrin domains. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 310, n. 1, p. 182–187, out. 2003.
- CHIPPAUX J. P. Snake-bites: appraisal of the global situation. **Bulletin of the World Health Organization**, p. 515–524, 1998.
- CHIPPAUX, J.-P. Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. e0005662, jun. 2017.
- CINTRA, A. C. O. *et al.* Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. **Toxicon**, v. 60, n. 1, p. 70–82, jul. 2012.
- CORDEIRO, F. A. *et al.* Purification and enzymatic characterization of a novel metalloprotease from *Lachesis muta rhombeata* snake venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 24, n. 1, p. 32, dez. 2018.
- CREMONEZ, C. M. *et al.* Experimental *Lachesis muta rhombeata* envenomation and effects of soursop (*Annona muricata*) as natural antivenom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 22, n. 1, p. 12, dez. 2016.
- DELANO WL. **The PyMOL Molecular Graphics System**. , 2002. Disponível em: <<http://www.pymol.org/>>
- DEUTSCH, H. F.; DINIZ, C. R. SOME PROTEOLYTIC ACTIVITIES OF SNAKE VENOMS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 216, n. 1, p. 17–26, set. 1955.
- FERREIRA, R. N. *et al.* Complete amino-acid sequence, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of leucurolysin-a, a nonhaemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 65, n. 8, p. 798–801, 1 ago. 2009.
- FFRENCH-CONSTANT, C. Alternative splicing of fibronectin—many different proteins but few different functions. **Experimental Cell Research**, v. 221, n. 2, p. 261–271, dez. 1995.

- FISER, A.; ŠALI, A. Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. Em: **Methods in Enzymology**. [s.l.] Elsevier, 2003. v. 374p. 461–491.
- FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 969–985, jun. 2005.
- FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (Svmp) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity: Snake venom metalloproteinases and venom complexity. **FEBS Journal**, v. 275, n. 12, p. 3016–3030, jun. 2008.
- FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 24, p. 4195–4200, dez. 2010.
- FREITAS-DE-SOUSA, L. *et al.* Insights into the Mechanisms Involved in Strong Hemorrhage and Dermonecrosis Induced by Atroxlysin-Ia, a PI-Class Snake Venom Metalloproteinase. **Toxins**, v. 9, n. 8, p. 239, 2 ago. 2017.
- FRESON, K. *et al.* What's new in using platelet research? To unravel thrombopathies and other human disorders. **European Journal of Pediatrics**, v. 166, n. 12, p. 1203–1210, dez. 2007.
- GARDINER, E. E. *et al.* Controlled shedding of platelet glycoprotein (GP)VI and GPIb–IX–V by ADAM family metalloproteinases. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 5, n. 7, p. 1530–1537, jul. 2007.
- GARDINER, E. E.; ANDREWS, R. K. Plasma sGPVI: Changing levels in human disease. **Thrombosis Research**, v. 133, n. 3, p. 306–307, mar. 2014a.
- GARDINER, E. E.; ANDREWS, R. K. Platelet Receptor Expression and Shedding: Glycoprotein Ib-IX-V and Glycoprotein VI. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 28, n. 2, p. 56–60, abr. 2014b.
- GAY, L. J.; FELDING-HABERMANN, B. Contribution of platelets to tumour metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 2, p. 123–134, fev. 2011.
- GEORGE, J. N. Platelets. **The Lancet**, v. 355, n. 9214, p. 1531–1539, abr. 2000.
- GIORGIANNI, M. W. *et al.* The origin and diversification of a novel protein family in venomous snakes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 20, p. 10911–10920, maio 2020.
- GREMSKI, L. H. *et al.* Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a metalloproteinase from Bothrops leucurus snake venom. **Toxicon**, v. 50, n. 1, p. 120–134, jul. 2007.
- GUI, L. *et al.* Identification of the heparin-binding determinants within fibronectin repeat iii1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 46, p. 34816–34825, nov. 2006.

GUTIÉRREZ, J. *et al.* Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 33, n. 1, p. 19–29, jan. 1995.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Snakebite envenoming. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 1–21, set. 2017.

HAAD J. J. SILVA. A Review of Venom Toxinology and Epidemiology of Envenoming of Bushmasters (*Lachesis*) With Report of a fatal Bite. **Bulletin of the Chicago Herpetology Society**, p. 113–123, 1998.

HAAD J. S. Accidentes humanos por las serpientes de los géneros *Bothrops* y *Lachesis*. **Mem Inst Butantan**, v. 44, n. 45, p. 403–423, 1981.

HALFTER, W. *et al.* New concepts in basement membrane biology. **The FEBS Journal**, v. 282, n. 23, p. 4466–4479, dez. 2015.

HARRISON, P.; MARTIN CRAMER, E. Platelet α -granules. **Blood Reviews**, v. 7, n. 1, p. 52–62, mar. 1993.

HASSAN, MD. I.; SAXENA, A.; AHMAD, F. Structure and function of von Willebrand factor. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, v. 23, n. 1, p. 11–22, jan. 2012.

HENRIQUES, O. B. *et al.* The proteolytic activity of the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemical Journal**, v. 68, n. 4, p. 597–605, 1 abr. 1958.

HERRERA, C. *et al.* Effects of pi and piii snake venom haemorrhagic metalloproteinases on the microvasculature: a confocal microscopy study on the mouse cremaster muscle. **PLOS ONE**, v. 11, n. 12, p. e0168643, dez. 2016.

HSU, C. C.; WU, W. B.; HUANG, T. F. A snake venom metalloproteinase, kistomin, cleaves platelet glycoprotein VI and impairs platelet functions. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, jun. 2008.

HSU, C.-C. *et al.* Antithrombotic effect of a protein-type i class snake venom metalloproteinase, kistomin, is mediated by affecting glycoprotein ib-von willebrand factor interaction. **Molecular Pharmacology**, v. 72, n. 4, p. 984–992, out. 2007.

HUANG, J. *et al.* Platelet integrin α IIb β 3: signal transduction, regulation, and its therapeutic targeting. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 12, n. 1, p. 26, dez. 2019.

HUIZINGA, E. G. *et al.* Structures of Glycoprotein Ib α and Its Complex with von Willebrand Factor A1 Domain. **Science**, v. 297, n. 5584, p. 1176–1179, 16 ago. 2002.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33–38, fev. 1996.

IZUMI, M.; YAMADA, K. M.; HAYASHI, M. Vitronectin exists in two structurally and functionally distinct forms in human plasma. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 990, n. 2, p. 101–108, fev. 1989.

KEFALIDES, N. A. Isolation of a collagen from basement membranes containing three identical α -chains. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 45, n. 1, p. 226–234, out. 1971.

KEHREL, B. *et al.* Glycoprotein VI Is a Major Collagen Receptor for Platelet Activation: It Recognizes the Platelet-Activating Quaternary Structure of Collagen, Whereas CD36, Glycoprotein IIb/IIIa, and von Willebrand Factor Do Not. **Blood**, v. 91, n. 2, p. 491–499, 15 jan. 1998.

KIM, J. K. *et al.* Insight into autoproteolytic activation from the structure of cephalosporin acylase: A protein with two proteolytic chemistries. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 6, p. 1732–1737, 7 fev. 2006.

KIM, S.-J.; JENNE, C. N. Role of platelets in neutrophil extracellular trap (NET) production and tissue injury. **Seminars in Immunology**, v. 28, n. 6, p. 546–554, dez. 2016.

KIMURA, N. *et al.* Entactin-2: A New Member of Basement Membrane Protein with High Homology to Entactin/Nidogen. **Experimental Cell Research**, v. 241, n. 1, p. 36–45, maio 1998.

KLEINMAN, H. K.; MARTIN, G. R. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. **Seminars in Cancer Biology**, v. 15, n. 5, p. 378–386, out. 2005.

KURTOVIĆ, T. *et al.* Ammodytagin, a heterodimeric metalloproteinase from *Vipera ammodytes ammodytes* venom with strong hemorrhagic activity. **Toxicon**, v. 58, n. 6–7, p. 570–582, nov. 2011.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, ago. 1970.

LENTING, P. J.; CHRISTOPHE, O. D.; DENIS, C. V. Von willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. **Blood**, v. 125, n. 13, p. 2019–2028, mar. 2015.

LEONARDI, A. *et al.* Two coagulation factor X activators from *Vipera a. ammodytes* venom with potential to treat patients with dysfunctional factors IXa or VIIa. **Toxicon**, v. 52, n. 5, p. 628–637, out. 2008.

LEONARDI, A. *et al.* Comprehensive study of the proteome and transcriptome of the venom of the most venomous european viper: discovery of a new subclass of ancestral snake venom metalloproteinase precursor-derived proteins. **Journal of Proteome Research**, v. 18, n. 5, p. 2287–2309, maio 2019.

LONGBOTTOM *et al.* Vulnerability to snakebite envenoming: a global mapping of hotspots. **The Lancet**, v. 392, n. 10148, p. 673–684, 2018.

LORÍA, G. D. *et al.* Characterization of ‘basparin A,’ a prothrombin-activating metalloproteinase, from the venom of the snake *Bothrops asper* that inhibits platelet aggregation and induces defibrination and thrombosis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 418, n. 1, p. 13–24, out. 2003.

MACHADO DE AVILA, R. A. *et al.* Mimotopes of mutalysin-II from *Lachesis muta* snake venom induce hemorrhage inhibitory antibodies upon vaccination of rabbits. **Peptides**, v. 32, n. 8, p. 1640–1646, ago. 2011.

MATIAS, M. S. *et al.* BaltDC: purification, characterization and infrared spectroscopy of an antiplatelet DC protein isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 36, dez. 2017.

MAZZI, M. V. *et al.* Molecular characterization and phylogenetic analysis of BjussuMP-I: A RGD-P-III class hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 26, n. 1, p. 69–85, jul. 2007.

MINER, J. H.; YURCHENCO, P. D. Laminin functions in tissue morphogenesis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 20, n. 1, p. 255–284, nov. 2004.

MODDERMAN, P. W. *et al.* Glycoproteins V and Ib-IX form a noncovalent complex in the platelet membrane. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 1, p. 364–369, 5 jan. 1992.

MONTAGUE, S. J.; ANDREWS, R. K.; GARDINER, E. E. Mechanisms of receptor shedding in platelets. **Blood**, v. 132, n. 24, p. 2535–2545, dez. 2018.

MOSESSON, M. W. Fibrinogen and fibrin structure and functions. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 3, n. 8, p. 1894–1904, ago. 2005.

MOURA-DA-SILVA, A. *et al.* Processing of snake venom metalloproteinases: generation of toxin diversity and enzyme inactivation. **Toxins**, v. 8, n. 6, p. 183, jun. 2016.

MOURA-DA-SILVA, A. M. *et al.* Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. **Biochimie**, v. 90, n. 3, p. 484–492, mar. 2008.

NEGISHI, Y.; NOMIZU, M. Laminin-derived peptides: Applications in drug delivery systems for targeting. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 202, p. 91–97, out. 2019.

Neglected tropical diseases – GLOBAL. , [s.d.]. Disponível em: <<https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases>>. Acesso em: 17 jan. 2023

NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER, A. L. **Lehninger principles of biochemistry**. Seventh edition ed. New York, NY : Houndmills, Basingstoke: W.H. Freeman and Company ; Macmillan Higher Education, 2017.

NEU, R.; ADAMS, S.; MUNZ, B. Differential expression of entactin-1/nidogen-1 and entactin-2/nidogen-2 in myogenic differentiation. **Differentiation**, v. 74, n. 9–10, p. 573–582, dez. 2006.

OLAOPA, O. T. *et al.* Snake Venom Metalloproteinases (Svmps): A structure-function update. **Toxicon**, v. 7, p. 100052, set. 2020.

OLIVEIRA, L. S. *et al.* Atroxlysin-iii, a metalloproteinase from the venom of the peruvian pit viper snake *Bothrops atrox* (Jergón) induces glycoprotein vi shedding and impairs platelet function. **Molecules**, v. 24, n. 19, p. 3489, set. 2019.

PALACIOS-ACEDO, A. L. *et al.* Platelets, Thrombo-Inflammation, and Cancer: Collaborating With the Enemy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1805, 31 jul. 2019.

PANKOV, R.; YAMADA, K. M. Fibronectin at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. 20, p. 3861–3863, out. 2002.

PATTEN, J.; WANG, K. Fibronectin in development and wound healing. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 170, p. 353–368, mar. 2021.

PIDDE-QUEIROZ, G. *et al.* P-i snake venom metalloproteinase is able to activate the complement system by direct cleavage of central components of the cascade. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 10, p. e2519, out. 2013.

POLGÁR, J. *et al.* Platelet activation and signal transduction by convulxin, a c-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (Tropical rattlesnake) venom via the p2/gpvi collagen receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 21, p. 13576–13583, maio 1997.

POŽEK, K. *et al.* Genomic confirmation of the p-iii subclass of snake venom metalloproteinases and characterisation of its first member, a disintegrin-like/cysteine-rich protein. **Toxins**, v. 14, n. 4, p. 232, mar. 2022.

PYRON, R. A. *et al.* The phylogeny of advanced snakes (Colubroidea), with discovery of a new subfamily and comparison of support methods for likelihood trees. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 58, n. 2, p. 329–342, fev. 2011.

REININGER, A. J. Function of von Willebrand factor in haemostasis and thrombosis. **Haemophilia**, v. 14, p. 11–26, nov. 2008.

RIVERA, J. *et al.* Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. **Haematologica**, v. 94, n. 5, p. 700–711, 1 maio 2009.

RODRIGUES, V. M. *et al.* Structural and Functional Characterization of Neuwiedase, a Nonhemorrhagic Fibrin(ogen)olytic Metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* Snake Venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 381, n. 2, p. 213–224, set. 2000.

RUGGERI, Z.; ZIMMERMAN, T. The complex multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor. **Blood**, v. 57, n. 6, p. 1140–1143, jun. 1981.

SADLER, J. E. Von willebrand factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 34, p. 22777–22780, dez. 1991.

SAGE, H. Collagens of basement membranes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 79, n. s1, p. 51s–59s, jul. 1982.

SAJEVIC, T. *et al.* VaH3, one of the principal hemorrhagins in *Vipera ammodytes ammodytes* venom, is a homodimeric P-IIIc metalloproteinase. **Biochimie**, v. 95, n. 6, p. 1158–1170, jun. 2013.

ŠALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of Molecular Biology**, v. 234, n. 3, p. 779–815, dez. 1993.

SANCHEZ, E. *et al.* Direct fibrinolytic snake venom metalloproteinases affecting hemostasis: structural, biochemical features and therapeutic potential. **Toxins**, v. 9, n. 12, p. 392, dez. 2017.

SANCHEZ, E. F. *et al.* Biological activities of venoms from South American snakes. **Toxicon**, v. 30, n. 1, p. 95–103, jan. 1992.

SANCHEZ, E. F. *et al.* Resolution of isoforms of mutalysin II, the metalloproteinase from bushmaster snake venom. **Toxicon**, v. 41, n. 8, p. 1021–1031, jun. 2003.

SANCHEZ, E. F. *et al.* The novel metalloproteinase atroxlysin-I from Peruvian *Bothrops atrox* (Jergón) snake venom acts both on blood vessel ECM and platelets. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 496, n. 1, p. 9–20, abr. 2010.

SANCHEZ, E. F. *et al.* A novel fibrinolytic metalloproteinase, barnettlysin-I from *Bothrops barnetti* (Barnett's pitviper) snake venom with anti-platelet properties. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1860, n. 3, p. 542–556, mar. 2016.

SANCHEZ, E. F.; DINIZ, C. R.; RICHARDSON, M. The complete amino acid sequence of the haemorrhagic factor LHFII, a metalloproteinase isolated from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). **FEBS Letters**, v. 282, n. 1, p. 178–182, abr. 1991.

SÁNCHEZ, E. F.; MAGALHÃES, A.; DINIZ, C. R. Purification of a hemorrhagic factor (Lhf-i) from the venom of the bushmaster snake, *Lachesis muta muta*. **Toxicon**, v. 25, n. 6, p. 611–619, jan. 1987.

SANCHEZ, ELADIO. F. *et al.* A fibrinolytic snake venom metalloproteinase, mutalysin-II, with antiplatelet activity and targeting capability toward glycoprotein GPIIb α and glycoprotein GPVI. **Biochimie**, v. 184, p. 1–7, maio 2021.

SANZ, L.; CALVETE, J. Insights into the evolution of a snake venom multi-gene family from the genomic organization of *echis ocellatus* svmp genes. **Toxins**, v. 8, n. 7, p. 216, jul. 2016.

SARTIM, M. A. *et al.* Moojenactivase, a novel pro-coagulant PIIIc metalloprotease isolated from *Bothrops moojeni* snake venom, activates coagulation factors II and X and induces tissue factor up-regulation in leukocytes. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 5, p. 1261–1278, maio 2016.

SCHVARTZ, I.; SEGER, D.; SHALTIEL, S. Vitronectin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 31, n. 5, p. 539–544, maio 1999.

SEIFERT, S. A.; ARMITAGE, J. O.; SANCHEZ, E. E. Snake envenomation. **New England Journal of Medicine**, v. 386, n. 1, p. 68–78, jan. 2022.

SERRANO, S. M. T. *et al.* A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: An approach to understanding venom proteomics. **PROTEOMICS**, v. 5, n. 2, p. 501–510, fev. 2005.

SHIRAKI, R. *et al.* Expression of Toll-like receptors on human platelets. **Thrombosis Research**, v. 113, n. 6, p. 379–385, jan. 2004.

SOUZA *et al.* The enigma of the North margin of the Amazon River: Proven Lachesis bites in Brazil, report of two cases, general considerations about the genus and bibliographic review. **Bull. Chicago Herp**, v. 42, n. 7, p. 105–115, 2007.

SUZUKI-INOUE, K. A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by the C-type lectin receptor CLEC-2. **Blood**, v. 107, n. 2, p. 542–549, 15 jan. 2006.

TANUS JORGE, M. *et al.* Snakebite by the bushmaster (*Lachesis muta*) in Brazil: Case report and review of the literature. **Toxicon**, v. 35, n. 4, p. 545–554, abr. 1997.

TAVARES, N. A. C. *et al.* Expression of mRNAs coding for VAP1/crotastatin-like metalloproteases in the venom glands of three South American pit vipers assessed by quantitative real-time PCR. **Toxicon**, v. 52, n. 8, p. 897–907, dez. 2008.

THEOCHARIS, A. D. *et al.* Extracellular matrix structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 4–27, fev. 2016.

TORRES R, JAIME R.; TORRES A, MARÍA A.; ARROYO-PAREJO, MAXA. Coagulation disorders in bushmaster envenomation. **The Lancet**, v. 346, n. 8972, p. 449–450, ago. 1995.

TORRES-HUACO, F. D. *et al.* Purification and Characterization of a New Weak Hemorrhagic Metalloproteinase BmHF-1 from *Bothrops marajoensis* Snake Venom. **The Protein Journal**, v. 29, n. 6, p. 407–416, ago. 2010.

VAN DER MEIJDEN, P. E. J.; HEEMSKERK, J. W. M. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. **Nature Reviews Cardiology**, v. 16, n. 3, p. 166–179, mar. 2019.

WEISEL, J. W. Fibrinogen and Fibrin. Em: **Advances in Protein Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2005. v. 70p. 247–299.

WU, W.-B.; PENG, H.-C.; HUANG, T.-F. Crotalin, a vwf and gp ib cleaving metalloproteinase from venom of *Crotalus atrox*. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 86, n. 12, p. 1501–1511, 2001.

WURSTER, T. *et al.* Plasma levels of soluble glycoprotein VI (sGPVI) are associated with ischemic stroke. **Platelets**, v. 24, n. 7, p. 560–565, nov. 2013.

APÊNDICE A - MANUSCRITO PUBLICADO NO PERIÓDICO TOXICON:

Toxicon 228 (2023) 107097



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon



Rhomb-I, a P-I metalloproteinase from *Lachesis muta rhombeata* venom degrades vessel extra cellular matrix components and impairs platelet aggregation

Valéria Gonçalves de Alvarenga^a, Luciana S. Oliveira^a, Gustavo O. Santos^a, Dan E. Vivas-Ruiz^b, Márcia Helena Borges^c, Rodrigo C.G. de Souza^d, Johannes A. Eble^e, Ana Maria Moura-da-Silva^f, Eladio F. Sanchez^{a,*}

^a Laboratório de Bioquímica de Proteínas de Venenos Animais, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Brazil

^b Laboratório de Biologia Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Peru

^c Laboratório de Proteômica e Aracnídeos, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Brazil

^d Serra Grande Center, Itacaré, Bahia, Brazil

^e Institute of Physiological Chemistry and Pathobiochemistry, University of Münster, Germany

^f Laboratório de Imunopatologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Handling Editor: Ray Norton

Keywords:

Lachesis muta rhombeata
Snake venom metalloproteinase
Platelet receptors
Hemostasis
Hemorrhage

ABSTRACT

Rhomb-I, a 23-kDa metalloproteinase was isolated from *L. m. rhombeata* venom. Its dimethylcasein proteolysis was abolished by metal chelators, and slightly enhanced by Ca^{2+} and Mg^{2+} ions, but inhibited by Co^{2+} , Zn^{2+} and α 2-macroglobulin. In aqueous solution, rhomb-I autoproteolyzed to a 20- and 11-kDa fragments at 37 °C. The amino acid sequence showed high homology with other snake venom metalloproteinases. Rhomb-I causes hemorrhage that may be ascribed to hydrolysis of essential basement membrane, extracellular matrix and plasma proteins. It preferentially cleaves the α -chains of fibrin (ogen). Rhomb-I inhibited convulxin- and von Willebrand factor (vWF)-induced aggregation on human platelets without significant effect on collagen-stimulated aggregation or other effectors. It digests vWF into a low-molecular-mass multimers of vWF and a rvWF-A1 domain to a 27-kDa fragment as revealed by western blotting with mouse anti-rvWF A1-domain IgG. Incubation of platelets with rhomb-I resulted in adhesion to and cleavage of platelet receptors glycoprotein (GP)Ib and GPVI to release a 55-kDa soluble form. Both membrane glycoproteins GPIb that binds vWF, together with GPVI which binds collagen, play a key role in mediating platelet adhesion/activation and can initiate (patho)physiological thrombus formation. Conclusions: rhomb-I is implicated in the pathophysiology of *Lachesis* envenoming by disrupting vasculature, hemostasis and platelet aggregation through impairing vWF-GPIb axis and blocking GPVI-collagen binding.

1. Introduction

Snakebite envenoming represents a danger to human health and is a neglected disease worldwide, particularly throughout tropical and sub-tropical countries (Chippaux, 2017; Slagboom et al., 2017). On the other hand, snake venoms are a goldmine of active compounds responsible for the multi-functional activities that perturb vital physiological systems including enzymes, receptors or ion channels, and can be broadly

classified as haemotoxic, neurotoxic or cytotoxic (Vetter et al., 2011; Slagboom et al., 2017). In South America, the predominant group of venomous pitvipers (Crotalinae subfamily of Viperidae) of medical relevance includes the genera *Bothrops*, *Crotalus* and *Lachesis* (Campbell and Lamar, 2004; Chippaux, 2017; Slagboom et al., 2017). Of particular interest, *Lachesis* (bushmaster) inhabits lowland tropical forested areas in Central and South America, is a terrestrial and nocturnal snake, and is the only neo-tropical snake that lays eggs.

Abbreviations: ADAM, a disintegrin and metalloproteinase; BM, basement membrane; DMC, dimethylcasein; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; ECM, extracellular matrix; Fg, fibrinogen; Fb, fibrin; FN, fibronectin; PMSF, phenyl methyl sulfonyl fluoride; ND, nidogen; SVMs, Snake venom metalloproteinases; vWF, von Willebrand factor; VT, vitronectin.

* Corresponding author. Research and Development Directory, Ezequiel Dias Foundation, Belo Horizonte, MG, Brazil.

E-mail address: eladio.flores@funed.mg.gov.br (E.F. Sanchez).

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2023.107097>

Received 18 January 2023; Received in revised form 21 March 2023; Accepted 22 March 2023

Available online 5 April 2023

0041-0101/© 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Lachesis is probably the largest viper in the world, up to 3.5 m (Campbell and Lamar, 2004; Souza et al., 2007). Literature on human envenomings by bushmasters is rare and represents approximately 3% of reported accidents in Brazil. However, in the Amazon, snakebites caused by bushmasters are around 9% (Souza et al., 2007; Chippaux, 2017) and should be considered of a great medical emergency, in part due to the quantity of venom delivered by adult snakes around 300–400 mg/snake (Sanchez et al., 1992; Souza et al., 2007). Envenomation attributed to Lachesis is characterized by immediate local pain and edema within a very short time (within 20 min after the bite), mild hemorrhage at the bite site, and neurotoxic activity. Furthermore, Lachesis venom degrades fibrinogen and prothrombin, provoking disseminated intravascular coagulation with fibrinogen consumption and increased bleeding times. Systemic manifestations such as diarrhea, vomiting, cardiovascular (hypotension), and coagulopathy due to massive hyperfibrinolysis and hemorrhage (Torres et al., 1995; Tanus Jorge et al., 1997; Campbell and Lamar, 2004; Souza et al., 2007) are often associated with human accidents. *L. muta* is mainly distributed in equatorial forest, of South American tropical countries. In accordance with the phylogenetic relationships, two subspecies have been described for *L. muta*: *L. m. muta* mainly inhabits the equatorial Amazon tropical forest east of the Andes; and *L. m. rhombeata* occurs in the Atlantic forest of Brazil from Rio de Janeiro to Ceará State (Campbell and Lamar, 2004; Stephano et al., 2005; Souza et al., 2007; Pla et al., 2013).

In spite of the fact that viperid venoms comprise over 100 protein compounds, they belong to only a few protein families, including those with enzymatic activity: metalloproteinases (SVMPs), serine proteinases (SVSPs), L-amino acid oxidases (LAOs), phospholipases A₂ (PLA₂s), hyaluronidases among others; and proteins/peptides without enzymatic effect: disintegrins, C-type lectins, myotoxins, CRISP toxins, proteinase inhibitors, natriuretic peptides, cystatin, and Kunitz-type proteinase inhibitors (Serrano et al., 2005; Sanz et al., 2008; Calvete, 2011; Madrigal et al., 2012). Thus, pathophysiological symptoms and clinical evolution of human bite victims of Lachesis are probably a consequence of the direct effect of a few molecules already reported from *L. muta* venom, principally SVMPs (Estêvão-Costa et al., 2000; Sanchez, 2004), SVSPs of the three groups: fibrinogen-clotting enzymes (thrombin-like) (Magalhaes et al., 2003), plasminogen activator (Sanchez et al., 2000, 2006), and kallikrein-like proteinases (Felicori et al., 2003; Weinberg et al., 2004), myotoxic K49 PLA₂s and basic D49 PLA₂s (Fuly et al., 2000; Damico et al., 2006), among other active molecules.

Among other efforts to improve the characterization of proteins/toxins of Lachesis venom, a comparison of proteomic analysis of the protein composition of *L. m. rhombeata* (Pla et al., 2013; Wiesel et al., 2019) with those of other Central and South American bushmasters (Sanz et al., 2008; Madrigal et al., 2012), provides clues for correlating venom composition and the pathological effects of envenomation across Lachesis venoms. These studies revealed remarkably similar venom phenotypes comprising seven or eight protein families including the aforementioned molecules. In connection with proteomic analysis, transcriptomic investigations were performed by the generation of expressed sequence tags (ESTs) from the venom glands of *L. muta* (Junqueira-de-Azevedo et al., 2006). The main pathological effects such as hemorrhage, local inflammation, and coagulopathy induced by the majority of viperid venoms are related directly or indirectly to the action of SVMPs. SVMPs are major components in most viperid venoms (>30% of all proteins), e.g. Lachesis, capable of inducing a diverse array of functions and disrupting hemostasis by blocking or triggering several steps of the coagulation cascade and impairing platelet functions of human envenoming victims (Torres et al., 1995; Tanus Jorge et al., 1997; Souza et al., 2007). As a result of the extensive representation in viperid venoms, SVMPs are the principal causes of life-threatening hemorrhagic pathologies detected following viperid snakebites (Casewell et al., 2011, 2013). Evolutionarily, SVMPs seem to have evolved from ADAM (A disintegrin and metalloproteinase) genes (Moura-da-Silva et al., 1996; Fry et al., 2008; Brust et al., 2013) that have been

duplicated near the base of advanced snake (Caenophidia) radiation, prior to the divergence of the Viperidae from most other Caenophidians (Moura-da-Silva et al., 1996; Fry et al., 2008; Brust et al., 2013). In accordance with the structural domains, SVMPs are conventionally classified into three classes: P-I, P-II, and P-III (Fox and Serrano, 2005; Takeda et al., 2006) further divided in several subclasses. The P-I class comprises only a metalloproteinase (MP) domain, P-IIs are those sequentially extended by a disintegrin (Dis) domain, and P-IIIs by a Dis-like and cysteine-rich (Cys-) domains. The P-III class SVMPs share a topological similarity that is homologous to the ectodomain of membrane-anchored ADAMs and with matrix metalloproteinases (MMPs) and are included in the M12 clan (MEROPS database: <http://merops.sanger.ac.uk>) of metalloproteinases also termed to as adamalysins or reprolysins (Gomis-Rüth, 2003; Takeda et al., 2006; Takeda, 2016). Moreover, after post-translational modification, the SVMPs can be found in several isoforms in the venoms, either only with the catalytic domain (P-I class) or in combination of the catalytic domain with the Dis domain (P-II class) or with Dis and Cys domains (P-III class) (Takeda, 2016; Moura-da-Silva et al., 2016). P-III SVMPs show a high hemorrhagic effect and also more diverse and specific biological activities than the P-I class.

Snake venom proteins and peptides have extremely diverse pharmacology with a wide range of molecular targets mainly in the cardiovascular and nervous systems. Due to the abundance in venoms, their structural and functional diversity, SVMPs offer amazing potentials for the development of newer bioactive agents for innovative therapeutics to treat various thromboembolic and hemostatic disorders and in diagnosis (Hsu et al., 2008; Vetter et al., 2011; Casewell et al., 2013; Kini and Koh, 2016; Sanchez et al., 2017, 2021). With regard to hemostasis and thrombosis, platelets are endowed with a repertoire of surface receptors that enable them to adhere, activate and aggregate at the sites of tissue damage or infection (Andrews et al., 2007). The engagement of the adhesion receptors regulating pathophysiological thrombus formation, the GPIb-IX-V complex binds to vWF and other ligands, together with the major collagen receptor GPVI and play a critical role in the initiation of platelet adhesion and activation (Andrews et al., 2007; Vilahur et al., 2018; Grover et al., 2018; Sanchez et al., 2021).

The preliminary characterization of a P-I class SVMP, Lmr-MP from *L. m. rhombeata* venom, has been reported previously (Cordeiro et al., 2018). Searching for fibrinolytic SVMPs that affect hemostasis by disrupting blood coagulation, vasculature and platelet function, we describe the purification of a P-I SVMP termed rhomb-I, and have assessed its effects on basement membrane (BM) components, associated extracellular matrix (ECM), and plasma proteins. Particularly, its action upon platelet aggregation and coagulation cascade was investigated. We have found that rhomb-I binds to and cleaves vWF, and the surface platelet receptors GPIb and GPVI, resulting in impaired platelet activities. Like other SVMPs, rhomb-I has important implications for envenomed patients as several hemostatic processes and physiological targets can be affected by these enzymes.

2. Materials and methods

2.1. Venom and animals

Lachesis muta rhombeata venom was kindly donated by Dr. Rodrigo C.G. de Sousa from Serra Grande Center for Lachesis muta Breeding, with Authorization of Instituto do Meio Ambiente e Recursos Hídricos No: 2016.001.002764/INEMA/Lic-02764, Bahia State. Swiss Webster mice (female, 18–22 g) from FUNED were used for in vivo experiments in accordance with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation and approved by the local Ethics Committee, Protocol number CEUA/FUNED: June 2019.

2.2. Reagents

Bacterial expression and purification of recombinant A1 domain of human vWF (rvWF-A1 domain) was performed as reported (Sanchez et al., 2016). Convulxin (CVX) was purified from South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* venom as described (Polgár et al., 1997), ADP (A2754), thrombin (112,374), prostaglandin E1 (P5515), fibronectin (F2006), vitronectin (5051), bovine (F8630), and human fibrinogen (F4129) essentially plasminogen free were obtained from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Von Willebrand factor (vWF, 681, 300) was from Merck (Darmstadt, Germany), type I collagen (5368) and ristocetin (001226) were from Helena Laboratories (Beaumont, TX, USA). The GPVI polyclonal antibody (AF3627) from human platelets and antihuman CD42b/GPIIb polyclonal antibody (AF4067) were from R&D Systems (Minneapolis, USA). Secondary peroxidase conjugated antibody (A6154) was from Sigma. Protein G peroxidase conjugated (P21041) and the ECL chemiluminescent blotting substrate (32,106) were from Thermo Scientific (Waltham, MA USA). N-glycosidase F (PNGase F-P0704S) was from New England Biolabs (Massachusetts, MA, USA). All other chemicals were of analytical grade.

2.3. Purification

The proteinase rhomb-I was isolated from *L. m. rhombeata* venom by a two-step purification procedure with size exclusion chromatography. Lyophilized venom (2400 mg) was dissolved in 8 ml of 0.05 M ammonium acetate buffer (pH 7.3) containing 0.3 M NaCl, and centrifuged at 6000×g to remove insoluble material. Step A: the supernatant solution (2160 mg) was loaded onto two Sephacryl S-200 (2.5 × 100 cm) columns in series, equilibrated and eluted with the same buffer. The flow rate was 7 ml/h and fractions were collected at 4 °C. Active fractions (Peak 5) of approximately 25 kDa containing proteolytic and low hemorrhagic activity were pooled, dialyzed against distilled water containing 1 mM CaCl₂ and lyophilized. Step B: fractions of peak 5 (471 mg, 21.82% m/v) still containing impurities was applied to a Sephadex G-50 fine (1.5 × 100 cm) column equilibrated and eluted with 20 mM Hepes buffer, pH 7.5 containing 1 mM CaCl₂ at a flow rate of 6 ml/h at 4 °C. Proteins were monitored at 280 nm. Proteinase activity on dimethylcasein (DMC) and hemorrhagic activity on mice were also assessed and SDS-PAGE was performed on selected fractions according to Laemmli (1970). Aliquot of the peak from the B step was diluted in 1 ml trifluoroacetic acid (0.1% TFA, v/v) and submitted to an HPLC system using a reverse phase column (C4 Vydac, 250 × 4.6 mm). Column was washed with 0.1% TFA and subsequently eluted with a linear gradient of 0–80% acetonitrile (ACN) in 0.1% aqueous TFA at a flow rate of 1 ml/h. The peak was collected for further structural characterization.

2.4. Mass spectrometry analysis by MALDI-TOF

The relative molecular mass (Mr) of rhomb-I was determined by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF) according to (Naumann et al., 2011). Spectra were recorded and analyzed using an Autoflex III Smartbeam instruments in a linear positive mode controlled by the proprietary COMPASS™ 1.2 as described previously (Naumann et al., 2011). The Mr of the isolated protein was also estimated by SDS-PAGE (12.5% gels) from reducing gels and stained with Coomassie blue 250.

2.5. Amino acid sequence determination

To determine its amino acid sequence, rhomb-I (50 µg protein) was purified by RP-HPLC and submitted to liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) by the University of São Paulo BIOMASS-Core Facility for Scientific Research (CEFAP-USP). The sample was then denatured with urea, reduced by triethylphosphine, and alkylated by iodoethanol before treatment with trypsin (0.2 µg/µl) at

25 °C, overnight. For the LC-MS/MS, peptide samples were redissolved in 0.1% TFA and analyzed using an EASY-nLC system (Thermo Scientific) coupled to a LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Scientific) according experimental conditions reported recently (Nachtigall et al., 2022).

2.6. 3D model of rhomb-I

The theoretical rhomb-I 3D model was predicted by comparative homology modeling (Sali and Blundell, 1993). A BLASTp search was performed to identify appropriated rhomb-I homologue templates. Five templates were selected for modeling: 3GBO (Bothrops moojeni), 1DTH (Crotalus atrox), 4AIG (Crotalus adamanteus), 4Q1L (Bothrops leucurus) and 1ND1 (Bothrops asper). Modeller v 9.16 (Fiser and Šali, 2003) was used to generate rhomb-I structure in.pdb format. The best model was selected based on the least discrete optimized protein energy (DOPE) and modeller objective function (MOF) scores. Root Mean Square Deviation (RMSD) was calculated using the program VMD v 1.9.2 (Humphrey et al., 1996). Validation analysis was conducted using SAVES Sever (<https://services.mbi.ucla.edu/SAVES/>) which includes PROCHECK WHATCHECK, ERRAT, VERIFY-3D and Ramachandran counter map calculations. Finally, the structure visualization was generated by using the Pymol software (Delano, 2002).

2.7. Effects of divalent cations and enzyme inhibitors

Proteolytic activity was tested using DMC as substrate as reported in (Sanchez et al., 2000). Rhomb-I (1 µg) was incubated with 10 mM of CaCl₂, MgCl₂, BaCl₂, ZnCl₂ and CoCl₂ in 20 mM Hepes buffer, pH 7.4 for 30 min at 37 °C before proteolytic activity was assayed. In addition, enzymatic activity was challenged with several proteinase inhibitors: batimastat (Bat), marimastat (Mar) (0.5 µM each), MMP inhibitor-III (i-MMP-III, ratio of 1:50), iodoacetamide (IAA, 1 mM), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 5 mM), phenyl methane sulfonyl fluoride (PMSF, 5 mM). To determine the stoichiometry of inhibition of rhomb-I with plasma inhibitor α2-macroglobulin (α2-M), increasing amounts of α2-M (7.9–63 µg) were incubated with a fixed concentration of rhomb-I (1 µg) in 250-µl of 20 mM Hepes buffer, pH 7.4 at 37 °C for 5 min. The molar ratios of α2-M: proteinase varied from 0.5 to 2.0. The results of enzyme-α2-M interaction were analyzed by SDS-PAGE. The residual activity was performed with DMC.

2.8. Hemorrhagic activity

To elucidate if rhomb-I induces hemorrhage, the skin assay procedure (Sanchez et al., 1992) was modified in a murine model as follows. Three doses of 10, 25 and 50 µg venom or rhomb-I were inoculated subcutaneously into a dorsal shaved skin of three animals (20–22 g)/dose. After 4 h the animals were euthanized, the dorsal skin was removed and the diameter of the hemorrhagic halo on the inner surface of the skin was measured. The minimum hemorrhagic dose (MHD) was defined as the amount of venom or enzyme to produce a hemorrhagic halo 1 cm in diameter. The P-I class SVMPs, atroxlysin-I (atr-I, hemorrhagic), mutalysin-II (mut-II, L.m.muta) and leucurolysin-a (leuc-a, B. leucurus) (non-hemorrhagic) were used as positive and negative controls, respectively.

2.9. Autodigestion assay

Protein degradation was observed during isolation (Step B). Thus, to verify autoprotoleolysis, rhomb-I (5 µg) in aqueous solution was incubated at 37 °C for 24 h and then the reaction was terminated by adding sample buffer under reducing conditions. The autodigestion pattern was analyzed on SDS-PAGE (18% gel). Another sample of mut-II (5 µg) was electrotransferred to a nitrocellulose membrane. Immunoblots were developed with rabbit anti-mutalysin-II IgG (primary antibody) and

anti-rabbit-IgG antibody conjugated with peroxidase (1:2000 dilution), detected with ECL and visualized by chemiluminescence imaging system ChemiDoc (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Furthermore, autoproteolytic fragments of 20- and 11-kDa separated by SDS-PAGE were subjected to automated in-gel digestion with trypsin followed to sequence analysis by LC-MS/MS.

2.10. Test to detect the presence of glycoconjugates in the protein

Samples containing 10 µg of rhomb-I were dissolved in 50 µl of denaturing buffer (0.5% SDS, 1% 2-β-ME). The protein was denatured by boiling it for 5 min. After the addition of 20 µl of reaction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0), 2.5 µl of detergent solution (IGEPAL 15% Roche), and 2 units of recombinant PNGase F, the samples were incubated for 6 h at 37 °C according to (Naumann et al., 2011). The native and treated proteinases were analyzed by SDS-PAGE under reducing conditions.

2.11. Functional characterization

2.11.1. Activity on plasma proteins, fibrinogen, fibrin, fibronectin and vitronectin

Human fibrinogen, fibrin and fibronectin were incubated with rhomb-I in a 1:200 (w/w) ratio at 37 °C in 50 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂, pH 8.0. In the case of vitronectin incubation with enzyme was in a ratio of 1:150. At various time intervals, 10 µl aliquots were analyzed by 12% SDS-PAGE under reducing conditions, and degradation products were visualized with Coomassie brilliant blue staining.

2.11.2. Proteolysis of matrigel

Matrigel Matrix (Corning, Bedford, MA, USA) was used to assess the effect of rhomb-I on BM components. Matrigel is a solubilized BM-like composite from Engelbreth-Holm-Swarm sarcoma, which is used as a surrogate of BM (Lebleu et al., 2007). Its main components are type-IV collagen, laminin, nidogen, and heparan sulfate proteoglycans. Matrigel (50 µg) was incubated with rhomb-I (1 µg) in 50 µl of 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 8.0 at 37 °C in the absence or presence of 10 mM EDTA. Aliquots were analyzed after 60 min by SDS-PAGE (7–15%) polyacrylamide gel under reducing conditions. Reactions were stopped by the addition of one volume of SDS-PAGE buffer (reducing conditions). The Matrigel compounds and their cleavage fragments were electro-transferred to a nitrocellulose membrane, analyzed by immunoblotting, and detected with specific antibodies against laminin (NB300-144, Novus, 1:5000), collagen-IV (70R31139, Fitzgerald, 1:4000) and nidogen (AF2570, RD Systems, 1:5000) (primary antibodies), and peroxidase-coupled protein G (diluted 1:5000) by chemiluminescence imaging system ChemiDoc.

2.11.3. Effect on platelet aggregation

To assess the effect of rhomb-I on platelet aggregation, human platelet suspension was prepared from the blood of consenting aspirin-free healthy volunteers. Venous blood was collected in acid-citrate dextrose (ACD: 78 mM citric acid; 117 mM sodium citrate; 282 mM dextrose) [6:1, (v/v)] centrifuged at 800×g for 15 min to obtain platelet-rich plasma (PRP). Human-washed platelets (WPs) were isolated as described previously (Sanchez et al., 2016). WPs were re-suspended in Tyrode's solution and adjusted to about 2.5 × 10⁵ platelets/µl. Platelet aggregation assays were monitored by light transmission in an eight channel platelet aggregometer (AggRam Helena Laboratories, Beaumont, TX, USA) with stirring at 600 rpm at 37 °C. To analyze the effect of rhomb-I on platelets, WPs (225 µl) or PRP were pre-incubated with the proteinase at different concentrations (WPs: 0.07–1.2 µM; PRP: 0.3–2.4 µM) in Tyrode's solution pH 7.4, 3 min. Platelets were stimulated by addition of several agonists: 10 µg/ml type I collagen, 10 µM ADP, 50 µg convulxin, 5.5 µg/ml vWF plus 0.5 mg/ml ristocetin. Ethical approval was granted by the FUNED human Ethics Committee (Protocol number: 35329520.4.00009507).

2.11.4. Effects of rhomb-I on commercial vWF and its recombinant A1 domain

To investigate the effect of the proteinase on vWF, 4 µg of vWF was incubated with rhomb-I (1 µg) for 60 min at 37 °C in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4. The reaction was stopped by the addition of sample buffer (8 M urea, 4% SDS, 4% 2-mercaptoethanol). Degradation products were analyzed by SDS-PAGE (7.5% gel). Recombinant vWF-A1 domain (rvWF-A1 domain, 10 µg) was incubated with or without enzyme (5 µg) for 60 min at 37 °C. Digestion was terminated with 5 µl of 10 mM EDTA. Aliquots were analyzed by SDS-PAGE (12.5% gel). The gels were either directly stained with Coomassie brilliant blue or transferred onto the nitrocellulose membrane. After blocking with 1% bovine serum albumin (BSA) in Tris-buffered saline 1 h, blots were developed with anti-mouse-rvWF-A1 domain IgG (1:400) and protein G peroxidase conjugated (Sigma-Aldrich) (1:3000) in subsequent incubation steps and, analyzed by chemiluminescence imaging system ChemiDoc.

2.11.5. Analysis of binding to and cleavage the platelet membrane receptors GPIIb and GPVI

We have analyzed the interaction between rhomb-I and GPIIb or GPVI from the membrane of WPs in response to rhomb-I. WPs (5 × 10⁵ platelets/µl) were incubated in the absence or presence of 10 mM NEM (N-ethylmaleimide, Sigma) as a positive control, 100 nM GI254023X (inhibitor of ADAM10, Sigma), Co²⁺ (10 mM) without or with rhomb-I (2 µg) at 37 °C for 60 min. Reactions were terminated by incubation for 5 min, 4 °C and then centrifuging at 1500×g for 2.5 min. To determine the interaction between rhomb-I and GPIIb as well as the degradation and shedding of GPVI, Western blot assays were performed using specific antibodies as described recently (Sanchez et al., 2021).

3. Results and discussion

3.1. Purification and biochemical properties

The venom of the Atlantic bushmaster, *L. m. rhombeata* is rich in proteins/peptides that strongly affect hemostasis by activating or inhibiting platelet aggregation, coagulation, fibrinolysis, and thrombosis. In this study, its venom was size-fractionated by a gel filtration chromatography on Sephacryl S-200 into eight fractions (Fig. 1A). Fractions that exhibited either hemorrhagic or proteolytic activity were distributed mainly in fractions 2 and 5. The fraction 2 (tubes 70–79), which contained the main hemorrhagic SVMP of class P-III (approximately 55 kDa) is presently under investigation. We focused our attention on fraction 5 (tubes 100–110), which contained the protein of interest of approximately 23-kDa, exhibiting low hemorrhagic activity in mice and high proteolytic activity on DMC. The separation of fraction 5 on a Sephadex G-50 fine column under conditions described in Experimental methods, showed one peak with constant specific DMC proteolysis across the peak (Fig. 1B) and a low hemorrhagic effect (not shown). The homogeneity of this protein was established by two methods. First, one protein peak was observed by reverse phase HPLC on a C4 column (Fig. 1C). Second, this preparation gave a single protein band of approximately 23-kDa on SDS-PAGE under reducing and non-reducing conditions (Fig. 1C, inset). Analysis by MALDI-TOF mass spectrometry showed a M of 22,860 Da (Fig. 1D). This value in comparison to the calculated mass of rhomb-I, from its amino acid sequence (22,577 Da) gave a difference of 284 Da. Considering that the analysis was performed in the Bruker Autoflex III Smart Beam (Maldi TOF-TOF) equipment, in linear mode, which has a resolution >5000 m/Δm and mass accuracy <20 ppm, this variation was expected. Based on its molecular mass and source (*L. m. rhombeata* venom), the isolated proteinase corresponds to P-I class SVMPs and was called rhomb-I. The final step resulted in 23.5 mg from 2160 mg protein of crude venom. Table 1 summarizes the purification procedure. Several SVMPs were previously isolated by a two-step procedure, e.g. barnettysin-I from *B. barnetti*

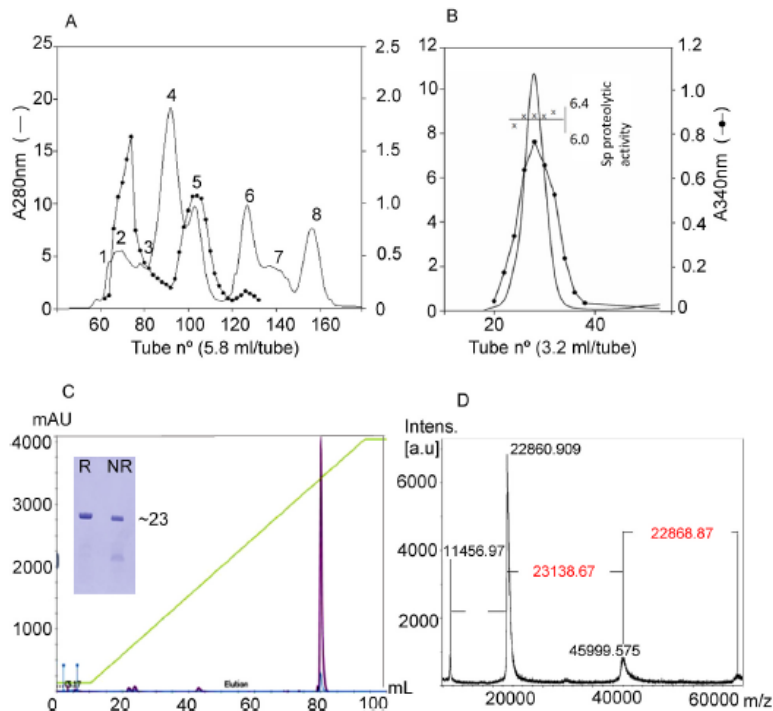


Fig. 1. Purification of rhomb-I. The isolation procedure is described in the purification section. Line, absorbance at 280 nm; filled circle, proteolytic activity on dimethylcasein, measured by absorbance at 340 nm. (A) Gel filtration on Sephacryl S-200, eluted with 0.05 M ammonium acetate buffer (pH 7.3) containing 0.3 M NaCl. (B) Gel filtration on Sephadex G-50 of the pooled active fraction 5 from the previous step, elution with 20 mM Hepes buffer, pH 7.5 containing 1 mM CaCl_2 . (C) RP-HPLC analysis of purified proteinase was performed using a Vydac C4 (250 × 4.6 mm) column. SDS-PAGE (12% gel) analysis of purified rhomb-I under reduced (R) or non-reduced (NR) conditions (inset). (D) Mass spectrometry of native rhomb-I. Purified rhomb-I was analyzed by MALDI-TOF/TOF. The main signal (displayed in arbitrary units – a.u.) represented a single ion charge of 22860.909 Da.

Table 1
Purification of rhomb-I.

Step	Protein		Hemorrhagic activity				Proteolytic activity (DMC)				
	mg	%	MHD ^a (mg)	Specific activity ^b (U/mg. 10 ³)	Total (U)	Yield %	PF	Specific activity ^c (U/mg)	Total (U)	Yield %	PF ^d
Crude venom	2160	100	0.005	0.0023	434.8	100	1	7.45	0.13	100	1
Sephacryl S-200	471.3	21.82	0.025	0.0144	69.4	20.13	4.9	21.4	0.047	36.1	2.9
Sephadex G-50	23.5	1.08	0.043	0.02	50	11.5	8.7	25.5	0.04	30.8	3.4

^a Minimum Hemorrhagic Dose (MHD). One unit of hemorrhagic activity is one MHD.

^b Specific activity is expressed as U/mg protein.

^c One unit is defined as $\Delta\text{A}340/\text{min}$.

^d Purification Factor (PF).

(Sanchez et al., 2016). The progress of purification was followed by testing proteolysis on DMC (Estêvão-Costa et al., 2000), coagulant activity on Fg, fibrino (geno)lytic and amidolytic assays on DL-BAPNA (Magalhaes et al., 2003), and testing the in vivo hemorrhagic effect on each protein fraction. Likewise, hemorrhage caused by rhomb-I was similar to that inflicted by atroxlysin-I (atr-I, B. atrox), when injected (up to 50 μg) subcutaneously into mice, but different from the non-hemorrhagic SVMPs mut-II and leuc-a (Fig. 2A and B).

It is likely that some ions such as Ca^{+2} and Mg^{+2} have an important role in the stabilization of certain venom proteins, while others, particularly Zn^{+2} , may actually participate in the catalysis of metalloenzymes. Thus, the effects of some cations on DMC degradation were examined. The addition of Ca^{+2} and Mg^{+2} (10 mM) enhanced rhomb-I proteolytic activity, whereas Zn^{+2} and Co^{+2} acted as effective inhibitors. Approximately 80% of the activity was lost in the presence of Co^{+2} , and Zn^{+2} ion (10 mM) completely blocked its activity (Fig. 2C). This result might be explained by the hypothesis that the metalloproteases have two Zn^{+2} -binding sites: a stable structural zinc binding motif HEXGHXXGXXH and another zinc atom that together with calcium ions are required for the stability and expression of enzyme activity

(Nagase and Woessner, 1999; Oliveira et al., 2019). Similar data have been reported for other SVMPs (Bello et al., 2006; Oliveira et al., 2019) and MMPs (Nagase and Woessner, 1999). Like EDTA, the zinc binder inhibitors of MMPs: batimastat, marimastat, and the inhibitor of MMP-III (i-PIII), are effective blockers of rhomb-I activity. However, PMSF, an active-site serine protease inhibitor, had no effect (Fig. 2D). Furthermore, its catalytic function can be regulated by exchanging the cationic cofactor. The most abundant inhibitor of proteases found in plasma, α -2 macroglobulin (α -2M, 725-kDa), inhibits rhomb-I activity probably by physical entrapment as reported for other SVMPs (Sanchez et al., 2016). In vitro, the catalytic activity of rhomb-I decreased with increasing α -2M concentration and was eventually blocked completely at 1:1 α -2M stoichiometry of inhibitor/enzyme (Fig. 2E). Under reducing conditions, α -2M appeared as one main 180 kDa band corresponding to one of four equal subunits (Fig. 2F, lane C). The interaction of rhomb-I with α -2M was shown by 180 kDa subunit proteolysis to yield the characteristic 90 kDa band. Probably it was caused by the cleavage of the Arg⁶⁹⁶-Leu⁶⁹⁷ bond, as identified for other P-I SVMPs such as barnettlysin-I (Sanchez et al., 2016) and leucurolysin-a (Bello et al., 2006), using as a model substrate: ⁶⁹⁵G HARLVHVEEPH⁷⁰⁴ that occurs at

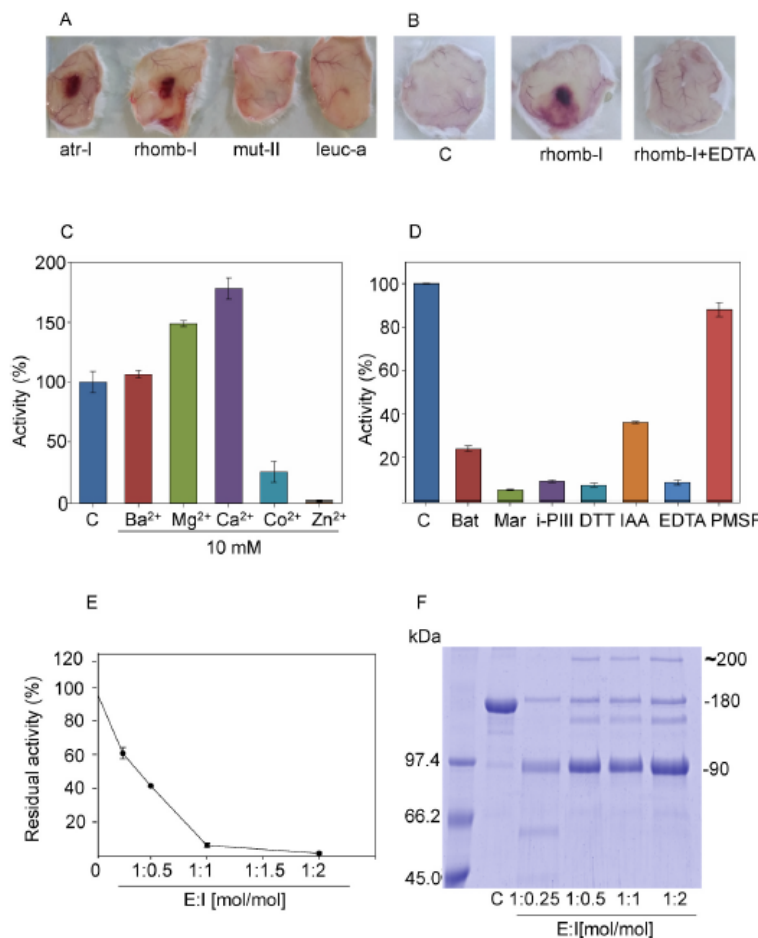


Fig. 2. Hemorrhage induced by P-I SVMPs. Subcutaneous injection (50 μ g) of each proteinase. In (A), atr-I and rhomb-I are hemorrhagic; mut-II and leuc-a are non-hemorrhagic, in (B), C (control saline), rhomb-I (50 μ g) and EDTA-treated rhomb-I. The dorsal skin of mice were removed after 4 h. In (C) effect of divalent cations and in (D) proteinase inhibitors on DMC proteolysis of rhomb-I. Rhomb-I (1 μ g) was incubated with each reagent as described in Experimental procedures, batimastat, marimastat, MMP-III inhibitor (0.5 μ M each), DTT (2 mM), IAA (1 mM), EDTA and PMSF (5 mM each). The remaining activity was assayed with DMC as substrate: C, control (enzyme only). In (E), Stoichiometry of inhibition of rhomb-I by α 2-M. Rhomb-I (1 μ g) was incubated with various amounts of α 2-M at molar ratios indicated on the abscissa [α 2-M:enzyme = 0.25 to 2]. Residual proteinase activity in the mixture was tested with DMC, the ordinate indicates the remaining activity of rhomb-I as a percent of the original activity. In (F), Reduced SDS-PAGE (7.5%) profile of rhomb-I treated with α 2-M. Molar ratios of α 2-M:rhomb-I were 0.25–2. From top to bottom: The band at ~200-kDa may represent a complex of 180-kDa α 2-M subunit with rhomb-I, the main cleavage fragment of ~90-kDa. C, α 2-M control.

the bait region of α 2-M. Also, the peptide: ⁴⁰⁶RREYHTEKLVTSKGD⁴²⁰ corresponding to α -chain Fg was cleaved at K⁴¹³-L⁴¹⁴ bond by the latter and other P-I SVMPs. The band of approximately 200 kDa may be the complex of α 2-M/rhomb-I (Fig. 2F). In addition, rhomb-I underwent autoproteolysis yielding 20- and 11 kDa fragments as evidenced by SDS-PAGE (Fig. 1S, A, supplemental). In connection with these data Western blot analysis using rabbit-anti mut-II IgG reacted with these autoproteolytic fragments (Fig. 1S, B; mut-II is homologous P-I SVMP). Furthermore, direct sequence analysis of the N-terminal of the 11 kDa fragment of rhomb-I (Fig. 1S, A) provided YGNLNTIRT sequence, that is identical to the rhomb-I sequence at position Y20 to T29 (Fig. 3, underlined). Also, the sequence NSVGIVQDHSPKT at position N118 to T130 has been determined from the same 11 kDa fragment (Fig. 3, underlined). A short sequence KPQCILNKP obtained from the sequence of the 20 kDa fragment is located in the C-terminal sequence of rhomb-I at position K193 to P201 (Fig. 3, underlined). In relation to these results, autoproteolysis has been described for other active SVMPs e.g. crotalin from *Crotalus atrox* (Wu et al., 2001) and brevilysin H6 from *Glodius halys brevicaudatus* (Fujimura et al., 2000) among others.

3.2. Structural characterization of rhomb-I

MS/MS spectra analysis of a tryptic digest of the purified rhomb-I

yielded fifteen peptides with homology to SVMPs sequence. A database searches identified these fragments as presented in Table 2S (Supplemental), as well as additional information for the peptide fragments identified by mass spectrometry. The protein sequence data for rhomb-I will appear in the UniProt database under the accession number COHM67. Multiple sequence alignment of mature rhomb-I with other SVMP sequences share a high percentage of identity (Fig. 3). As observed the protease domain presented a C-terminally extended zinc-binding motif, HEXXHXGXXHD, with a hall-mark glycine and a third zinc-binding histidine or aspartate, and a conserved methionine which forms a unique "Met-turn" structure. These results confirm that rhomb-I belongs to P-I class SVMPs. Alignment between rhomb-I with LHF-II (P22796, *L.m.muta*) shows few differences in some residues at positions, 47–49, 53 and 70 (highlight in cyan). As shown in Fig. 3, rhomb-I lacks the N-linked glycosylation site (N-X-S/T) that has Ala 70, while LHF-II has Asn at the same position. The change of Asn by Ala in rhomb-I lead to the loss of a potential N-glycosylation site, thereby treatment rhomb-I with PNGase F did not affect the mobility of the proteinase (Fig. 1S, C).

3.3. Three dimensional model

The theoretical three-dimensional structure of rhomb-I (Fig. 4A–D)

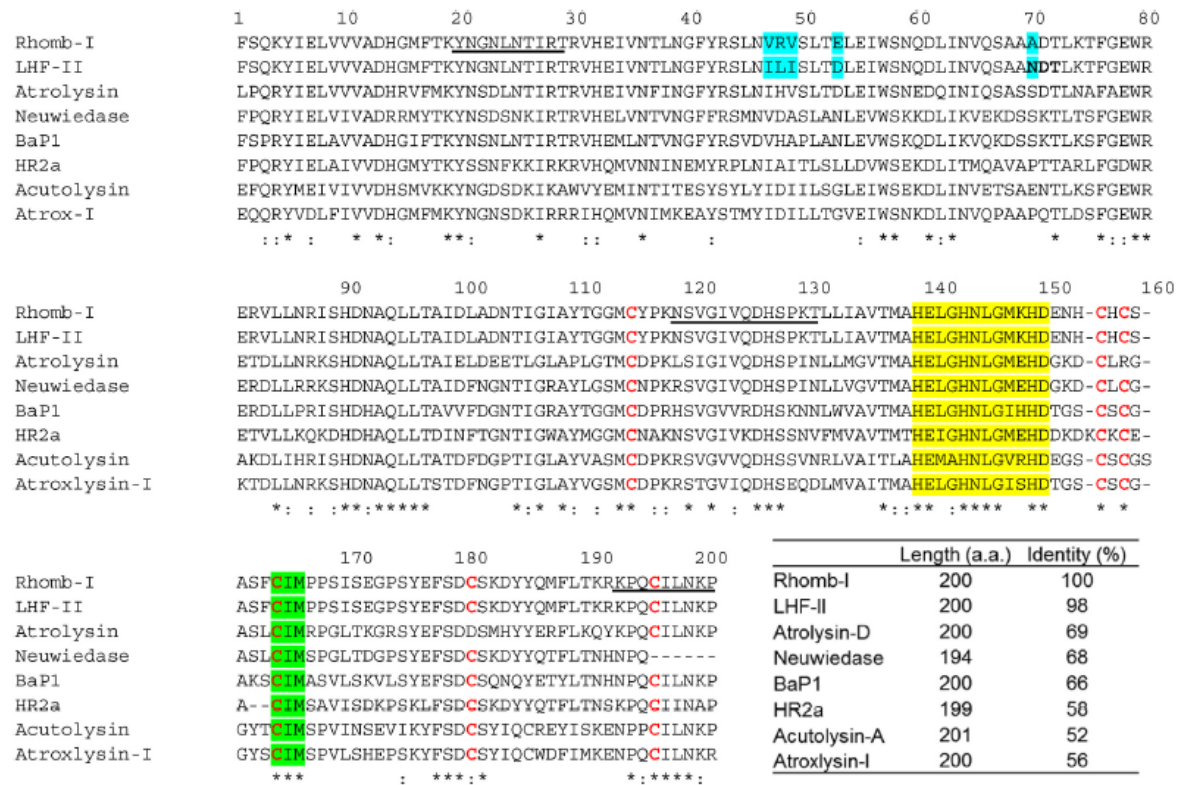


Fig. 3. Alignment of mature protein sequences of rhomb-I with others P-I SVMPs. The GenBank accession number of the sequences used are: LHF-II from *Lachesis muta muta* (P22796), atrolysin from *Crotalus atrox* (P15167), neuwiedase from *Bothrops pauloensis* (Q919R4), BaP1 from *Bothrops asper* (P83512), HR2A from *Protobothrops flavoviridis* (P14530), acutolysin-A from *Deinagkistrodon acutus* (Q9PW35) and atroxlysin-I from *Bothrops atrox* (P85420). (*) identical residues; (.) strongly similar residues; (-) indicate gaps inserted to optimize the sequence identity. The zinc-binding motif and the methionine 165 of the characteristic basement Met-turn, are invariant and highlighted in yellow and green, respectively. The cysteine residues are bold and highlighted in red. The sequences of the autocatalytic fragments of the 11-kDa: YNGNLNLTIRT, NSVGIVQDHSFKT and a short sequence KPQCILNKP of the 20-kDa are underlined. Few differences in amino acid residues of rhomb-I with LHF-II at positions 47–49, 53 and 70 are highlighted in cyan. a.a., amino acids. Sequences were aligned using the CLUSTAL W Program. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

was predicted by the homology modeling (Šali and Blundell, 1993) using as templates: 3GBO (*B. moojeni*), 1DTH (*C. atrox*), 4AIG (*C. adamanteus*), 4Q1L (*B. leucurus*) and 1ND1 (*B. asper*). Appropriate rhomb-I model was generated with Modeller v9.16 (Fiser and Šali, 2003). Analysis of the metal binding sites indicated that the theoretical architecture presents sites for Ca²⁺ and Zn²⁺ binding and are in homology with the used templates. A calcium ion is located on the surface of rhomb-I close to the C-terminus opposite to the catalytic site (Fig. 4B). It is known that catalytic activity of SVMPs depends on the protonation of the zinc-coordinating histidine residues on one hand and on the polarization capacity of the glutamate residue on the other.

3.4. Hydrolysis of plasma and ECM components

Hemorrhage is caused by proteolytic degradation of ECM components of blood vessels and coagulation-relevant serum proteins. Therefore, we assessed the enzymatic effects of rhomb-I on Fg, Fb, FN, VT, and Matrigel. Our data showed that rhomb-I is an α-fibrin (ogen)ase, as the α-chains of Fg and Fb were degraded within 5 and 20 min, respectively, without apparent effect on the β- and γ-chains (Fig. 5A and B). As shown in Fig. 5C, plasma FN was degraded to ~88 kDa band at 0.5 h, with the appearance of three additional fragments of ~59, ~133, and ~140 kDa after 3 h. Similarly, VT was hydrolyzed to a ~53, ~35 and ~25-kDa

products after 1 h incubation (Fig. 5D). To investigate the effect of rhomb-I on several BM proteins, Matrigel was incubated with the enzyme (60 min at 37 °C), and the extent of hydrolysis was analyzed on SDS-PAGE and confirmed by Western blot. Thus, Matrigel was digested into six main products of ~95, ~68, ~61 and ~43 kDa, concomitant with the reduction in the intensity of the protein bands of ~300- and 200 kDa of control (Fig. 6A, lane 1). Conversely, EDTA-treatment of rhomb-I completely abolished its activity (Fig. 6A, lane 2). These results were further analyzed by Western blot with specific antibodies against laminin (LM), type IV collagen, and nidogen (ND). Immunodetection of LM in Matrigel samples with anti-laminin revealed two main protein bands of ~300 and ~200 kDa (C, control sample), likely to representing to LM α1 and β1/γ1 chains, respectively. Rhomb-I cleaved LM chains into fragments of ~101, ~72, and ~56 kDa (Fig. 6B). Likewise, collagen IV, that run as uncleaved band of ~190 kDa (control coll-IV), is degraded into ~55, and ~30 kDa fragments (Fig. 6C). Nidogen antibodies revealed two main bands of ~151, and ~135 kDa (control ND). Under our experimental conditions, the band of ~151 kDa was completely digested, and three fragments of ~130-, ~65 and ~55 kDa were observed (Fig. 6D). Therefore, the results revealed that rhomb-I degrades the main proteins of BM in microvessels. Previous studies with the P-I SVMPs BaP1 from *B. asper* showed similar results, in comparison with a non-hemorrhagic leuc-a (*B. leucurus*) (Escalante

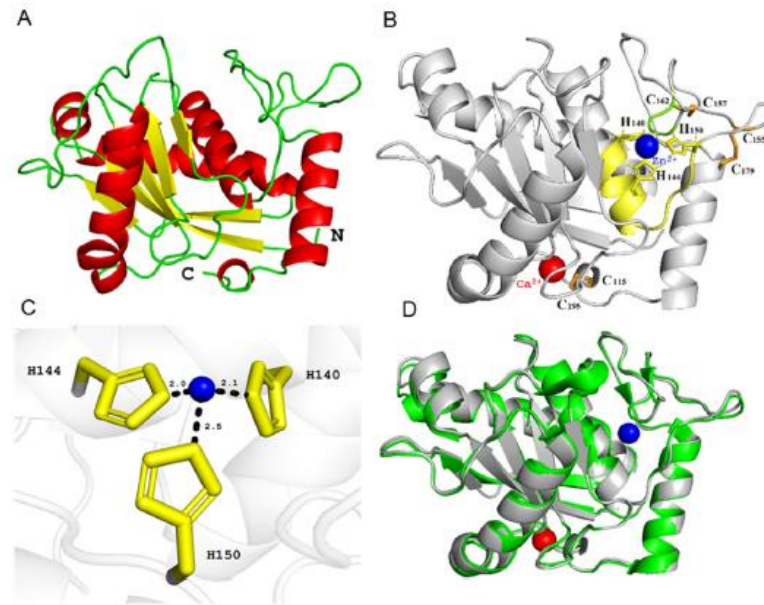


Fig. 4. 3D model of rhomb-I. (A) Final theoretical rhomb-I cartoon model showing alpha helix (red), beta sheet (yellow) and random coil (green); N and C: N-terminal and C-terminal respectively. (B) Functional motif; The conserved zinc binding motif and the met-turn are highlighted in yellow and bright green, respectively. The disulfide bridges are highlighted in orange, the Zn (blue sphere) and Ca (red sphere) cations are shown. (C) Zinc binding motif showing the coordination geometry between histidine residues in the active site and zinc ion is shown as in (B). The interactions are shown in black dashes. (D) Superposition of alpha C of rhomb-I (grey) with the structure of non-hemorrhagic metalloproteinase BmooMPa-I (PDB: 3GBO). The 3D model was generated by the homology criterion with the Modeller v 9.16 program and using five P-III SVMPS-III as templates (3GBO, 1DTH, 4AIG, 4Q1L and 1ND1). The PyMol program was used to visualise the structure. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

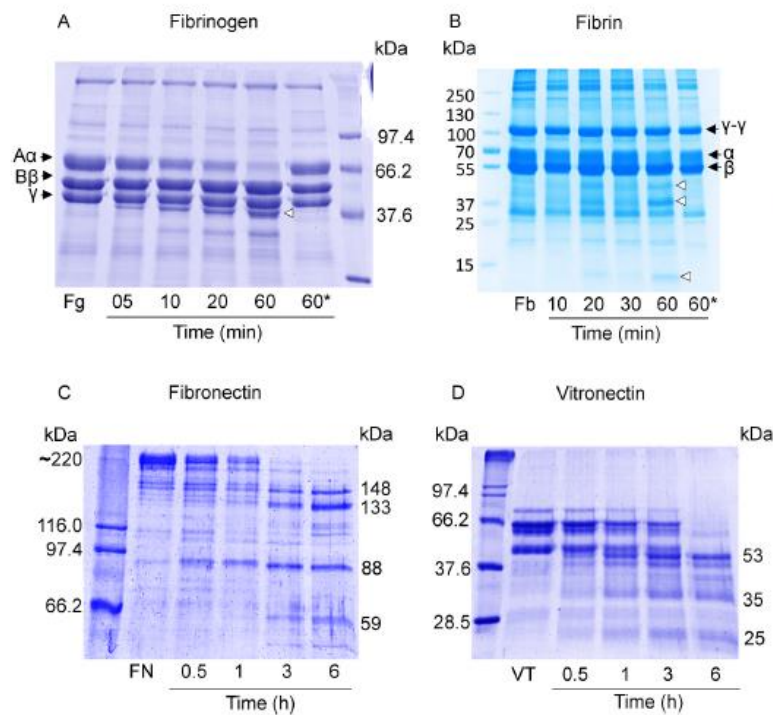


Fig. 5. Proteolysis of isolated plasma proteins by rhomb-I. Reducing SDS-PAGE (12.5% gel) of fibrinogen (Fg, A), fibrin (Fb, B), fibronectin (FN, C) and vitronectin (VT, D) after incubation with rhomb-I at the indicated intervals at 37 °C, at molar ratios of enzyme:substrate of 1:200 for Fg, Fb and FN, and 1:150 for VT. In controls, Fg and Fb were incubated for 60 min or 6 h (FN and VN) without rhomb-I. The reactions were stopped with reduced sample buffer. The polypeptide chains of fibrinogen and fibrin are indicated by black arrow heads. (*) In (A) and (B) rhomb-I was pre-incubated with EDTA (5 mM) for 15 min before the reaction with Fg/Fb. The hydrolysis products are indicated by open arrow heads. In (C) and (D) the main digested products of FN and VT are indicated at the right.

et al., 2011). In this context, rhomb-I probably plays an important role in the rapid tissue damage observed in patients after bites from bushmaster snakes. Moreover, interesting insights to explain the action of P-III SVMPS in comparison with some P-I class underscore the complexity of

the pathology triggered by SVMPS in the microvasculature (Herrera et al., 2016).

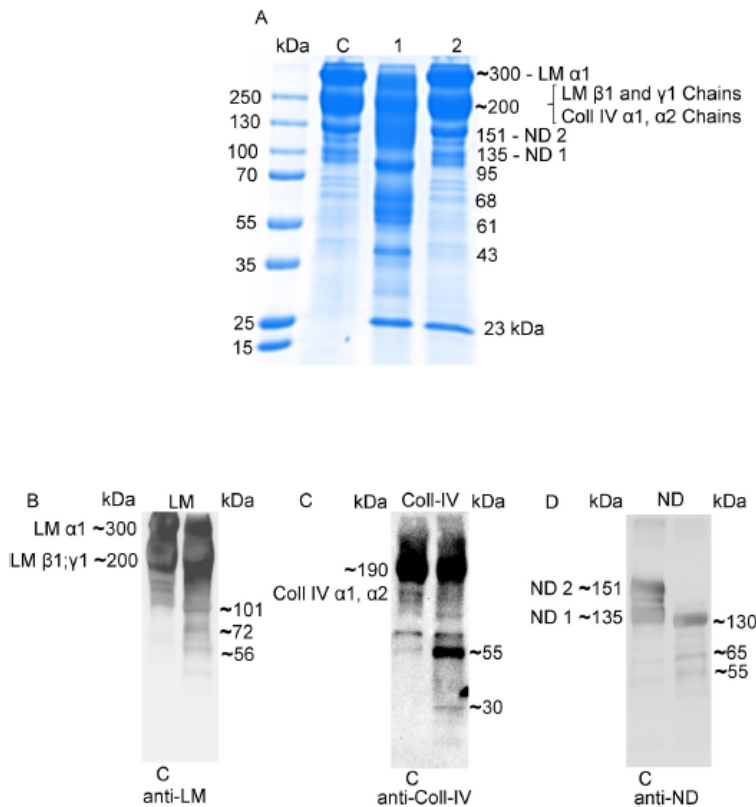


Fig. 6. Effect of rhomb-I on matrigel. (A) Matrigel (50 µg) was incubated with rhomb-I (1 µg) for 1 h at 37 °C (lane 1). Also, matrigel was incubated with pretreated rhomb-I with EDTA (10 mM) for 15 min (lane 2). The control experiment proceeded for 1 h without rhomb-I (lane C). The reaction was stopped by adding reduced sample buffer and boiled for 5 min. Matrigel degradation fragments were electrophoresed on a 7–15% gel under reducing conditions, transferred on the cellulose membrane and detected with (B) anti-laminin, (C) anti-collagen IV and (D) anti-nidogen antibodies, and subsequently with protein G peroxidase conjugated (1:5000 dilution). In controls C are indicated the approximate molecular mass of the laminin chains (LM α1 ~300 kDa, LM β1 and γ1 ~200 kDa), collagen IV (Coll IV α-1 and α-2 ~190 kDa), and nidogen (ND 1–135 kDa, ND 2–151 kDa), respectively. The degradation products and their apparent molecular masses are indicated at the right. The results are representative of three similar experiments.

3.5. Platelet aggregation studies

Platelets are essential contributors to hemostasis and to pathological arterial thrombus formation, and are targeted by SVMPs. To assess the effects of rhomb-I on platelet activation and aggregation, human PRP or WPs were pretreated with rhomb-I. Thereafter, we evaluated their response to ADP, vWF plus ristocetin, CVX and collagen by aggregometry. PRP pretreated with rhomb-I (0.3–2.4 µM) for 3 min at 37 °C were not influenced in their aggregation triggered by ADP- or CVX (Fig. 7A and B). However, at high concentration (above 2.4 µM), ristocetin-induced aggregation was profoundly impaired (Fig. 7C). When washed platelets were used, low concentrations of rhomb-I exhibited a marked inhibitory effect on ristocetin-caused aggregation in the presence of vWF (5.5 µg), with half-maximal inhibition concentration (IC_{50}) value of 0.21 µM (Fig. 7F), indicating that also plasma component, most likely vWF, was affected by treatment of rhomb-I. In contrast, platelet aggregation triggered by collagen was only slightly delayed but not inhibited irrespective of whether PRP (data not shown) or WPs were used (Fig. 7D). Similar results were previously reported for a non-hemorrhagic P-I SVMPs, mut-II from *L.m.muta* (Sanchez et al., 2021) and bar-I from *B. barnetti* snake venoms (Sanchez et al., 2016). Moreover, pre-incubation of WPs with rhomb-I clearly abolished CVX-induced activation and aggregation (IC_{50} = 0.29 µM) as shown in Fig. 7E. By contrast, rhomb-I failed to inhibit aggregation induced by CVX in PRP (Fig. 7B). In line with this collagen stimulation of platelets was mediated via both $\alpha 2\beta 1$ and GPVI, while CVX targeted GPVI but not the integrin $\alpha 2\beta 1$, suggesting that GPVI may be a target of proteolysis by rhomb-I.

To elucidate the inhibitory effect of rhomb-I on the vWF-induced aggregation of PRP and WPs and on CVX-triggered aggregation in WPs, we examined if rhomb-I affected the signaling receptors, glycoprotein (GP)VI and GPIb α . GPVI which binds collagen and GPIb α of the GPIb-IX-V complex binds vWF and other ligands, and operate in concert to mediate platelet adhesion and activation events under a number of blood rheological conditions found in the vasculature (Montague et al., 2018). The levels of these receptors were reported to be regulated by shedding, mainly induced by ADAMs (ADAM10 and ADAM17). These metalloproteases cleave the receptors to release an ectodomain product into the plasma where they act as potential markers or modulators (Andrews et al., 2007; Montague et al., 2018). From the evolutionary viewpoint and biochemical properties it is a notably issue to elucidate why SVMPs and ADAMs have a similar specificity for GPIb α , vWF and/or GPVI.

Intact vWF circulates in plasma as a multimeric structure of approx. 270 kDa subunits as shown in Fig. 8A vWF A domains are involved in cell adhesion and are also found in ECM proteins and integrin receptors (Whittaker and Hynes, 2002), being critical for thrombus formation at high shear stress in hemostasis and thrombosis. The GPIb-IX-V-binding site on vWF is located within the vWF A1 domain. Incubation of the subunit molecule of vWF with rhomb-I (1 µg) 60 min at 37 °C, resulted in the complete degradation of the ~270 kDa multimers, to generate the low Mr subunits of ~110, ~90, ~66 and 35 kDa as showed by reduced SDS-PAGE (Fig. 8A). Such a degradation of the vWF multimeric molecule was not observed in EDTA-treated rhomb-I (data not shown). A band of ~35 kDa was conspicuously absent in the control vWF and appeared after incubation of vWF with rhomb-I, which may correspond

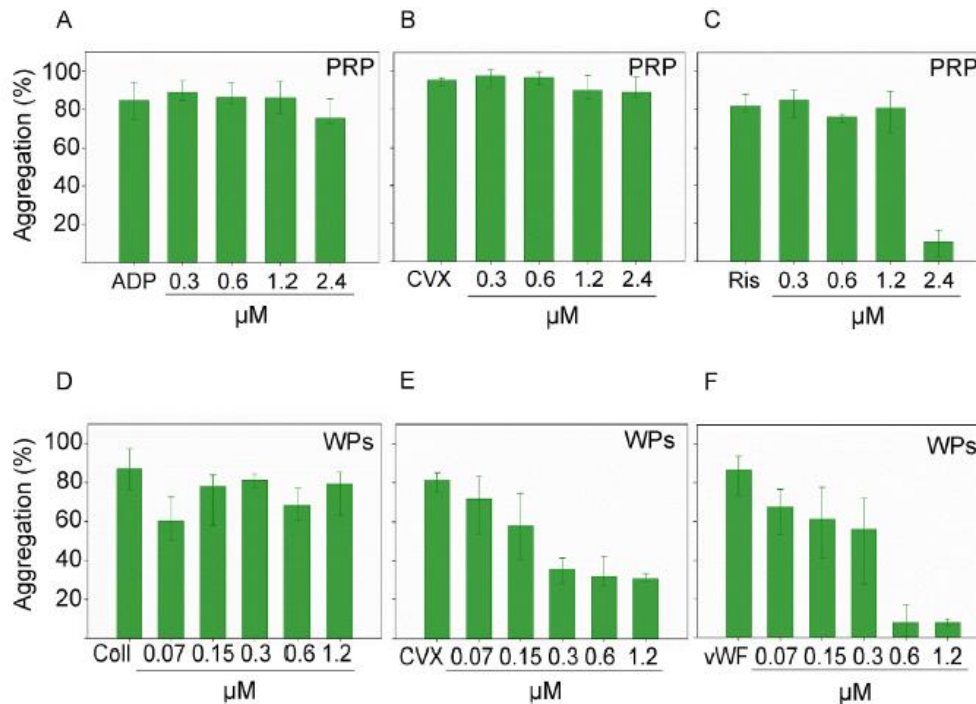


Fig. 7. Effect of rhomb-I on platelet aggregation of PRP and washed platelets (WPs). PRP (225 μL) or WPs (225 μL , $2.5 \times 10^5/\mu\text{L}$) were pre incubated with rhomb-I at variable concentrations (0.3–4.8 μM using PRP or 0.07–1.2 μM with WPs), for 3 min under stirring at 600 rpm at 37 $^{\circ}\text{C}$, before addition agonists to elicit aggregation; (A) ADP (10 μM), (B) convulxin (CVX, 50 μg), (C) ristocetin (Ris, 0.5 mg/ml), (D) collagen-I (10 $\mu\text{g/ml}$), (E) CVX (50 μg) and (F) vWF (5.5 $\mu\text{g/ml}$) plus Ris (0.5 mg/ml). Mean \pm standard deviation are shown. Rhomb-I inhibits aggregation of platelets in PRP triggered by Ris at concentration above 2.4 μM . Also, rhomb-I blocks aggregation of WPs stimulated with CVX and vWF, with an IC_{50} values of 0.29 μM and 0.21 μM , respectively. Data are presented as percentage of control and are mean \pm standard deviation.

to vWF-A1 domain (~ 35 kDa), as shown by reduced SDS-PAGE and proved by Western blot with anti-mouse-rvWF-A1 domain-IgG (Fig. 8B). Furthermore, a band of ~ 27 kDa appeared after incubation of rvWF-A1-domain (~ 35 kDa) with rhomb-I, as observed by reduced SDS-PAGE and proved by immunoblotting assay (Fig. 8B, left and right panel). Under similar experimental conditions, differences were detected between P-I SVMPs: rhomb-I (hemorrhagic) and a non-hemorrhagic, mut-II, the last proteinase exhibited low cleavage rates on vWF, and on rvWF-A1-domain (Sanchez et al., 2021). Therefore, we analyzed the properties of vWF-GPIIb axis after rhomb-I incubation of platelets at 37 $^{\circ}\text{C}$. To this end, a platelet lysate was separated by SDS-PAGE and assayed for GPIIb fragments by Western blot with CD42b/GPIIb-antibody. Intact GPIIb (140 kDa) was cleaved by rhomb-I to release two soluble products of ~ 130 kDa (glycocalicin) and ~ 35 kDa which were observed in total cell lysates and in supernatants as revealed by immunoblot with anti-human CD42b/GPIIb-antibody (Fig. 8C, upper and lower panel). The band of ~ 35 kDa was also detected by homologous non-hemorrhagic SVMP kistomin, and suggests that the metalloproteinase cleaved GPVI near the mucin-like region (Hsu et al., 2008). Moreover, a band of ~ 45 kDa was released by endogenous metalloproteinases (ADAMs), but not by SVMP rhomb-I. The reason for this discrepancy remains to be elucidated. On the other hand, the collagen receptor GPVI was cleaved primarily by ADAM10, to shed a soluble ~ 55 kDa ectodomain (sGPVI) and a ~ 10 kDa cytoplasmic domain product. Incubation of platelet lysate with rhomb-I resulted in the release of a soluble 55 kDa and an additional band of ~ 45 kDa. The ~ 45 kDa fragment was not released by endogenous ADAM10 (Fig. 8D). In addition, Co^{2+} -treated rhomb-I reduced the shed of soluble forms of the two

receptors (Fig. 8 C and D). In connection with this, the antiplatelet properties of rhomb-I are similar to other SVMPs, e.g. mut-II which acts by shedding GPVI (Sanchez et al., 2021). However, the platelet-inhibiting effects via proteolytic cleavage of GPIIb and GPVI may not distinguish between hemorrhagic (rhomb-I) and non-hemorrhagic P-I SVMPs (e.g. mut-II). This hypothesis merits further investigation. Low levels of GPVI, caused by deficiency or disease, enhance ADAM10-mediated shedding together with elevated plasma sGPVI, and is associated with a high risk of bleeding (Montague et al., 2018) as characterized by the pathology of snakebite envenoming by bushmaster and other vipers (Souza et al., 2007; Montague et al., 2018). It has been speculated that the physiological role of shedding is to limit platelet activation in intact vessels, mainly under high shear (Rayes et al., 2019). To test this hypothesis, rhomb-I (5 μg) was added to WPs (15 μL) for 30 min at 37 $^{\circ}\text{C}$, then subjected to SDS-PAGE (7–15% gel) and electroblotted onto a nitrocellulose membrane. Thereafter, platelet lysates and supernatants were immunoblotted with anti-GPIIb-antibody or anti-GPVI antibody. As shown in Fig. 8E, rhomb-I strongly bound to both platelet receptors (Fig. 8E, left and right panel). Taken together these results indicate that rhomb-I binds to and cleaves GPIIb and GPVI.

4. Conclusions

This study provides important structural and biological properties of the metalloproteinase rhomb-I from *L. m. rhombeata* venom, which strongly affects vWF, essential for hemostasis, and the platelet receptors, GPIIb and GPVI, thereby affecting vascular permeability and platelet aggregation. In addition, rhomb-I contributes to toxicity through local

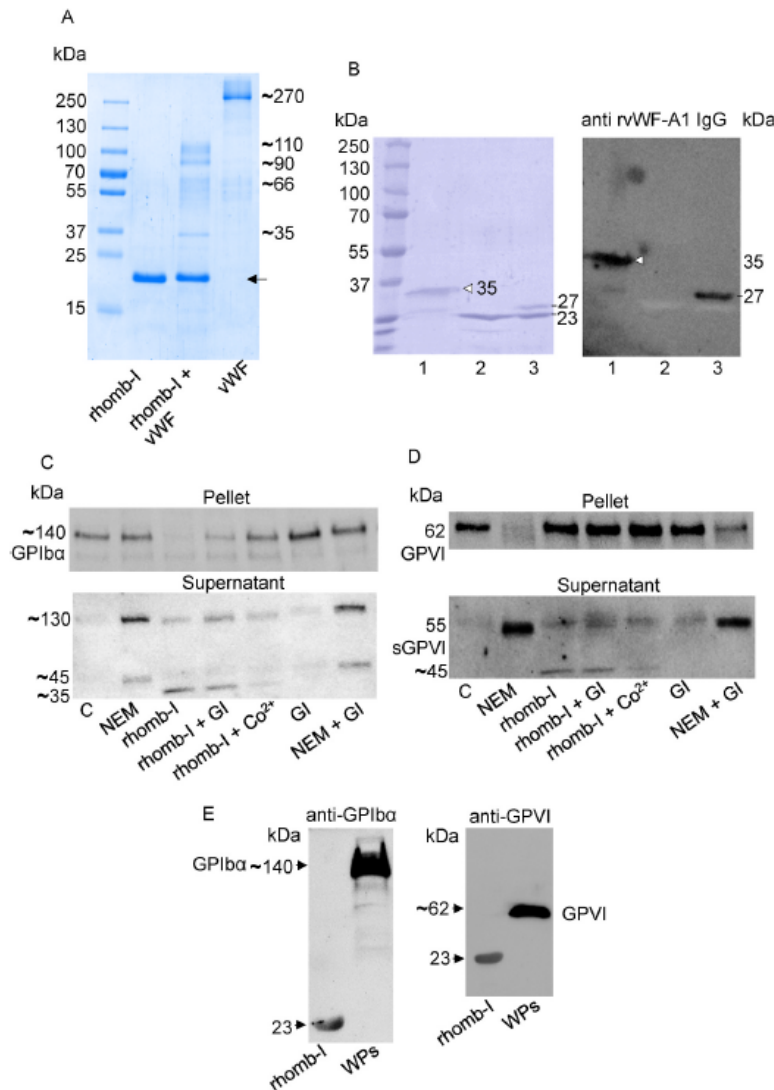


Fig. 8. Antiplatelet effect of rhomb-I assay by immunoblotting upon commercial vWF, its recombinant A1 domain and platelet surface glycoproteins (GPIIb/IIIa and GPVI). (A) Cleavage of vWF (4 µg) after incubation with rhomb-I (1 µg). Degradation fragments were analyzed by SDS-PAGE (7.5% gel) under reducing conditions. Controls, rhomb-I and commercial vWF (~270 kDa) are shown. (B) rvWF-A1 domain (10 µg) incubated with rhomb-I (5 µg) were subjected to SDS PAGE (12.5% gel) under reducing conditions followed by immunoblotting with anti-rvWF-A1 domain antibody recognizing the rvWF-A1 domain (open arrow head, ~35-kDa) and a product of ~27-kDa. The band of 23-kDa is rhomb-I (lane 2 and 3 in B). (C) Immunoblot with anti-GPIIb/IIIa antibody or (D) with anti-GPVI antibody of platelets pellet or supernatant of washed platelets ($5 \times 10^5/\mu\text{L}$) treated with: NEM (0.1 mM), rhomb-I (2 µg), rhomb-I plus GI254023X (GI, 100 nM), rhomb-I plus Co^{2+} (10 mM), GI254023X (GI, 100 nM), and NEM (0.1 mM) plus GI254023X (GI, 100 nM). (E) rhomb-I binds to the receptors GPIIb/IIIa and GPVI, rhomb-I (5 µg) were added in 15 µl of WPs ($5 \times 10^5/\mu\text{L}$). The reactions were stopped with sample buffer (1:1, v/v) and boiling for 5 min. WPs without treatment were used as positive control. The samples were subjected to SDS-PAGE (7.5–15%), transferred to nitrocellulose membrane followed by immunoblotting with anti-GPIIb/IIIa or anti-GPVI antibodies. Each experiment in panels B, C, D and E is representative of four similar experiments.

damage and, more importantly, systemic changes. These include hemorrhage and consumption-induced coagulopathy, cardiovascular collapse and autonomic nervous system changes caused by bushmaster venom directly or indirectly related to SVMPs. Even more difficult is understanding the detailed molecular determinants of protein-protein binding of SVMPs to induce severe bleeding, which remains elusive.

Credit authors statement

EFS, VGA, LSO, GOS, DVR, designed the study and performed experiments; EFS, AMMS, VGA, RS, MHB, DVR, JAE, conceptualization, resources, analyzed and interpreted data, EFS; writing-original draft preparation, EFS, AMMS and JAE; writing-review and editing. All the authors contributed equally to the draft revisions and approved the manuscript.

Funding

This work was supported by Brazilian Agencies: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, grant # APQ-01724-18), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grants #: 301,326/2018-5, 309,823-8), Programa Nacional de Investigación Científica y Estudios Avanzados (PROCIENCIA: grant 079-2021-FONDECYT). VGA is a recipient of CAPES, grant # 88882442320/19. EFS and AMMS are recipients of CNPq-PQ. JAE is financially supported by the German Research Foundation (DFG – Project-ID, 194468054 – SFB 1009 project A09) and by the Interdisciplinary Center of Clinical Research (IZKF grant: Ebl-A/009/21). This study is part of the PhD Thesis of VGA at Science-Toxinology Course of Butantan Institute, SP.

Ethical statement

Authors declare that the data contained in this study are original.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

The authors would like to thank Prof. Solange M. T. Serrano, Butantan Institute for MS/Ms analysis of rhomb-I autoproteolytic fragments.

Appendix B. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2023.107097>.

References

- Andrews, R.K., Karunakaran, D., Gardiner, E.E., Berndt, M.C., 2007. Platelet receptor proteolysis: a mechanism for downregulating platelet reactivity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27 (7), 1511–1520. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.141390>.
- Bello, C.A., Hemogenes, A.L.N., Magalhaes, A., Veiga, S.S., Gremski, L.H., Richardson, M., Sanchez, E.F., 2006. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (White-tailed jararaca) snake venom. *Biochimie* 88 (2), 189–200. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.07.008>.
- Brust, A., Sunagar, K., Undheim, E.A.B., Vetter, I., Yang, D.C., Casewell, N.R., Jackson, T. N.W., Koludarov, I., Alewood, P.F., Hodgson, W.C., Lewis, R.J., King, G.F., Antunes, A., Hendriks, I., Fry, B.G., 2013. Differential evolution and neofunctionalization of snake venom metalloprotease domains. *Mol. Cell. Proteomics* 12 (3), 651–663. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.023135>.
- Calvete, J.J., 2011. Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. *Expert Rev. Proteomics* 8 (6), 739–758. <https://doi.org/10.1586/epc.11.61>.
- Campbell, J.A., Lamar, W.W., 2004. *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Comstock Pub. Associates.
- Casewell, N.R., Wagstaff, S.C., Harrison, R.A., Renjifo, C., Wuster, W., 2011. Domain loss facilitates accelerated evolution and neofunctionalization of duplicate snake venom metalloproteinase toxin genes. *Mol. Biol. Evol.* 28 (9), 2637–2649. <https://doi.org/10.1093/molbev/mar091>.
- Casewell, N.R., Wüster, W., Vonk, F.J., Harrison, R.A., Fry, B.G., 2013. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. *Trends Ecol. Evol.* 28 (4), 219–229. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.10.020>.
- Chippaux, J.-P., 2017. Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 11 (6), e0005662. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005662>.
- Cordeiro, F.A., Coutinho, B.M., Wiesel, G.A., Borlon, K. de C.F., Bregge-Silva, C., Rosa-Garzon, N.G., Cabral, H., Ueberheide, B., Arantes, E.C., 2018. Purification and enzymatic characterization of a novel metalloprotease from *Lachesis muta rhombata* snake venom. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 24 (1), 32. <https://doi.org/10.1186/s40409-018-0171-x>.
- Damico, D.C.S., Bueno, L.G.F., Rodrigues-Simioni, L., Marangoni, S., da Cruz-Höfling, M. A., Novello, J.C., 2006. Functional characterization of a basic D49 phospholipase A2 (Lmtr-i) from the venom of the snake *Lachesis muta muta* (Bushmaster). *Toxicon* 47 (7), 759–765. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.02.007>.
- Delano, W.S., 2002. The PyMOL Molecular Graphics System. De Lano Scientific, San Carlos, CA. <http://www.pymol.org>.
- Escalante, T., Ortiz, N., Rucavado, A., Sanchez, E.F., Richardson, M., Fox, J.W., Gutiérrez, J.M., 2011. Role of collagens and perlecan in microvascular stability: exploring the mechanism of capillary vessel damage by snake venom metalloproteinases. *PLoS One* 6 (12), e28017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028017>.
- Estêvão-Costa, M.L., Diniz, C.R., Magalhães, A., Markland, F.S., Sanchez, E.F., 2000. Action of metalloproteinases mutalysin I and II on several components of the hemostatic and fibrinolytic systems. *Thromb. Res.* 99 (4), 363–376. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(00\)00259-0](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(00)00259-0).
- Felicioni, L.F., Souza, C.T., Velarú, D.T., Magalhães, A., Almeida, A.P., Figueiredo, S., Richardson, M., Diniz, C.R., Sanchez, E.F., 2003. Kallikrein-like proteinase from bushmaster snake venom. *Protein Expr. Purif.* 30 (1), 32–42. [https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(03\)00053-6](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(03)00053-6).
- Fiser, A., Šali, A., 2003. Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. *Methods Enzymol.* 374, 461–491. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)74020-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)74020-8). Elsevier.
- Fox, J.W., Serrano, S.M.T., 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 repolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* 45 (8), 969–985. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.012>.
- Fry, B.G., Scheib, H., van der Weerd, L., Young, B., McNaughtan, J., Ramjan, S.F.R., Vidal, N., Poelmann, R.E., Norman, J.A., 2008. Evolution of an arsenal. *Mol. Cell. Proteomics* 7 (2), 215–246. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700094-MCP200>.
- Fujimura, S., Oshikawa, K., Terada, S., Kimoto, E., 2000. Primary structure and autoproteolysis of brevilysin h6 from the venom of *Gloydius halys brevicaudus*. *J. Biochem.* 128 (2), 167–173. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022737>.
- Fuly, A.L., Calil-Elias, S., Zingali, R.B., Guimaraes, J.A., Melo, P.A., 2000. Myotoxic activity of an acidic phospholipase A2 isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. *Toxicon* 38 (7), 961–972. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(99\)00208-1](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(99)00208-1).
- Gomis-Rüth, F.X., 2003. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Mol. Biotechnol.* 24 (2), 157–202. <https://doi.org/10.1385/MB:24:2:157>.
- Grover, S.P., Bergmeier, W., Mackman, N., 2018. Platelet signaling pathways and new inhibitors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 38 (4). <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.310224>.
- Herrera, C., Voisin, M.-B., Escalante, T., Rucavado, A., Nourshargh, S., Gutiérrez, J.M., 2016. Effects of PI and PIII snake venom haemorrhagic metalloproteinases on the microvasculature: a confocal microscopy study on the mouse cremaster muscle. *PLoS One* 11 (12), e0160643. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160643>.
- Hsu, C.C., Wu, W.B., Huang, T.F., 2008. A snake venom metalloproteinase, kistomin, cleaves platelet glycoprotein VI and impairs platelet functions. *J. Thromb. Haemostasis*. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03071.x>.
- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K., 1996. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 14 (1), 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
- Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., Ching, A.T.C., Carvalho, E., Faria, F., Nishiyama, M.Y., Ho, P.L., Diniz, M.R.V., 2006. *Lachesis muta* (Viperidae) cDNAs reveal diverging pit viper molecules and scaffolds typical of cobra (Elapidae) venoms: implications for snake toxin repertoire evolution. *Genetics* 173 (2), 877–889. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.056515>.
- Kini, R., Koh, C., 2016. Metalloproteinases affecting blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation from snake venoms: definition and nomenclature of interaction sites. *Toxins* 8 (10), 284. <https://doi.org/10.3390/toxins8100284>.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature* 227 (5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- LeBlou, V.S., MacDonald, B., Kalluri, R., 2007. Structure and function of basement membranes. *Exp. Biol. Med.* 232 (9), 1121–1129. <https://doi.org/10.3181/0703-MR-72>.
- Madrigal, M., Sanz, L., Flores-Díaz, M., Sasa, M., Núñez, V., Alape-Girón, A., Calvete, J.J., 2012. Snake venomomics across genus *Lachesis*. Ontogenetic changes in the venom composition of *Lachesis stenophrys* and comparative proteomics of the venoms of adult *Lachesis melanocephala* and *Lachesis acrochorda*. *J. Proteomics* 77, 280–297. <https://doi.org/10.1016/j.jpro.2012.09.003>.
- Magalhães, A., Ferreira, R.N., Richardson, M., Gontijo, S., Yarleque, A., Magalhães, H.P. B., Bloch, C., Sanchez, E.F., 2003. Coagulant thrombin-like enzymes from the venoms of Brazilian and Peruvian bushmaster (*Lachesis muta muta*) snakes. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 136 (2), 255–266. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(03\)00202-1](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(03)00202-1).
- Montague, S.J., Andrews, R.K., Gardiner, E.E., 2018. Mechanisms of receptor shedding in platelets. *Blood* 132 (24), 2535–2545. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-03-742660>.
- Moura-da-Silva, A., Almeida, M., Portes-Junior, J., Nicolau, C., Gomes-Neto, F., Valente, R., 2016. Processing of snake venom metalloproteinases: generation of toxin diversity and enzyme inactivation. *Toxins* 8 (6), 183. <https://doi.org/10.3390/toxins8060183>.
- Moura-da-Silva, A.M., Theakston, R.D.G., Crampton, J.M., 1996. Evolution of disintegrin cysteine-rich and mammalian matrix-degrading metalloproteinases: gene duplication and divergence of a common ancestor rather than convergent evolution. *J. Mol. Evol.* 43 (3), 263–269. <https://doi.org/10.1007/BF02338834>.
- Nachtigall, P.G., Freitas-de-Sousa, L.A., Mason, A.J., Moura-da-Silva, A.M., Grazziotin, F. G., Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., 2022. Differences in pla 2 constitution distinguish the venom of two endemic Brazilian mountain lanceheads, *Bothrops cotiara* and *Bothrops fonscolombei*. *Toxins* 14 (4), 237. <https://doi.org/10.3390/toxins14040237>.
- Nagase, H., Woessner, J.F., 1999. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274 (31), 21491–21494. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.31.21491>.
- Naumann, G.B., Silva, L.F., Silva, L., Faria, G., Richardson, M., Evangelista, K., Kohlhoff, M., Gontijo, C.M.F., Navdaev, A., de Rezende, F.F., Eble, J.A., Sanchez, E. F., 2011. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an L-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* 1810 (7), 683–694. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.04.003>.
- Oliveira, L.S., Estêvão-Costa, M.L., Alvarenga, V.G., Vivas-Ruiz, D.E., Yarleque, A., Lima, A.M., Cavaco, A., Eble, J.A., Sanchez, E.F., 2019. Atrolysin-III, a metalloproteinase from the venom of the peruvian pit viper snake *Bothrops atrox* (Jergón) induces glycoprotein VI shedding and impairs platelet function. *Molecules* 24 (19), 3489. <https://doi.org/10.3390/molecules24193489>.

- Pla, D., Sanz, L., Molina-Sánchez, P., Zorita, V., Madrigal, M., Flores-Díaz, M., Alape-Girón, A., Núñez, V., Andrés, V., Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., 2013. Snake venomomics of *Lachesis muta rhombata* and genus-wide antivenomics assessment of the paraspecific immunoreactivity of two antivenoms: evidence of the high compositional and immunological conservation across Lachesis. *J. Proteomics* 89, 112–123. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.028>.
- Polgár, J., Clemetson, J.M., Kehrel, B.E., Wiedemann, M., Magnenat, E.M., Wells, T.N.C., Clemetson, K.J., 1997. Platelet activation and signal transduction by convulxin, a c-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (Tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor. *J. Biol. Chem.* 272 (21), 13576–13583. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.21.13576>.
- Rayes, J., Watson, S.P., Nieswandt, B., 2019. Functional significance of the platelet immune receptors GPVI and CLEC-2. *J. Clin. Invest.* 129 (1), 12–23. <https://doi.org/10.1172/JCI122955>.
- Šali, A., Blundell, T.L., 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234 (3), 779–815. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1626>.
- Sanchez, E.F., 2004. Mutalysins. In: Barret, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes*, second ed. Elsevier Ltd, pp. 32–42.
- Sanchez, E.F., Felicori, L.F., Chavez-Olortegui, C., Magalhães, H.B.P., Hemogenes, A.L., Diniz, M.V., Junqueira-de-Azevedo, I. de L.M., Magalhães, A., Richardson, M., 2006. Biochemical characterization and molecular cloning of a plasminogen activator proteinase (Lv-pa) from bushmaster snake venom. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* 1760 (12), 1762–1771. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.08.023>.
- Sanchez, E.F., Freitas, T.V., Ferreira-Alves, D.L., Velarde, D.T., Diniz, M.R., Cordeiro, M. N., Agostini-Cotta, G., Diniz, C.R., 1992. Biological activities of venoms from South American snakes. *Toxicon* 30 (1), 95–103. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(92\)90505-Y](https://doi.org/10.1016/0041-0101(92)90505-Y).
- Sanchez, E.F., Richardson, M., Gremski, L.H., Veiga, S.S., Yarleque, A., Niland, S., Lima, A.M., Estevo-Costa, M.I., Eble, J.A., 2016. A novel fibrinolytic metalloproteinase, barnettysin-1 from *Bothrops barnetti* (Barnett's pitviper) snake venom with anti-platelet properties. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* 1860 (3), 542–556. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.12.021>.
- Sanchez, E.F., Santos, C.I., Magalhães, A., Diniz, C.R., Figueiredo, S., Gilroy, J., Richardson, M., 2000. Isolation of a proteinase with plasminogen-activating activity from *Lachesis muta muta* (Bushmaster) snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 378 (1), 131–141. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1781>.
- Sanchez, E., Flores-Ortiz, R., Alvarenga, V., Eble, J.A., 2017. Direct fibrinolytic snake venom metalloproteinases affecting hemostasis: structural, biochemical features and therapeutic potential. *Toxins* 9 (12), 392. <https://doi.org/10.3390/toxins9120392>.
- Sanchez, Eladio F., Alvarenga, Valeria G., Oliveira, Luciana S., Oliveira, Débora L., Estevo-Costa, Maria I., Flores-Ortiz, R., Eble, Johannes A., 2021. A fibrinolytic snake venom metalloproteinase, mutalysin-II, with antiplatelet activity and targeting capability toward glycoprotein GPIIb/IIIa and glycoprotein GPVI. *Biochimie* 184, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.01.016>.
- Sanz, L., Escolano, J., Ferretti, M., Biscoglio, M.J., Rivera, E., Crescenti, E.J., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., 2008. Snake venomomics of the South and Central American Bushmasters. Comparison of the toxin composition of *Lachesis muta* gathered from proteomic versus transcriptomic analysis. *J. Proteomics* 71 (1), 46–60. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2007.10.004>.
- Serrano, S.M.T., Shannon, J.D., Wang, D., Camargo, A.C.M., Fox, J.W., 2005. A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: an approach to understanding venom proteomics. *Proteomics* 5 (2), 501–510. <https://doi.org/10.1002/pmic.200400931>.
- Slagboom, J., Kool, J., Harrison, R.A., Casewell, N.R., 2017. Haemotoxic snake venoms: their functional activity, impact on snakebite victims and pharmaceutical promise. *Br. J. Haematol.* 177 (6), 947–959. <https://doi.org/10.1111/bjh.14591>.
- Souza, R.C.G., Nogueira, A.P.B., Lima, T., Cardoso, J.L.C., 2007. The enigma of the North margin of the Amazon River: proven *Lachesis* bites in Brazil, report of two cases, general considerations about the genus and bibliographic review. *Bull. Chic. Herpetol. Soc.* 42 (7), 105–115.
- Stephano, M.A., Guidolin, R., Higashi, H.G., Tambourgi, D.V., Sant'Anna, O.A., 2005. The improvement of the therapeutic anti-*Lachesis muta* serum production in horses. *Toxicon* 45 (4), 467–473. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.12.006>.
- Takeda, S., 2016. ADAM and ADAMTS family proteins and snake venom metalloproteinases: a structural overview. *Toxins* 8 (5), 155. <https://doi.org/10.3390/toxins8050155>.
- Takeda, S., Igarashi, T., Mori, H., Araki, S., 2006. Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. *EMBO J.* 25 (11), 2388–2396. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601131>.
- Tanus Jorge, M., Sano-Martins, S., Tomy, I.C., Castro, S.C.B., S.A. Ferrari, R., Ribeiro, Adriano, L., A. Warrell, D., 1997. Snakebite by the bushmaster (*Lachesis muta*) in Brazil: case report and review of the literature. *Toxicon* 35 (4), 545–554. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(96\)00142-0](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(96)00142-0).
- Torres, R., Jaime, R., Torres, A., María, A., Arroyo-Parejo, Max, A., 1995. Coagulation disorders in bushmaster envenomation. *Lancet* 346 (8972), 449–450. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(95\)92325-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(95)92325-1).
- Vetter, I., Davis, J.L., Rash, L.D., Anangi, R., Mobli, M., Alewood, P.F., Lewis, R.J., King, G.F., 2011. Venomics: a new paradigm for natural products-based drug discovery. *Amino Acids* 40 (1), 15–28. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0516-4>.
- Vilahur, G., Gutiérrez, M., Arzanauskaitė, M., Mendieta, G., Ben-Aicha, S., Badimon, L., 2018. Intracellular platelet signalling as a target for drug development. *Vasc. Pharmacol.* 111, 22–25. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2018.08.007>.
- Weinberg, M.L.D., Felicori, L.F., Bello, C.A., Magalhães, H.P.B., Almeida, A.P., Magalhães, A., Sanchez, E.F., 2004. Biochemical properties of a bushmaster snake venom serine proteinase (LV-KA), and its kinin releasing activity evaluated in rat mesenteric arterial rings. *J. Pharmacol. Sci.* 96 (3), 333–342. <https://doi.org/10.1254/jphs.FPJ04005X>.
- Whittaker, C.A., Hynes, R.O., 2002. Distribution and evolution of von willebrand/integrin domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol. Biol. Cell* 13 (10), 3369–3387. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-05-0259>.
- Wiesel, G.A., Bordon, K.C., Silva, R.R., Gomes, M.S., Cabral, H., Rodrigues, V.M., Ueberheide, B., Arantes, E.C., 2019. Subproteome of *Lachesis muta rhombata* venom and preliminary studies on LmrSP-4, a novel snake venom serine proteinase. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 25, e147018. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-jvattid-1470-18>.
- Wu, W.-B., Peng, H.-C., Huang, T.-F., 2001. Crotalin, a vWF and GP IIb cleaving metalloproteinase from venom of *Crotalus atrox*. *Thromb. Haemostasis* 86 (12), 1501–1511. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1616755>.

ANEXO A - OUTRAS PARTICIPAÇÕES EM TRABALHOS DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO

Sanchez, Eladio.F.; Alvarenga, Valeria.G.; Oliveira, Luciana.S.; Oliveira, Débora.L.; Estevao-Costa, Maria.I.; Flores-Ortiz, Renzo; Eble, Johannes.A. A fibrinolytic snake venom metalloproteinase, mutalysin-II, with antiplatelet activity and targeting capability toward glycoprotein GPIb α and glycoprotein GPVI. *BIOCHIMIE.* v.184, p.1 - 7, 2021.

Vivas-Ruiz, Dan E.; Sandoval, Gustavo A.; Gonzalez-Kozlova, Edgar; Zarría-Romero, Jacquelyne; Lazo, Fanny; Rodríguez, Edith; Magalhães, Henrique P.B.; Chávez-Olortegui, Carlos; Oliveira, Luciana S.; Alvarenga, Valeria G.; Urra, Félix A.; Toledo, Jorge; Yarlequé, Armando; Eble, Johannes A.; Sanchez, Eladio F. Fibrinogen-clotting enzyme, pictobin, from *Bothrops pictus* snake venom. Structural and functional characterization. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES.*, v.153,p.779 - 795, 2020.

Oliveira, Luciana S.; Estevão-Costa, Maria Inácia; Alvarenga, Valéria G.; Vivas-Ruiz, Dan E.; Yarleque, Armando; Lima, Augusto Martins; Cavaco, Ana; Eble, Johannes A.; Sanchez, Eladio F. Atroxlysin-III, A Metalloproteinase from the Venom of the Peruvian Pit Viper Snake *Bothrops atrox* (Jergón) Induces Glycoprotein VI Shedding and Impairs Platelet Function. *MOLECULES.*, v.24, p.3489 - ,2019.

Geraldo Soares, Thiago; Dos Santos, Jaqueline Leal; Gonçalves de Alvarenga, Valéria; Soares Coelho Santos, Janete; Yvette Leclercq, Sophie; Dolores Faria, Carmem; Aparecida Assunção Oliveira, Marluce; Porto Bemquerer, Marcelo; Oswaldo Flores Sanchez, Eladio; Elena De Lima, Maria; Gomes Figueiredo, Suely; Helena Borges, Márcia. Biochemical and functional properties of a new L-amino acid oxidase (LAAO) from *Micrurus lemniscatus* snake venom. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES.*, v.140, p.1 -12, 2019.