

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

RAFAELA INDALECIO MORENO

**SCREENING DE INIBIDORES DE CATEPSINA-B E CASPASE-
1 A PARTIR DE ANIMAIS MARINHOS, PARA DIMINUIÇÃO NA
NEUROINFLAMAÇÃO**

Bragança Paulista
2022

RAFAELA INDALECIO MORENO - RA:001202015090

SCREENING DE INIBIDORES DE CATEPSINA-B E CASPASE-1 A PARTIR DE ANIMAIS MARINHOS, PARA DIMINUIÇÃO NA NEUROINFLAMAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Juliana MozerSciani

Bragança Paulista
2022

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por me ajudar a ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo do curso. Aos meus pais, que estiveram ao meu lado me apoiando ao longo dessa jornada. À Karine Renzominha supervisora pelo incentivo ao longo do curso. À minha orientadora Professora Juliana, pela paciência, compreensão e por ter me orientado e conduzido até aqui.

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é a 7ª causa de morte no mundo. Acredita-se que a atividade de secretases na proteína APP gere certos peptídeos β -amilóides ($A\beta$) que se agregam e se acumulam em regiões do cérebro, causando disfunção mitocondrial e lisossomal, inflamação e apoptose. A deposição de $A\beta$ pode ativar a microglia, que libera mediadores pró-inflamatórios que contribuem para a neuroinflamação e contribuem para a DA. A participação das caspases-1 e na montagem do inflamassoma da microglia é essencial para a liberação do mediador, que pode ser um interessante alvo terapêutico para a DA. As catepsinas B também contribuem para a ativação da microglia, resultando na liberação de mediadores inflamatórios. Neste trabalho realizamos uma triagem de novos inibidores de caspase-1 e catepsina B a partir de extratos de animais invertebrados marinhos da biodiversidade brasileira. Esses animais podem fornecer uma biblioteca de moléculas que podem atuar em tais alvos e contribuir para a descoberta de medicamentos para esta doença incurável. Os extratos de 10 espécies foram testados quanto à atividade inibitória sobre as enzimas, utilizando enzimas comerciais e substratos sintéticos específicos. O extrato capaz de inibir uma das enzimas foi fracionado por HPLC para a obtenção de uma molécula ativa pura, que foi analisada por espectrometria de massas. Foi possível obter 2 extratos inibidores da caspase-1 (*Chiropsamusquadrumanus* e *Eudendriumcarneum*) e 5 extratos que inibiram a catepsina B. Extratos de *C.quadrumanus* e *E.carneum* foram fracionados, e suas frações testadas novamente no mesmo modelo enzimático, onde 2 frações de cada extrato foi ativo na mesma enzima. *Zoanthussociatus* e *Aipstasiapallida* foram fracionados por serem inibidores da catepsina B. *AA.pallida* apresentou 1 fração com inibição significativa, enquanto as frações de *Z. sociatus* não inibiram a catepsina. A análise por espectrometria de massas revelou que os extratos necessitam de mais uma etapa cromatográfica para um alto nível de pureza, mas o íon ativo já foi identificado, uma vez estava presente nas frações ativas, e será caracterizado. Em conclusão, foram obtidas duas moléculas que inibem a caspase-1 e uma molécula que inibe a catepsina B, que pode auxiliar no controle da neuroinflamação na Doença de Alzheimer.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, neuroinflamação, catepsina B, caspase-1, inibidores, animais marinhos

ABSTRACT

The Alzheimer's Disease (AD) is the 7th leading cause of death in the World. It is believed that the activity of secretases on the APP protein generates certain β amyloid ($A\beta$) peptides that aggregate and accumulate in regions of the brain, causing mitochondrial and lysosomal dysfunction, inflammation, and apoptosis. $A\beta$ deposition can activate microglia, which releases pro-inflammatory mediators that contribute to neuroinflammation and contribute to AD. The participation of caspases-1 and in the inflammasome assembly from microglia is essential for the mediator's release, which can be an interesting therapeutic target for AD. Cathepsins B also contribute to the activation of microglia, resulting in the release of inflammatory mediators. In this work we performed a screening of new caspase-1 and cathepsin B inhibitors from extracts from marine invertebrate animals from Brazilian biodiversity. Such animals can provide a library of molecules that can act on such targets and contribute to the drug discovery for this incurable disease. The extracts of 10 species were tested for their inhibitory activity on the enzymes using commercial enzymes and specific synthetic substrates in enzyme inhibition models. The extract capable of inhibiting the enzyme was fractionated by HPLC aiming the obtention of a pure active molecule, which was analyzed by mass spectrometry. It was possible to obtain 2 extracts that inhibited caspase-1 (*Chiropsamusquadrumanus* and *Eudendriumcarneum*) and 5 extracts that inhibited cathepsin B. *C. quadrumanus* and *E. carneum* extracts were fractionated, and their fractions tested again in the same enzymatic model, where 2 fractions from each extract were active on caspase-1. *Zoanthussociatus* and *Aipstasia pallida* were fractionated as they were inhibitors of cathepsin B. *A. pallida* presented 1 fraction with significant inhibition, while *Z. sociatus* fractions did not inhibited the enzyme. Mass spectrometric analysis revealed that the extracts required one more chromatographic step for a high purity level, but the active ion have already been identified, as it was present in the active fractions. In conclusion, we have obtained two molecules that inhibited caspase-1, and 1 molecule that inhibits cathepsin B, which can help the control of neuroinflammation in the Alzheimer's Disease.

Keywords: Alzheimer's Disease, neuroinflammation, cathepsin B, caspase-1, inhibitors, marine animals

Lista de Símbolos e Abreviações

A β : peptídeo beta amiloide

APP (Amyloid precursor protein): Proteína precursora do peptídeo β -amiloide

ara-C: Citarabina

CrmA: Serinopeptidase

CEAF: Componente Especializado da Assistência Farmacêutica

DAMPs (Damage-associated molecular pattern): Padrões moleculares associados a danos

DA: Doença de Alzheimer

DTT: Ditioneitol

ET-743: Ecteinascidina

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IL-1 β : pirogênio leucocítico

M. phillippina: Macrorhynchiaphilippina

MTT: brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil-2 H-tetrazólio

MVIA: Ziconotida

μ L: microlitro

ug: micrograma

mL: mililitros

m/z: massa sobre carga

nm: Nanômetro

PAMPs (Pathogen-associated molecular pattern): Padrões moleculares associados a patógenos

PCDT: Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas

RP-HPLC: cromatografia de fase reversa

ROS (ReactiveOxygenSpecies): espécies reativas ao oxigênio

SUS: Sistema Único de Saúde

TLR (toll-like receptor): receptor similar a toll

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Catepsina B vista super expressa no hipocampo.....	13
FIGURA 2 – Formação do inflamassomo após a ativação de NLRP3 por oligômeros amiloides A β e proteína Tau, causadores da Doença de Alzheimer.....	15
FIGURA 3 – Atuação da catepsina B na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e na ativação da caspase-1 para a liberação de IL-1 β	17
FIGURA 4 – Atividade enzimática de extratos de invertebrados marinhos sobre caspase-1.....	23
FIGURA 5 – Fracionamento e atividade de moléculas de <i>C. quadrumanus</i>	25
FIGURA 6 – Fracionamento e atividade de moléculas de <i>E. carneum</i>	28
FIGURA 7 - Atividade enzimática de extratos de invertebrados marinhos sobre a inibição da catepsina B.....	30
FIGURA 8 – Fracionamento e atividade de moléculas de <i>Z. sociatus</i>	31
FIGURA 9 – Fracionamento e atividade de moléculas de <i>A. pallida</i>	32

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Exemplos de agentes terapêuticos obtidos a partir da biodiversidade marinha.....	11
TABELA 2 – Espécies coletadas para o estudo, cujos extratos e secreções foram utilizados em ensaios de inibição enzimática	20

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. Animais marinhos como fontes de novas moléculas bioativas.....	10
1.2. Catepsinas B.....	12
1.3. Caspase-1.....	14
1.4. Neuroinflamação.....	16
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. Objetivos específicos.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1. Obtenção dos animais e extratos.....	20
4.2. HPLC.....	21
4.3. Espectrometria de massas.....	21
4.4. Ensaio enzimáticos.....	21
5. RESULTADOS.....	23
5.1. Caspase-1.....	23
5.1.1. C. quadumanus.....	24
5.1.2. E. carneum.....	27
5.2. Catepsina B.....	30
5.2.1. Z. sociatus.....	30
5.2.2. A. pallida.....	32
6. DISCUSSÃO.....	34
7. CONCLUSÃO.....	37
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

1. INTRODUÇÃO

1.1. Animais marinhos como fonte de novas moléculas bioativas

O ambiente marinho corresponde a cerca de 70% da superfície da Terra, sendo possível encontrar uma vasta diversidade de animais que sintetizam moléculas para defesa química contra predadores, microrganismos e digestão da presa. Neste sentido, podemos utilizar essa “biblioteca de moléculas” previamente selecionada pela evolução a favor da biotecnologia, descobrindo novas estruturas funcionais, que podem atingir alvos terapêuticos relevantes (HENDLER et al., 1995).

Cabe ressaltar que as moléculas bioativas provenientes de animais marinhos, normalmente diferentes daquelas descritas para animais de ambiente terrestre, atualmente somam mais de 13000 novas moléculas descritas nos últimos anos, sendo que 3000 delas são biologicamente ativas nos sistemas testados pelos respectivos autores dos trabalhos (VIGNESH et al., 2011). Sendo assim, esse ambiente pouco explorado representa a fronteira do conhecimento de novas moléculas, que está longe de estar saturado, e pode nos oferecer um novo repertório de moléculas.

Devido ao insucesso da indústria de encontrar novas estruturas químicas derivadas dos modelos de *design* racional de moléculas e da química combinatória, recentemente houve o aparecimento dos medicamentos biológicos – proteínas recombinantes e anticorpos monoclonais. Os anticorpos monoclonais, já disponíveis no mercado, foram muito bem-sucedidos no tratamento de diversas doenças. No entanto, alguns problemas são levantados, como o alto custo de produção (e conseqüentemente venda) e possíveis efeitos adversos que possam aparecer a longo prazo (MORROW; FELCONE, 2004).

Por outro lado, várias moléculas de baixa massa molecular, de origem marinha, estão em fases avançadas de desenvolvimento para inúmeras doenças, como câncer, infecções virais, dor, inflamação e doenças neurológicas (MALVE, 2016).

Cerca de um terço das drogas mais vendidas no mundo são derivadas de produtos naturais, dentre elas plantas e animais, e diversas outras estão em fases avançadas de desenvolvimento para inúmeras doenças, como câncer, infecções virais, dor, inflamação e doenças neurológicas (MALVE, 2016; RAWAT et al., 2006; NEWMAN e CRAGG, 2007). A

tabela 1 mostra exemplos de medicamentos utilizados na clínica, baseados em moléculas de animais marinhos.

TABELA 1- Exemplos de agentes terapêuticos obtidos a partir da biodiversidade marinha

Substância	Fonte	Doença
Trabectedina	Ecteinascidiaturbinata	Câncer
Ziconotídeo	Conusmagus	Dor neuropática
Girolina	Pseudoxinyssacantharela	Câncer
Hemiassterlina	Hemiassterellavasiformis var.	Câncer
Ziduvudina (AZT)	Algas vermelhas	Vírus da Imunodeficiência humana
Briostatina	Bugulaneritina	Câncer
Discodermolídeo	Dicodermia dissoluta	Câncer
Aplidina	Aplidiumalbicans	Câncer
kahalatido F	Elysiarufescens	Câncer
Halichondrina B	Halichondriaokadai	Câncer
Jamaicamidas A-D	Lyngbyamajuscula	Câncer

Fonte: CechineIFilho;Zanchett, 2020.

Atualmente existem alguns fármacos relacionados a substâncias de origem marinha em uso clínico – como anticâncer [ara-C (Citarabina®) e trabectedina (Yondelis®)], antiviral [ara-A (Vidarabina®)] e analgésico neuropático [ziconotídeo (Prialt®)].Ara-C é usada principalmente na terapia da leucemia aguda não linfoblástica, enquanto que ara-A é utilizada na forma de colírio para tratamento de infecções oftalmológicas com o vírus Herpes simplex.

Trabectedina (ET-743, Yondelis®) é um alcalóide tetra-hidroquinolínico isolado da ascídia caribenha Ecteinascidiaturbinata e cujo mecanismo de alquilação de DNA difere da grande maioria dos outros agentes alquilantes.

Trabectedina foi o segundo protótipo desenvolvido pela PharmaMar e o primeiro fármaco a ser aprovado para uso clínico no tratamento de sarcoma de tecidos moles, atualmente, segue cumprindo outros protocolos de ensaios clínicos e encontra-se em fase 3 para tratamento de

câncer de ovário e em fase 2 para câncer de próstata e mama, osteossarcoma e tumores sólidos pediátricos.

O ziconotídeo ou ω -conotoxina MVIIA (Prialt®) é um peptídeo analgésico de 25 aminoácidos isolado do molusco *Conus magnus*, como outros peptídeos, este fármaco é administrado para o controle da dor severa, incluindo aqueles pacientes refratários a tratamentos com opioides (COSTA-LOTUFO et al., 2009).

1.2. Catepsinas B

As catepsinas são subdivididas em clans, baseadas na composição do sítio ativo, que confere específicas atividades catalíticas. Esses clans são cisteínopeptidases (B, C, F, H, K, L, S, V, X), serinopeptidases (A e G) e aspartilpeptidases (D e E) (RAWLINGS et al., 2018).

As catepsinas B são as cisteíno proteases de mamíferos, presentes na maioria das células e tecidos. São enzimas lisossomais, atuam na degradação intracelular de proteínas, porém podem agir extracelularmente quando liberadas em determinadas circunstâncias, degradando componentes da matriz extracelular (BRIX et al., 2008).

Em geral, as catepsinas B estão envolvidas com vários processos fisiológicos e fisiopatológicos, como a regulação do ciclo celular, desenvolvimento de câncer, autofagia e neuroinflamação (YAN; SLOANE, 2003).

A enzima também está envolvida em várias doenças do sistema nervoso central, como a Doença de Alzheimer (DA), hemorragias intracerebrais e lesões cerebrais traumáticas (CATALDO; NIXON, 1990; HOOK et al., 2005, 2014; MUELLER-STEINER et al., 2006; KINDY et al., 2012).

A superexpressão de catepsinas B, L e X tem sido relatada na DA (PIŠLAR e KOS, 2013). Muitos estudos encontraram níveis altos de catepsina B ou sua atividade aumentada no plasma e líquido cefalorraquidiano (SUNDELOF et al., 2010). Além disso, o aumento de níveis plasmáticos de catepsina B está relacionado com a disfunção cognitiva da DA (ASSFALGMACHLEIT et al., 1990).

No hipocampo a catepsina B foi vista super expressa, em níveis de mRNA, como é mostrado na figura 1. Outras catepsinas também atuam nesse sistema, mas o aumento dos

níveis de catepsina B são muito mais significativos em função do período de desenvolvimento, em comparação com outras catepsinas (HOOK et al., 2020).

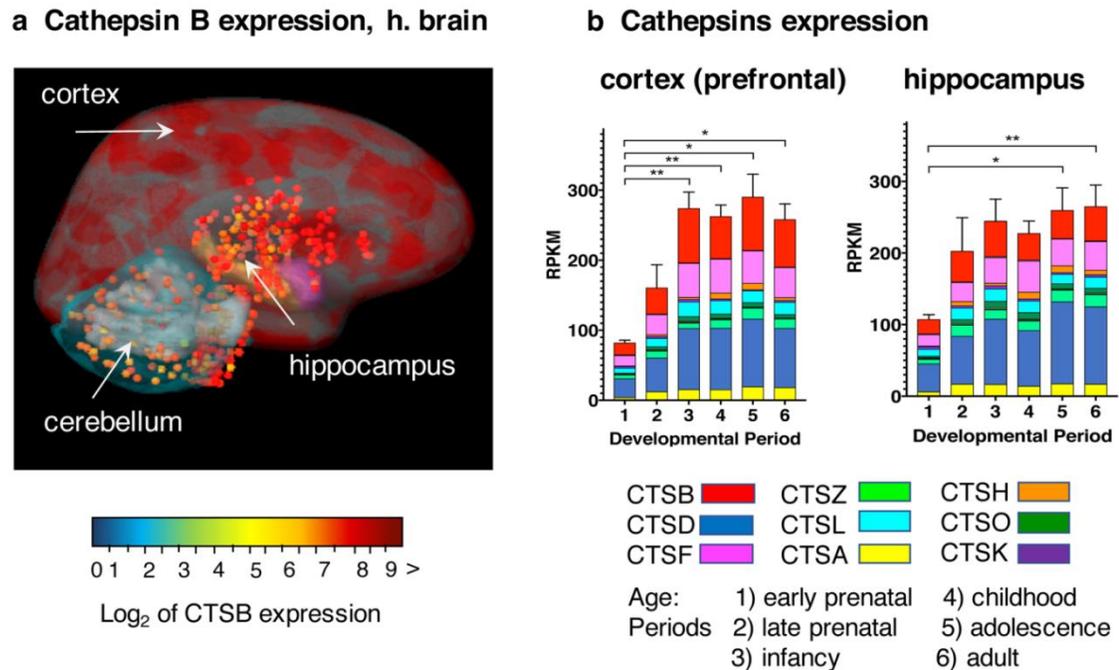


FIGURA 1-CatepsinaB vista super expressa no hipocampo. Níveis de mRNA, em comparação com córtex e cerebelo (A) e aumento dos níveis de catepsina B no córtex e hipocampo em períodos de desenvolvimento em comparação com expressão de outras catepsinas. Fonte: Hook et al. (2020).

Em modelos animais geneticamente modificados para expressar a APP mutada, causadora da DA (APP KM670/671NL, Swedish; APP (716V, Florida; APP V171I, London), a concentração de catepsina B foi avaliada em níveis proteicos e gênicos, e estiveram aumentados em torno de 50% no córtex e hipocampo, comparado a um grupo controle, sem a mutação (SUN, 2015).

Quando o gene que expressa a catepsina foi silenciado, foi verificada uma melhora no déficit de memória, que eram observados nos animais com modelo da doença (KINDY, 2012).

Desta forma, a catepsina B, em humano que possui a DA, está aumentada em localização extracelular, em contraste com a sua localização nos lisossomos, sendo a enzima re-distribuída na patologia. A formação intracelular de peptídeos amiloides causa rompimento na membrana

dos lisossomos, causando extravasamento das enzimas do compartimento para o citosol(ZANG, 2006).

Em condições fisiológicas, a catepsina B é ativa em endossomos iniciais e lisossomos (TARALP et al., 1995), e em pH baixo exerce atividade de carboxipeptidase na APP e A β (MACKAY et al., 1997). Ainda não é claro qual é o substrato da catepsina B citosólica, mas é sabido que ela cliva Bid para gerar tBid, que leva a liberação de citocromo c da mitocôndria, causando apoptose (ZHOU et al., 2017).

De fato, a geração de peptídeos amiloides A β 2-x truncados na sua porção N-terminal que saem dos astrócitos foi demonstrada estar associada com a catepsina B da membrana celular. Além disso, a catepsina B lisossomal parece estar envolvida na degradação de A β 1-x em células de neuroglioma, mas não em astrócitos. Assim, em nível intracelular, a enzima pode ter um papel importante na clivagem de certos peptídeos β -amiloides (FRIEDMAN et al., 2015).

O extravasamento de catepsinas B para o citosol ocorre após a membrana do lisossomo perder a integridade. A enzima citosólica então causa morte celular dependente de caspase, pela clivagem da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e remoção da proteína que previne apoptose, Bcl-xl, causando morte celular. Além disso, a catepsina B aumenta a produção de citocinas inflamatórias IL-1 β pela via no neuroinflamassomo (AMPDEN RI, 2019).

Algumas moléculas com atividade em catepsinas já foram isoladas de animais marinhos, como a aspiropterina, um inibidor de catepsina B isolado da esponja marinha *Asteropus simplex* (MURAYAMA et al., 2008). Esses achados apontam para um sucesso do projeto, que busca novos compostos na biodiversidade marinha, com atividades em catepsinas, de uma vez que utilizaremos espécies de esponjas, além de outras espécies pouco estudadas do ponto de vista molecular. Além de testar novas moléculas, serão utilizados modelos pouco explorados (ensaios em catepsinas), o que proporciona grandes chances de novas opções de terapia.

1.3. Caspase-1

Caspase-1, conhecida como enzima conversora da interleucina 1 β , é uma enzima do tipo cisteínopeptidase, ativa em humanos por processar formas inativas da IL-1 β e IL-18 para 14orna-las ativas.É bastante estudada pé várias patologias, como Infecções bacterianas e virais, além de esclerose lateral amiotrófica(RAWLINGS et al., 2018).

A caspase-1 está presente na formação no inflamassoma, clivando apro-IL-1 β , pro-IL-18 e a proteína gasdermina D (GSDMD), liberando as formas ativas das proteínas (VOET et al., 2019; GHAYUR et al., 1997).

A via de montagem do inflamassomo se inicia com a ligação de padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs) ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) em receptores de membrana (como os receptores tipo toll–TLRs) da micróglia. Após essa ligação, a via segue para a ativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B), que resulta no aumento da expressão de citocinas pró-IL-1 β e pro-IL-18 e da proteína NLRP3 (HANSLIK; ULLAND, 2020).

A NLRP3 é predominantemente expressa em macrófagos, junto com a proteína ASC e a pró-caspase-1, que formam então o inflamassoma, um complexo proteico essencial para a imunidade inata (Zhang et al., 2020).

O inflamassoma NLRP3 foi co-localizado em placas amiloides em paciente com a Doença de Alzheimer. Já foi demonstrado que a ativação de NLRP3 aumenta a agregação de A β . Foi visto que a proteína Tau também é capaz de ativar o NLRP3 e a via da formação do inflamassoma (Zhang et al., 2020).

A figura 2 mostra as vias de ativação e formação do complexo pelos peptídeos amiloides e proteína Tau.

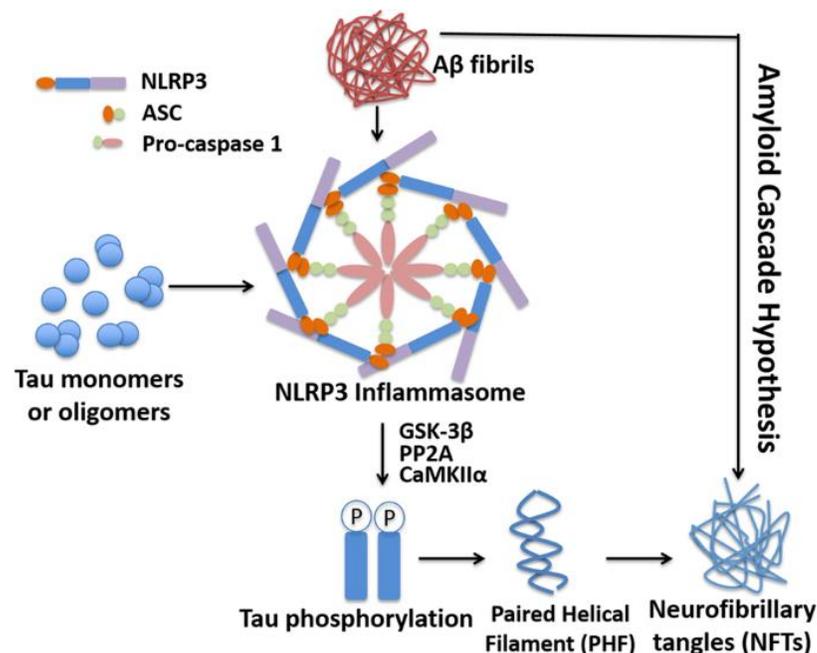


FIGURA 2 – Formação do inflamassoma após a ativação de NLRP3 por oligômeros amiloides A β e proteína Tau, causadores da Doença de Alzheimer.

1.4. Neuroinflamação

A neuroinflamação é definida como uma resposta inflamatória que ocorre no cérebro ou na medula espinhal, mediada pela produção e liberação de citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio e mensageiros secundários (DISABATO et al., 2016).

Os mediadores inflamatórios são produzidos pela glia residente do SNC (micróglia e astrócitos), células endoteliais e células imunes derivadas periféricamente. Existem consequências imunológicas, fisiológicas, bioquímicas e psicológicas dessas respostas neuroinflamatórias. Além disso, o grau de neuroinflamação depende do contexto, duração e curso do estímulo primário ou insulto (DISABATO et al., 2016).

A inflamação crônica está relacionada à Doença de Alzheimer, cuja progressão consiste em agregação de peptídeos amiloides, que gera placas amiloides, e hiperfosforilação da proteína Tau, que causam ativação da glia do SNC, infiltração de células imunes periféricas, dano, morte neuronal e atrofia neuronal ao longo do tempo (Bucciantini et al. 2002, Sokolova et al. 2009).

A liberação de citocinas pró-inflamatórias tem sido relatada na DA, e pesquisas recentes apontam para a participação de catepsina B e caspase-1 nesse processo. A catepsina B no citosol, situação comum na DA, ativa o inflamassoma para elevar a produção de IL-1 β . O inflamassoma NLRP3 na microglia participa da DA e doenças neurodegenerativas relacionadas, como mencionado acima. O A β oligomérico e estresse oxidativo da DA e neurodegeneração ativam catepsina B, que induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Além disso, A β induzem a ativação mediada por catepsina B do inflamassoma NLRP3 para iniciar o processamento de pró-caspase-1 em caspase-1 e subsequente caspase-1 conversão de pró-IL-1 β em fator inflamatório IL-1 β ativo, como mostrado na figura 3.

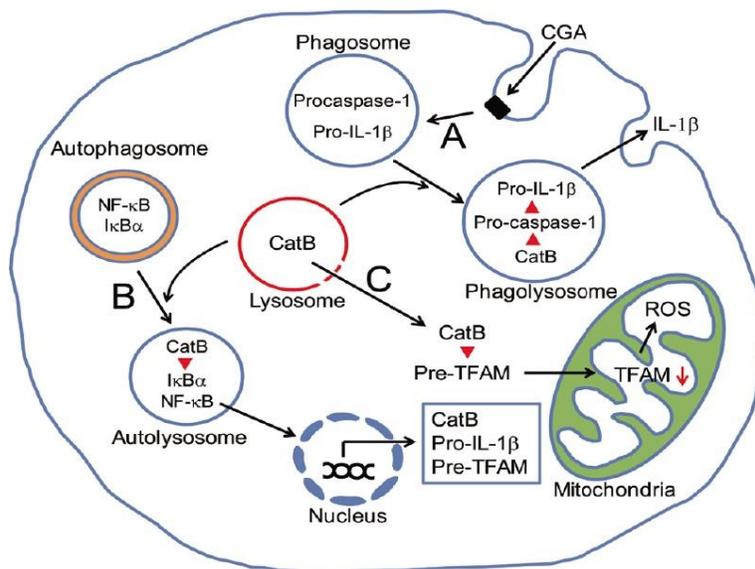


FIGURA 3-Atuação da catepsina B na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e na ativação da caspase-1 para a liberação de IL-1 β

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente, o Brasil passa por um processo de envelhecimento da população - a faixa etária de 60 anos ou mais passou de 3,1%, em 1970, para 10,8%, em 2010, ou seja, quase dobrou, e estima-se que esse percentual alcançará 24% em 2040 (IBGE, 2018). Considerando esse quadro, tem-se observado a alta prevalência de doenças neurodegenerativas na faixa etária idosa, o que eleva os gastos com esta doença pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

Com o aumento da expectativa de vida da população mundial, o número de acometidos por demências aumentou significativamente. Em 2015, houve 46,8 milhões de casos no mundo (a 7ª causa de morte), e estima-se que esse número chegue a 131,5 milhões em 2050. Assim, as síndromes demenciais constituem atualmente um grande problema de saúde pública mundial e no Brasil (APRAHAMIAN et al, 2009).

Em 2010, o SUS gastou 2,4 bilhões de reais com internações hospitalares por doenças crônicas (diabetes, hipertensão arterial, neoplasias, doenças respiratórias, cardiovasculares, do aparelho locomotor, endócrinas nutricionais e metabólicas) (SOTO et al., 2015). No período de 2008 a 2013 foram gastos pelo SUS mais de R\$ 90 milhões em medicamentos para o tratamento da Doença de Alzheimer (DA) (COSTA et al., 2015).

Para o tratamento da DA, o SUS disponibiliza gratuitamente os medicamentos donepezila, galantamina e rivastigmina, por meio do Componente Especializado da Assistência Farmacêutica (CEAF), e seu fornecimento está sujeito ao cumprimento dos critérios e normas estabelecidos pelo Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) da doença (LIMA, 2008).

A Doença de Alzheimer acometeu 48 milhões de pessoas no mundo em 2015, sendo a 7ª causa de morte (WHO). Considerando que o tratamento para a doença não promove uma cura, mas somente o aumento da expectativa de vida, novas propostas para um tratamento são essenciais.

Desta forma, este trabalho busca prospectar novas moléculas visando a diminuição da neuroinflamação causada pelo acúmulo das placas amiloides.

3. OBJETIVOS

Prospectar novas moléculas com atividade inibidora de caspase-1 e/ou cathepsina B, a partir de extratos de animais marinhos brasileiros.

3.1. Objetivos específicos

- Obter novos extratos a partir de animais marinhos invertebrados brasileiros;
- Fracionar extratos por HPLC;
- Analisar as frações por espectrometria de massas;
- Testar extratos e moléculas isoladas em ensaios enzimáticos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção dos animais e extratos

Espécimes marinhos de 10 diferentes espécies (tabela 2) foram coletados por mergulho autônomo na Ponta do Jarobá, São Sebastião, São Paulo, Brasil (23°49'44''S; 45°25'23''W) sob a licença ICMBio nº 68917-1. Após a amostragem, os animais foram lavados com água do mar filtrada e os demais animais e plantas foram removidos manualmente. Os animais foram imersos em metanol contendo 0,1% de ácido acético por 24 horas em temperatura ambiente. O extrato resultante foi centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi submetido a um evaporador rotativo para remoção do solvente. O conteúdo restante foi então dissolvido na água ultrapura e então armazenado a -20°C. Do ouriço-do-mar, foi obtido o líquido celômico por meio de inserção de agulha na cavidade peristomial. O líquido foi centrifugado a 3000 rpm e o sobrenadante armazenado em -20°C.

Tabela 2 – Espécies coletadas para o estudo, cujos extratos e secreções foram utilizados em ensaios de inibição enzimática

Cnidaria - Anthozoa	Cnidaria - Hydrozoa
<i>Aiptasia pallida</i>	<i>Eudendrium carneum</i>
<i>Antholoba achates</i>	
<i>Anthopleura cascaia</i>	
<i>Carijoa riisei</i>	Cnidaria Cubozoa
<i>Palythoa caribaeorum</i>	<i>Chiropsalmus quadrumanus</i>
<i>Renilla reniformis</i>	
<i>Zoanthus sociatus</i>	
	Echinoderms
	<i>Lytechinus variegatus</i>

4.2. HPLC

Foram coletadas frações dos extratos dos animais marinhos após cromatografia líquida de alta eficiência, em um equipamento Agilent 1260 Infinity. Alíquotas de 80 μ L foram inseridas no equipamento e inseridas na coluna Phenomenex C18 (4,6 x 250 mm, 300 Å). A eluição se deu pelo gradiente de solventes B em A em 30 minutos, sendo a fase móvel A = Ácido trifluoroacético 0,1% em água ultrapura e B = Acetonitrila/ água Milli Q/ Ácidotrifluoroacético 0,1% (900:100:1 v/v/v), em fluxo constante de 0,400mL/min. O conteúdo eluído foi monitorado por absorvância em 214 nm e os picos foram coletados manualmente, de acordo com o cromatograma obtido.

No caso do re-fracionamento, o mesmo equipamento foi utilizado, porém a coluna foi C8 (4,6 x 150 mm, 300 Å) e fluxo constante de 1 mL/min em eluição isocrática de ácido trifluoroacético 0,1% em água ultrapura.

4.3. Espectrometria de massas

As frações coletadas após a cromatografia foram analisadas por espectrometria de massa (Xevo GS nQToF, Waters, Co). Alíquotas de 5 μ L foram inseridas no equipamento, sem coluna cromatográfica. A eluição foi realizada com 50% de acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico. O equipamento foi ajustado em modo de ionização ESI positivo e os dados foram coletados em uma varredura completa MS variando de 100 a 1000 m/z

4.4. Ensaios enzimáticos

Os ensaios em caspase-1 foram conduzidos em placas de 384 poços, em triplicata, com um volume final de reação de 20 μ L usando o kit de ensaio de triagem de inibidor de Caspase-1 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA). As amostras (10 μ g) foram previamente incubadas com enzima (caspase-1 recombinante humana) tratada com 2 mM de DTT por 10 minutos em temperatura ambiente. Tampão foi adicionado aos poços e, em seguida, o substrato sintético (Ac-VEID-AFC, 4 μ M). Um conhecido inibidor de caspase-1, Z-VEID-CHO, foi usado como controle positivo. O aumento da fluorescência 2 horas após a incubação foi medido por um

fluorímetro, no comprimento de onda de excitação de 400 nm e comprimento de onda de emissão de 505 nm (GloMax®, Promega). Todos os valores de fluorescência foram subtraídos do fundo (tampão) e a porcentagem de inibição foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{inibição} = [(\text{atividade inicial} - \text{atividade final}) / \text{atividade inicial}] \times 100$$

Os ensaios de catepsina B foram conduzidos em placas de 384 poços, em triplicata, com volume final de reação de 20 μL , utilizando o Cathepsin B Inhibitor Screening Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As amostras (10 μg) foram previamente incubadas com enzima (catepsina B recombinante humana) tratada com 2 mM de DTT por 10 minutos em temperatura ambiente. Adicionou-se tampão aos poços e, em seguida, o substrato sintético (Ac-RR-AFC 10 mM). Um inibidor conhecido, FFFMK (10 μM), foi usado como controle positivo. O aumento da fluorescência 50 minutos após a incubação foi medido por um fluorímetro a cada 10 minutos, no comprimento de onda de excitação de 400 nm e comprimento de onda de emissão de 505 nm. O cálculo foi realizado conforme mencionado acima para a caspase-1 (SCIANI et al., 2013).

5. RESULTADOS

5.1. Caspase -1

Dez extratos foram testados quanto à atividade enzimática da caspase-1, utilizando substrato sintético específico e enzima recombinante. Para a triagem, foi medido um valor de fluorescência após um período de 2 horas, e uma porcentagem de inibição foi calculada, e comparada com um controle positivo, um inibidor conhecido. É importante mencionar que esses extratos foram previamente testados em cultura de neurônios, e nenhum deles causou citotoxicidade, mesmo em alta concentração (dados não mostrados).

Com o ensaio enzimático foi possível identificar 2 extratos que inibiram a caspase-1: *C. quadrumanus* e *E. carneum* (figura 4). As duas espécies não estão relacionadas em termos de filogenia, o que indica que podem ser moléculas diferentes entre as espécies.

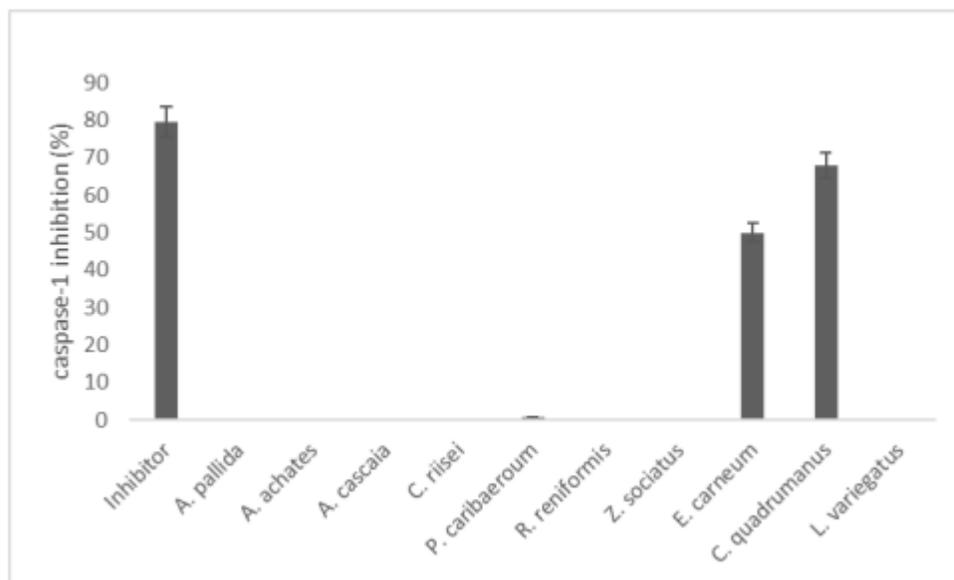


FIGURA 4 - Atividade enzimática de extratos de invertebrados marinhos sobre caspase-1

A seguir, estão mostrados o fracionamento e os novos testes de inibição enzimática da caspase-1 das frações coletadas após cromatografia líquida, separadas por espécie:

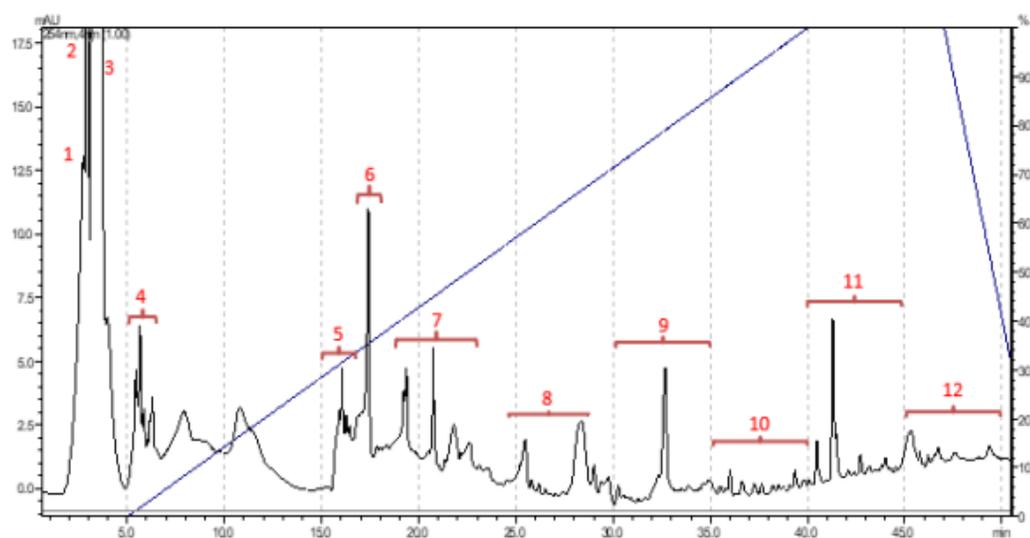
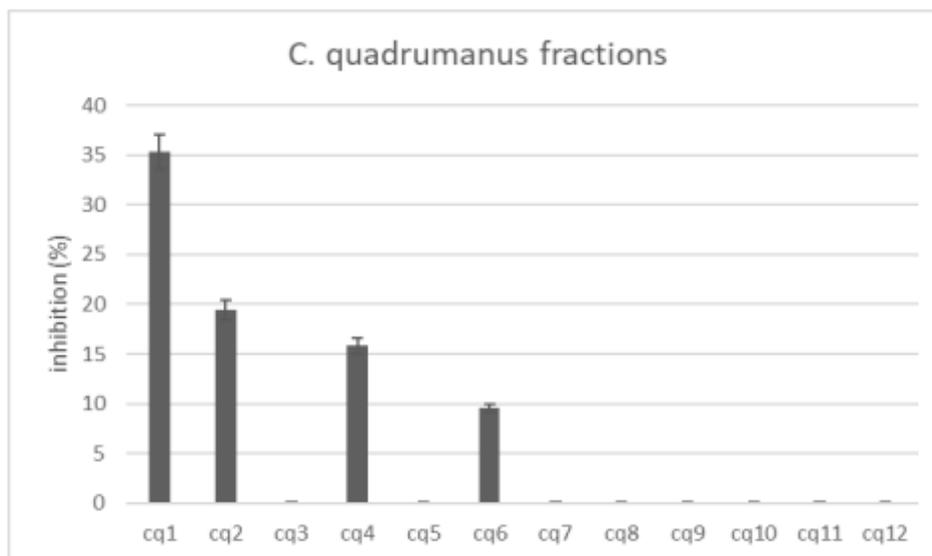
5.1.1. *C. quadrumanus*

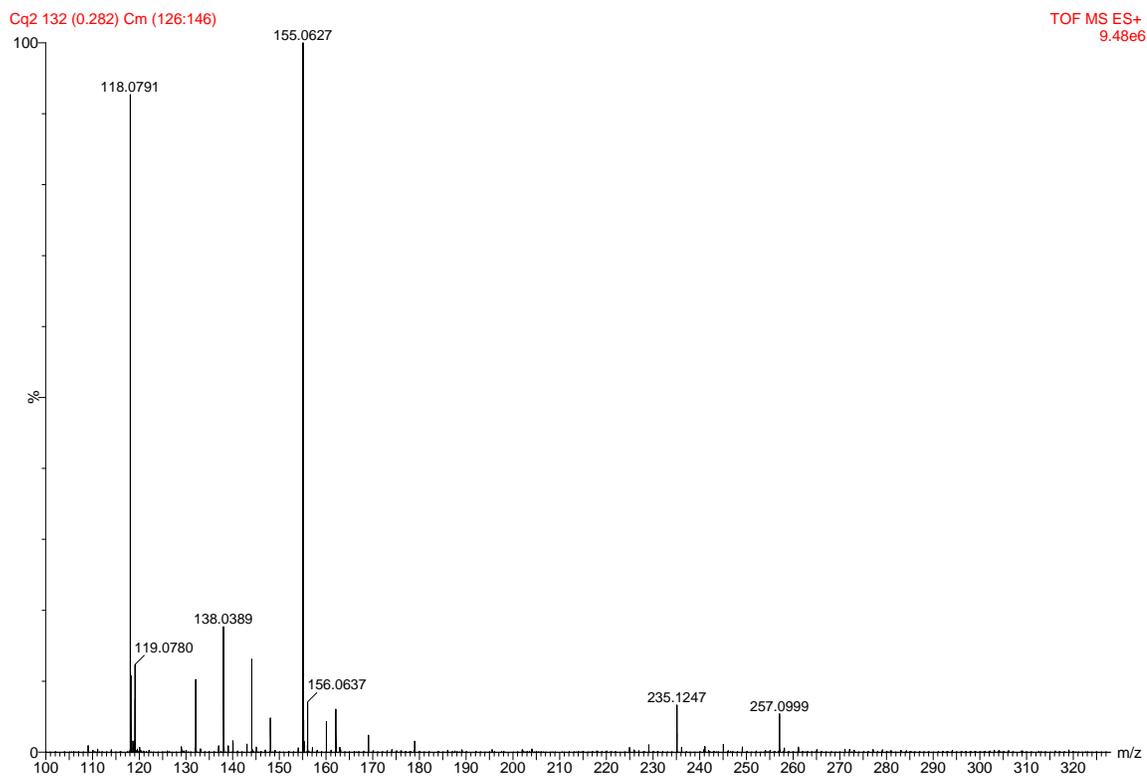
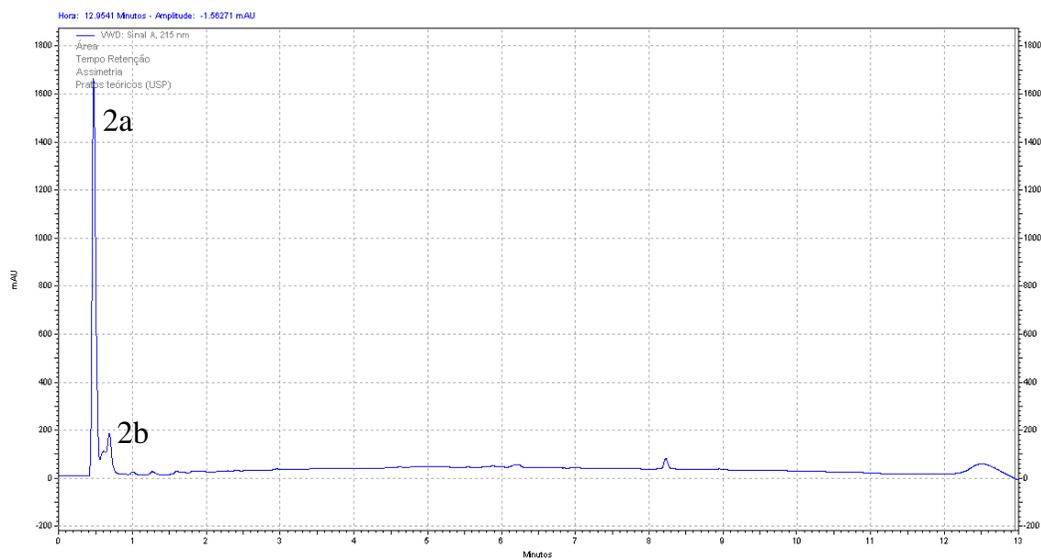
O perfil cromatográfico e as frações coletadas após separação por HPLC do extrato de *C. quadrumanus* são mostrados na figura 5A. Foi possível observar a presença de vários picos ao longo do gradiente de acetonitrila, indicando um extrato complexo, mas capaz de ser separado por cromatografia C18 de fase reversa. Doze frações foram coletadas, conforme indicado no cromatograma, foram liofilizadas e testadas novamente na atividade da caspase-1.

Dentre as 12 frações de *C. quadrumanus*, 4 foram identificadas como inibidoras, sendo as nomeadas 1 e 2 as mais intensas (figura 5B). As frações 1 e 2 estão próximas e pode ter ocorrido contaminação cruzada durante a coleta.

A fração 2, por ser a mais intensa e ter apresentado maior atividade, foi analisada por espectrometria de massas, e foi possível verificar que não estava pura, tendo a presença de vários íons (figura 5C), apesar do pico ser intenso, simétrico e estreito.

Essa fração foi então submetida a uma nova etapa cromatográfica, em coluna C8, utilizando eluição isocrática em 0% B. O cromatograma obtido está mostrado na figura 5D, em que dois picos foram coletados (2a e 2b) e testados novamente na inibição da caspase-1.

A**B**

C**D**

E

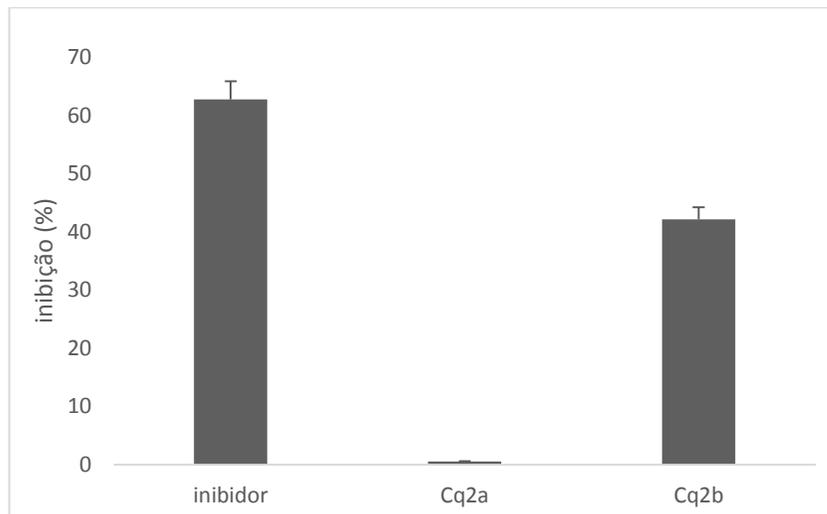


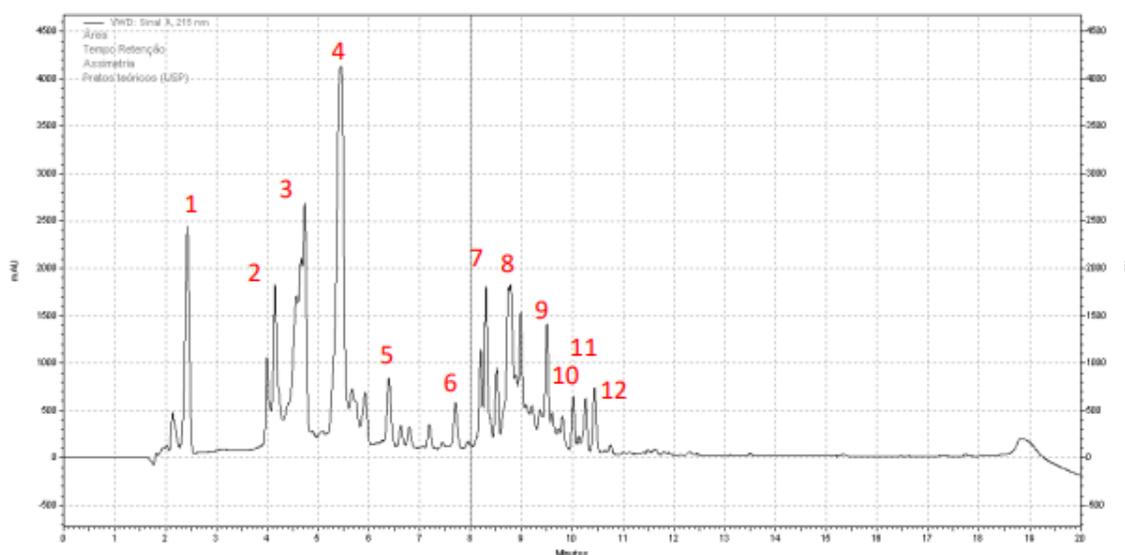
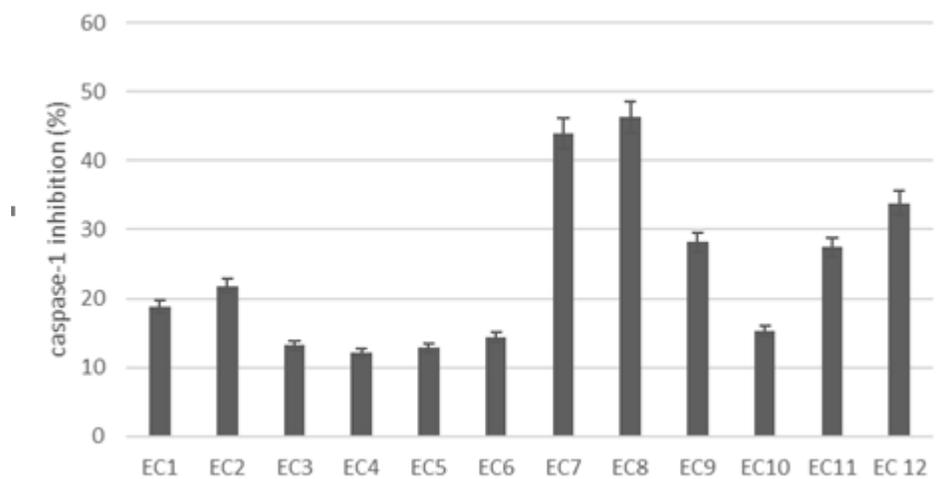
FIGURA5– Fracionamento e atividade de moléculas de *C. quadrumanus*. A =Perfil cromatográfico por HPLC e fracionamento (os números indicam as frações coletadas). B = Atividade das frações de *C. quadrumanus*, após RP-HPLCna inibição de caspase-1. C = Análise por espectrometria de massa da fração 2, ativa no ensaio inibitório de caspase-1. D = re-fracionamento da amostra 2, coletada na primeira cromatografia (os números indicam as frações coletadas). E = teste das frações coletadas em D.

5.1.2. *E. carneum*

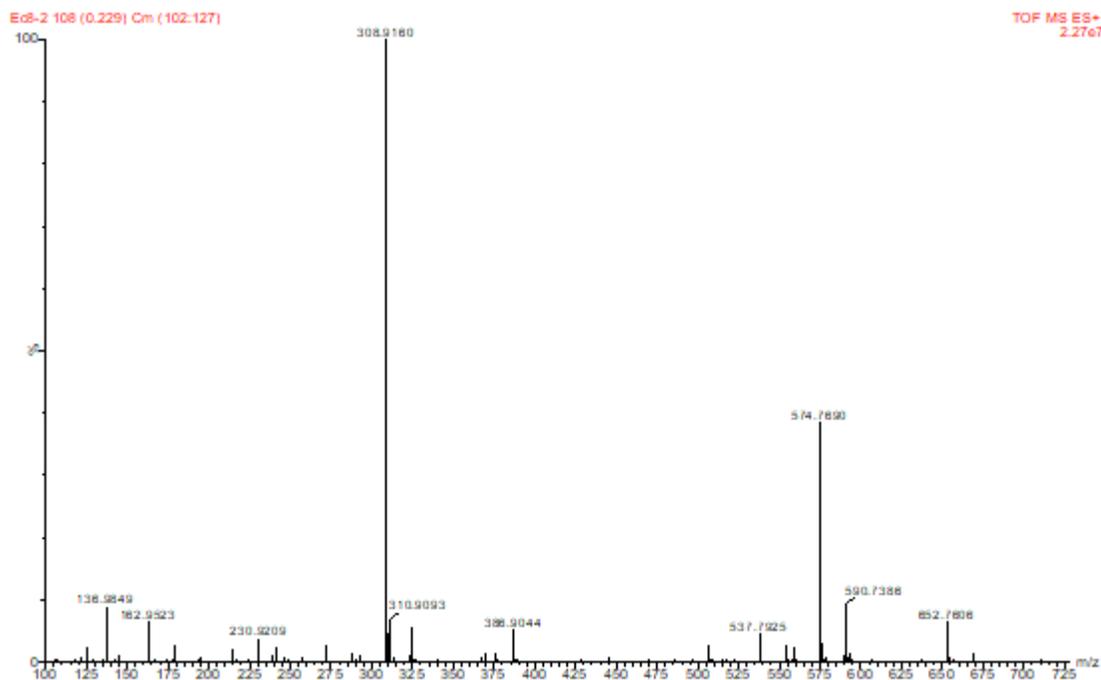
Em relação ao *E. carneum*, outro extrato que inibiu a caspase-1, também foi realizado o fracionamento e as frações coletadas para posterior reteste da mesma enzima. O cromatograma RP-HPLC C18 é mostrado na figura 6A, bem como as frações coletadas. Como o *C. quadrumanus*, os picos foram bem separados, e 12 frações puderam ser coletadas.

As frações foram testadas na atividade enzimática da caspase-1, e algumas frações foram identificadas como ativas, ou seja, inibiram a enzima, conforme figura 6B. As frações 7 e 8 foram as mais ativas e foram conduzidas para análise por espectrometria de massas.

As amostras compartilham vários íons, como 308, 574 e 590 m/z, indicando moléculas comuns, provavelmente as ativas (figuras 6C e 6D). Os espectros foram de baixa complexidade, sendo necessária mais uma etapa cromatográfica.

A**B**

C



D

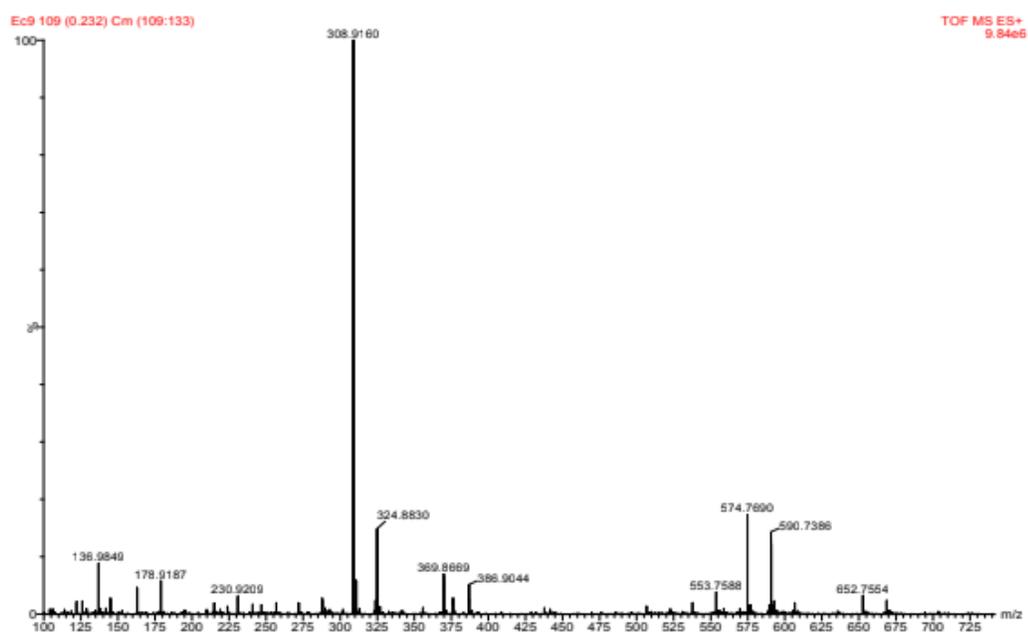


FIGURA 6 – Fracionamento e atividade de moléculas de *E. carneum*. A = Perfil cromatográfico por HPLC e fracionamento (os números indicam as frações coletadas). B = Atividade das frações de *E.*

carneum, após RP-HPLC na inibição de caspase-1. C = Análise por espectrometria de massa da fração 7. D = Análise por espectrometria de massa da fração 8.

5.2. Catepsina B

Além de atuar na caspase-1, o extrato de *E. carneum* inibiu 100% da atividade da catepsina B (figura 7). Além de *E. carneum*, outros extratos marinhos foram capazes de inibir tal enzima, como mostrado na figura 7.

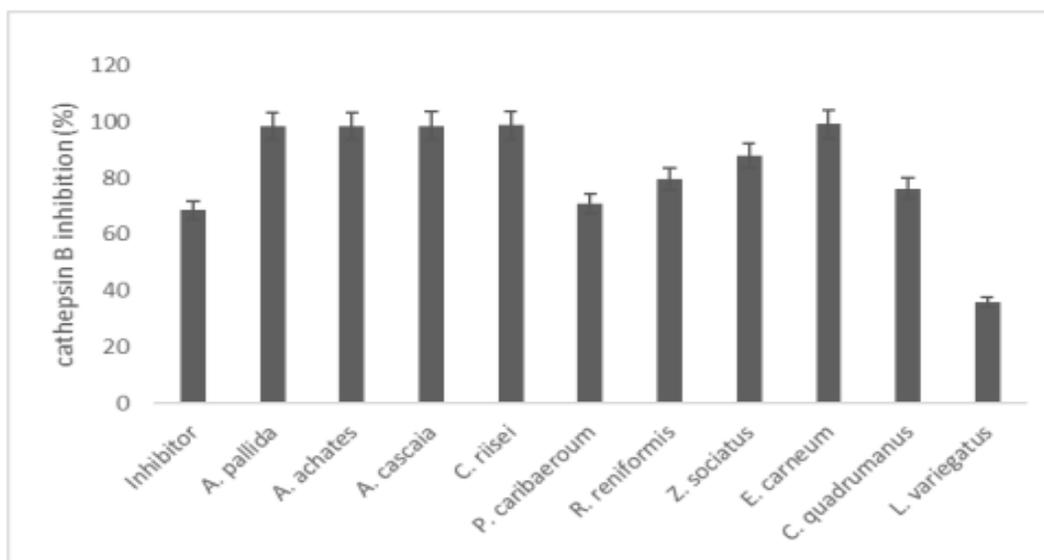


FIGURA 7 -Atividade enzimática de extratos de invertebrados marinhos sobre a inibição da catepsina B.

Considerando essa importante inibição, outros extratos foram considerados para posterior avaliação, e foram fracionados por HPLC: *Zoanthus sociatus* e *Apstasiapallida*, apresentados nas figuras 8 e 9, respectivamente.

5.2.1. *Z. sociatus*

As frações de *Z. sociatus* foram coletadas conforme o cromatograma mostrado na figura 8A. As frações foram analisadas quanto à inibição da catepsina B. Foi encontrada uma fraca inibição de catepsina B com as frações de *Z. sociatus* (figura 8B), o que pode indicar o efeito sinérgico de mais de uma molécula.

Essa amostra, portanto, não prosseguirá para ensaios subsequentes.

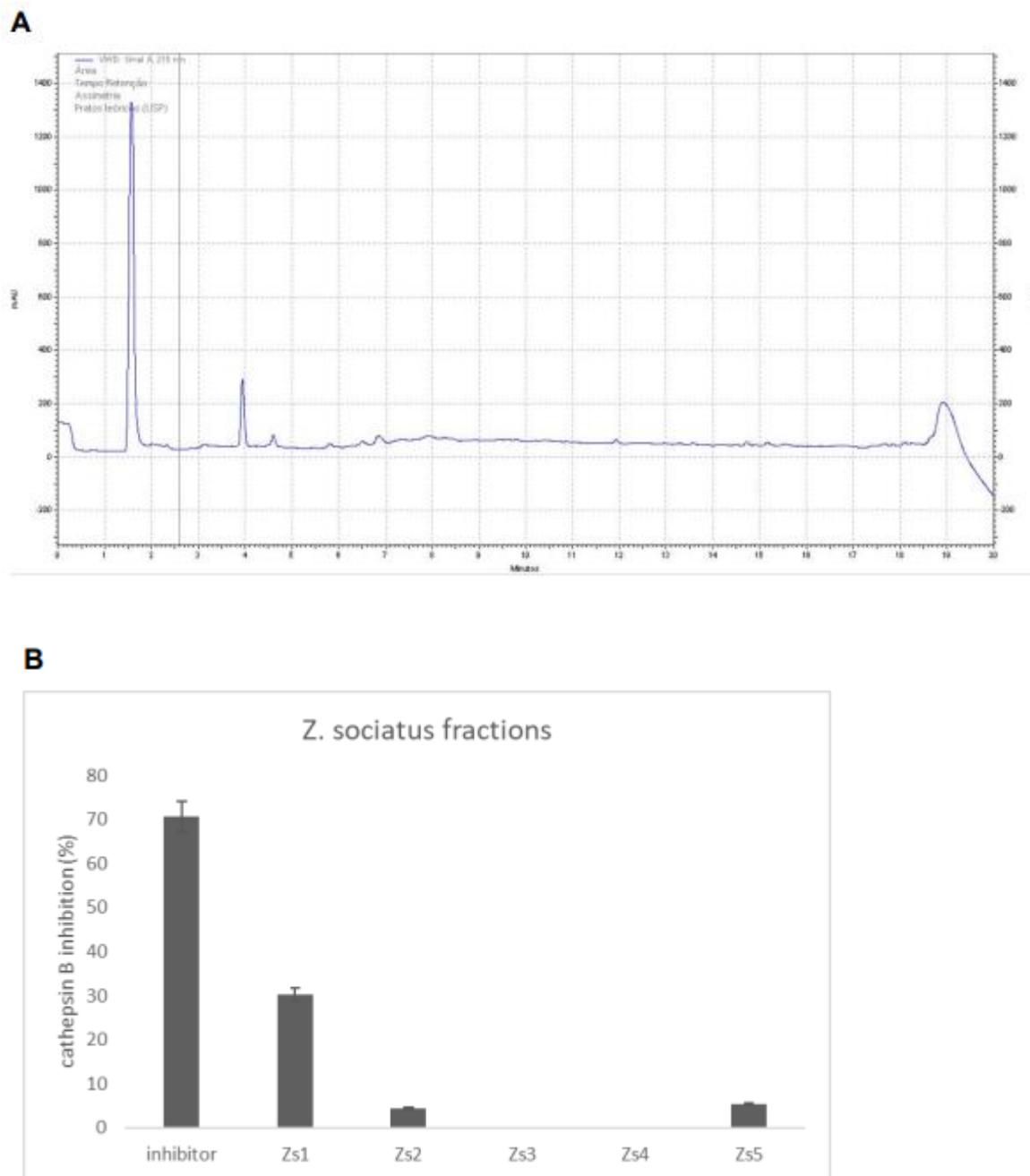
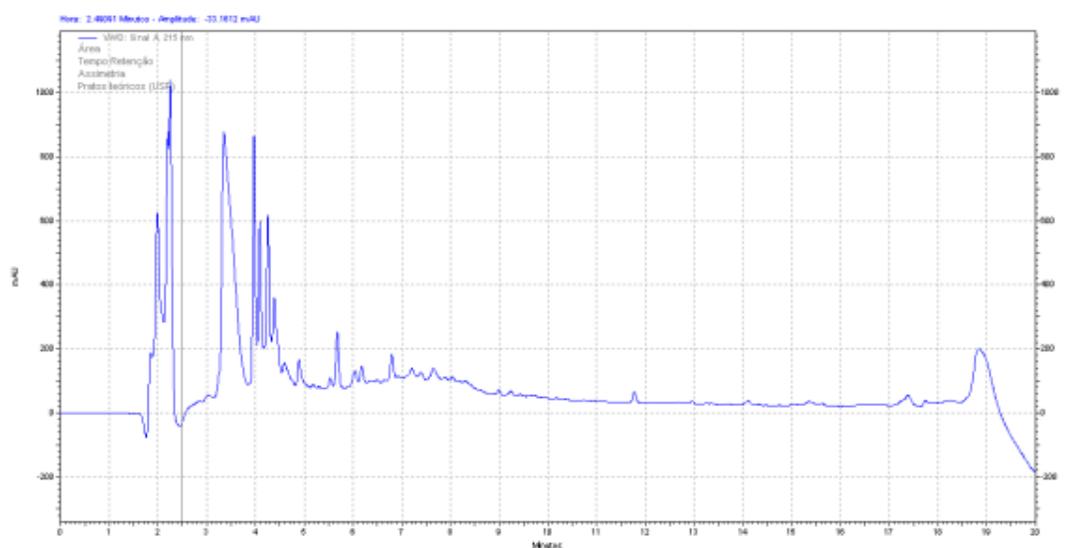


FIGURA 8 – Fracionamento e atividade de moléculas de *Z. sociatus*. A = Perfil cromatográfico por HPLC e fracionamento (os números indicam as frações coletadas). B = Atividade das frações de *Z. sociatus*, após RP-HPLC na inibição de catepsina B.

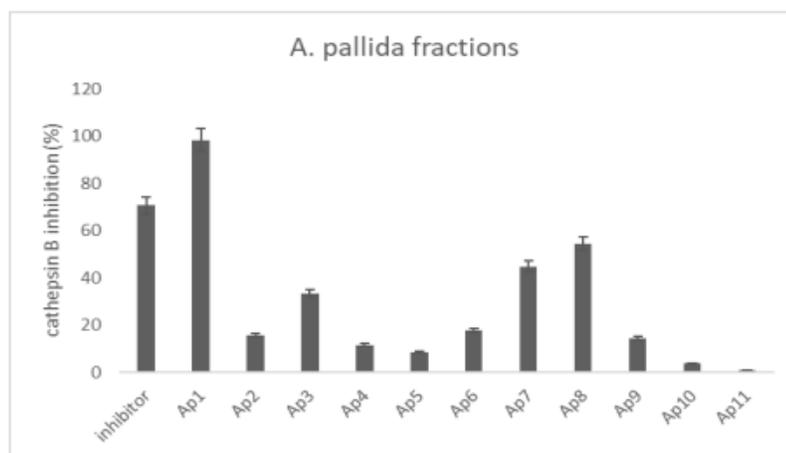
5.2.2. *A. pallida*

Em relação ao *A. pallida*, foram coletadas 11 frações, conforme mostrado no cromatograma da figura 9A. Uma importante inibição foi observada com a incubação da fração 1 (figura 9B), além de serem identificadas outras frações ativas.

A



B



C

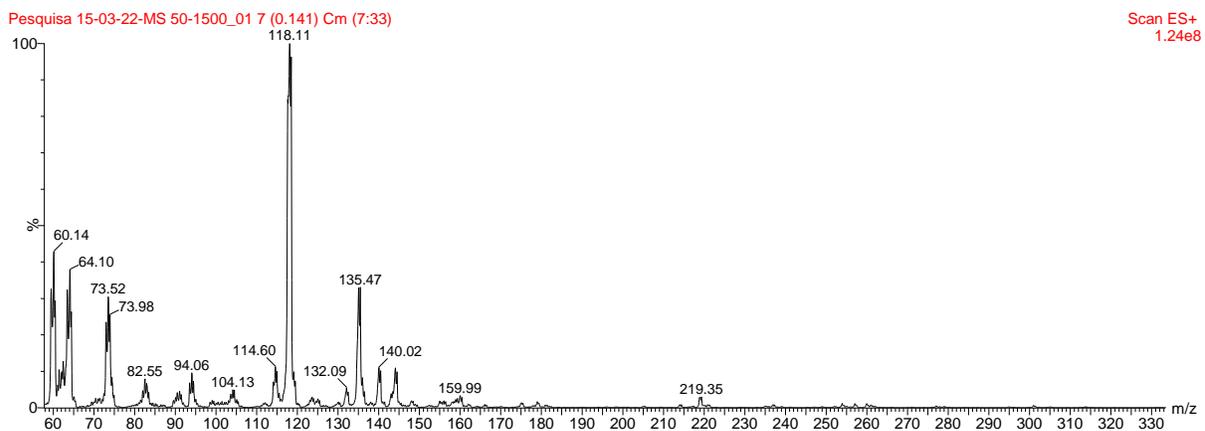


FIGURA 9 – Fracionamento e atividade de moléculas de *A. pallida*. A = Perfil cromatográfico por HPLC e fracionamento (os números indicam as frações coletadas). B = Atividade das frações de *A. pallida*, após RP-HPLC na inibição de catepsina B. C = Análise por espectrometria de massa da fração 1, ativa no ensaio inibitório de catepsina B.

6. DISCUSSÃO

A neuroinflamação é uma condição sempre presente na Doença de Alzheimer, causada pela liberação de mediadores inflamatórios após uma cascata de sinalização, disparada por peptídeos amiloides e proteínas Tau.

Assim, a busca por novos compostos que diminuam a neuroinflamação é essencial para o tratamento da doença.

Esta é a primeira vez, ao nosso conhecimento, que moléculas extraídas de animais marinhos mostraram efeitos inibitórios de caspase-1.

O CrmA, uma serinopeptidase da família da serpina, foi o primeiro inibidor de caspase-1 descoberto, como um produto do vírus da varíola bovina (RAY et al., 1992).

O inibidor de caspase-1 mais conhecido é o peptídeo Ac-YVAD-CHO, no entanto tem uma limitada permeação em membranas celulares, baixa estabilidade e potência. Para contornar esse problema, fluorometilcetonas (FMK) foram inseridos para a obtenção do inibidor Z-YVAD-FMK, e apesar de ser permeável às células, é um inibidor enzimático irreversível, o que tem potencial de causar efeitos adversos quando administrado sistemicamente em um humano (o inibidor Z-VAD teve os estudos descontinuados por alta toxicidade in vivo). (VAN NOORDEN, 2001).

Embora alguns inibidores tenham sido estudados, poucos estão focados na Doença de Alzheimer. O inibidor VX-765 foi estudado em camundongos e foi visto que ele era capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, e não demonstrou toxicidade. Além disso, reverteu comprometimento de memória espacial e episódica, de maneira dependente de dose. Esses efeitos observados foram de encontro com redução da deposição de peptídeos beta-amiloide e reverteu a neuroinflamação (FLORES et al., 2018).

No momento, a molécula está sendo testada em estudos clínicos para epilepsia e psoríase, e tem demonstrado efeitos adversos leves. Ainda não foram iniciados estudos para Alzheimer (ADDF).

Este trabalho demonstrou a presença de uma molécula proveniente de uma água-viva (*C. quadumanus*), com efeito inibitório da caspase-1. Devido à dificuldade de coleta de animais, esta espécie é pouco estudada do ponto de vista bioquímico e de bioprospecção.

Nosso grupo vem estudando o extrato de *C. quadrumanus* em neurônios em diversos aspectos. Demonstramos que diferentes concentrações do extrato metanólico não causaram efeito tóxico sobre a linhagem diferenciada de neuroblastoma humano SH-SY5Y, um modelo de cultura de células neuronais comumente utilizado para investigações de doenças neurodegenerativas. Verificou-se que o extrato de Cq altera as estruturas dos neurônios relacionadas aos neuritos, causando um alongamento, não afetando a proliferação, necrose ou apoptose das células (ARRUDA et al., 2021).

Além disso, o extrato metanólico não mostrou influência sobre o corpo celular, mas aumentou as junções ramificadas conectadas às células. Esses dados indicam que existem moléculas potenciais que podem ser usadas para aumentar a conexão do neurônio, útil para doenças neurodegenerativas, como Alzheimer. Somado a essa melhora da rede, o extrato pode ter o potencial para reverter a neuroinflamação, conforme demonstrado aqui, pela inibição da caspase-1 e conseqüentemente a inibição da formação do inflamassoma e a liberação de citocinas pró-inflamatórias.

Além disso, avaliamos o mesmo extrato metanólico de *C. quadrumanus* na neurotransmissão autonômica, pois pudemos verificar que o extrato não causou nenhum efeito tóxico para o tecido (incluindo neurônios), mas altera a neurotransmissão baseada na noradrenalina. Esses dados reforçam a segurança de tais moléculas e sua capacidade de interagir com os receptores dos neurônios, afetando somente a neurotransmissão, o que pode contribuir com um restabelecimento da rede neural (BUENO et al., 2021).

O extrato detambém causou atividade inibitória de caspase-1. *E. carneum* é um hidróide comumente encontrado nos costões rochosos brasileiros, também pouco explorado do ponto de vista bioquímico. Moléculas bioativas foram extraídas de hidróides, como *Macrorhynchiaphillipina*, uma espécie relacionada: macrofilonas com efeito citotóxico em linhagens de células cancerígenas (YAN et al., 2018; ZLOTKOWSKI et al., 2017) e isololiólidos com atividade antitripanossomal (LIMA et al., 2019). Não foram descritas moléculas isoladas desta espécie com atividade inibidora de enzima.

Além de moléculas inibidoras de caspase-1, foram encontradas moléculas inibidoras de catepsina B.

Estudos mostram que as catepsinas B são ativas nas micróglias para liberação de mediadores inflamatórios, desenvolvendo um papel central na inflamação crônica. Tais mediadores podem induzir a apoptose, causando perda neuronal e declínio cognitivo, além da

liberação de espécies reativas de oxigênio, que também podem ser tóxicas para os neurônios. (CARRILLO-MORA et al., 2014; TANE0 et al., 2015).

Além disso, foi demonstrado que placas amiloides causam inibição de catepsinas lisossomais, e esse evento determina a apoptose do neurônio. O acúmulo de substrato autofágico dentro dos lisossomos causa fragilidade na membrana da organela e consequente extravasamento das enzimas, o que leva a célula à apoptose e neurodegeneração. Já foi demonstrado que com a função lisossomal comprometida, há formação de mais agregados proteicos, levando mais neurônios à apoptose (VIDONI et al., 2016).

A inibição da catepsina B, na micróglia, por meio da sinalização de RNA, resultou na redução dos efeitos tóxicos causados pela A β (GAN et al., 2004). Assim, novos inibidores, principalmente os reversíveis, são importantes a serem descobertos, visando o tratamento da Doença de Alzheimer.

A administração oral de E-64d, um potente inibidor de catepsina B, em camundongos APP/Lon resultou em melhora do déficit de memória e redução nos níveis de A β (1–40) e A β (1–42), assim como peptídeos truncados pGlu-A β (3–40) e pGlu-A β (3–42) (pGlu = piroglutamato). No entanto, tal inibidor é pouco seletivo, e inibe outros tipos de catepsina. (HOOK G, 2014).

Outro inibidor, o CA-074, potente e seletivo para catepsina B, foi administrado na sua forma de pró-droga (CA-074Me) em camundongos geneticamente modificados para DA causou melhora da memória e reduziu A β (1–40) e A β (1–42) no cérebro (HOOK VY, 2008). No entanto, os dois inibidores são irreversíveis e podem causar sérios efeitos adversos (MURATA M, 1991).

Desta forma, a obtenção de novos inibidores de enzimas comprovadamente importantes para o desenvolvimento da neuroinflamação na Doença de Alzheimer, como é o caso da caspase-1 e da catepsina B, a partir de produtos naturais nunca estudados, representa a descoberta de novos protótipos que podem contribuir com a redução da neuroinflamação e ser um dos tratamentos dessa doença sem cura.

7. CONCLUSÃO

Foi possível obter extratos e moléculas capazes de inibir tanto a caspase-1 quanto a catepsina B, enzimas importantes para o desenvolvimento da neuroinflamação causada por placas amiloides e proteínas Tau na Doença de Alzheimer.

Desta forma, novos protótipos foram obtidos e poderão contribuir para o controle dessa doença.

REFERENCIAS

ADDF.2019. https://www.alzdiscovery.org/uploads/cognitive_vitality_media/VX-765-Cognitive-Vitality-For-Researchers.pdf

AMPDEN RI, ZHANG Y. The role of lysosomal cysteine cathepsins in NLRP3 inflammasome activation. *ArchBiochemBiophys*. 2019. July 30;670:32–42.

APRAHAMIAN, IVAN; MARTINELLI, JOSÉ EDUARDO; YASSUDA, MÔNICA SANCHES. Doença de Alzheimer: revisão da epidemiologia e diagnóstico. *RevBrasClín Méd*. v. 7, p. 27-35, 2009

ARRUDA GLM, VIGERELLI H, BUFALO MC, LONGATO GB, VELOSO RV, ZAMBELLI VO, PICOLO G, CURY Y, MORANDINI AC, MARQUES AC, SCIANI JM. Box Jellyfish (Cnidaria, Cubozoa) Extract Increases Neuron's Connection: A Possible Neuroprotector Effect. *Biomed Res Int*. 2021 Mar 4;2021:8855248.

ASSFALG-MSCHLEIDT I, JOCHUM M, NAST-KOLB D, SIEBECK M, BILLING A, JOKA T, ROTHE G, VALET G, ZAUNER R, SCHEUBER HP, et al. Cathepsin B-indicator for the release of lysosomal cysteine proteinases in severe trauma and inflammation. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1990. May;371 Suppl:211–22.

BASKIN, J. M.; WU, X.; CHRISTIANO, R., OH, M.S.; SCHAUDER, C.M.; GAZERRO, E.; MESSA, M.; BALDASSARI, S.; ASSERETO, S.; BIANCHERI, R.; ZARA, F.; MINETTI, C.; RAIMONDI, A.; SIMONS, M.; WALTHER, T.C.; REINASCH, K.M.; DE CAMILLI, P. The leukodystrophyprotein FAM126A (hyccin) regulatesPtdIns (4) P synthesisatthe plasma membrane. *NatureCellBiology*, v. 18, n. 1, pp. 132–138, 2016.

BRIX, K.; DUNKHORST, A.; MAYER, K.; JORDANS, S. Cysteinecathepsins: cellularroadmaptodifferentfunctions. *Biochimie*, v. 90, p. 194-207, 2008.

BUCCIANINI M, GIANNONI E, CHITI F, et al. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature*. 2002;416:507–511.

BUENO, T.C., COLLAÇO, R. DE C., CARDOSO, B.A., BREDARIOL, R.F., ESCOBAR, M.L., CAJADO, I.B., GRACIA, M., ANTUNES, E., ZAMBELLI, V.O., PICOLO, G., CURY, Y., MORANDINI, A.C., MARQUES, A.C., SCIANI, J.M., ROCHA, T.

Neurotoxicity of *Olindias sambaquiensis* and *Chiropsalmus quadrumanus* extracts in sympathetic nervous system. *Toxicon* 199. 2021.

CARRILLO-MORA, P.; LUNA, R.; COLÍN-BARENQUE, L. Amyloid Beta: Multiple Mechanisms of Toxicity and Only Some Protective Effects? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Article ID 795375, 2014.

CECHINEL FILHO, V.; ZANCHETT, C.C.C. *Fitoterapia Avançada: Uma Abordagem Química, Biológica e Nutricional*. Grupo A, 2020.

COSTA, ROBERTA DORNELES FERREIRA DA COSTA; OSOSRIO-DE-CASTRO, CLAUDIA GARCIA SERPA; SILVA, RONDINELI MENDES DA; MAIA, AURÉLIO DE ARAUJO, RAMOS, MARIANA DE CARVALHO BARBOSA RAMOS; CAETANO, ROSÂNGELA. Aquisição de medicamentos para a Doença de Alzheimer no Brasil: uma análise no sistema federal de compras, 2008 a 2013. *Ciênc. Saúde Coletiva*, v.20, n.12, 2015.

COSTA-LOTUFO, L.V.; WIKLE, D.; JIMENEZ, P.C.; EPIFANIO, R.A. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. *Quím. Nova*, v. 32, n.3, p. 703-716, 2009.

DISABATO DJ, QUAN N, Godbout JP. Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem*. 2016;139 Suppl 2(Suppl 2):136-153. doi:10.1111/jnc.13607

FILHO, VALDIR CECHINEL E CAMILE CECHINEL ZANCHETT, *Fitoterapia Avançada: Uma Abordagem Química, Biológica e Nutricional*. Grupo A, 2020.

DUARTE SIMONE, Produção recombinante e caracterização de uma cisteína protease (tipo catepsina B) de cana de açúcar(2008)

FLORES, J., NOEL, A., FAVOEAU, B. et al. Caspase-1 inhibition alleviates cognitive impairment and neuropathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Nat Commun* 9, 3916 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06449-x>

FRIEDMAN, L.G.; QURESHI, Y.H.; YU, W.H. Promoting autophagic clearance: viable therapeutic targets in Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics*, v. 12, p. 94-108, 2015.

GAN, L.; YE, S.; CHU, A.; ANTON, K.; YI, S.; VINCENT, V.A.; SCHACK, D.; CHIN, D.; MURRAY, J.; LOHR, S.; PATTHY, L.; GONZALEZ-ZULUETA, M.; NIKOLICH, K.; URFER, R. Identification of Cathepsin B as a Mediator of Neuronal Death Induced by A β -activated Microglial Cells Using a Functional Genomics Approach. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, p. 5565–5572., 2004.

GHAYUR, T. et al. Caspase-1 processes IFN- γ -inducing factor and regulates LPS-induced IFN- γ production. *Nature*, v. 386, n. 6625, p. 619-623, 1997

HANSLIK, K. L.; ULLAND, T. K. The Role of Microglia and the Nlrp3 Inflammasome in Alzheimer's Disease. *Frontiers In Neurology*, v. 11, p. 1-9, 2020.

HENDLER, G.; MILLER, J.E.; PAWSON, D.; KIER, P.M. Sea stars, sea urchins, and allies: echinoderms of Florida and the Caribbean. Washington: Smithsonian Institution Press, 1995.

HOOK VY, KINDY M, HOOK G., Inhibitors of cathepsin B improve memory and reduce beta-amyloid in transgenic Alzheimer disease mice expressing the wild-type, but not the Swedish mutant, beta-secretase site of the amyloid precursor protein. *J BiolChem*. 2008. March 21;283(12):7745–53

HOOK G, YU J, TONEFF T, KINDY M, HOOK V., Brain pyroglutamate amyloid- β is produced by cathepsin B and is reduced by the cysteine protease inhibitor E64d, representing a potential Alzheimer's disease therapeutic. *J Alzheimers Dis*. 2014;41(1):129–49.

KINDY MS, YU J. ZHU H EL-AMOURI SS, HOOK V, HOOK GR. Deletion of the cathepsin B gene improves memory deficits in a transgenic Alzheimer's disease mouse model expressing A β PP containing the wild-type β -secretase site sequence. *J AlzheimersDis*. 2012;29(4):827–40.

LIMA, DANIELE A., Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*, v. 7, p. 78-87, 2008

LIMA, M.L., ROMANELLI, M.M., BORBOREMA, S.E.T., JOHNS, D.M., MIGOTTO, A.E., LAGO, J.H.G., TEMPONE, A.G., 2019. Antitrypanosomal activity of isololiolide isolated from the marine hydroid *Macrorhynchiaphilippina* (Cnidaria, Hydrozoa). *Bioorganic Chemistry* 89.

MACKAY, E. A., EHRHARD A., MONIATTE, M, GUENET, C., TARDIF, C., TARNUS, C., Tarnus, C., et al. (1997). A possible role for cathepsins D, E, and B in the processing of beta-amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *Eur. J. Biochem*. 244, 414–425. doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.00414.x

MALVE, H. Exploring the ocean for new drug developments: marine pharmacology. *J. Pharm. Bioallied. Sci.*, v. 8, p. 83-91, 2016.

MORROW, T.; FELCONE, L.H. Defining the difference: What Makes Biologics Unique. *BiotechnolHealthc*. v. 1, p. 24-29, 2004.

MURATA M , MIYASHITA S, YOKOO C, TAMAI M, HANADA K, HATAYAMA K, TOWATARI T, NIKAWA T, KATUNUMA N., Novel epoxysuccinyl peptides. Selective inhibitors of cathepsin B, in vitro. FEBS Lett. 1991. March 25;280(2):307–10.

MURAYAMA, SHUHEI; NAKAO, YOICHI ; MATSUNAGA, Shigeki. Asteropterin, an inhibitor of cathepsin B, from the marine sponge *Asteropus simplex*. Tetrahedron Letters, v. 49, p. 4186-4188, 2008.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. J. Nat. Prod., v. 70, p. 461–477, 2007.

PIŠLAR, A.; KOS, J. Cysteine cathepsins in neurological disorders. Mol Neurobiol.; v.49, n. 2, p. 1017-30, 2014.

RAWAT, D.S.; JOSHI, M.C.; JOSHI, P.; ATHEYAYA, H. Marine peptides and related compounds in clinical trial. AntiCancer Agents Med. Chem., v. 6, p. 33-40, 2006.

RAWLINGS, NEIL ; BARRETT, ALAN; THOMAS, PAUL; HUANG, XIAOSONG; BATEMAN, ALEX; FINN, ROBERT. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. Nucleic Acids Res. v. 46, D624-D632, 2018.

RAY CA, BLACK RA, KRONHEIM SR, GREENSTREET TA, SLEATH PR, Salvesen GS, et al. Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 β converting enzyme. Cell. 1992;69:597–604.

SCIANI, J.M.; ANTONIAZZI, M.M.; NEVES, A.C.; PIMENTA, D.C. Cathepsin B/X is secreted by *Echinometra lucunter* sea urchin spines, a structure rich in granular cells and toxins. J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis., v. 19, p. 33, 2013.

SOKOLOVA A, HILL MD, RAHIMI F, WARDEN LA, HALLIDAY GM, SHEPHERD CE. Monocyte chemoattractant protein-1 plays a dominant role in the chronic inflammation observed in Alzheimer's disease. Brain Pathol. 2009;19:392–398.

SUNDELOF J, SUNDSTROM J, HANSSON O, ERIKSDOTTER-JONHAGEN M, GIEDRAITIS V, LARSSON A, DEGERMAN-GUNNARSSON M, INGELSSON M, MINTHON L, BLENNOW K, KILANDER L, BASSUN H, LANNFELT L. Higher cathepsin B levels in plasma in Alzheimer's disease compared to healthy controls. J Alzheimers Dis. 2010;22(4):1223–30.

SUN Y, RONG X, LU W, PENG Y, LI J, XU S, WANG L, WANG X. Translational study of Alzheimer's disease (AD) biomarkers from brain tissues in A β PP/PS1 mice and serum of AD patients. *J Alzheimers Dis.* 2015;45(1):269–82.

TANEO, J.; ADACHI, T.; YOSHIDA, A.; TAKAYASU, K.; TAKAHARA, K.; INABA, K. Amyloid β oligomers induce interleukin-1 β production in primary microglia in a cathepsin B- and reactive oxygen species-dependent manner. *BiochemBiophys Res Commun.*v. 458, p. 561-567, 2015.

TARALP, A., KAPLAN, H., SYTWU, I. I., VLATTAS, I., BOHACEK, R, KNAP, A. K., et al. (1995). Characterization of the S3 subsite specificity of cathepsin B. *J. Biol. Chem.* 270, 18036–18043. doi: 10.1074/jbc.270.30.18036

VAN NOORDEN CJF. The history of Z-VAD-FMK, a tool for understanding the significance of caspase inhibition. *Acta Histochem.* 2001;103:241–51.

VIDONI, C.; FOLLO, C.; SAVINO, M.; MELONE, M.A.B.; ISIDORO, C.I. The Role of Cathepsin D in the Pathogenesis of Human Neurodegenerative Disorders. *Med. Res. Rev.*, v. 36, p. 845–870, 2016.

VOET, Sofie et al. Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. *Embo Molecular Medicine*, v. 11, n. 6, p. 1-16, 2019.

VIGNESH, S.; RAJA, A.; JAMES, R.A. Marine drugs: Implication and future studies. *Int J Pharmacol*, v. 7, p.22-30, 2011.

YAN, P., RITT, D.A., ZLOTKOWSKI, K., BOKESCH, H.R., REINHOLD, W.C., SCHNEEKLOTH, J.S., MORRISON, D.K., GUSTAFSON, K.R., 2018. Macrophilones from the Marine Hydroid *Macrorhynchiaphilippina* Can Inhibit ERK Cascade Signaling. *Journal of Natural Products* 81.

YAN, S.; SLOANE, B.F. Molecular regulation of human cathepsin B: implication in pathologies. *Biol Chem.*; v. 384, n. 6, p. 845-54, 2003.

ZANG, Y., DONG, Z & SONG, W. NLRP3 inflammasome as a novel therapeutic target for Alzheimer's disease. *SigTransduct Target Ther* 5, 37 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0145-7>

ZANG J, GOODLETT DR, QUINN JF, PESKIND E, KAYE JA, ZHOU Y, PAN C, YI E, ENG J, WANG Q, AEBERSOLD RH, MONTINE TJ. Quantitative proteomics of cerebrospinal

fluid from patients with Alzheimer disease. *J AlzheimersDis.* 2005. April;7(2):125–33; discussion 173–80. Erratum in: *J AlzheimersDis.* 2006 Mar;9(1):81–8.

ZHOU, XY.; LUO, Y.; ZHU, YM. et al. Inhibition of autophagy blocks cathepsins–tBid–mitochondrial apoptotic signaling pathway via stabilization of lysosomal membrane in ischemic astrocytes. *Cell Death Dis* 8, e2618 (2017).

ZLOTKOWSKI, K., HEWITT, W.M., YAN, P., BOKESCH, H.R., PEACH, M.L., NICKLAUS, M.C., O'KEEFE, B.R., MCMAHON, J.B., GUSTAFSON, K.R., SCHNEEKLOTH, J.S., 2017. MACROPHILONE A: Structure Elucidation, Total Synthesis, and Functional Evaluation of a Biologically Active Iminoquinone from the Marine Hydroid *Macrorhynchiaphilippina*. *Organic Letters* 19.