

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
Programa de Pós-Graduação em Medicina

JÉSSICA LOPES DE OLIVEIRA

Avaliação toxicológica integrada - *in vivo* e *in silico* - de NXH8, uma α -neurotoxina não convencional da cobra coral brasileira, *Micrurus corallinus*.

São Paulo
2024

JÉSSICA LOPES DE OLIVEIRA

Avaliação toxicológica integrada - *in vivo* e *in silico* - de NXH8, uma α -neurotoxina não convencional da cobra coral brasileira, *Micrurus corallinus*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Nove de Julho, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde (Medicina)

Orientador: Prof. Dr. Henrique Roman Ramos

**São Paulo
2024**

Oliveira, Jéssica Lopes de.

Avaliação toxicológica integrada - in vivo e in silico - de NXH8, uma α -neurotoxina não convencional da cobra coral brasileira, *Micrurus corallinus*. / Jéssica Lopes de Oliveira. 2024.

67 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2024.

Orientador (a): Prof. Dr. Henrique Roman Ramos.

1. *Micrurus corallinus*. 2. Receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR). 3. 3FTx. 4. A-bungarotoxina. 5. NXH8. 6. Neurotoxinas. 7. Docking molecular. 8. Modelagem molecular.
I. Ramos, Henrique Roman. II. Título.

CDU 615.8

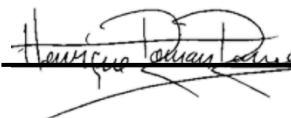
São Paulo, 11 de dezembro de 2024.

TERMO DE APROVAÇÃO

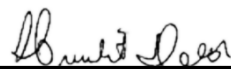
Aluna: **Jéssica Lopes de Oliveira**

Título da dissertação: **Avaliação toxicológica integrada – *in vivo* e *in silico* – de NXH8, uma alfa-neurotoxina não-convencional da cobra coral brasileira, *Micrurus corallinus*.**

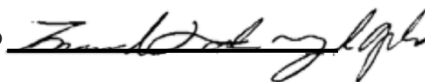
Presidente: Prof. Dr. Henrique Roman Ramos



Membro: Prof. Dr. Humberto Dellê



Membro: Prof. Dr. Inácio de Loiola Meirelles Junqueira de Azevedo



Dedico este trabalho a todos que amam a ciência e buscam o conhecimento como fonte de transformação para o mundo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero expressar minha profunda gratidão ao meu orientador, Prof. Dr. Henrique Roman Ramos. Com muita dedicação, ele me guiou passo a passo, compartilhando seu conhecimento. Tenho a imensa felicidade de ser sua aluna desde a minha graduação em biologia. A cada orientação, aprendi não apenas sobre a pesquisa, mas também sobre a importância da humildade intelectual. Com ele, compreendi que a verdadeira sabedoria está em reconhecer que nada se sabe completamente e que devemos sempre buscar o aprendizado, aceitando nossa ignorância como parte essencial desse processo. Henrique, mais do que um orientador, tornou-se um amigo, alguém que esteve ao meu lado nos momentos mais desafiadores, oferecendo suporte, ensinamentos, incentivo e conselhos valiosos. Sou imensamente grata por tudo o que eu aprendi e continuo aprendendo com ele, por sua paciência e dedicação ao longo da pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Humberto Dellê, por todo o apoio, carinho e ensinamentos ao longo dessa jornada acadêmica. Seu conhecimento foi fundamental para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos professores do mestrado, por toda sabedoria compartilhada.

Aos colegas: Aline Áurea, Amanda Cabral, Douglas Edgard e James Jamyl, pelas trocas de ideias e momentos de descontração que tornaram essa jornada acadêmica leve e agradável.

Aos meus colegas de pós-graduação e aos técnicos e estagiários de laboratório, que, direta ou indiretamente, me ajudaram em algum momento dessa trajetória, e pelas conversas legais.

À minha família, por todo o amor, apoio e compreensão ao longo dessa trajetória, e por estarem sempre ao meu lado, celebrando cada conquista e me ajudando a superar os desafios. Este trabalho é, também, uma vitória de vocês.

À Universidade Nove de Julho e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina, pelo acolhimento e apoio recebido ao longo desses semestres, que foram essenciais para o meu crescimento acadêmico.

À FAPESP e à CAPES, pelo suporte financeiro, que foi fundamental para o meu desenvolvimento acadêmico e para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste sonho.

Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto.

Carl Sagan

RESUMO

A pesquisa teve como objetivo avaliar a toxicidade *in vivo* da toxina NXH8, uma α -neurotoxina não convencional de *Micrurus corallinus*, e investigar sua interação com o receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) de *Tetronarce californica* (anteriormente conhecida como *Torpedo californica*). Para isso, foram realizados experimentos de letalidade para determinar a toxicidade da NXH8 e a eficácia de anticorpos anti-NXH8 na neutralização da letalidade do veneno de *M. corallinus*. Além disso, avaliou-se o efeito do Varespladib, um inibidor de Fosfolipase A2 (PLA2), na sobrevivência de camundongos expostos ao veneno de *M. corallinus*. Análises *in silico* foram conduzidas para compreender as interações moleculares entre NXH8 e o nAChR de *T. californica*, comparando-as com as interações da α -bungarotoxina (α -BgTx), uma neurotoxina de *Bungarus multicinctus* com alta afinidade pelo mesmo receptor. Os resultados mostraram que a NXH8 apresenta baixa toxicidade *in vivo* e que os anticorpos anti-NXH8 não foram eficazes na neutralização do envenenamento por *M. corallinus*. Em contrapartida, a administração de Varespladib aumentou a sobrevivência dos animais, sugerindo a relevância da atividade PLA2 para a ação letal do veneno. As análises *in silico*, incluindo modelagem molecular, docking molecular e dinâmicas moleculares, revelaram que a NXH8 se liga às mesmas interfaces do nAChR que a α -BgTx ($\alpha\delta$ e $\alpha\gamma$), mas apresenta interações menos favoráveis devido à ausência de resíduos críticos necessários para uma ligação eficaz. Enquanto a α -BgTx promove grandes alterações estruturais no nAChR, a NXH8 mantém a estrutura do receptor praticamente inalterada, explicando sua menor toxicidade. Esses achados contribuem para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação da NXH8 e das diferenças em relação a outras neurotoxinas, como a α -BgTx.

Palavras-chave: *Micrurus corallinus*, receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), 3FTx, α -bungarotoxina, NXH8, neurotoxinas, docking molecular, modelagem molecular, dinâmica molecular, Varespladib, Fosfolipase A2.

ABSTRACT

The study aimed to evaluate the *in vivo* toxicity of NXH8, a non-conventional α -neurotoxin from *Micrurus corallinus*, and investigate its interaction with the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) from *Tetronarce californica* (formerly known as *Torpedo californica*). To achieve this, lethality experiments were conducted to determine the toxicity of NXH8 and the efficacy of anti-NXH8 antibodies in neutralising the lethality of *M. corallinus* venom. Additionally, the effect of Varespladib, a phospholipase A2 (PLA2) inhibitor, on the survival of mice exposed to *M. corallinus* venom was assessed. *In silico* analyses were performed to understand the molecular interactions between NXH8 and the nAChR of *T. californica*, comparing them with the interactions of α -bungarotoxin (α -BgTx), a neurotoxin from *Bungarus multicinctus* with high affinity for the same receptor. The results showed that NXH8 exhibits low *in vivo* toxicity and that anti-NXH8 antibodies were ineffective in neutralising *M. corallinus* venom. Conversely, the administration of Varespladib significantly increased animal survival, suggesting the critical role of PLA2 activity in the venom's lethality. *In silico* analyses, including molecular modelling, molecular docking, and molecular dynamics, revealed that NXH8 binds to the same nAChR interfaces as α -BgTx ($\alpha\delta$ and $\alpha\gamma$) but displays less favourable interactions due to the absence of critical residues required for effective binding. While α -BgTx induces significant structural alterations in the nAChR, NXH8 preserves the receptor's structure nearly unchanged, explaining its lower toxicity. These findings contribute to a better understanding of NXH8's mechanisms of action and its differences compared to other neurotoxins, such as α -BgTx.

Key-words: *Micrurus corallinus*, nicotinic acetylcholine receptor (nAChR), 3FTx, α -bungarotoxin, NXH8, neurotoxins, molecular docking, molecular modelling, molecular dynamics, Varespladib, Phospholipase A2.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fotografias de diversas espécies de cobras-corais do gênero <i>Micrurus</i> spp -----	18
Figura 2 - Sintomas sistêmicos após picada por <i>Micrurus corallinus</i> -----	20
Figura 3 - Estrutura da fosfolipase A2 de <i>Micrurus corallinus</i> -----	22
Figura 4 - Exemplos de toxinas de três dedos de serpentes -----	23
Figura 5 - Estrutura da toxina NXH8 de <i>Micrurus corallinus</i> -----	25
Figura 6 - Ensaio de sobrevivência e neutralização por anti-sNXH8 e VLP -----	35
Figura 7 - Análise Comparativa dos Mapas 2D, Gráficos Temporais e Histogramas de RMSD para as Interações de BgTx e NXH8 com o Receptor nAChR de <i>T. californica</i> . -----	39
Figura 8 - Análise dos Gráficos de RMSF para as Interações de BgTx e NXH8 com o Receptor nAChR de <i>T. californica</i> . -----	41
Figura 9 - Distribuição dos Componentes Principais (PC1 e PC2) para as Interações de BgTx e NXH8 com o Receptor nAChR de <i>T. californica</i> . -----	42
Figura 10 - Comparação do Raio de Giro (Rg) entre as Interações de BgTx e NXH8 com o Receptor nAChR de <i>T. californica</i> -----	43
Figura 11 - Padrões de Correlação Cruzada para as Interações de BgTx e NXH8 com o Receptor nAChR de <i>T. californica</i> -----	44

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos de camundongos utilizados em ensaios de sobrevivência-----	29
Tabela 2 - Resíduos Ativos e Passivos Identificados nas Interfaces $\alpha\delta$ e $\alpha\gamma$ -----	31
Tabela 3 - Resíduos envolvidos nas interações de α -BgTx e NXH8 com a interface $\alpha\gamma$ do nAChR --	36
Tabela 4 - Resíduos envolvidos nas interações de α -BgTx e NXH8 com a interface $\alpha\delta$ do nAChR --	37

LISTA DE ABREVIATURAS

3D: Representação tridimensional, com largura, altura e profundidade.

3FTx: Toxina de Três Dedos (toxinas de três dedos)

Anti-sNXH8: Anticorpos específicos gerados contra a toxina sintética NXH8.

GSH-GSSG: Relação entre glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)

His: Histidina.

Leu: Leucina.

M1: receptor muscarínico do subtipo 1

média $\pm$ DP: Representação estatística de média e desvio-padrão.

Met: Metionina.

n = 5: Tamanho amostral por grupo.

p < 0,05: Significância estatística.

pH: Potencial de hidrogênio.

Phe: Fenilalanina.

pLDDT: Predicted Local Distance Difference Test

Rg: Raio de giro

RMSD: Root Mean Square Deviation.

RMSF: Root Mean Square Fluctuation.

Ser: Serina.

Thr: Treonina.

Tris-HCl: Tampão de tris-hidroximetil-aminometano

Trp: Triptofano.

Tyr: Tirosina.

Z-score (ProSA): Valor estatístico utilizado no ProSA.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACh: Acetilcolina.

AChE: Acetilcolinesterase.

AMBER: Construção Assistida de Modelos com Refinamento de Energia (tradução nossa).

α -BgTx: α -Bungarotoxina.

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais.

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

DL50: Dose letal para 50%.

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético (tradução nossa).

ESI-MS: Espectrometria de Massas por Ionização por Eletrospray (tradução nossa).

Fmoc: Fluorenilmetil carbonila.

G1: Grupo 1.

G2: Grupo 2.

G3: Grupo 3.

G4: Grupo 4.

G5: Grupo 5.

HADDOCK: Atracção Biomolecular Guiada por Alta Ambiguidade (tradução nossa).

HCTU: 1H-6-Clorobenzotriazol-1-il (tradução nossa).

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (tradução nossa).

ipTM: Modelagem de Moldes Preditos com Interface (tradução nossa).

LDDT: Teste de Diferença de Distância Local (tradução nossa).

mAChR: Receptor Muscarínico de Acetilcolina.

MT7: Toxina muscarínica 7.

nAChR: Receptor nicotínico de acetilcolina.

NMM: N-metil morfolina.

NMP: N-metil pirrolidona.

NMS: N-metil escopolamina.

NPT ensemble: Número de partículas, Pressão e Temperatura constantes (tradução nossa).

NXH8: Homólogo 8 de Neurotoxina (tradução nossa).

PBS: Solução salina tamponada com fosfato (tradução nossa).

PC1 e PC2: Componentes principais.

PCA: Análise de Componentes Principais (tradução nossa).

PLA₂: Fosfolipase A2.

ProSA: Análise de estrutura de proteína (tradução nossa).

SAE: Soro antielapídico.

SBCAL: Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório.

sNXH8: NXH8 sintética.

Spp: *Species pluralis* (várias espécies dentro do gênero).

TFA: Ácido trifluoroacético.

TIP3P: Modelo de água usado em simulações moleculares.

TIS: Triisopropilsilano.

UNINOVE: Universidade Nove de Julho.

UPA: Unidade de Pronto Atendimento.

VPL: Varespladib.

LISTA DE SÍMBOLOS

Å: Angstrom (1×10^{-10} m)

°C: Graus Celcius

K: Kelvin.

mg: miligrama (1×10^{-3} g)

Kg: Quilograma (1×10^3 g)

mmol: Milimol (1×10^{-3} mol)

ns: Nanossegundo.

$\alpha 2\beta\gamma\delta$: Composição de subunidades do receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), composta por duas subunidades α , uma β , uma γ e uma δ .

α : Alfa.

β : Beta.

γ : Gama.

δ : Delta.

μ g: Micrograma (1×10^{-3} g).

μ L: Microlitro (1×10^{-3} L).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Características e Classificação da Família Elapidae.....	18
1.2 Importância Médica das Cobras Corais	18
1.2.1 Epidemiologia dos Acidentes Ofídicos.....	19
1.2.2 Envenenamento por <i>Micrurus</i> spp. no Brasil.....	19
1.2.2.1 Relato de caso	20
1.2.2.2 O estudo de toxinas de cobras-corais.	21
1.3 O veneno de <i>Micrurus corallinus</i>	21
1.3.1 Fosfolipases A ₂	22
1.3.2 As toxinas de três dedos (3FTx)	23
1.3.2.1 Mecanismos de ação	23
1.3.2.2 Ação antagonista sobre nAChR.	24
1.3.2.3 Atuação nos Receptores Muscarínicos de Acetilcolina (mAChRs).	24
1.3.2.4 Inibição da Acetilcolinesterase.....	24
1.3.2.5 Modulação de Canais Iônicos	24
2.1 Objetivos gerais	27
2.2 Objetivos específicos	27
3.1 Síntese Química de NXH8	28
3.2 Letalidade de sNXH8 <i>in vivo</i>	28
3.2.1 Ensaio de sobrevivência.....	28
3.3 Análises estruturais	29
3.3.1 Modelagem molecular	29
3.3.1.1 nAChR de <i>Torpedo californica</i> (<i>Tetronarce californica</i>)	30
3.3.2 Atracamento molecular (<i>docking</i>).....	30
3.3.3 Dinâmica Molecular com Amber.....	32
3.3.4 Análises estatística	33
3.3.5 Declaração de Ética	33
4.1 Letalidade <i>in vivo</i> de NXH8.....	34
4.2 Ensaio de sobrevivência	34
4.3 Análises estruturais <i>in silico</i>.	35
4.3.1 Análise comparativa das interações de α -BgTx e NXH8 com o Receptor nAChR de <i>T. californica</i> ...	35
4.3.1.1 Interações na interface $\alpha\gamma$ do nAChR	35
4.3.1.2 Interações na interface $\alpha\gamma$ do nAChR	37
4.3.2 Dinâmica Molecular	38
4.3.2.1 Análise de RMSD.....	38
4.3.2.2 Gráficos de RMSF.....	40
4.3.2.3 Distribuição nos Componentes Principais (PC1 e PC2).....	41
4.3.2.4 Gráficos do Raio de Giro (Rg).....	42
4.3.2.5 Padrões de Correlação Cruzada.....	44
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÃO	48
7. REFERÊNCIAS	49
APÊNDICE I	51
APÊNDICE II.....	57
APÊNDICE III	58
ANEXO I.....	63
ANEXO II	64
ANEXO III.....	65
ANEXO IV	66

1. INTRODUÇÃO

1.1 Características e Classificação da Família Elapidae

As cobras-corais (Ordem: Squamata; Subordem: Serpentes; Família: Elapidae) são os únicos elapídeos em todo o continente americano. Dentro da família Elapidae, o gênero *Micrurus* destaca-se como o mais abundante e diverso, com distribuição geográfica que se estende desde a América do Norte até a América do Sul.

Embora no Brasil o termo “cobra” seja popularmente utilizado para designar qualquer serpente, internacionalmente seu uso é mais específico, sendo associado a espécies como a cobra-rei (*Ophiophagus hannah*), a cobra-indiana (*Naja naja*), a cobra-egípcia (*Naja haje*), a cobra-capelo (*Naja kaouthia*) e, naturalmente, às cobras-corais (*Micrurus* spp.), todos representantes da família Elapidae.

Classificadas na subfamília Elapinae, as cobras-corais têm no gênero *Micrurus* sua maior representatividade. Entre as espécies destacadas, encontra-se *Micrurus corallinus*, que, por ser endêmica do Brasil, é conhecida como cobra-coral brasileira. As serpentes do gênero *Micrurus* exibem padrões de coloração aposemática característicos, que funcionam como um alerta visual sobre sua toxicidade. Além disso, *M. corallinus* apresenta dentição proteróglifa, com dentes canaliculados adaptados para a inoculação de peçonha [1] (Figura 1).

Figura 1 - Fotografias de diversas espécies de cobras-corais do gênero *Micrurus* spp



Por William Quatman - Flickr, CC BY-SA 2.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=48471931>



Por Gsanjuan, CC BY-SA 4.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=55850830>



Por Bernard DUPONT, CC BY-SA 2.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=40775143>



Por JoelAmaya, CC BY-SA 4.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=63883519>

Fotografias de quatro diferentes espécies de cobras-corais do gênero *Micrurus* spp. Em cima: *M. frontalis* e *M. corallinus*. Em baixo: *M. surinamensis* e *M. ruatanus*. Essas espécies exibem variações notáveis nos padrões de coloração e na disposição das faixas anelares, características fundamentais para sua identificação.

1.2 Importância Médica das Cobras Corais

Os acidentes ofídicos resultam da inoculação de peçonha durante a picada de serpentes,

podendo ocasionar quadros clínicos de gravidade variável, desde sintomas locais até complicações sistêmicas graves. Mundialmente, estima-se que 5,4 milhões de pessoas sejam afetadas anualmente, com 1,8 a 2,7 milhões de casos de envenenamento e entre 81.410 e 137.880 óbitos [2]. No Brasil, as serpentes de importância médica pertencem às famílias Viperidae e Elapidae, com 35 e 38 espécies descritas, respectivamente. Dentre os elapídeos, as cobras-corais verdadeiras (*Micrurus* spp.) são conhecidas por seu veneno neurotóxico e seu impacto na saúde pública [3].

1.2.1 Epidemiologia dos Acidentes Ofídicos

Em 2022, o Brasil notificou 29.543 acidentes ofídicos, dos quais apenas 1,15% foram atribuídos a serpentes da família Elapidae. Apesar da baixa frequência, os acidentes elapídicos demandam atenção devido à elevada toxicidade de seu veneno. A taxa de letalidade geral dos acidentes ofídicos no Brasil foi de 0,32%, com predominância de óbitos causados por serpentes da família Viperidae. Não houve registro de óbitos decorrentes de acidentes com cobras-corais verdadeiras em 2022 [3].

1.2.2 Envenenamento por *Micrurus* spp. no Brasil

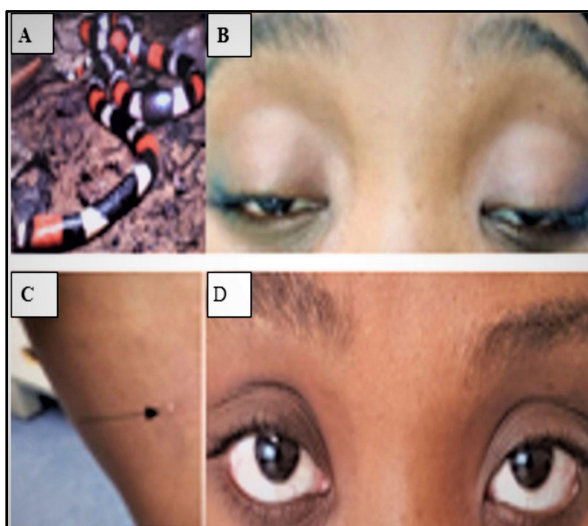
No Brasil, as espécies *M. corallinus* e *M. frontalis* são as principais responsáveis pelos casos de envenenamento por cobras-corais. A peçonha de *M. frontalis* é predominantemente composta por α -neurotoxinas que atuam sobre os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) pós-sinápticos localizados na junção neuromuscular, provocando paralisia muscular. Devido à sua ação antagonista, o uso de anticolinesterásicos é frequentemente empregado como medida terapêutica pois, ao inibirem a ação da enzima acetilcolinesterase (AChE) EC 3.1.1.7, responsável pela hidrólise de acetilcolina (ACh) em acetato e colina, estes fármacos elevam a concentração de ACh na fenda sináptica, dificultando por competição a ligação das toxinas ao receptor [4, 5].

Em relação à peçonha de *M. corallinus*, além de conter α -neurotoxinas semelhantes às de *M. frontalis*, o envenenamento caracteriza-se por apresentar um bloqueio tanto pré-sináptico quanto pós-sináptico. Esse efeito combinado ocorre devido à presença de β -neurotoxinas, que, diferentemente das α -neurotoxinas, inibem a liberação de ACh pelos terminais pré-sinápticos. Nessas condições, a ausência de ACh na fenda sináptica torna o uso de anticolinesterásicos ineficaz [4, 5].

Devido ao comportamento fossorial das cobras-corais, sua menor agressividade e à ocorrência de “picadas secas”, onde há pouca ou nenhuma inoculação de peçonha, os acidentes elapídicos são bem menos frequentes do que os acidentes botrópicos e crotálicos. Ainda assim,

quando há inoculação, a ação das neurotoxinas presentes no veneno causam efeitos sistêmicos como fraqueza muscular, oftalmoplegia, diplopia e ptose palpebral (Figura 2), podendo evoluir para quadros graves de insuficiência respiratória, potencialmente fatais.

Figura 2 - Sintomas sistêmicos após picada por *Micrurus corallinus*



Imagens de (A) *M. lemniscatus* e do paciente apresentando (B) ptose palpebral bilateral e (C) uma pequena marca de punção na parte interna da coxa direita (seta preta) causada pela picada da cobra. O paciente apresentou recuperação completa da ptose 10 dias após o tratamento com neostigmina (D) (MACK; REYES; RAMCHARAN; GIDDINGS, 2021). Licença de uso cedida por *BMJ PUBLISHING GROUP LTD.* (ANEXO I).

A conscientização sobre prevenção, reconhecimento de acidentes e acesso rápido ao tratamento são fundamentais para minimizar os impactos desse tipo de envenenamento. A administração precoce de soro antielapídico (SAE) é essencial para reverter os efeitos do envenenamento e evitar complicações fatais.

1.2.2.1 Relato de caso

Dado o papel das α e β -neurotoxinas nos envenenamentos por serpentes do gênero *Micrurus* spp., a compreensão das ações dessas toxinas é essencial para o manejo clínico, sendo a identificação correta da espécie fundamental, especialmente em crianças. Como já descrito, a peçonha de *M. corallinus* contém β -neurotoxinas que bloqueiam a liberação de ACh pelos terminais pré-sinápticos, dificultando a eficácia terapêutica de anticolinesterásicos.

Em um relato recente, realizado pelo Centro de Informações Toxicológicas de Santa Catarina, destacou um caso de envenenamento por *M. corallinus* envolvendo uma criança de 1 ano de idade [6]. O paciente apresentou vômitos e dificuldade respiratória cerca de uma hora após o acidente, evoluindo rapidamente para depressão do nível de consciência, necessitando de intubação por três dias devido a insuficiência respiratória, além de desenvolver pneumonia aspirativa. A alta hospitalar ocorreu nove dias após o acidente.

A transferência para o hospital de referência foi realizada três horas após a intubação na

Unidade de Pronto Atendimento (UPA). Estima-se que o intervalo entre o acidente e a administração de SAE tenha sido de aproximadamente seis horas, período suficiente para que as β -neurotoxinas fossem endocitadas pelos terminais pré-sinápticos. Uma vez internalizadas, essas toxinas tornam-se inacessíveis aos anticorpos do SAE, o que pode ter contribuído para as complicações clínicas observadas, como a necessidade de ventilação mecânica prolongada. Ainda assim, a identificação da serpente, que se encontrava morta junto ao gato da família, como *M. corallinus*, foi basilar para orientar as condutas terapêuticas descritas no caso.

1.2.2.2 O estudo de toxinas de cobras-corais.

As serpentes da família Viperidae produzem grandes volumes de veneno e podem ser mantidas em cativeiro com relativa facilidade. Essas características favorecem tanto a extração de veneno para pesquisas científicas quanto para a produção de soros antiofídicos.

Por outro lado, as cobras-corais apresentam desafios significativos para estudos científicos e produção de soros devido a algumas peculiaridades: essas serpentes produzem quantidades significativamente menores de veneno e possuem comportamento fossorial, além de uma dieta predominantemente ofiófaga, composta por outras serpentes, lagartos e cecílias. Essas características dificultam a captura, manejo e manutenção em cativeiro [7], fazendo com que quase a totalidade do veneno extraído seja destinado à produção de soro antielapídico, restando quantidades insuficientes (quando disponíveis) para pesquisas científicas.

A consequência dessas dificuldades é refletida grande disparidade no número de estudos relacionados a cobras-corais em comparação aos realizados com outras serpentes da família Elapidae, como as espécies do gênero *Naja* spp. e *Notechis* spp.; uma simples pesquisa na base de dados PubMed, realizada em novembro de 2024, retornou apenas 416 estudos para o termo “*Micrurus*”, enquanto que o uso dos termos “*Naja*” (elapídeos amplamente distribuídos em regiões da África e da Ásia) e “*Notechis*” (elapídeo nativo da Austrália) retornaram 2.909 e 2.605 estudos, respectivamente.

Esses números refletem não apenas as dificuldades práticas associadas ao manejo e à extração de veneno de *Micrurus* spp., mas também a maior relevância de outros gêneros de elapídeos para fins práticos, como o desenvolvimento de soros e pesquisas biomédicas aplicadas.

1.3 O veneno de *Micrurus corallinus*

Com base no estudo transcriptômico de *Micrurus corallinus* [8], duas classes de toxinas se destacam entre as diversas identificadas: as toxinas de três dedos (3FTx – *Three Finger Toxins*) e as fosfolipases A2 (PLA₂). Ambas desempenham papéis fundamentais no mecanismo

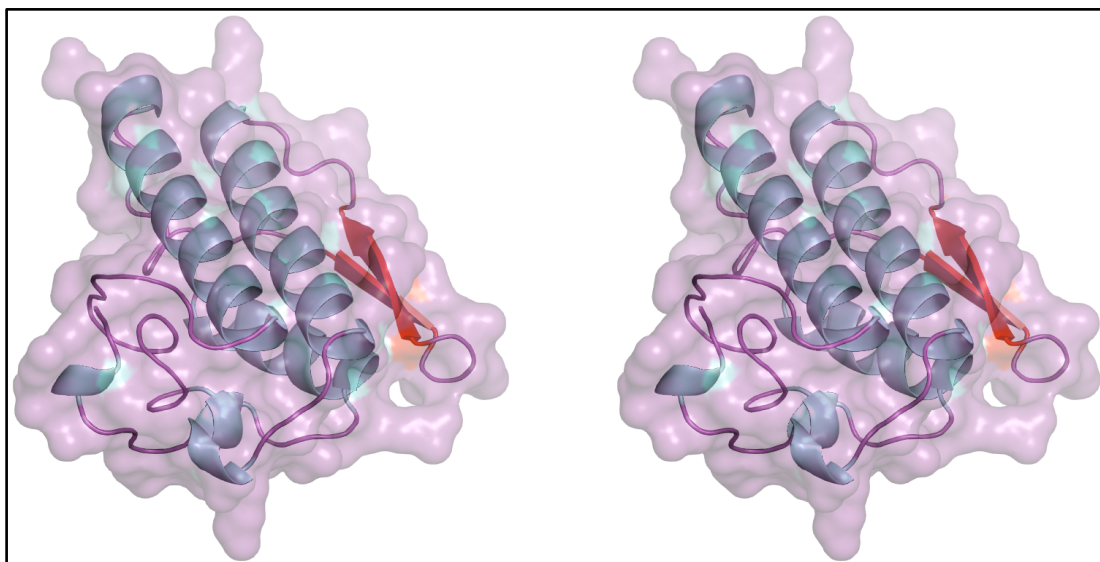
de envenenamento e serão descritas em detalhes a seguir.

1.3.1 Fosfolipases A₂

As PLA₂ estão amplamente presentes nos venenos de serpentes e desempenham funções críticas no envenenamento, sendo divididas em dois subtipos principais: tipo I, predominante nos elapídeos, e tipo II, mais frequente nos viperídeos. Dentro dos elapídeos, essas enzimas se subdividem em variantes Ia e Ib, sendo a forma Ia a mais comum.

Estruturalmente, as PLA₂ possuem estrutura primária com cerca de 120 resíduos de aminoácidos e entre seis e sete ligações dissulfeto que contribuem para sua estabilidade e funcionalidade. Sua estrutura secundária é caracterizada predominantemente por α -hélices, com algumas regiões de folhas beta (Figura 3).

Figura 3 - Estrutura da fosfolipase A2 de *Micrurus corallinus*



Representação estereoscópica da estrutura tridimensional da fosfolipase A2 (PLA₂) de *M. corallinus*. As α -hélices estão representadas em azul; as folhas β em vermelho, e a superfície molecular é exibida em rosa translúcido.

Funcionalmente, as PLA₂ exibem uma ampla gama de atividades tóxicas, dentre as quais se encontra a ação como β -neurotoxinas, bloqueando a liberação de acetilcolina nas junções neuromusculares e causando paralisia muscular [9]. Além disso, essas enzimas podem causar miotoxicidade grave, despolarizando membranas celulares e promovendo necrose e inflamação muscular. Também contribuem para disfunções na coagulação sanguínea, provocando hemorragias locais e sistêmicas, o que amplia sua relevância clínica em envenenamentos graves [10, 11].

A versatilidade funcional das PLA₂ as posiciona como componentes patogênicos de destaque nos venenos de serpentes, contribuindo significativamente para a letalidade dos

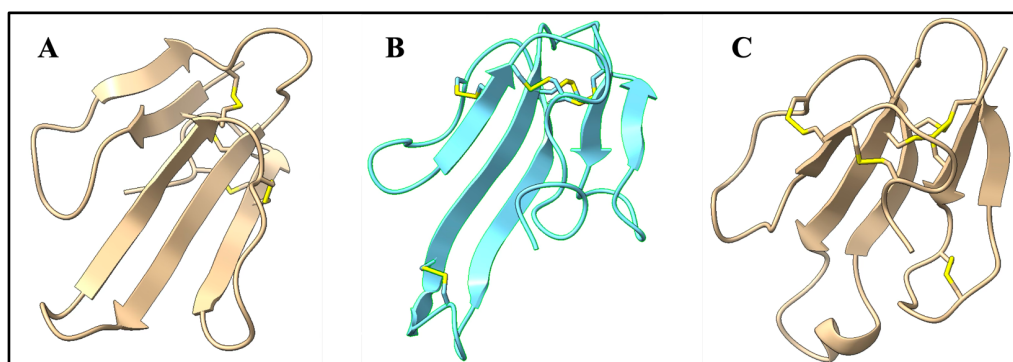
envenenamentos [1, 4, 5, 12].

1.3.2 As toxinas de três dedos (3FTx)

As 3FTx constituem uma das classes mais intrigantes e estudadas de proteínas presentes nos venenos de serpentes, especialmente as da família Elapidae, como cobras e mambas. Essas toxinas ganharam atenção especial devido à sua ampla gama de atividades biológicas, alta especificidade de ligação a alvos celulares e potencial para aplicações biomédicas.

Apresentando uma estrutura de três alças que se projetam a partir de uma região central estabilizada por ligações dissulfeto, assemelhando-se a “dedos” (característica que deu origem ao nome), as 3FTx são pequenos polipeptídeos, contendo de 60 a 80 resíduos de aminoácidos, estabilizados por ligações dissulfeto que conferem uma arquitetura tridimensional robusta e conservada. Possuem um núcleo hidrofóbico do qual partem três alças beta, formando uma estrutura semelhante a uma mão com três dedos. Apesar de sua simplicidade estrutural aparente, a sequência de aminoácidos e as modificações pós-traducionais conferem a essas toxinas uma ampla diversidade funcional [13] (Figura 4).

Figura 4 - Exemplos de toxinas de três dedos de serpentes



Exemplos de 3FTx de venenos de serpentes. **A.** Erabutoxina b, de *Laticauda semifasciata* (PDB: 1ERA); **B.** α -Bungarotoxina, de *Bungarus multicinctus* (PDB: 1KFH); **C.** Toxina não convencional (WTX) de *Naja kaouthia* (PDB: 2MJ0).

As 3FTx podem ser classificadas em subtipos com base em sua estrutura e número de ligações dissulfeto: *i. cadeia curta*: compostas por quatro ligações dissulfeto e menos de 66 aminoácidos; *ii. cadeia longa*: possuem uma ligação dissulfeto adicional na segunda alça, estendendo-se a pelo menos 66 aminoácidos. *iii. não convencionais*: incluem uma ligação dissulfeto extra na primeira alça.

1.3.2.1 Mecanismos de ação

A versatilidade funcional das 3FTx é observada em sua capacidade de interagir com múltiplos alvos moleculares. Esses alvos incluem receptores de membrana, canais iônicos e enzimas, resultando em uma ampla variedade de efeitos tóxicos e farmacológicos, conforme

descrito a seguir.

1.3.2.2 Ação antagonista sobre nAChR.

As α -neurotoxinas são talvez o grupo mais bem estudado de 3FTx. Elas se ligam com alta afinidade e especificidade aos nAChRs na junção neuromuscular, inibindo a ação da ACh e resultando em paralisia muscular, sendo esse efeito responsável pela letalidade do veneno em muitas espécies. Dentre as α -neurotoxinas mais conhecidas, podemos citar a α -bungarotoxina (*Bungarus multicinctus*) [14] e a α -cobratoxina (*Naja kaouthia*) [15].

1.3.2.3 Atuação nos Receptores Muscarínicos de Acetilcolina (mAChRs).

Toxinas como a muscarínica MT7 [16, 17], isolada do veneno de *Dendroaspis angusticeps* (mamba-verde-oriental), atuam como antagonistas altamente seletivos dos receptores muscarínicos do subtipo M1. Essa toxina interage com um sítio alostérico do receptor, modulando a afinidade de ligantes no sítio ortostérico e formando complexos ternários que influenciam a dinâmica de ligação e dissociação de outros ligantes, como a N-metil escopolamina (NMS). Estudos demonstraram que a MT7 reduz significativamente a taxa de dissociação do NMS, evidenciando sua capacidade de estabilizar a ligação ao receptor muscarínico M1.

A especificidade estrutural da MT7 é atribuída principalmente aos resíduos localizados no loop II, como Arg³⁴, Met³⁵ e Tyr³⁶, que desempenham um papel crucial na interação alostérica com o receptor. Essas interações foram confirmadas por mutações nos resíduos críticos, indicando que tais posições são essenciais para a alta afinidade e seletividade da toxina. A configuração estrutural da MT7, característica das toxinas de três dedos (3FTx), fornece a base para sua estabilidade e eficácia na modulação de receptores muscarínicos, destacando-a como uma ferramenta valiosa para o estudo da farmacologia desses receptores [16, 17].

1.3.2.4 Inibição da Acetilcolinesterase

Algumas toxinas, como as fasciculinas, inibem a AChE, uma enzima que degrada a acetilcolina na fenda sináptica. Isso leva à acumulação de acetilcolina e à estimulação excessiva dos músculos, causando espasmos e fasciculações.

1.3.2.5 Modulação de Canais Iônicos

Canais de cálcio tipo L: toxinas como a calciseptina [18] bloqueiam esses canais, resultando na inibição da contração muscular.

Canais iônicos sensíveis ao ácido: mambalginas, encontradas no veneno de mambas, interagem com esses canais, causando analgesia sem efeitos colaterais significativos [19].

1.3.2.2 Efeitos Hemorrágicos e Citotóxicos

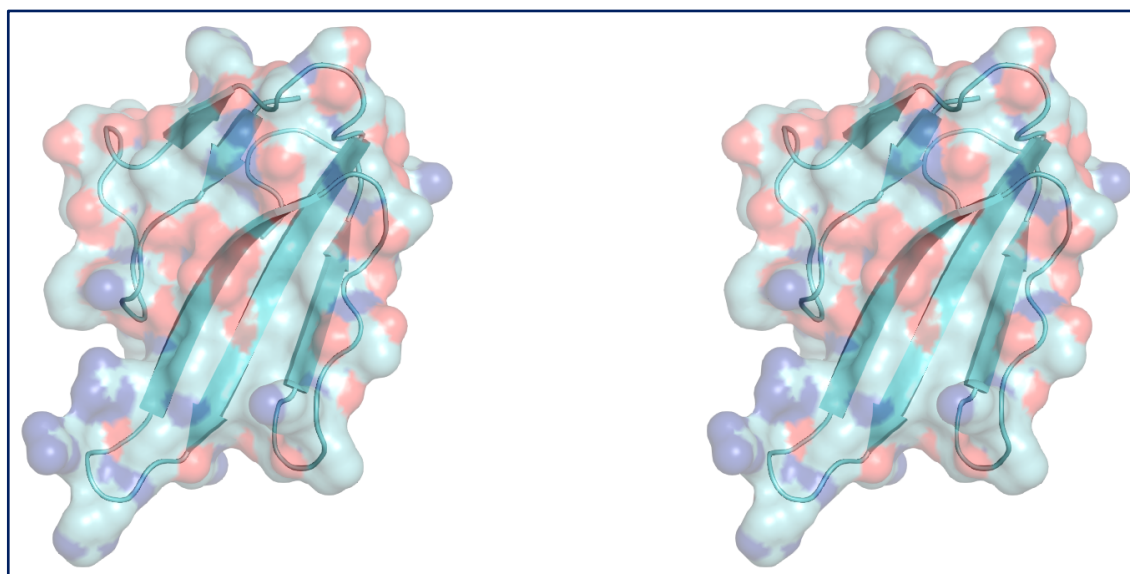
Além de atuarem no sistema nervoso, algumas 3FTx têm efeitos diretos sobre células epiteliais e musculares. A cardiotoxina III da *Naja atra*, por exemplo, promove a formação de poros nas membranas celulares, levando à lise celular [20].

1.3.2.7 NXH8, uma 3FTx com ação pós-sináptica sobre nAChR.

Identificada e isolada do veneno de *M. corallinus*, a NXH8 é uma toxina de três dedos (3FTx) particularmente interessante. Sua estrutura se assemelha às das toxinas não convencionais [21, 22], apresentando uma estrutura primária com 10 resíduos de cisteína e uma quinta ligação dissulfeto a primeira alça [8, 12, 22] (Figura 5).

Posteriormente, observou-se que NXH8 foi capaz de se ligar aos nAChRs pós-sinápticos presentes em preparações *ex vivo* de nervo frênico-diafragma de camundongos. Essa interação, entretanto, mostrou-se consideravelmente fraca, visto que a reversão do bloqueio pôde ser facilmente atingida com uma simples lavagem com solução salina [23].

Figura 5 - Estrutura da toxina NXH8 de *Micrurus corallinus*



Representação estereoscópica da estrutura da NXH8 mostrando sua superfície molecular, bem como as suas estruturas secundárias.

A partir destas informações, o presente trabalho tem como objetivo avaliar, por meio de experimentos *in vivo*, a toxicidade da NXH8 e a capacidade de anticorpos gerados contra essa proteína em neutralizar a letalidade do veneno de *Micrurus corallinus*.

Juntamente aos estudos *in vivo*, serão realizadas análises *in silico* utilizando ferramentas avançadas, como o AlphaFold2 e técnicas de docking molecular, para investigar as possíveis

interações da NXH8 com os nAChRs. Essas análises serão comparadas à estrutura da α -bungarotoxina (α -BgTx), cuja ação pós-sináptica é amplamente descrita na literatura científica.

Através dessas abordagens, espera-se alcançar uma compreensão mais profunda sobre o mecanismo de ação da NXH8 nos nAChRs e sua relevância para a letalidade do veneno de *M. corallinus*, contribuindo para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas mais eficazes no tratamento de envenenamentos causados por serpentes da família Elapidae.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

- Investigar a toxicidade *in vivo* da toxina NXH8 em grupos de camundongos Balb/c fêmeas;
- Investigar, *in silico*, as interações moleculares de NXH8 com o nAChR de *Torpedo californica*, visando a compreensão dos mecanismos moleculares que influenciam em sua toxicidade;
- Comparar as interações de NXH8 com o nAChR com aquelas observadas com α -bungarotoxina, cuja alta afinidade sobre estes receptores já está bem descrita.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a estrutura molecular de NXH8 através de AlphaFold2;
- Realizar o docking molecular *in silico* da NXH8 com receptores nAChR de torpedo;
- Comparar as interações da NXH8 com nAChR as interações da α -BgTx;
- Correlacionar os resultados obtidos *in vivo* e *ex vivo* com os resultados *in silico*; identificando possíveis fatores estruturais na NXH8 que contribuem para a toxicidade em comparação à α -BgTx.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Síntese Química de NXH8

A forma ativa de NXH8 foi obtida por meio da síntese química, conforme descrito anteriormente [23]. Resumidamente, a sequência madura de NXH8 foi sintetizada em uma escala de 50 mmol utilizando a metodologia fluorenilmetil carbonila (Fmoc) em um sintetizador *Prelude* (Gyros Protein Technologies, Tucson, AZ, EUA), com resina ChemMatrix funcionalizada com o aminoácido protegido adequado. As proteções de cadeia lateral dos aminoácidos Fmoc utilizados incluíram éster t-butílico (Glu, Asp), éter t-butílico (Ser, Thr, Tyr), tritil (Cys, His, Asn, Gln), 2,2,5,7,8-pentametil-cromano-6-sulfonil (Arg) e t-butiloxicarbonil (Trp).

O acoplamento dos aminoácidos foi realizado em ciclos de 5 minutos, com uma mistura de Fmoc-aminoácido, HCTU e N-metilmorfolina (NMM) em N-metilpirrolidona (NMP), seguido pela cobertura da resina. A remoção da proteção Fmoc foi conduzida utilizando uma solução de piperidina a 20% em NMP. Após a clivagem da resina e desproteção das cadeias laterais com uma solução de TFA, H₂O e TIS (90:5:5), os peptídeos foram precipitados em etanol frio, liofilizados em ácido acético a 10% e purificados por HPLC semipreparativa em uma coluna Vydac C18, com um gradiente de 40-60% de acetonitrila e 0,1% de TFA ao longo de 40 minutos.

Os peptídeos foram submetidos ao processo de enovelamento em uma solução de Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), contendo 1 mM de EDTA, 1 mM de GSH-GSSG e 20% de glicerol, com uma concentração de peptídeo de 0,05 mg/mL. Após incubação por 24–36 horas a 4°C, o pH foi ajustado para 3 com TFA a 30%, e os peptídeos enovelados foram purificados novamente por HPLC. A caracterização final da estrutura e pureza foi realizada por espectrometria de massa ESI-MS em um Bruker Esquire HCT 3000 plus. Para evitar adsorção de proteínas, o enovelamento foi conduzido em tubos Microsorb de 10 mL (Nunc, Thermo Fisher Scientific).

Para maior clareza, a toxina sintética será identificada por sNXH8.

3.2 Letalidade de sNXH8 *in vivo*

Camundongos Balb/c, fêmeas, com peso de aproximadamente 20g foram divididos em 3 grupos de 5 animais, cada. Grupo controle: recebeu 3 DL₅₀ de veneno de *Micrurus corallinus* [24]. Grupo 20 µg: recebeu 20µg de NXH8 sintética; Grupo 40 µg: recebeu 40 µg de NXH8 sintética. A sobrevivência dos animais foi monitorada por 48 horas. Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados.

3.2.1 Ensaio de sobrevivência

25 camundongos Balb/c, fêmeas, com peso aproximado de 20 g, foram divididos em cinco

grupos de 5 animais, os quais foram inoculados com 3 DL₅₀ de veneno de *Micrurus corallinus* [24] diluído em solução salina estéril, na presença de soro antielapídico (Instituto Butantan), na presença de anticorpos anti-sNXH8 ou ainda na presença de um inibidor de PLA₂, Varespladib [25-29] (Tabela 1).

Tabela 1 - Grupos de camundongos utilizados em ensaios de sobrevivência

<i>Grupo</i>	<i>Material inoculado</i>	<i>Volume inoculado e via de inoculação</i>
Grupo 1	Veneno de <i>M. corallinus</i> pré-incubado (30 min, 37°C), com solução salina.	50 µL - Intramuscular
Grupo 2	Veneno de <i>M. corallinus</i> pré-incubado (30 min, 37°C), com soro antielapídico (Instituto Butantan).	50 µL - Intramuscular
Grupo 3	Veneno de <i>M. corallinus</i> pré-incubado (30 min, 37°C), com anticorpos anti-NXH8 – proporção 1:1 (v/v).	50 µL - Intramuscular
Grupo 4	Veneno de <i>M. corallinus</i> pré-incubado (30 min, 37°C), com solução salina.	50 µL - Intramuscular
	Varespladib (VPL) – 0,5 mg·Kg ⁻¹ .	100 µL - Intraperitoneal
Grupo 5	Veneno de <i>M. corallinus</i> pré-incubado (30 min, 37°C), com anticorpos anti-NXH8 – proporção 1:1 (v/v).	50 µL - Intramuscular
	Varespladib (VPL) – 0,5 mg·Kg ⁻¹ .	100 µL - Intraperitoneal

3.3 Análises estruturais

3.3.1 Modelagem molecular

Para prever a estrutura 3D da NXH8, foi utilizado o AlphaFold2 (*Google DeepMind*), uma ferramenta de predição da estrutura de proteínas, tendo como base as sequências de aminoácidos [30].

Para a modelagem da toxina NXH8, utilizou-se a sequência isolada do peptídeo maduro da toxina NXH8 (UniProt: P58370); enquanto para a modelagem da estrutura de NXH8 em complexo com o receptor nAChR, juntamente com a sequência isolada do peptídeo maduro da toxina NXH8, foram também adicionadas as sequências das subunidades $\alpha_2\beta\gamma\delta$ de nAChR de *Torpedo californica* (subunidade α : UniProt P02710, subunidade β : UniProt P02712, subunidade γ : UniProt P02714, subunidade δ : UniProt P02718).

Para cada estrutura, foram gerados cinco modelos conformacionais ranqueados com base na qualidade estrutural. As estruturas preditas foram validadas por meio de diversas métricas de qualidade: RMSD, utilizado para quantificar a diferença entre as estruturas preditas e as estruturas já determinadas de proteínas homólogas, Z-score (ProSA) avaliou a qualidade global do modelo em comparação com estruturas experimentais, LDDT forneceu uma medida

da precisão da modelagem em relação às proteínas homólogas. Por sua vez, o diagrama de Ramachandran foi empregado para verificar os ângulos de torção das cadeias polipeptídicas, garantindo a integridade conformacional do modelo [31, 32]. Os modelos com os escores de confiança mais altos (pLDDT entre 70 e 90; ipTM entre 0,6 e 0,8) foram selecionados para as análises subsequentes.

3.3.1.1 nAChR de *Torpedo californica* (*Tetronarce californica*)

A *Tetronarce californica*, anteriormente conhecida como *Torpedo californica*, é uma arraia costeira. Ela utiliza os dois órgãos elétricos localizados nas laterais da cabeça tanto para caçar quanto para se defender. Taxonomicamente, pertence à ordem Torpediniformes, à família Torpedinidae e ao gênero *Tetronarce*, descrito por Gill em 1862 e registrado oficialmente no *ZooBank* com o identificador LSID: urn:lsid:zoobank.org:act:1C4C2702-322D-46A7-BE48-9E7C1891CCD9 [33]. Para a espécie em questão, o basônimo é *Torpedo californica* Ayres, 1855, enquanto o nome canônico atual é *Tetronarce californica* [34]. A espécie foi descrita originalmente por Ayres em 1855 e, posteriormente, transferida para o gênero *Tetronarce* por Gill, devido aos avanços no entendimento taxonômico. O nome do gênero, *Tetronarce*, deriva do grego e faz referência às características elétricas da espécie, enquanto, *californica*, denota o estado da Califórnia, onde o animal foi descoberto pela primeira vez [35, 36].

O nAChR de *T. californica* é composto por cinco subunidades, sendo elas $\alpha 2\beta\gamma\delta$, esse receptor e um sítio de ligação, é amplamente utilizado em estudos de predição de proteínas devido à sua estrutura tridimensional bem caracterizada, que serve como modelo para proteínas de membrana e canais iônicos ativados por ligantes. Este receptor oferece dados experimentais de alta qualidade para validar algoritmos de predição, como os baseados em modelagem por homologia. Além disso, sua interação bem documentada com ligantes, como a α -bungarotoxina, facilita a análise da dinâmica molecular [37].

3.3.2 Atracamento molecular (docking)

Após a predição das estruturas de NXH8 em complexo com o receptor nAChR de *T. californica*, realizou-se um docking com as estruturas de melhor qualidade. Para isso, os arquivos PDB das proteínas de interesse, gerados previamente pelo AlphaFold2, foram submetidos ao servidor HADDOCK (High Ambiguity Driven DOCKing), versão 2.4 (VAN ZUNDERT et al., 2016). Este servidor utiliza informações de restrições ambíguas e não ambíguas para realizar acoplamentos moleculares detalhados.

Os resíduos envolvidos nas interfaces $\alpha\gamma$ e $\alpha\delta$ foram identificados com base na análise prévia dos resultados obtidos pelo AlphaFold, especificamente considerando os resíduos em

potencial contato direto no complexo predito.

A tabela 2 apresenta os resíduos ativos e passivos identificados nas interfaces $\alpha\delta$ e $\alpha\gamma$, separados por cadeia. Os resíduos ativos foram determinados manualmente a partir das análises de contato com as estruturas obtidas pelo AlphaFold, enquanto os passivos foram identificados automaticamente pelo HADDOCK, com base em critérios estruturais, como a proximidade espacial aos resíduos ativos. Os resíduos passivos representam regiões adjacentes ou próximas aos resíduos ativos, com potencial para participar de interações intermoleculares. Essa abordagem automatizada permite que o software inclua áreas adicionais que possam contribuir para a estabilidade e especificidade das interações durante o processo de atracção molecular, garantindo uma análise mais abrangente e objetiva das interfaces de interação, reduzindo o viés introduzido pelo operador.

Tabela 2. Resíduos Ativos e Passivos Identificados nas Interfaces $\alpha\delta$ e $\alpha\gamma$

Interface	Cadeia	Resíduos Ativos	Resíduos Passivos
$\alpha\delta$	α	D93 W149 W187 Y189 Y190 T191 C193 Y198	D89 L90 N94 A96 Y127 E129 K145 G153 S157 S159 K185 H186 V188 C192 P194 D195 T196 P197 L199
	δ	T38 W57 L111 D180 P181 E182 E186	D59 I79 Y106 N109 R113 Y117 T119 L121 I178 I179 A183 F184 T185 G188 E189 E191 K224
$\alpha\gamma$	α	Y93 W149 W187 Y190 C193 Y198	D89 L90 N94 A96 E129 K145 G153 S157 S159 K185 H186 V188 Y189 T191 C192 P194 D195 T196 P197 L199
	γ	W55 L119 H172 D174 P175 E180	K34 T36 Y104 N107 L109 Y117 E163 W170 I173 E176 D177 F178 T179 G182 E183 T185 R189 K218

O procedimento foi configurado com 500 passos no primeiro estágio de resfriamento e 1000 passos nos estágios subsequentes. O método de agrupamento aplicado foi o FCC, com cutoff de 0,6, e o modelo dielétrico utilizado foi o rdie, com potencial eletrostático ativado para assegurar a precisão. As análises energéticas consideraram interações de van der Waals, repulsão estérica, energia eletrostática e energia de solvatação. Além disso, ligações de hidrogênio e a integridade estrutural foram verificadas, enquanto a solvatação inicial foi realizada sem manutenção de moléculas de água.

Os modelos gerados foram agrupados em clusters com base nos valores de energia, e os melhores modelos de cada cluster foram selecionados para análise posterior. A validação

considerou a estabilidade conformacional e a relevância biológica dos complexos, assegurando que as interações observadas fossem consistentes com os dados obtidos previamente pelo AlphaFold.

3.3.3 Dinâmica Molecular com Amber

Para as análises de dinâmica molecular das toxinas NXH8 ou α -BgTx em contato com o nAChR, as estruturas primárias das cinco subunidades ($\alpha 2\beta\gamma\delta$) nAChR de *T. californica*, junto com a sequência (em duplicata) de NXH8 ou α -BgTx, foram submetidas a simulações de dinâmica molecular através do framework disponibilizado no Google Colab, o qual utiliza os protocolos descritos por Arantes *et al.* [38] e que integram o toolkit OpenMM em notebooks Jupyter.

Inicialmente, os sistemas foram preparados a partir das estruturas PDB, com a aplicação do campo de força AMBER ff14SB [39, 40] para descrever as interações biomoleculares. O sistema foi imerso em uma caixa de água explícita com modelo TIP3P [41], e íons foram adicionados para neutralizar a carga total. Após a minimização de energia e o aquecimento gradual até 300 K, a simulação foi conduzida em condições de pressão e temperatura constantes, permitindo a observação da dinâmica molecular em condições próximas às fisiológicas. Devido às limitações de tempo de execução do Colab, a simulação foi dividida em 50 segmentos (*strides*), com cada segmento cobrindo 2 ns de produção. Ao final de cada *stride*, arquivos de estado contendo posições e velocidades dos átomos foram gerados, permitindo a continuidade dos cálculos até totalizar 100 ns de simulação.

As análises realizadas incluíram o cálculo do RMSD (*Root Mean Square Deviation*), para monitorar mudanças globais na conformação do complexo, e do RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*), para avaliar a flexibilidade local, identificando regiões dinâmicas e estáveis. Componentes principais (PC1 e PC2) foram utilizados para entender os principais modos de movimento do complexo ao longo da simulação, enquanto o raio de giro (*Rg*) forneceu informações sobre a compactação estrutural. Além disso, padrões de correlação cruzada (*CCj*) foram analisados para identificar interdependências dinâmicas entre diferentes regiões do complexo, contribuindo para a compreensão das interações cooperativas entre NXH8 e o receptor.

As simulações também permitiram explorar as interações específicas entre NXH8 e os loops C das subunidades α do receptor, que desempenham um papel essencial no reconhecimento e ligação da toxina. Comparações com dados de toxinas bem caracterizadas, como a α -bungarotoxina, reforçaram a relevância funcional de NXH8 no bloqueio ou

modulação do receptor nAChR, fornecendo subsídios para entender seu impacto em processos neuromusculares.

3.3.4 Análises estatística

Para avaliar a diferença estatística entre os diferentes grupos experimentais nos ensaios de sobrevivência, realizou-se o teste de Kruskal-Wallis. A análise foi feita através do software R versão 4.4.1 (*The R Foundation for Statistical Computing Platform*). Este teste não paramétrico foi escolhido devido ao pequeno tamanho amostral ($n = 5$, por grupo) e à sua adequação para comparar medianas de dois ou mais grupos independentes, sem a necessidade de suposição de distribuição normal (ANEXO IV).

3.3.5 Declaração de Ética

Os experimentos com animais descritos neste relatório foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE, protocolo n.º 4463100419). Os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes éticas gerais para uso de animais estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e legislação brasileira (Lei Federal n.º 11.794, de 8 de outubro de 2008), em conjunto com as diretrizes para experimentos com animais estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a Diretiva da UE 2010/63/UE para a proteção de animais usados para fins científicos (ANEXO II).

4. RESULTADOS

4.1 Letalidade *in vivo* de NXH8.

48 horas após a administração, com exceção do grupo que recebeu o veneno de *Micrurus corallinus*, todos os camundongos permaneceram vivos, ao fim do experimento, todos os camundongos foram eutanasiados.

Se considerarmos que o veneno de *Micrurus corallinus* apresenta DL_{50} de aproximadamente $0,35 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ [24], estes resultados sugerem que NXH8 apresenta baixa toxicidade, visto que nem mesmo a dose de $2,0 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$, equivalente a 6 vezes a DL_{50} do veneno total, apresentou letalidade aos grupos de animais.

Infelizmente, devido ao alto custo para se obter estas toxinas através de síntese química, optamos pela não determinação dos valores exatos de DL_{50} , visto que esse procedimento consumiria quantidades importantes de material, o que inviabilizaria futuras caracterizações.

Em relação, especificamente, à toxina NXH8, esta baixa toxicidade não é uma surpresa se considerarmos que NXH8 é similar às neurotoxinas não convencionais, às quais são conhecidas por sua baixa toxicidade [21]. Ademais, como descrito anteriormente [23], a ação bloqueadora de NXH8 sobre a placa motora em preparações *ex vivo* de nervo frênico-diafragma, pode ser facilmente revertida através de lavagem com solução salina.

4.2 Ensaio de sobrevivência

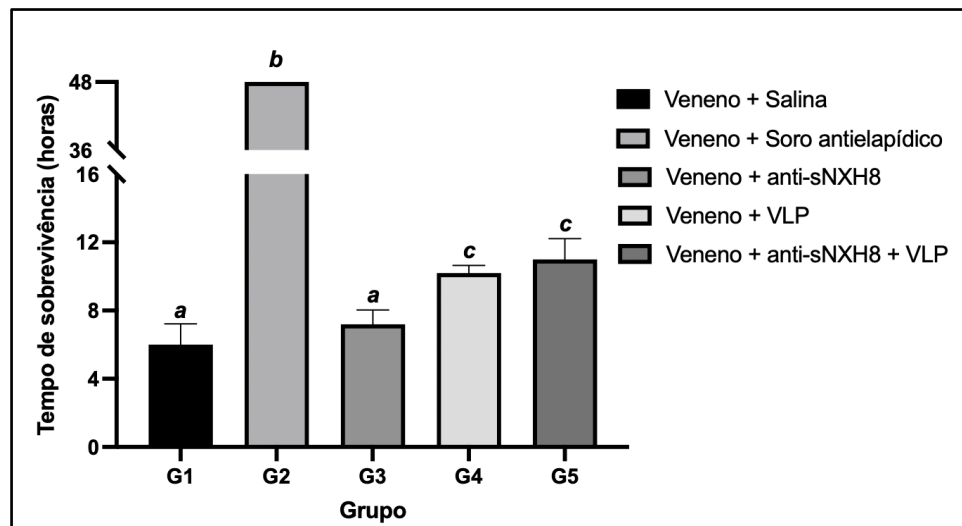
Camundongos injetados com veneno pré-incubado com solução salina (G1) morreram em $6,00 \pm 1,22$ horas (média $\pm$ DP). Em contrapartida, todos os camundongos injetados com veneno pré-incubado com soro antielapídico do Instituto Butantan (G2) sobreviveram por mais de 48 horas. Camundongos injetados com veneno pré-incubado com anticorpos anti-sNXH8 (G3) não conseguiram neutralizar a toxicidade do veneno, resultando em um tempo de sobrevivência de $7,2 \pm 0,84$ horas, sugerindo que outros componentes do veneno são responsáveis pela letalidade. Não houve diferença estatisticamente significativa na sobrevivência entre G1 e G3 ($p = 0,108$).

A administração intramuscular de Varespladib (VPL) após a administração intraperitoneal de veneno pré-incubado com solução salina (G4) aumentou significativamente a sobrevivência para $10,2 \pm 0,45$ horas ($p < 0,05$), indicando que a PLA₂ (possivelmente uma β -neurotoxina pré-sináptica) contribui para a letalidade. Estes resultados corroboram achados já publicados por outros pesquisadores [25-29].

A administração intramuscular de VPL, após a administração intraperitoneal de veneno pré-incubado com anti-sNXH8 (G5) aumentou ainda mais a sobrevivência para $11,0 \pm 1,22$ horas. No entanto, o aumento na sobrevivência entre G4 e G5 não foi estatisticamente

significativo ($p = 0,207$), sugerindo que o efeito adicional dos anticorpos anti-sNXH8 não é significativo (Figura 6).

Figura 6 - Ensaio de sobrevivência e neutralização por anti-sNXH8 e VLP



Avaliação da capacidade de anticorpos anti-sNXH8 e VLP em neutralizar a toxicidade do veneno de *M. corallinus*. Letras diferentes indicam haver diferença estatística entre os grupos ($p < 0.05$). Letras iguais indicam não haver diferença estatística entre os grupos ($p > 0.05$).

4.3 Análises estruturais *in silico*.

4.3.1 Análise comparativa das interações de α -BgTx e NXH8 com o Receptor nAChR de *T. californica*

A análise das interações entre as alças de α -BgTx e NXH8 com o receptor nAChR de *T. californica* revela diferenças fundamentais que explicam a menor afinidade de NXH8 em relação a α -BgTx. Essas diferenças refletem o número, tipo e especificidade dos contatos estabelecidos entre os resíduos das toxinas e do receptor.

4.3.1.1 Interações na interface $\alpha\gamma$ do nAChR

Na interface $\alpha\gamma$, a primeira alça de α -BgTx forma uma rede complexa e densa de interações com resíduos da cadeia α . Dentre os contatos, destacam-se α Trp¹⁸⁷, que interage diretamente com os resíduos Thr⁶, Ala⁷, Thr⁸ e Ser⁹ de α -BgTx, e α Tyr¹⁸⁹, que forma múltiplas conexões com Thr⁶, Thr⁸, Ser⁹, Pro¹⁰ e Ile¹¹. Esses resíduos desempenham papéis centrais na ligação, criando uma interface rica em interações aromáticas e hidrofóbicas, essenciais para uma estabilidade e alta afinidade. Em contraste, NXH8 estabelece interações menos diversificadas e com menor densidade, envolvendo α Trp¹⁸⁷ em ligação com Phe⁸, enquanto α Tyr¹⁸⁹ interage apenas com Lys⁹. Essa limitação reflete a menor capacidade de NXH8 em estabelecer uma rede de contatos complexa como a de α -BgTx (Tabela 3).

A segunda alça de α -BgTx também contribui significativamente para a interface $\alpha\gamma$. Ela

interage com resíduos como α Tyr¹⁸⁹, α Tyr¹⁹⁰ e α Thr¹⁹¹, formando ligações com Val³⁹, Val⁴⁰, Asp³⁰, Phe³² e Arg³⁶ de α -BgTx. Essas interações incluem contatos aromáticos e hidrofóbicos, que aumentam a estabilidade e especificidade da ligação. Por outro lado, NXH8 apresenta uma rede de contatos menos diversificada. Os principais pontos de interação envolvem α Tyr¹⁹⁸, α Cys¹⁹² e α Tyr¹⁹⁰, que se conectam a Arg³⁹, Thr³³ e Leu³⁷. A ausência de resíduos aromáticos adicionais em NXH8 limita a formação de interações π - π e hidrofóbicas, reduzindo ainda mais sua afinidade (Tabela 3).

Tabela 3 - Resíduos envolvidos nas interações de α -BgTx e NXH8 com a interface $\alpha\gamma$ do nAChR

	nAChR	α -BgTx	NXH8	Finger #
$\alpha\gamma$ interface	α Trp187	Thr6 Ala7 Thr8 Ser9	Phe8	I
	α Tyr189	Thr06 Thr08 Ser09 Pro10 Ile11 Val39 Val40	Lys9 Arg38	I II
	α Tyr190	Asp30 Phe32 Arg36 Gly37 Lys38 Val39	Thr33	II
	α Thr191	Arg36 Gly37 Lys38	Leu37	II
	α Cys192	Arg36	Arg39	II
	α Pro194	Ile11	Thr10	I
	α Asp195		Lys9	I
	α Tyr198	Arg36	Arg39	II
	γ Lys34	Ser34	His34	II
	γ Thr36	Ala31		II
	γ Trp55	Ala31	Phe32	II
	γ Tyr117	Ser35	Arg35	II
	γ Leu119		His34	II
	γ Glu163	Ser34		II
	γ His172	Asp30 Ala31	Thr33	II
	γ Asp174	Asp30		II
	γ Pro175	Tyr54	Trp31 Asn32 Pro52	II III
	γ Glu176	Trp28	Arg38 Lys51	II III
	γ Phe178		Pro52	III
	γ Glu180		Pro52	III
	γ Asp194		Trp31 Thr33	II

As diferenças se tornam ainda mais evidentes na terceira alça. Na cadeia γ , α -BgTx utiliza resíduos aromáticos, como Trp⁵⁵ e Tyr¹¹⁷, para formar interações estáveis e complementares com resíduos como Lys³⁴ e Thr³⁶ do receptor. Essas interações incluem forças π - π e hidrofóbicas, essenciais para reforçar a estabilidade. Por outro lado, NXH8 apresenta interações menos específicas e dispersas. Os contatos principais envolvem resíduos como Lys³⁴, Tyr¹¹⁷ e Leu¹¹⁹, que interagem com His³⁴, Arg³⁵ e Thr³³ de NXH8. A ausência de uma rede densa de interações aromáticas em NXH8 compromete a força da ligação, resultando em uma menor afinidade geral na interface $\alpha\gamma$ (Tabela 3).

4.3.1.2 Interações na interface $\alpha\gamma$ do nAChR

Na interface $\alpha\delta$, α -BgTx demonstra sua capacidade de formar redes de interações amplas e altamente complementares, aproveitando resíduos aromáticos, hidrofóbicos e polares tanto na cadeia α quanto na cadeia δ do receptor (Tabela 4).

Tabela 4 - Resíduos envolvidos nas interações de α -BgTx e NXH8 com a interface $\alpha\delta$ do nAChR

	nAChR	α -BgTx	NXH8	Finger #
$\alpha\delta$ interface	α Trp187	Thr6 Ala7		I
	α Val188	Val39		I
				I
	α Tyr189	Thr6 Thr8 Ser9 Pro10 Val39 Val40	Phe8 Lys9 Arg38	I II
	α Tyr190	Asp30 Arg36	Arg38	II
	α Thr191	Arg36 Lys38 Val40	Ile39	II
	α Cys192	Arg 36	Arg35	II
	α Cys193		Arg35	II
	α Pro194	Ser9 Gln10	Lys9 Thr10	I
	α Asp195		Lys9	I
	α Tyr198	Arg36	Arg35	II
	δ Thr38	Ala31	His34	II
	δ Trp57	Phe32		II
	δ Leu111		Arg35	II
	δ Thr119		Arg35	II
	δ Leu121	Phe32	His34	II
	δ Met163		His34	
	δ Asp165	Ser34	Leu37	II
	δ Trp176		Asn32	II
	δ Ile178		Asn32 Thr33	II
	δ Ile179		Trp31 Val54	
	δ Asp180	Asp30	Arg38	II
	δ Pro181	Cys29 Tyr54	Trp31 Val54	II III
	δ Glu182	Trp28 Tyr54	Arg38	II III
	δ Phe184		Lys51	III
	δ Thr185		Lys51	III
	δ Glu186		Lys51	III
	δ Lys195		Pro52 Gly53	III

Na cadeia α , destacam-se os resíduos α Trp¹⁸⁷, que estabelece múltiplos contatos com Thr⁶, Ala⁷, Thr⁸ e Ser⁹ de α -BgTx, e α Tyr¹⁸⁹, que interage com Thr⁶, Thr⁸, Ser⁹, Pro¹⁰ e Ile¹¹. Além disso, α Val¹⁸⁸ e α Pro¹⁹⁴ reforçam a rede de interações ao conectarem-se a Val³⁹, Ser⁹ e Gln¹⁰. Essas conexões aromáticas e hidrofóbicas criam uma interface altamente estável e complementar. Por outro lado, NXH8 apresenta interações na cadeia α que são menos

diversificadas e restritas. Por exemplo, α Tyr¹⁸⁹ interage com Phe⁸ e Lys⁹, enquanto α Pro¹⁹⁴ e α Asp¹⁹⁵ estabelecem contatos com Lys⁹ e Thr¹⁰. A ausência de resíduos aromáticos adicionais, como os encontrados em α -BgTx, limita as interações π - π e hidrofóbicas, comprometendo a estabilidade geral da ligação.

Na cadeia δ , α -BgTx mantém sua superioridade na densidade e diversidade de interações. Resíduos como Thr³⁸, Trp⁵⁷ e Leu¹²¹ interagem com Ala³¹, Phe³² e outros resíduos de α -BgTx. A presença de resíduos aromáticos, como Trp⁵⁷ e Phe³², e de resíduos polares, como Asp¹⁸⁰ e Glu¹⁸², assegura uma rede de interações π - π , hidrofóbicas e eletrostáticas altamente estável. Em contraste, NXH8 forma uma rede mais restrita com a cadeia δ , envolvendo contatos limitados, como os entre His³⁴, Asn³² e Trp³¹ de NXH8 com Thr³⁸, Leu¹²¹ e Trp¹⁷⁶ do receptor. A ausência de resíduos aromáticos, como os equivalentes a Phe³² de α -BgTx, reduz significativamente as interações estabilizadoras.

As interações específicas da terceira alça na cadeia δ reforçam ainda mais essas diferenças. α -BgTx utiliza resíduos como Tyr⁵⁴ para formar interações específicas e altamente estáveis com Pro¹⁸¹ e Glu¹⁸², criando uma interface robusta. Em contrapartida, NXH8 forma interações mais dispersas, envolvendo resíduos como Gly⁵³, Pro⁵² e Val⁵⁴, mas a predominância de resíduos hidrofílicos limita a força e a estabilidade dessas interações.

4.3.2 Dinâmica Molecular

A análise de dinâmica molecular revela diferenças cruciais entre os efeitos conformacionais de α -BgTx e NXH8 sobre o nAChR. Embora ambos os ligantes bloqueiem o receptor, NXH8 induz alterações conformacionais menos extensas e globalmente disruptivas do que BgTx, o que está diretamente associado ao seu menor potencial tóxico. A seguir, apresentamos como os resultados das análises estruturais ajudam a explicar essas diferenças.

4.3.2.1 Análise de RMSD

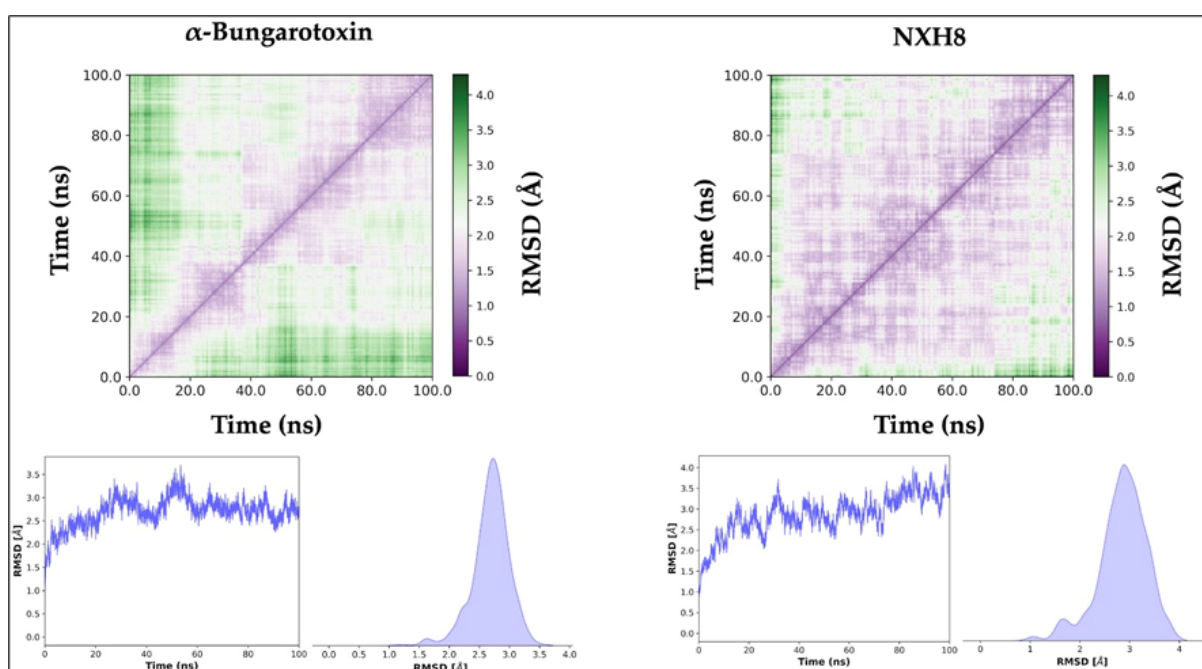
Os mapas bidimensionais de RMSD fornecem informações sobre as diferenças conformacionais ao longo do tempo. Para NXH8, o mapa apresenta uma predominância de tons púrpuras claros, refletindo pequenas variações conformacionais entre os estados estruturais consecutivos.

A linha verde na base do quadrado evidencia que ainda que variações estruturais entre o estado inicial ($t = 0$ ns) e os momentos mais avançados da simulação estejam presentes, estas alterações ocorrem de forma incremental, sem grandes oscilações. Isso sugere que NXH8, embora ainda possa apresentar atividade antagonista sobre o nAChR, como já foi observado em preparações *ex vivo* [23], não induz perturbações drásticas ou explorações conformacionais

extensas (Figura 7).

Em comparação, o mapa de α -BgTx apresenta várias regiões esverdeadas dispersas, especialmente entre o intervalo entre 40 e 60 ns, indicando alterações conformacionais significativas. Esse período sugere a capacidade de α -BgTx em promover transições estruturais mais amplas e desestabilizadoras, eventualmente acompanhadas de perturbações globais na conformação do receptor (Figura 7).

Figura 7 - Análise Comparativa dos Mapas 2D, Gráficos Temporais e Histogramas de RMSD para as Interações de BgTx e NXH8 com o Receptor nAChR de *T. californica*.



Os mapas 2D, gráficos de RMSD ao longo do tempo e histogramas destacam diferenças conformacionais do receptor nAChR com α -BgTx (esquerda) e NXH8 (direita). Para α -BgTx, as flutuações estabilizam-se após 20 ns, precedidas por grandes variações estruturais. O histograma concentra-se entre 2,5 – 3,0 Å, indicando alterações consistentes e possivelmente significativas no sítio ortostérico, comprometendo a ligação da acetilcolina e abertura do canal iônico. NXH8, por outro lado, induz flutuações menos estáveis, com alterações ao longo de todo o tempo. O histograma mais espalhado e o mapa 2D, com predomínio de púrpura, sugerem interações dinâmicas, mas sem causar alterações críticas no sítio ortostérico, permitindo a ligação da acetilcolina e abertura do canal iônico.

Os histogramas de distribuição de RMSD fornecem uma visão geral da variação conformacional ao longo da simulação. Para α -BgTx, a distribuição de RMSD apresenta um pico mais amplo e centrado em torno de 2,5 – 3,0 Å. Esse perfil confirma que α -BgTx induz variações estruturais significativas no receptor, refletindo a exploração de diferentes estados conformacionais ao longo de toda a simulação. No caso de NXH8, a distribuição de RMSD é mais estreita, com um pico centrado entre 2,0 e 2,5 Å, indicando que as alterações conformacionais são mais limitadas. No entanto, isso não implica uma estabilização funcional do receptor, mas sim que NXH8 promove mudanças estruturais que, embora suficientes para

bloquear o receptor, ocorrem de maneira menos drástica e mais incremental, sem que ocorram grandes perturbações globais.

Na comparação, BgTx causa mudanças conformacionais globais mais significativas, como evidenciado pelas maiores flutuações no RMSD e pela amplitude da distribuição. Esse comportamento está associado ao seu mecanismo de interação mais agressivo, que frequentemente induz estados conformacionais amplamente divergentes. Por outro lado, NXH8 apresenta um perfil de interação mais contido, promovendo alterações conformacionais limitadas que não comprometem de forma severa a integridade estrutural do receptor, apesar de ainda bloqueá-lo.

Esses resultados sugerem que α -BgTx explora múltiplos estados conformacionais do receptor, promovendo perturbações significativas na sua dinâmica global. Em contraste, NXH8 promove alterações mais localizadas e menos disruptivas, mantendo o receptor em conformações que, embora bloqueadas, não apresentam grandes desvios estruturais. Essa diferença reflete os distintos mecanismos de ação e os perfis de toxicidade de cada ligante, com BgTx agindo de forma mais disruptiva e NXH8 impactando o receptor de maneira menos agressiva. Essas observações são consistentes com outras análises, como PCA, RMSF e correlação cruzada, que corroboram a natureza distinta das interações entre os ligantes e o nAChR.

4.3.3.2 Gráficos de RMSF

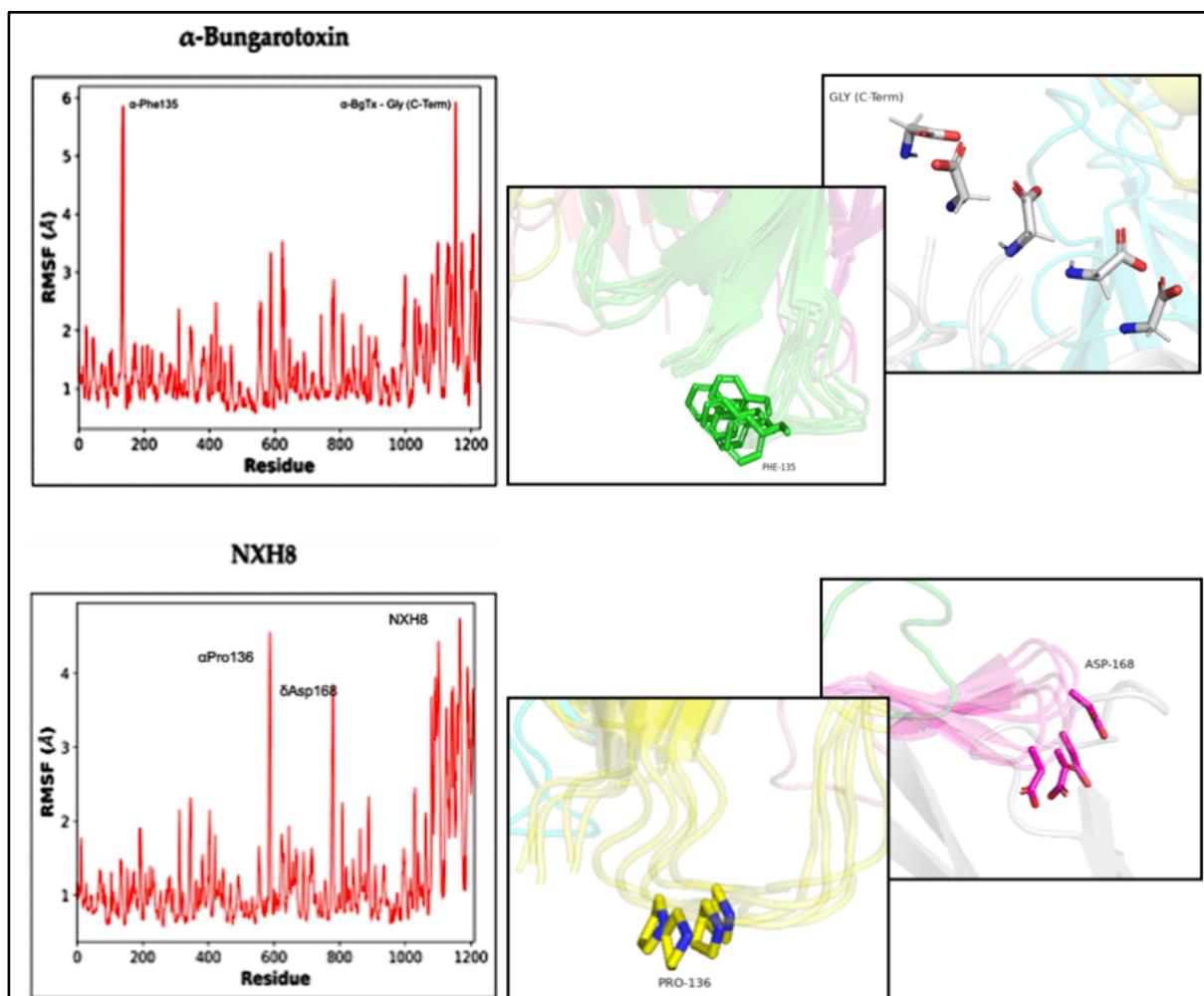
Os gráficos de RMSF oferecem uma visão detalhada sobre a flexibilidade dos resíduos do receptor em interação com os ligantes α -BgTx e NXH8, permitindo identificar padrões distintos entre as duas toxinas.

Para α -BgTx, os picos mais acentuados de RMSF estão associados a resíduos localizados em regiões que, por natureza, apresentam maior mobilidade. No entanto, os resíduos finais (faixa 1100–1200), correspondentes às duas moléculas de α -BgTx, exibem uma flexibilidade relativa com valores próximos a 3 Å, indicando que essas regiões permanecem relativamente estáveis ao longo da simulação. Esse comportamento sugere que, embora α -BgTx induza alguma mobilidade em áreas periféricas, sua ligação ao receptor é sólida, com interações suficientemente fortes para estabilizar as regiões diretamente envolvidas no contato (Figura 8).

De maneira semelhante, a análise de RMSF para NXH8 também revela picos pronunciados em resíduos localizados em regiões de alta mobilidade. Contudo, ao contrário de α -BgTx, as oscilações observadas na faixa de resíduos entre 1100 e 1200, correspondentes às duas moléculas de NXH8, são significativamente mais intensas. Esse comportamento está

alinhado com os dados previamente analisados (RMSD 2D – Figura 7), que indicam uma flexibilidade constante de NXH8 ao longo de toda a simulação.

Figura 8 - Análise dos Gráficos de RMSF para as Interações de BgTx e NXH8 com o Receptor nAChR de *T. californica*.

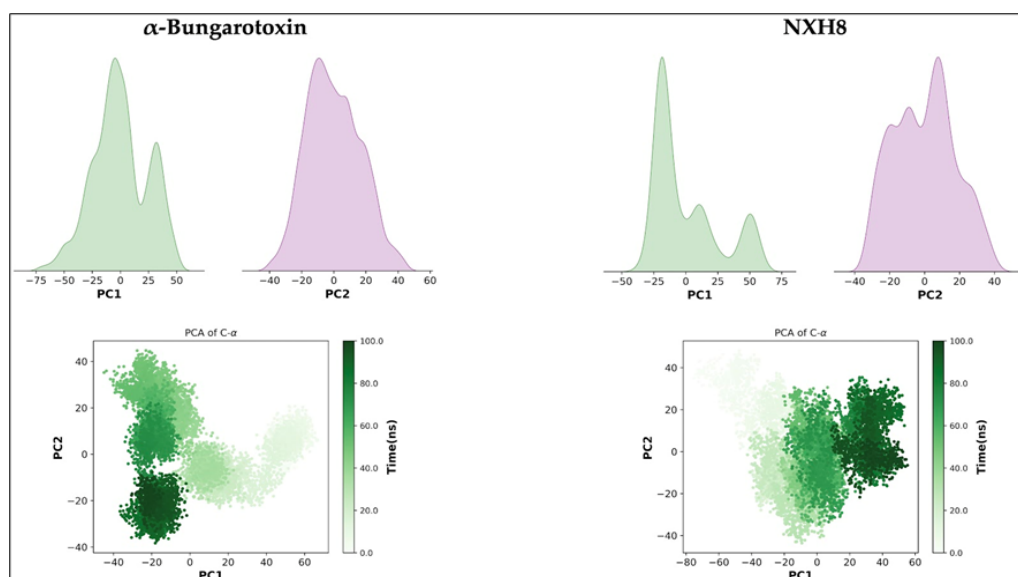


Gráficos de RMSF para o receptor nAChR de *Torpedo californica* em interação com α -BgTx (acima) e NXH8 (abaixo). O gráfico de α -BgTx apresenta dois picos acentuados em regiões específicas, os quais representam resíduos (α -Phe135 e Gly-C-Term) localizados em regiões naturalmente flexíveis (ilustrações ao lado). A região final (faixa 1100–1200), por outro lado, permanece relativamente estável, sugerindo uma menor mobilidade por parte de α -BgTx. O gráfico de NXH8 (abaixo) também mostra dois picos que representam dois resíduos (α -Pro136 e δ -Asp168) localizados em regiões flexíveis; no entanto, a faixa final (1100–1200) mostra oscilações mais intensas, indicando que NXH8 apresenta uma maior flexibilidade ao longo da simulação.

4.3.3.3 Distribuição nos Componentes Principais (PC1 e PC2)

A análise da distribuição nos componentes principais (PC1 e PC2) mostra que BgTx (à esquerda) apresenta dois agrupamentos bem definidos. Essa separação clara entre os clusters sugere que BgTx induz transições conformacionais significativas no receptor, levando-o a explorar estados estruturais distintos, mas bem definidos, ao longo da simulação. O espaçamento maior entre os agrupamentos indica que BgTx tem um impacto mais amplo e global na dinâmica do receptor (Figura 9).

Figura 9 - Distribuição dos Componentes Principais (PC1 e PC2) para as Interações de BgTx e NXH8 com o Receptor nAChR de *T. californica*.



A figura apresenta a distribuição dos componentes principais (PC1 e PC2) para as interações de BgTx (à esquerda) e NXH8 (à direita) com o receptor nAChR de *T. californica*. No caso de BgTx, observa-se a formação de dois agrupamentos bem definidos, sugerindo transições conformacionais significativas que levam à exploração de estados estruturais distintos. Esse espaçamento maior entre os clusters reflete um impacto global e dinâmico na conformação do receptor. Em contraste, o gráfico de NXH8 apresenta uma distribuição mais uniforme, com os pontos formando um único cluster contínuo. Isso indica que NXH8 provoca variações conformacionais menos pronunciadas, mantendo o receptor em estados estruturais mais homogêneos e restritos, com menor impacto nas transições globais.

Por outro lado, NXH8 (à direita) apresenta uma distribuição mais uniforme, com os pontos formando um único cluster contínuo, indicando que as variações conformacionais causadas por NXH8 são menos pronunciadas, mantendo o receptor em um conjunto de estados estruturais mais restrito e homogêneo. A ausência de separação clara em clusters sugere que NXH8 tem menor impacto sobre as transições conformacionais globais do receptor.

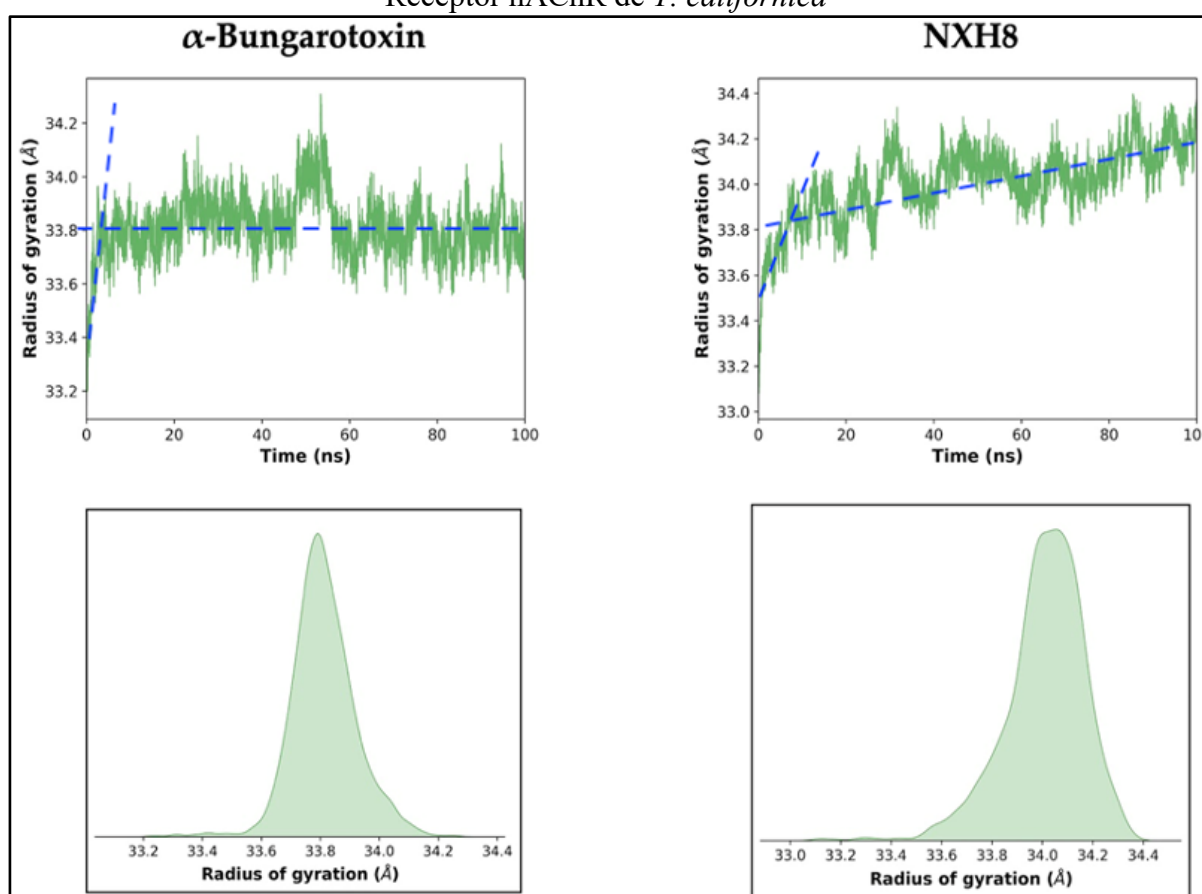
4.3.3.4 Gráficos do Raio de Giro (Rg)

Os gráficos apresentados na figura 10 comparam o comportamento do raio de giro do receptor nAChR de *T. californica* em interação com as toxinas α -BgTx e NXH8 ao longo do tempo de simulação, fornecendo informações relevantes sobre a estabilidade e a flexibilidade conformacional do receptor. No caso da α -Bungarotoxina (α -BgTx), observa-se que o raio de giro apresenta flutuações ao longo da simulação, com valores variando entre 33,4 e 34,2 Å. Apesar dessas oscilações, a tendência média se mantém constante em torno de 33,8 Å, conforme indicado pela linha de tendência azul pontilhada. Esse comportamento sugere que, embora haja pequenas variações locais, a estrutura global do receptor permanece estável durante toda a simulação, indicando uma conformação equilibrada e consistente na presença de α -BgTx.

Por outro lado, a análise do comportamento na presença de NXH8 revela um padrão

distinto. O gráfico mostra um aumento progressivo no raio de giro ao longo do tempo, partindo de valores próximos a 33,3 Å no início da simulação e atingindo aproximadamente 34,2 Å ao final. A linha de tendência azul pontilhada apresenta uma inclinação positiva, indicando uma expansão gradual e contínua da estrutura global do receptor. Esse comportamento sugere que NXH8 promove uma maior flexibilidade conformacional, levando a uma expansão estrutural ao longo da simulação. Essa observação é corroborada pela distribuição do raio de giração, que apresenta um pico menos definido e maior dispersão, evidenciando a dinâmica mais flexível do sistema em comparação à interação com α -BgTx.

Figura 10 - Comparação do Raio de Giro (Rg) entre as Interações de BgTx e NXH8 com o Receptor nAChR de *T. californica*



A figura ilustra as flutuações do raio de giro (Rg) do receptor nAChR em interação com α -BgTx e NXH8. A α -BgTx apresenta flutuações mais controladas, com valores médios constantes ao longo do tempo, refletindo uma estabilidade estrutural global, apesar das variações locais. Em contraste, o NXH8 exibe um aumento progressivo no Rg, indicando uma expansão gradual da estrutura do receptor e uma maior flexibilidade conformacional ao longo da simulação.

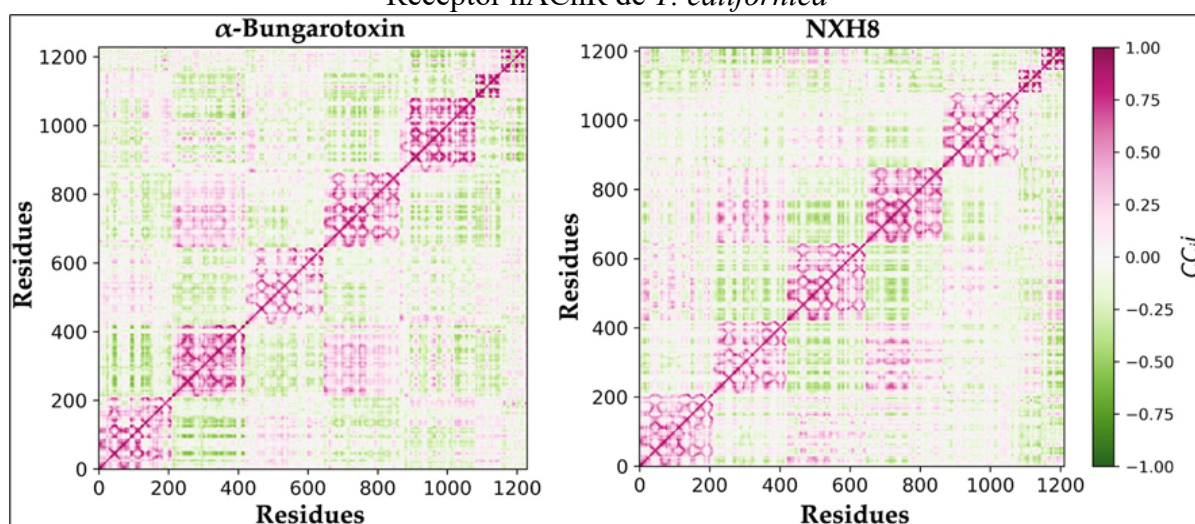
A comparação entre os dois comportamentos revela efeitos distintos das toxinas sobre o receptor nAChR. Enquanto α -BgTx atua de forma estabilizadora, mantendo a conformação estrutural com oscilações controladas e estabilidade ao longo do tempo, NXH8 induz uma maior mobilidade e uma expansão gradual da estrutura, refletindo um comportamento mais dinâmico e menos estável. Esses resultados sugerem que, embora ambas as toxinas interajam com o

receptor, elas modulam de maneira diferenciada sua estrutura e estabilidade conformacional.

4.3.3.5 Padrões de Correlação Cruzada

A figura 11 apresenta mapas de correlação cruzada (CCij) dos resíduos do receptor nAChR de *T. californica* em interação com α -BgTx e NXH8. Esses mapas representam a relação dinâmica entre os resíduos, com áreas escuras indicando fortes correlações cruzadas positivas (púrpura) ou negativas (verde), enquanto áreas em branco indicam baixa ou nenhuma correlação. A análise dos dois mapas revela comportamentos distintos na modulação estrutural do receptor promovida pelas duas toxinas.

Figura 11 - Padrões de Correlação Cruzada para as Interações de BgTx e NXH8 com o Receptor nAChR de *T. californica*



A figura apresenta os padrões de correlação cruzada (CCij) entre os resíduos do receptor nAChR de *T. californica* em interação com α -BgTx e NXH8. No gráfico de NXH8, predominam blocos de correlação positiva (púrpura) concentrados ao longo da diagonal principal, sugerindo movimentos coordenados localizados e limitados a regiões específicas do receptor. As áreas de correlação negativa (verde) são esparsas, indicando que a ligação de NXH8 promove poucas alterações estruturais globais, mantendo o receptor em um estado mais estável. Em contraste, o gráfico de α -BgTx exhibe padrões mais extensos de correlação positiva e negativa. Isso reflete uma reestruturação conformacional global mais pronunciada, com movimentos sincronizados (púrpura) e anticorrelacionados (verde) entre resíduos distantes.

No caso da α -BgTx (à esquerda), o mapa apresenta maiores regiões escuras, tanto em púrpura quanto em verde. Essas áreas indicam correlações cruzadas significativas entre os resíduos, refletindo mudanças estruturais coordenadas e dinâmicas em múltiplas regiões do receptor. A intensidade e extensão dessas correlações sugerem que a α -BgTx promove uma reestruturação conformacional global, envolvendo várias regiões do receptor, com interações dinâmicas mais acentuadas e interdependentes.

Em contraste, o mapa para NXH8 (à direita) exhibe maiores áreas em branco e regiões de correlação menos intensas, embora ainda existam correlações positivas e negativas concentradas em torno da diagonal principal. Esse padrão indica que, sob a influência de NXH8,

as correlações cruzadas entre resíduos são mais restritas e menos intensas em comparação com α -BgTx. A predominância de áreas em branco sugere uma menor reorganização estrutural, com menos mudanças coordenadas ao longo do receptor. Assim, NXH8 parece manter a estrutura global do receptor em um estado mais estável, com menos flexibilidade dinâmica e menores interdependências entre regiões distantes.

Portanto, a comparação entre os dois mapas destaca os efeitos distintos das toxinas na modulação conformacional do receptor nAChR. A α -BgTx induz mudanças estruturais mais amplas e dinâmicas, promovendo interações sincronizadas e anticorrelacionadas entre resíduos distantes. Por outro lado, a NXH8 apresenta um efeito mais localizado e estável, com menor intensidade de correlações cruzadas e, consequentemente, menor reorganização estrutural do receptor. Esses resultados corroboram as análises anteriores, sugerindo que α -BgTx atua como um modulador mais dinâmico, enquanto NXH8 exerce um papel mais estabilizador sobre a estrutura do receptor.

5. DISCUSSÃO

A baixa toxicidade *in vivo* da toxina NXH8, evidenciada pela ausência de letalidade mesmo em doses equivalentes a seis vezes a DL_{50} do veneno total de *M. corallinus*, reflete características estruturais típicas das α -neurotoxinas não convencionais. Ao contrário de toxinas altamente potentes, como a α -BgTx, NXH8 apresenta uma afinidade significativamente reduzida pelos nAChRs, conforme demonstrado pelas análises estruturais e de interação *in silico* [23, 42]. Essa afinidade reduzida limita a capacidade da toxina de modular a função do receptor de forma eficaz, contribuindo para sua menor toxicidade.

Os dados de sobrevivência dos camundongos reforçam a importância da PLA_2 como o principal fator de letalidade no veneno de *M. corallinus*. A administração de VPL, um inibidor de PLA_2 , aumentou significativamente a sobrevivência dos animais, sugerindo que a toxicidade do veneno está fortemente associada à ação dessa β -neurotoxina. Essa observação, junto ao fato de que a administração de VPL em conjunto com anticorpos anti-sNXH8 não ter resultado em maior proteção, corrobora o papel limitado que a toxina NXH8 tem sobre a letalidade global do veneno.

A análise estrutural das interações de NXH8 com o nAChR nas interfaces $\alpha\gamma$ e $\alpha\delta$ revelou diferenças fundamentais em comparação com a α -BgTx. Na primeira alça, Finger I, enquanto a α -BgTx possui uma rede densa de interações envolvendo resíduos aromáticos, hidrofóbicos e polares, promovendo alta afinidade ao nAChR, NXH8 demonstra interações limitadas e ausência de ligações entre resíduos aromáticos. Essa diferença enfraquece significativamente a interação de NXH8, refletindo sua baixa afinidade e menor impacto na modulação do receptor.

Nas interações envolvendo a segunda alça de NXH8 e α -BgTx nas interfaces $\alpha\gamma$ e $\alpha\delta$ do nAChR, a densidade e diversidade dos contatos são características cruciais que influenciam diretamente a afinidade de cada toxina pelo receptor. Na interface $\alpha\gamma$, α -BgTx se destaca por estabelecer interações mais densas e diversificadas, enquanto NXH8 depende de interações mais restritas e de menor força estabilizadora. Padrões semelhantes são observados na interface $\alpha\delta$, onde a estabilidade geral do complexo é influenciada pela maior complementaridade de α -BgTx em comparação com NXH8.

Embora ambas as toxinas compartilhem o mesmo sítio de ligação no receptor, suas capacidades de estabilizar as interações e induzir mudanças conformacionais no nAChR diferem significativamente devido às variações em suas composições estruturais. Em α -BgTx, essas interações são altamente diversificadas e robustas, proporcionando uma ligação estável e eficiente ao receptor, corroborando o que já foi descrito na literatura [43].

NXH8, por outro lado, apresenta uma rede de interações menos diversificada. Embora possua características importantes, como a ligação dissulfeto no loop II e interações iônicas que fornecem estabilidade adicional, essas interações são consideravelmente mais fracas em comparação com as de α -BgTx, resultando em uma ligação menos estável.

Na análise da terceira alça também se observa uma contribuição significativa para a modulação das interações com as subunidades $\alpha\gamma$ e $\alpha\delta$ do nAChR. α -BgTx demonstra alta eficiência em estabelecer contatos robustos e direcionais. Resíduos como Tyr54 e Trp55 desempenham papéis centrais, criando uma rede de interações que combina forças hidrofóbicas com estabilidade eletrostática, promovendo ajustes conformacionais que favorecem a ligação e aumentam a afinidade ao receptor.

Por outro lado, NXH8, ao interagir com as mesmas interfaces, apresenta uma estratégia de ligação substancialmente diferente. Suas interações são majoritariamente mediadas por ligações de van der Waals e contatos hidrofílicos, resultando em interações mais frágeis e menos direcionais. Essa diferença compromete a estabilidade e a afinidade do complexo, evidenciando que o Finger III de NXH8 possui um papel estabilizador mais limitado. Essas características reforçam a baixa toxicidade de NXH8 em comparação a α -BgTx, destacando a influência das diferenças estruturais nas propriedades funcionais de ambas as toxinas.

A análise de RMSD, RMSF e Rg evidencia que NXH8 induz menos alterações conformacionais no nAChR em comparação à α -BgTx. Os gráficos de RMSD demonstram que a NXH8 mantém a estrutura do receptor em um estado mais estável, com flutuações menores e menos dispersas. De forma semelhante, os padrões de RMSF revelam uma interação estabilizadora da NXH8, enquanto a α -BgTx promove maior mobilidade em regiões críticas do receptor.

Os padrões de correlação cruzada reforçam que NXH8 impacta apenas domínios limitados do receptor, sem causar mudanças conformacionais globais. Isso sugere que sua interação é mais localizada e menos disruptiva, diferentemente da α -BgTx, que explora múltiplos estados conformacionais.

A falta de validação como a cristalografia de raios X para os dados *in silico* é uma limitação deste estudo. Sugere-se a utilização futura dessas técnicas para refinar as informações dos modelos preditos. Do ponto de vista científico, a identificação de interações específicas entre NXH8 e o nAChR oferece informações valiosas para o desenvolvimento de intervenções mais eficazes, como anticorpos monoclonais direcionados, e para uma compreensão mais ampla dos mecanismos de ação da NXH8 e das diferenças em relação a outras neurotoxinas, como a α -BgTx.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade *in vivo* e *in silico* de NXH8, uma α -neurotoxina não convencional de *Micrurus corallinus*, investigando sua afinidade com o nAChR de *T. californica* e comparando-a com as interações da α -BgTx, uma toxina amplamente descrita na literatura científica. Além disso, buscou-se correlacionar os resultados estruturais e funcionais que contribuem para a toxicidade de NXH8.

Os resultados demonstraram que NXH8 apresentou baixa toxicidade e que os anticorpos anti-NXH8 não foram capazes de neutralizar o veneno de *M. corallinus* em camundongos. Por outro lado, a administração de VPL aumentou significativamente a sobrevida dos animais, sugerindo que a letalidade do veneno está provavelmente associada à ação de β -neurotoxinas, como a PLA₂.

Este estudo também revelou que NXH8, em comparação com α -BgTx, exibe interações menos densas e específicas com o nAChR, o que contribui para sua baixa toxicidade e função menos disruptiva. Essas diferenças destacam os papéis distintos de α -neurotoxinas convencionais e não convencionais, como NXH8, no contexto da ação de venenos.

Assim, esta pesquisa não apenas aprimora o entendimento sobre os mecanismos de ação de NXH8, mas também amplia a compreensão das particularidades estruturais e funcionais das α -neurotoxinas não convencionais. Esses achados possuem implicações práticas relevantes, fornecendo uma base sólida para o desenvolvimento de antivenenos mais eficazes e direcionados, capazes de neutralizar diferentes componentes do veneno de *Micrurus spp.* e reduzir sua letalidade.

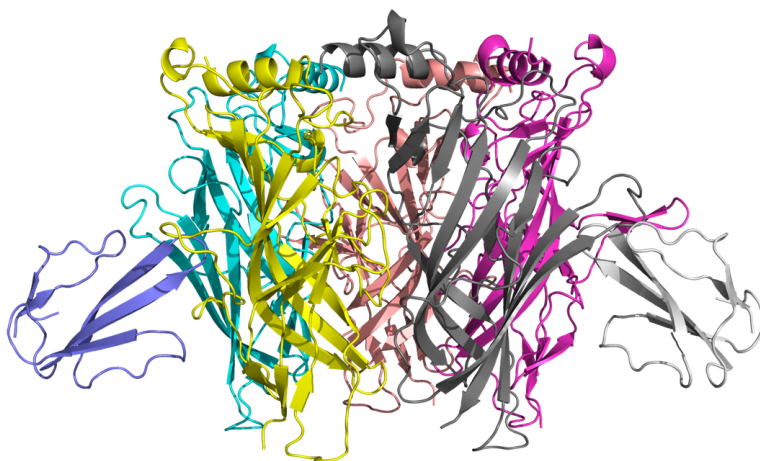
7 REFERÊNCIAS

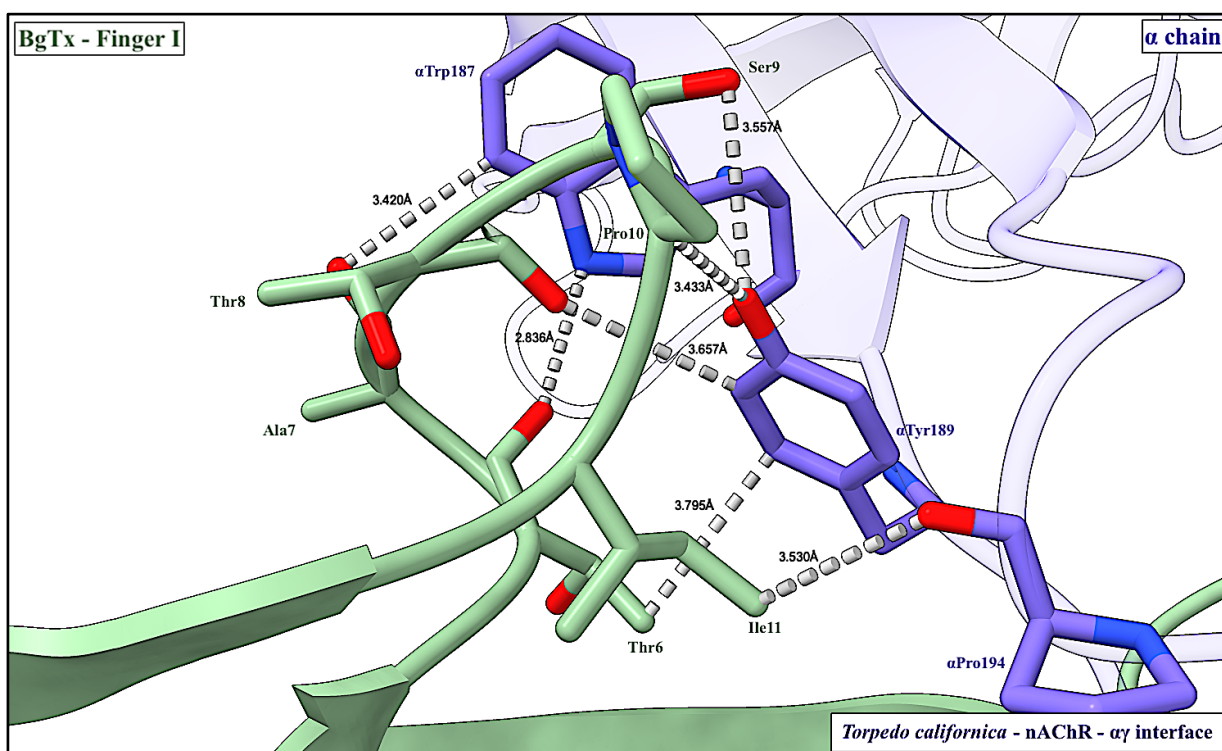
1. Roze, J.A., *Coral snakes of the Americas : biology, identification and venoms* / Janis A. Roze. 1996, Malabar, Fla: Krieger. xii, 328 p. : Ill. (some col.), maps.
2. Organização Mundial da Saúde, [FACT SHEET] Snakebite envenoming. Disponível em: < <https://web.archive.org/web/20240303212634/https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming> > (Arquivado em 03/03/2024).
3. Secretaria de Vigilância em Saúde, *Boletim epidemiológico* 18. Vol. 54. 2023, Ministério da Saúde, Brasil. p. 1 - 11.
4. Vital Brazil, O., *Coral snake venoms: mode of action and pathophysiology of experimental envenomation (I)*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 1987. **29**(3): p. 119-26.
5. Vital Brazil, O. and M.D. Fontana, *Ações pré-juncionais e pós-juncionais da peçonha da cobra coral Micrurus corallinus na junção neuromuscular*. Mem. Inst. Butantan, 1983/84. **47/48**: p. 13-26.
6. Torres, J.L., et al. *Envenenamento grave por serpente Micrurus corallinus em criança: relato de caso*. Universidade Federal de Santa Catarina 2013.
7. Serapicos, E. and J. Merusse, *Variação de peso e sobrevida de Micrurus corallinus sob diferentes condições de alimentação em biotério (Serpentes, Elapidae)*. Iheringia Série Zoologia, 2002. **92**(4): p. 105-109.
8. Leao, L.I., P.L. Ho, and L. Junqueira-de-Azevedo Ide, *Transcriptomic basis for an antiserum against Micrurus corallinus (coral snake) venom*. BMC Genomics, 2009. **10**: p. 112.
9. Rigoni, M., et al., *Snake presynaptic neurotoxins with phospholipase A2 activity induce punctate swellings of neurites and exocytosis of synaptic vesicles*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 16): p. 3561-70.
10. Dos Santos, J.I., et al., *Structural and functional studies of a bothropic myotoxin complexed to rosmarinic acid: new insights into Lys49-PLA(2) inhibition*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28521.
11. Tonello, F. and M. Rigoni, *Cellular Mechanisms of Action of Snake Phospholipase A2 Toxins*, in *Snake Venoms*, H. Inagaki, et al., Editors. 2017, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 49-65.
12. Ho, P.L., et al., *Reverse Biology Applied to Micrurus-Corallinus, a South-American Coral Snake*. Journal of Toxicology-Toxin Reviews, 1995. **14**(3): p. 327-337.
13. Fry, B.G., et al., *Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins*. J Mol Evol, 2003. **57**(1): p. 110-29.
14. Zeng, H., et al., *The solution structure of the complex formed between alpha-bungarotoxin and an 18-mer cognate peptide derived from the alpha 1 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor from Torpedo californica*. J Biol Chem, 2001. **276**(25): p. 22930-40.
15. Betzel, C., et al., *The refined crystal structure of alpha-cobratoxin from Naja naja siamensis at 2.4-A resolution*. J Biol Chem, 1991. **266**(32): p. 21530-6.
16. Servent, D., et al., *Muscarinic toxins*. Toxicon, 2011. **58**(6-7): p. 455-63.
17. Fruchart-Gaillard, C., et al., *Different interactions between MT7 toxin and the human muscarinic M1 receptor in its free and N-methylscopolamine-occupied states*. Mol Pharmacol, 2008. **74**(6): p. 1554-63.
18. de Weille, J.R., et al., *Calciseptine, a peptide isolated from black mamba venom, is a specific blocker of the L-type calcium channel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(6): p. 2437-40.
19. Diochot, S., et al., *Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain*. Nature, 2012. **490**(7421): p. 552-5.
20. Su, S.H., et al., *Cardiotoxin-III selectively enhances activation-induced apoptosis of human CD8+ T lymphocytes*. Toxicol Appl Pharmacol, 2003. **193**(1): p. 97-105.
21. Kini, R.M. and R. Doley, *Structure, function and evolution of three-finger toxins: mini proteins with multiple targets*. Toxicon, 2010. **56**(6): p. 855-67.
22. Prieto da Silva, A.R., *Clonagem, expressão e estudo de alguns cDNAs codificando proteínas estruturalmente relacionadas às alfa neurotoxinas da glândula de veneno da cobra coral Micrurus corallinus (Serpentes, Elapidae)* in *Instituto de Química*. 2002, Universidade de São Paulo: São Paulo. p. 166.
23. Roman-Ramos, H., et al., *The Cloning and Characterization of a Three-Finger Toxin Homolog (NXH8) from the Coralsnake Micrurus corallinus That Interacts with Skeletal Muscle Nicotinic Acetylcholine Receptors*. Toxins (Basel), 2024. **16**(4).

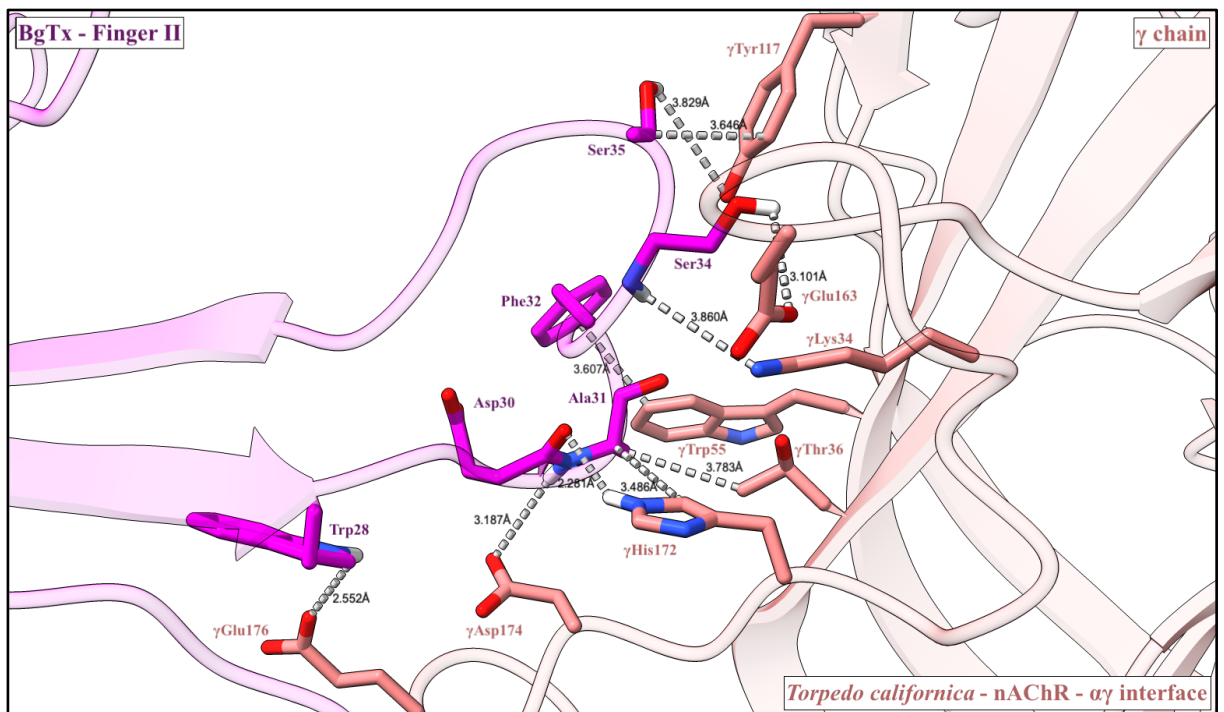
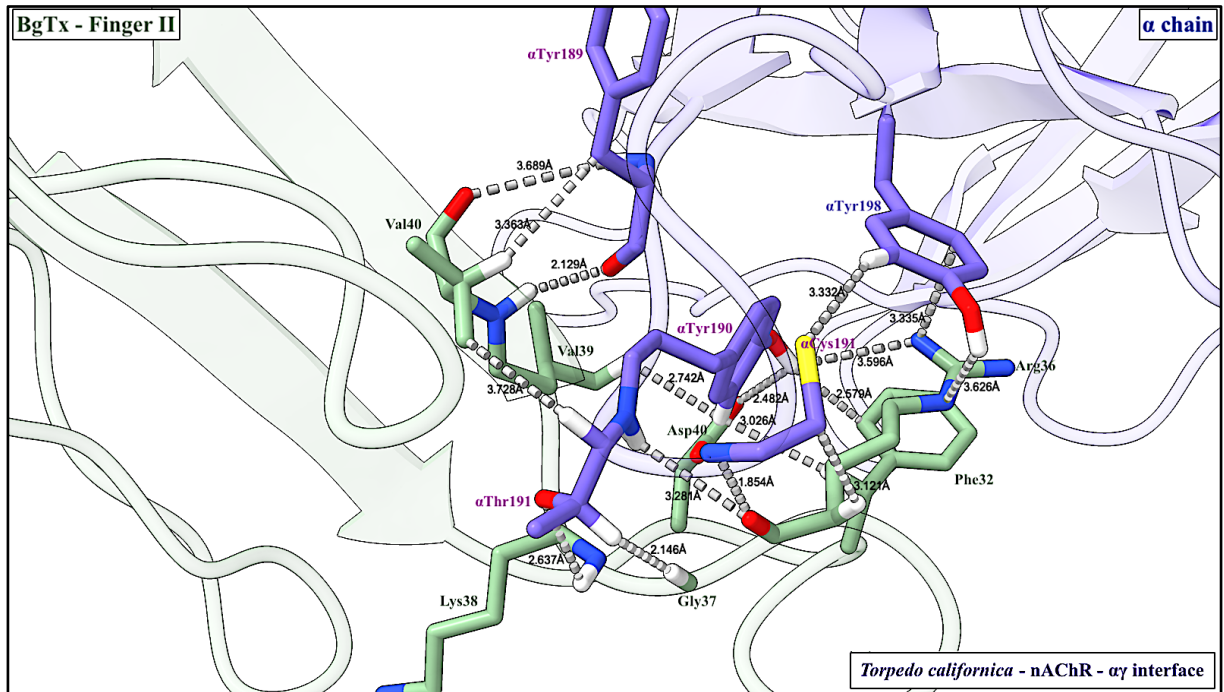
24. Tanaka, G.D., et al., *Diversity of Micrurus snake species related to their venom toxic effects and the prospective of antivenom neutralization*. PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(3): p. e622.
25. Gutierrez, J.M., et al., *Varespladib (LY315920) and Methyl Varespladib (LY333013) Abrogate or Delay Lethality Induced by Presynaptically Acting Neurotoxic Snake Venoms*. Toxins (Basel), 2020. **12**(2).
26. Lewin, M., et al., *Varespladib (LY315920) Appears to Be a Potent, Broad-Spectrum, Inhibitor of Snake Venom Phospholipase A2 and a Possible Pre-Referral Treatment for Envenomation*. Toxins (Basel), 2016. **8**(9).
27. Salvador, G.H.M., et al., *The synthetic varespladib molecule is a multi-functional inhibitor for PLA(2) and PLA(2)-like ophidic toxins*. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2021. **1865**(7): p. 129913.
28. Silva-Carvalho, R., et al., *Partial efficacy of a Brazilian coralsnake antivenom and varespladib in neutralizing distinct toxic effects induced by sublethal Micrurus dumerilii carinicauda envenoming in rats*. Toxicon, 2022. **213**: p. 99-104.
29. Silva-Carvalho, R., et al., *In vivo treatment with varespladib, a phospholipase A(2) inhibitor, prevents the peripheral neurotoxicity and systemic disorders induced by Micrurus corallinus (coral snake) venom in rats*. Toxicol Lett, 2022. **356**: p. 54-63.
30. Tunyasuvunakool, K., et al., *Highly accurate protein structure prediction for the human proteome*. Nature, 2021. **596**(7873): p. 590-596.
31. Bordogna, A., A. Pandini, and L. Bonati, *Predicting the accuracy of protein-ligand docking on homology models*. J Comput Chem, 2011. **32**(1): p. 81-98.
32. Mariani, V., et al., *lDDT: a local superposition-free score for comparing protein structures and models using distance difference tests*. Bioinformatics, 2013. **29**(21): p. 2722-8.
33. Gill, T.N., *Analytical synopsis of the order of Squali; and revision of the nomenclature of the genera*. Annals of the Lyceum of Natural History of New York, 1862. **7**: p. 367-370, 371-408.
34. Schoch, C.L., et al., *NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools*. Database (Oxford), 2020. **2020**.
35. Michael, S.W., *Reef sharks and rays of the world : a guide to their identification, behavior, and ecology*. 1993, Monterey, Calif.: Sea Challengers. vi, 107 p.
36. Ayres, W.O., *[Descriptions of new species of Californian fishes.] A number of short notices read before the Society at several meetings in 1855*. Proceedings of the California Academy of Sciences, 1855.
37. Noda, M., et al., *Structural homology of Torpedo californica acetylcholine receptor subunits*. Nature, 1983. **302**(5908): p. 528-32.
38. Arantes, P.R., et al., *Making it Rain: Cloud-Based Molecular Simulations for Everyone*. J Chem Inf Model, 2021. **61**(10): p. 4852-4856.
39. Case, D.A., et al., *AmberTools*. J Chem Inf Model, 2023. **63**(20): p. 6183-6191.
40. Maier, J.A., et al., *ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB*. J Chem Theory Comput, 2015. **11**(8): p. 3696-713.
41. Jorgensen, W.L., et al., *Comparison of simple potential functions for simulating liquid water*. The Journal of Chemical Physics, 1983. **79**(2): p. 926-935.
42. Nirthanan, S., et al., *Non-conventional toxins from Elapid venoms*. Toxicon, 2003. **41**(4): p. 397-407.
43. Nys, M., et al., *The molecular mechanism of snake short-chain alpha-neurotoxin binding to muscle-type nicotinic acetylcholine receptors*. Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 4543.

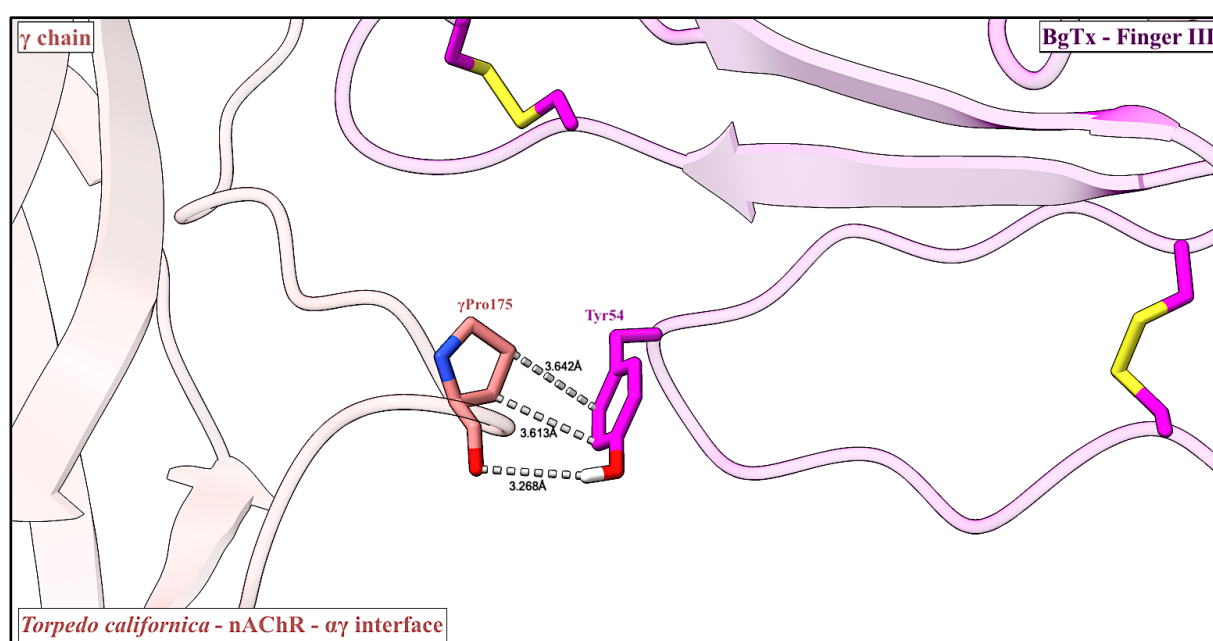
AlphaFold (nAChR - Porção extracelular + 2 x NXH8)

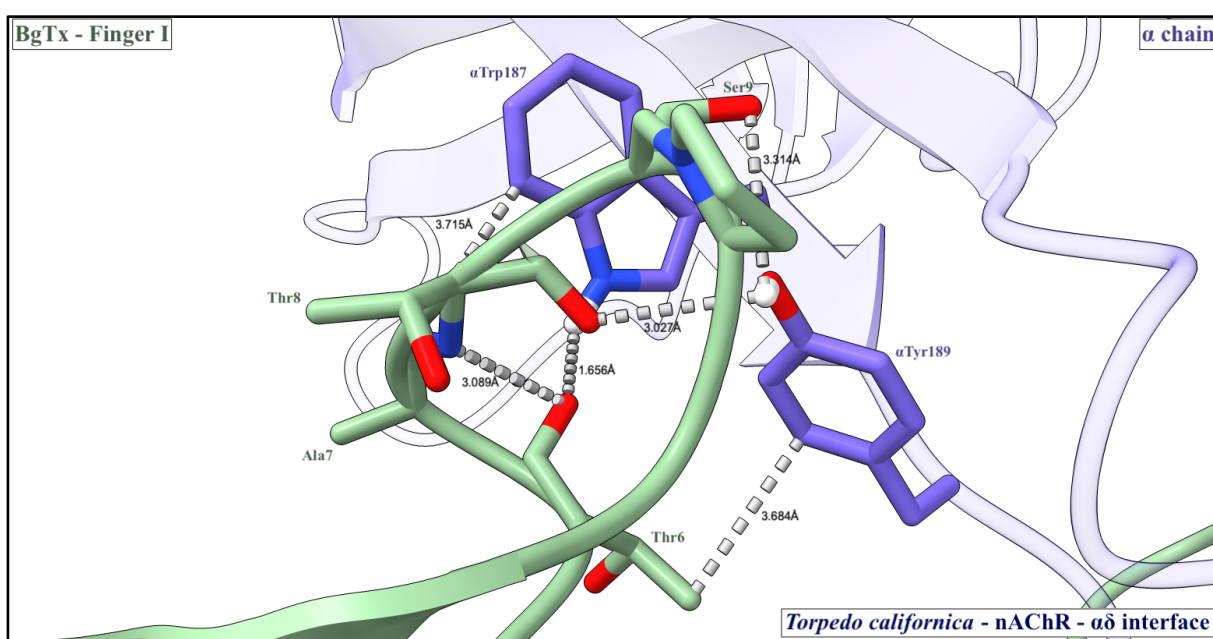
pLDDT=83.7
pTM=0.807
ipTM=0.774

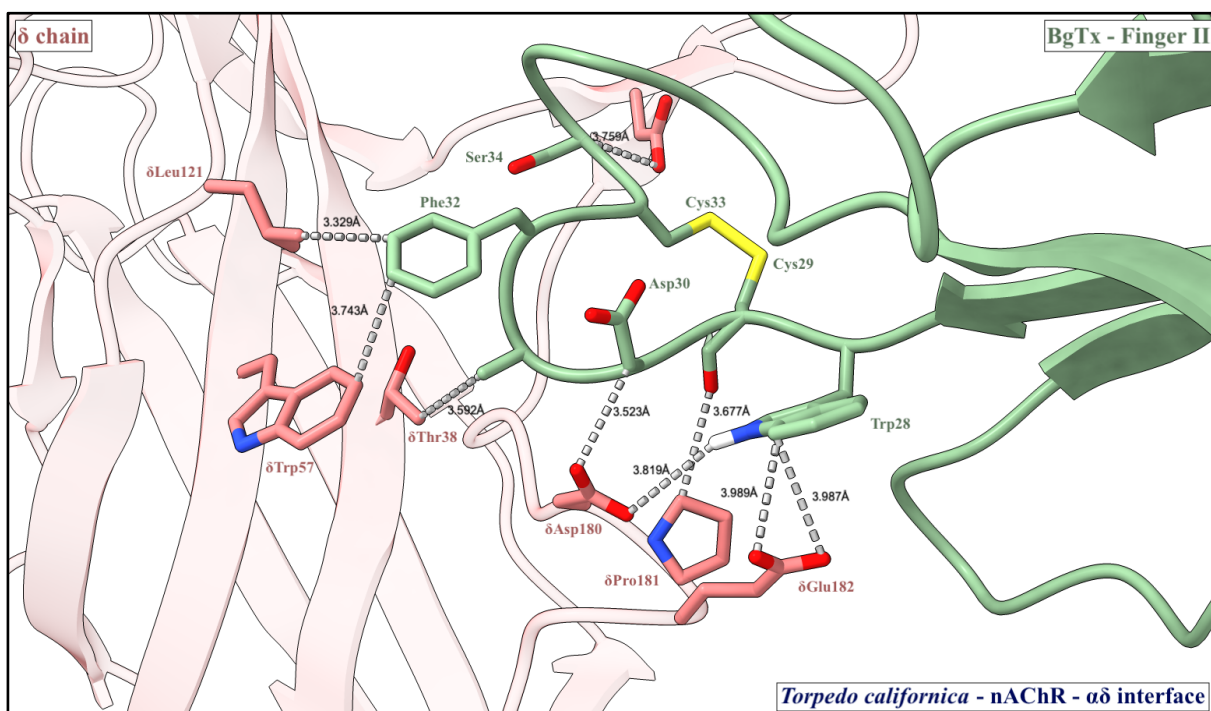
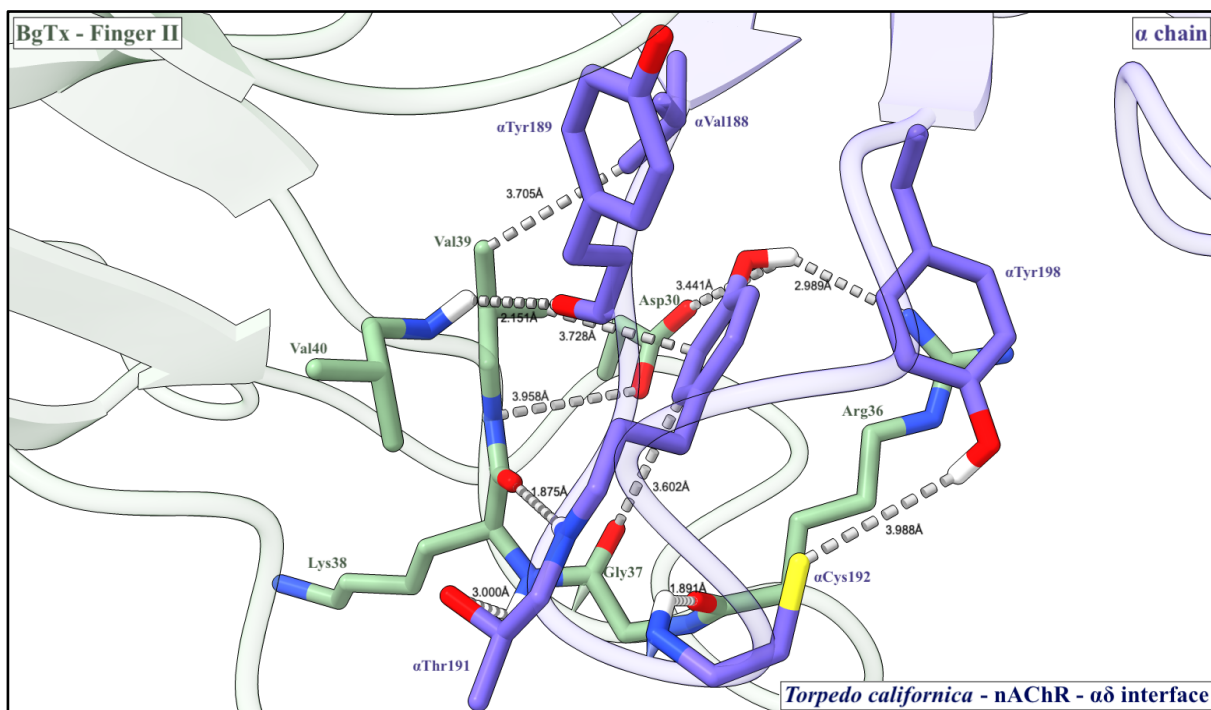


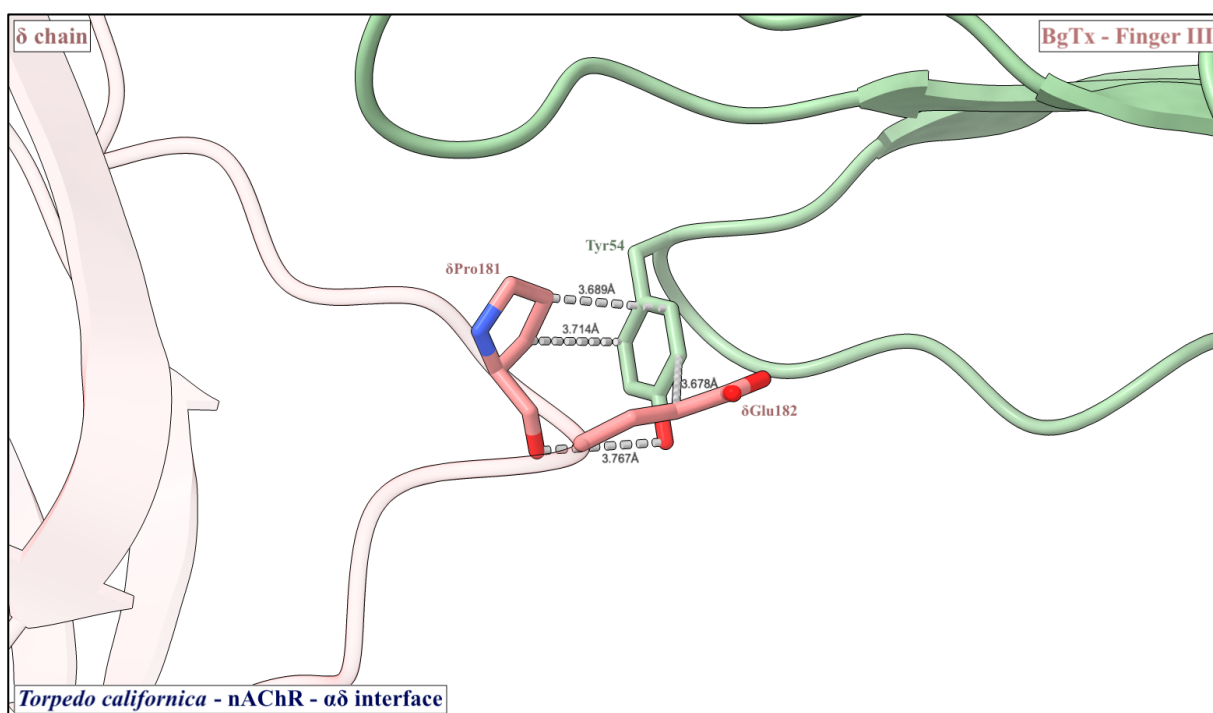


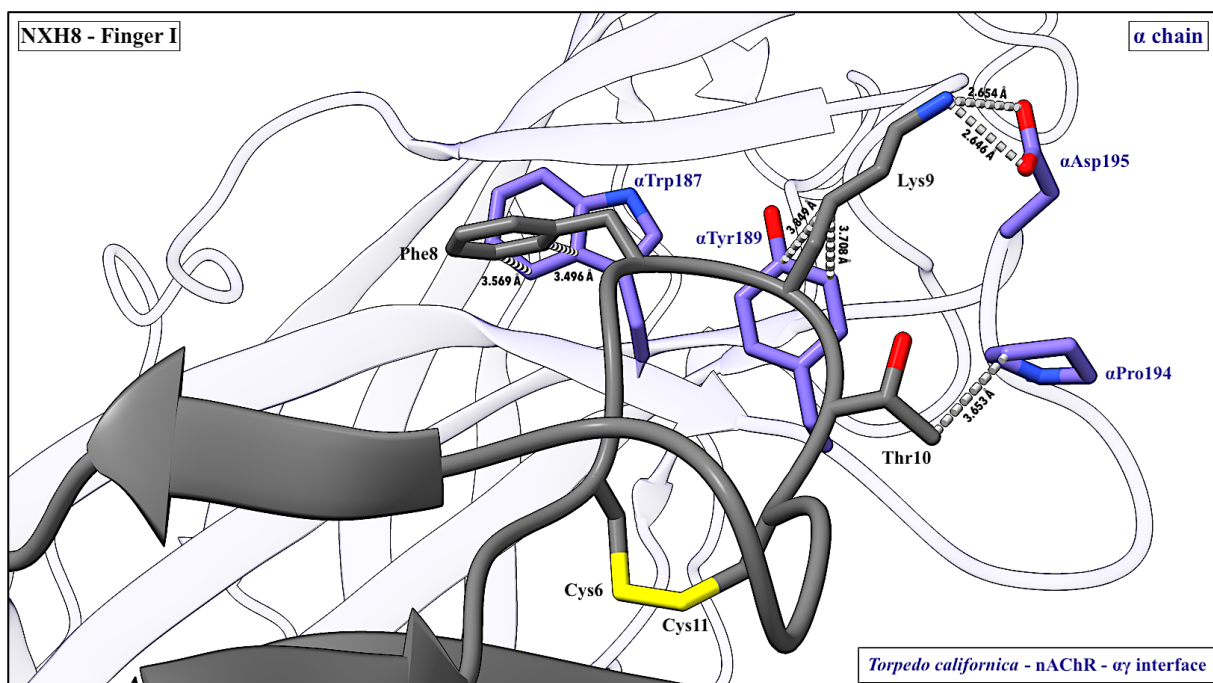


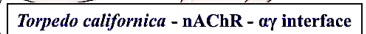
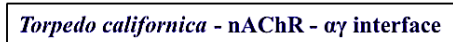


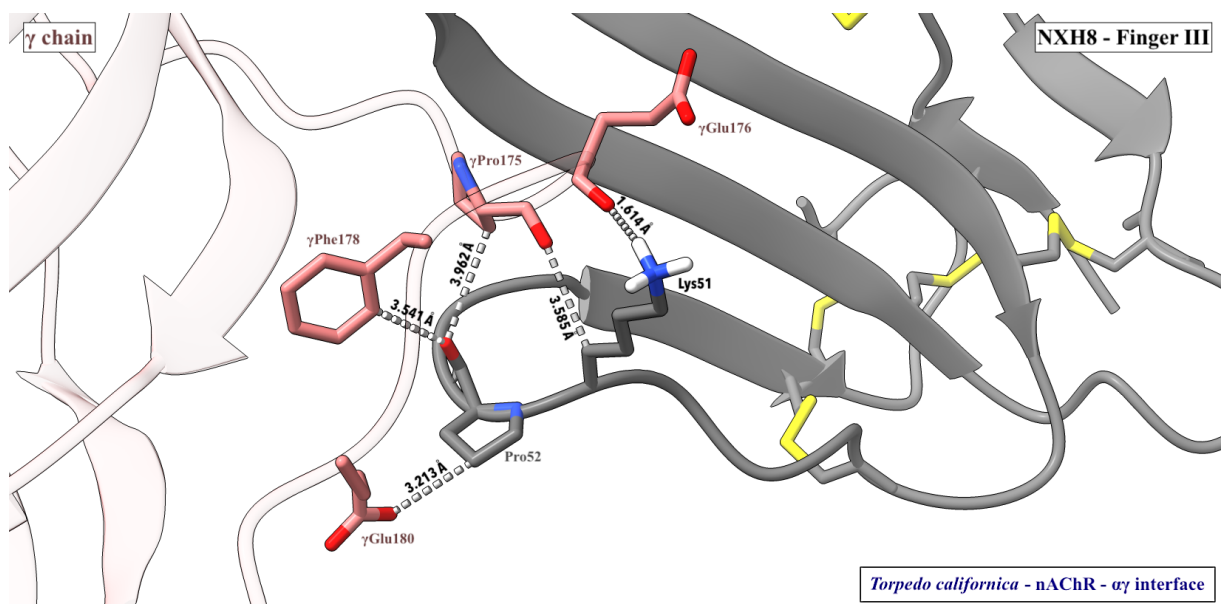


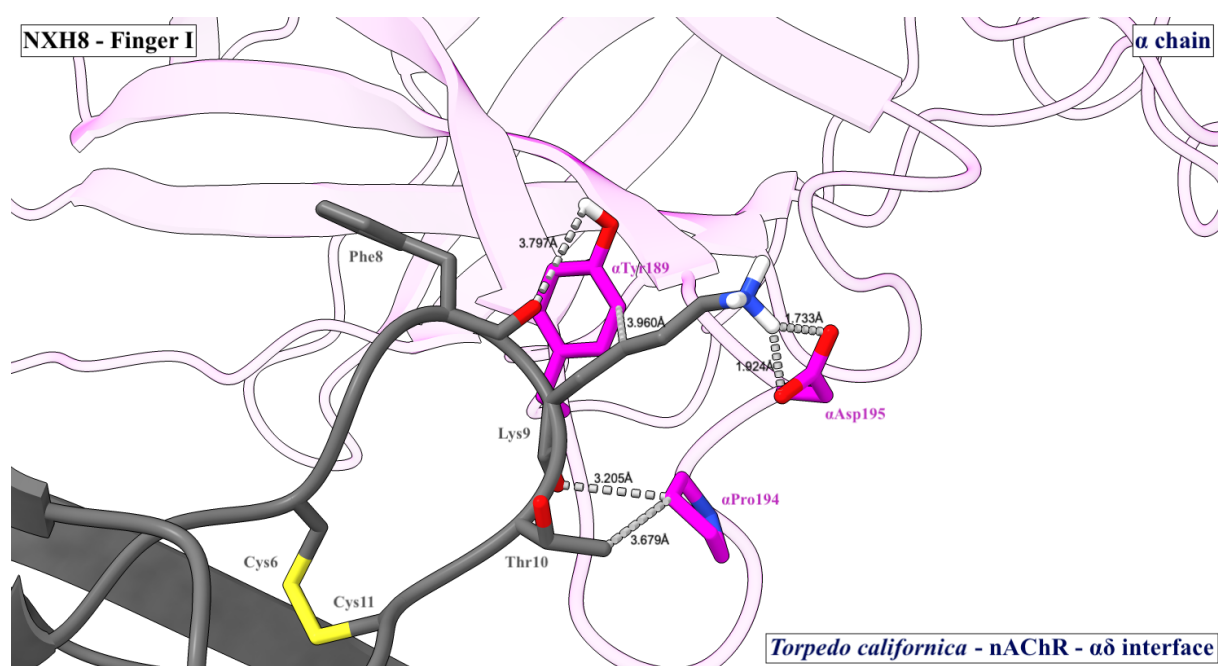


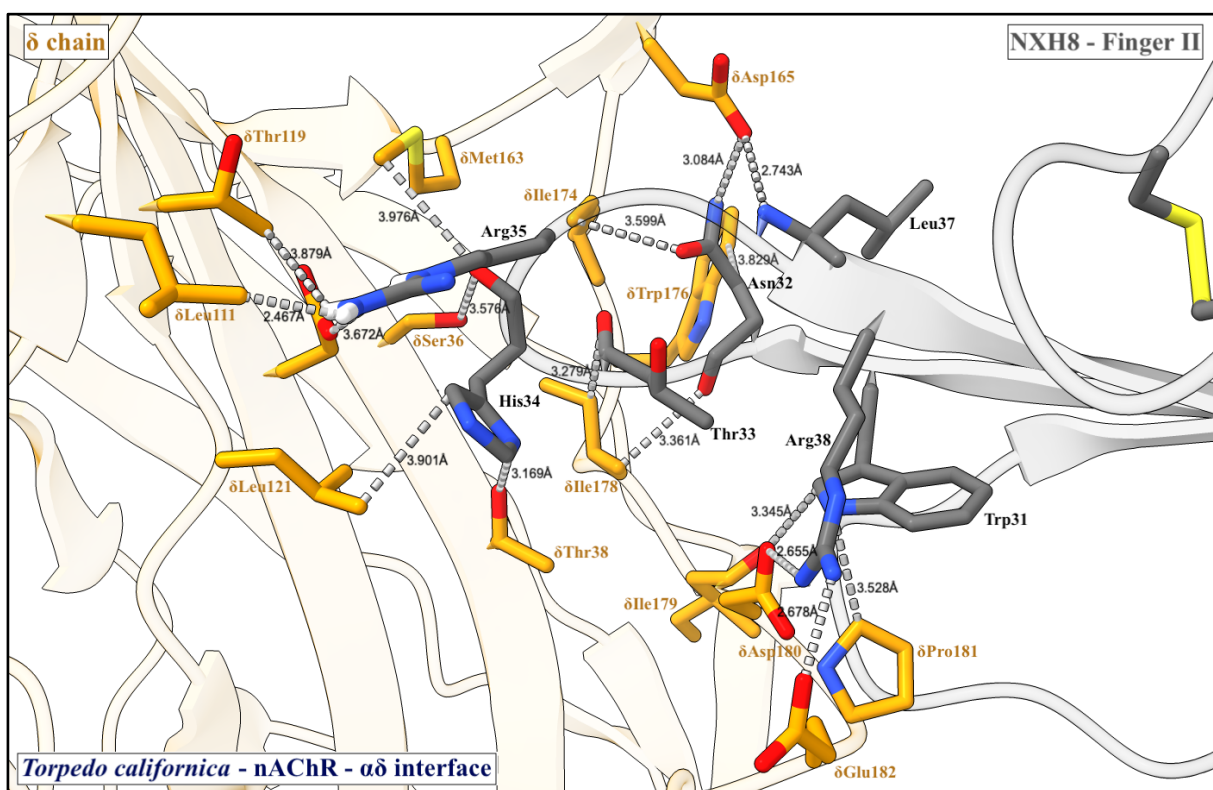
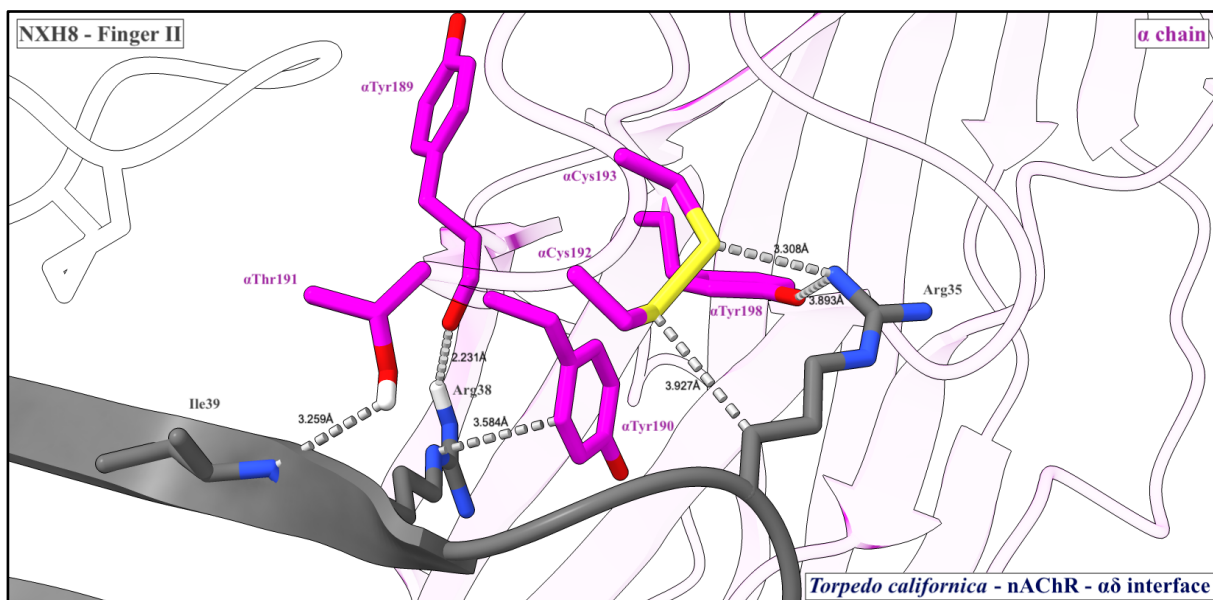


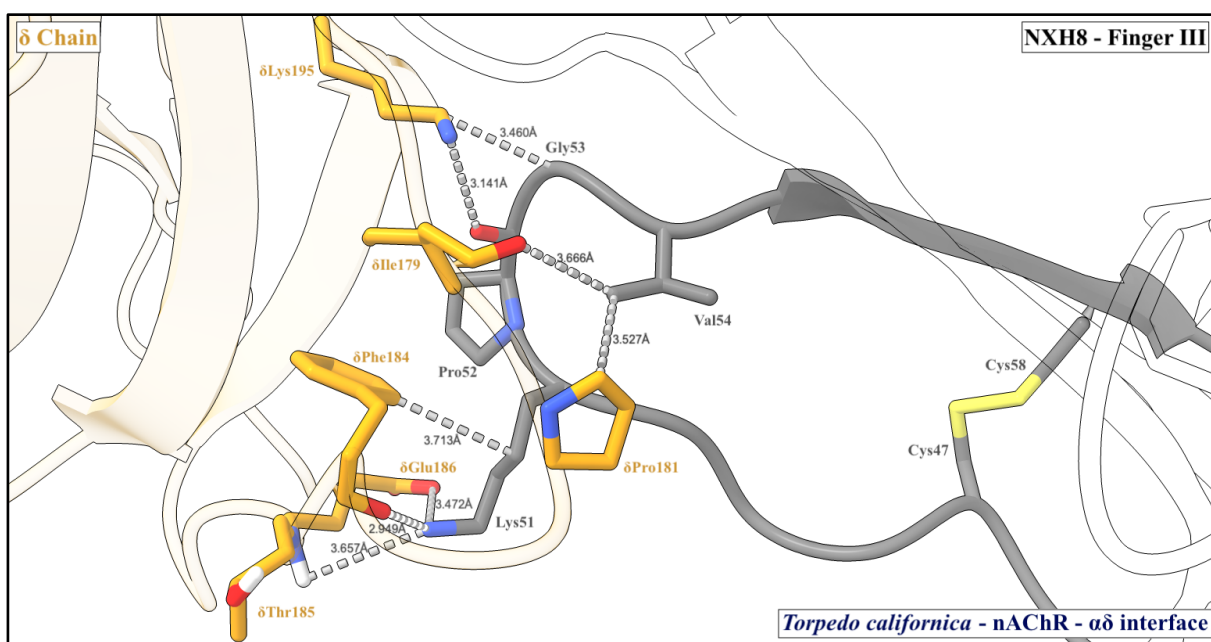












Licença de uso para a figura 2

License Number	5867070212261
License date	Sep 13, 2024
 Licensed Content	
Licensed Content Publisher	BMJ Publishing Group Ltd.
Licensed Content Publication	BMJ Case Reports
Licensed Content Title	Acute myasthenic syndrome following coral snake envenomation in the Caribbean: a harbinger for admission to the intensive care unit
Licensed Content Author	Narine Mack, Antonio Jose Reyes, Kanterpersad Ramcharan, Stanley Lawrence Giddings
Licensed Content Date	Mar 1, 2021
Licensed Content Volume	14
Licensed Content Issue	3
 Order Details	
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor Type	Individual
Format	Electronic
Portion Used	Figure/table/extract
Number of languages	1
Number of figure/table/extracts	1
Will you be translating?	Yes
 About Your Work	
Title of new work	Caracterização estrutural e toxicológica de NXH8, α -neurotoxina não convencional da cobra coral brasileira, <i>Micrurus corallinus</i> .
Institution name	Universidade Nove de Julho
Expected presentation date	Dec 2024
 Additional Data	
Order reference number	001
Portions	Figure 1.
The Requesting Person / Organization to Appear on the License	Prof. Dr. Henrique Roman Ramos
Specific Languages	Brazilian Portuguese
Circulation	1
 Requestor Location	
Requestor Location	Dr. Henrique Ramos Rua Vergueiro, 235/249 São Paulo, SP 01504-001 Brazil Attn: Dr. Henrique Ramos
 Tax Details	
Publisher Tax ID	GB674738491
Customer Tax ID	

Certificado de Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Síntese química e caracterização farmacológica de quatro alfa neurotoxinas presentes no veneno de *Micrurus corallinus* (cobra coral).", protocolada sob o CEUA nº 4463100419 (ID 000188), sob a responsabilidade de **Henrique Roman Ramos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE) na reunião de 22/10/2019.

We certify that the proposal "Chemical synthesis and pharmacological characterization of four alpha-neurotoxins from *Micrurus corallinus* (coral snake) venom.", utilizing 125 Isogenics mice (125 females), protocol number CEUA 4463100419 (ID 000188), under the responsibility of **Henrique Roman Ramos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Nove de Julho University (CEUA/UNINOVE) in the meeting of 10/22/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **10/2019** a **12/2020** Área: **Medicina**

Origem: **Biotério - Unidade Vergueiro**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **5 a 7 semanas**

N: **125**

Linhagem: **Balb/c**

Peso: **20 a 30 g**

Local do experimento: Todos os experimentos serão realizados em local adequado ao manejo de animais, nas dependências do biotério da Universidade Nove de Julho, Vergueiro.

São Paulo, 22 de outubro de 2019

Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho

Profa. Dra. Stella Regina Zamuner
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho

Certificado de Prorrogação de Prazo Aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).



*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

São Paulo, 08 de dezembro de 2021
CEUA N [4463100419](#)

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Henrique Roman Ramos
Área: Medicina

Título da proposta: "Síntese química e caracterização farmacológica de quatro alfa neurotoxinas presentes no veneno de *Micrurus corallinus* (cobra coral).".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNINOVE (ID 000103)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 01/dezembro/2021) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Prezados membros da comissão de ética no uso de animais. Considerando que durante o primeiro semestre de 2021 tivemos uma segunda onda de covid, prejudicando novamente o acesso e manuseio de animais de laboratório nas dependências da universidade, solicito que o prazo final do presente protocolo seja mais uma vez prorrogado, agora para o dia 30.06.2022. Este prazo adicional é necessário para que possamos concluir os experimentos com os animais que já se encontram sob tratamento no biotério da universidade. Havendo qualquer necessidade de informações adicionais, estou a inteira disposição. Desde já agradeço a atenção. Cordialmente. Henrique Roman Ramos".

Comentário da CEUA: "Projeto aprovado com alteração do prazo para 30 de junho de 2022.".

Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho

Profa. Dra. Stella Regina Zamuner
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho

ANEXO IV

Checklist Pós-Realização do Experimento - Normas ARRIVE

Categoria	Descrição
Desenho do Estudo	Estudo experimental com abordagem <i>in vivo</i> e <i>in silico</i> : <i>In vivo</i> : Testes de toxicidade e sobrevivência em camundongos Balb/c, com uso de um grupo controle, analisando os efeitos da toxina NXH8 e do veneno de <i>Micrurus corallinus</i> . <i>In silico</i> : Modelagem molecular e simulação de dinâmica molecular para estudar as interações de NXH8 com o receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR).
Tamanho da Amostra	<i>In vivo</i> : 25 camundongos Balb/c fêmeas, divididos em cinco grupos de cinco animais cada. <i>In silico</i> : Utilização de modelos computacionais baseados em dados de sequências de proteínas do receptor nAChR e da NXH8.
Crítérios de Inclusão e Exclusão	Inclusão: Camundongos da linhagem Balb/c, fêmeas, com peso aproximado de 20 g. Animais saudáveis e aptos para os procedimentos experimentais. Exclusão: Animais com condições pré-existentes que pudessem comprometer a validade dos resultados ou a ética do experimento.
Randomização	Animais foram agrupados de forma randomizada em grupos de 5 animais.
Cegamento	Durante o experimento, todos os camundongos Balb/c fêmeas foram escolhidos aleatoriamente para cada etapa, garantindo a aleatoriedade no manejo e minimizando o viés experimental. No entanto, o experimento não envolveu cegamento do pesquisador em relação à alocação dos grupos de tratamento, uma vez que a observação direta das respostas ao veneno e às intervenções (soro antielapídico, anticorpos anti-NXH8 e Varespladib) era essencial para o registro detalhado dos desfechos.
Desfechos	<i>In vivo</i> : Letalidade da NXH8 e do veneno completo de <i>Micrurus corallinus</i> em diferentes condições. Sobrevivência dos animais após intervenções com soro antielapídico, anticorpos anti-NXH8 e inibidor de PLA2 (Varespladib). <i>In silico</i> : Estabilidade das interações entre NXH8 e nAChR. Alterações conformacionais induzidas no receptor pelo NXH8, em comparação com a α -bungarotoxina.
Métodos Estatísticos	Teste de Kruskal-Wallis utilizado para análise de diferenças entre os grupos experimentais nos ensaios de sobrevivência, adequado ao pequeno tamanho amostral.
Animais Experimentais	Camundongos Balb/c fêmeas, com peso médio de 20 g. Os experimentos foram conduzidos conforme as normas éticas do CEUA/UNINOVE e legislações brasileiras e internacionais para uso de animais em pesquisa.
Procedimentos Experimentais	<i>In vivo</i> : Grupos experimentais receberam: Dose letal (3 DL50) de veneno de <i>Micrurus corallinus</i> . NXH8 em doses de 20 μ g ou 40 μ g. Intervenções adicionais (soro antielapídico, anticorpos anti-NXH8 e Varespladib). Sobrevivência monitorada por 48 horas. <i>In silico</i> : Modelagem molecular com AlphaFold2. Docking molecular com HADDOCK. Dinâmica molecular com AMBER, simulando interações da NXH8 e α -bungarotoxina com nAChR.
Resultados	<i>In vivo</i> : NXH8 demonstrou baixa toxicidade em camundongos. O soro antielapídico neutralizou completamente a toxicidade do veneno. Varespladib aumentou a sobrevivência, indicando o papel da PLA2 na letalidade. Anticorpos anti-NXH8 não foram suficientes para neutralizar a toxicidade do veneno. <i>In silico</i> : NXH8 interage com nAChR nas interfaces $\alpha\gamma$ e $\alpha\delta$, mas com menor afinidade do que a α -bungarotoxina. Menores alterações conformacionais foram observadas no receptor em presença de NXH8, explicando sua baixa toxicidade.