

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

RAFAELA INDALECIO MORENO

**PROSPECÇÃO DE INIBIDORES DE CATEPSINA B E
CASPASE-1 A PARTIR DE ANIMAIS MARINHOS, PARA
MODULAÇÃO DA NEUROINFLAMAÇÃO IN-VITRO**

Bragança Paulista
2022

RAFAELA INDALECIO MORENO - RA:001202015090

**PROSPECÇÃO DE INIBIDORES DE CATEPSINA B E
CASPASE-1 A PARTIR DE ANIMAIS MARINHOS, PARA
MODULAÇÃO DA NEUROINFLAMAÇÃO IN-VITRO**

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

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Mozer Sciani

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 Renzo, minha 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 patologia neurodegenerativa mais frequente relacionada à idade, cujas manifestações resultam em perda gradual de funções cognitivas. A doença se inicia após o processamento da proteína precursora amiloide mutada, gerando peptídeos amiloides tóxicos (A β), que se agregam e formam as placas senis. A consequência dessa toxicidade é perda progressiva de neurônios em certas regiões do cérebro, como o hipocampo, responsável pela memória. Além disso, essas placas causam inflamação crônica. A deposição de A β pode ativar a microglia, que libera mediadores pró-inflamatórios que contribuem para a neuroinflamação. A participação das caspases-1 e na montagem do inflamassoma da microglia é essencial para a liberação do mediador, e 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. A DA é incurável, os tratamentos são somente para retardar a evolução e preservar por mais tempo possível as funções intelectuais, portanto a busca por alternativas de tratamento e novos alvos terapêuticos são essenciais. Neste trabalho foi realizada a prospecção 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. Extratos de 10 espécies foram testados quanto à atividade inibitória sobre as caspase 1 e catepsina B, 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 (*Chiropsamus quadrumanus* e *Eudendrium carneum*), que foram fracionados, e suas frações testadas novamente no mesmo modelo enzimático. Duas moléculas puderam ser identificadas – a trigonelina para *C. quadrumanus* e um novo composto de 307 Da no *E. carneum* que será elucidado. Com relação à catepsina B, 5 extratos inibiram a ação da enzima, e foram escolhidos os das espécies *Zoanthus sociatus* e *Aipstasia pallida* para fracionamento. As frações de *Z. sociatus* não foram tão eficazes em inibir a enzima, enquanto que o extrato de *A. pallida* apresentou 1 fração com inibição significativa. Análises por espectrometria de massas revelaram o composto betaína como de provável atividade inibidora da catepsina B. Os dois compostos já foram encontrados anteriormente em outras espécies de animais marinhos, e mostram uma correlação de efeito biológico que pode contribuir para o controle da neuroinflamação, embora inibição das enzimas estudadas nunca tenha sido descrita. Em conclusão, foram obtidas

moléculas que inibem a caspase-1 e 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

Alzheimer's disease (AD) is the most frequent age-related neurodegenerative disease, whose manifestations cause gradual cognitive disability. The disease begins after the processing of mutated amyloid precursor protein, generating toxic amyloid peptides ($A\beta$), which aggregates and form senile plaques. As a consequence of this toxicity, there is a progressive loss of neurons in certain regions of the brain, such as the hippocampus, which controls memory. Besides, these plaques cause a chronic inflammation. $A\beta$ deposition can activate microglia, which release pro-inflammatory mediators that contribute to neuroinflammation and contribute to AD. The participation of caspases-1 and in the assembly of the microglia inflammasome is essential for the release of the mediator, which may be an interesting therapeutic target for AD. Cathepsins B also contribute to microglial activation, resulting in the release of inflammatory mediators. The disease is incurable, treatments are aimed at slowing down its evolution and preserving intellectual functions for as long as possible thus the search for new molecules and molecular targets are essential. In this work we performed a screening of new inhibitors of caspase-1 and cathepsin B from extracts of marine invertebrates from Brazilian biodiversity. These animals can provide a library of molecules that can act on such targets and contribute to the discovery of drugs for this incurable disease. Extracts from 10 species were tested for inhibitory activity on caspase 1 and cathepsin B, using commercial enzymes and specific synthetic substrates. The extract capable of inhibiting one of the enzymes was fractionated by HPLC to obtain a pure active molecule, which was analyzed by mass spectrometry. It was possible to obtain 2 extracts that inhibit caspase-1 (*Chiropsamus quadrumanus* and *Eudendrium carneum*), which were fractionated and fractions tested in the same enzyme model. Two molecules could be identified – trigonelline in *C. quadrumanus* and a new 307 Da compound in *E. carneum*, which will be elucidated. Regarding cathepsin B, *Zoanthus sociatus* and *Aipstasia pallida* were selected for fractionation. Fractions from *Z. sociatus* were not able to efficiently inhibit the enzyme, while *A. pallida* showed 1 fraction with significant inhibition. Mass spectrometry analysis revealed that betaine is probably the active compound. Both identified molecules were already found in marine animals and have shown a correlation between the biologic effect found here, which can contribute to the control of neuroinflammation, although inhibition of caspase-1 and cathepsin B have never been described for such compounds. In conclusion, molecules that inhibit caspase-1 and cathepsin B were obtained, which may help to control neuroinflammation in 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

ALC (Average Local Confidence): média da confiança local

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

ara-C: Citarabina

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

DA: Doença de Alzheimer

DTT: Ditioneitol

ESI: Ionização por Eletrospray

ET-743: Ecteinascidina

GSDMD: Proteína gasdermia D

HPLC: Cromatografia líquida de alta performance

ICMBIO: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

kDa: kilo Dalton

mL: Mililitros

M. philippina: Macrorhynchiaphilippina

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

MVIA: Ziconotida

m/z: massa sobre carga

NFT: Novelas neurofibrilares

nm: Nanometro

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

PCDT: Protocolo clinico de diretrizes terapêuticas

ROS (ReactiveOxygenSpecies): espécies reativas ao oxigênio

SUS: Sistema único de saúde

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

μL : Microlitro

μM : Micrimetro

μg : Micrigrama

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Formação do inflamassomo após a ativação de NLRP3 por oligômeros amiloides A β e proteína Tau, causadores da Doença de Alzheimer.....	13
FIGURA 2 – Superexpressão da catepsina B no cérebro de humanos.....	15
FIGURA 3 – Ensaio de viabilidade celular após incubação dos extratos de animais marinhos em neurônios SH-SY5Y diferenciados.....	28
FIGURA 4 – Atividade enzimática de extratos de invertebrados marinhos sobre caspase-1.....	30
FIGURA 5 – Fracionamento e atividade de moléculas de <i>C. quadrumanus</i>	32
FIGURA 6 – Fracionamento e atividade de moléculas de <i>E. carneum</i>	34
FIGURA 7 - Atividade enzimática de extratos de invertebrados marinhos sobre a inibição da catepsina B.....	36
FIGURA 8 – Fracionamento e atividade de moléculas de <i>Z. sociatus</i>	37
FIGURA 9 – Fracionamento e atividade de moléculas de <i>A. pallida</i>	38

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Exemplos de agentes terapêuticos obtidos a partir da biodiversidade marinha.....17

TABELA 2 – Espécies coletadas para o estudo, cujos extratos e secreções foram utilizados em ensaios de inibição enzimática22

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. Doença de Alzheimer.....	10
1.2. Neuroinflamação.....	10
1.2.1. Caspase-1.....	11
1.2.2. Catepsina B.....	13
1.3. Animais marinhos como fonte de novas moléculas bioativas.....	16
2. JUSTIFICATIVA.....	19
3. OBJETIVOS.....	21
3.1. Objetivos específicos.....	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1. Obtenção dos animais e extratos.....	22
4.2. Ensaio de viabilidade celular.....	25
4.3. Cromatografia líquida de alta performance (HPLC).....	25
4.4. Espectrometria de massas.....	26
4.5. Ensaio enzimáticos.....	26
5. RESULTADOS.....	28
5.1. Viabilidade de neurônios com o tratamento com extratos de animais marinhos.....	28
5.2. Efeito da inibição da caspase-1 com extratos de animais marinhos.....	30
5.2.1. <i>C. quadumanus</i>	30
5.2.2. <i>E. carneum</i>	34
5.3. Efeito da inibição da catepsina B com extratos de animais marinhos.....	36
5.3.1. <i>Z. sociatus</i>	36
5.3.2. <i>A. pallida</i>	37
6. DISCUSSÃO.....	39
7. CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Alzheimer

Doenças neurodegenerativas são caracterizadas pela degeneração dos neurônios, que ocorre de forma irreversível. A doença neurodegenerativa mais frequente associada à idade é a Doença de Alzheimer (DA), cujas manifestações resultam em perda de funções cognitivas. Ao final da doença, sintomas como a apatia, lentificação, dificuldade de concentração, perda de peso, insônia e agitação em algumas situações podem ocorrer (CAETANO et al., 2017, SERENIKI; VITAL, 2008).

A doença tem uma origem genética, principalmente baseada na mutação da proteína precursora amiloide (APP), que sofre processamento de secretases, que por sua vez geram peptídeos amiloides. Esses peptídeos são tóxicos, e causam morte neuronal. Além disso são hidrofóbicos e tendem a se oligomerizar em um ambiente aquoso, formando então placas senis, que também induzem toxicidade, liberação de espécies reativas de oxigênio e inflamação (HARDY; SELKOE, 2002).

Em nível histopatológico, a DA é caracterizada pela morte neuronal, e conseqüentemente perda sináptica. em regiões cerebrais responsáveis pela função cognitiva, incluindo o córtex cerebral, hipocampo, córtex entorrinal e estriado ventral. Além disso, é observada deposição de placas senis, acúmulo de filamentos anormais de proteína tau e posterior formação de emaranhados neurofibrilares (NFTs) e inflamação (SERENIKI; VITAL, 2008).

Muitos estudos têm sido conduzidos para o melhor entendimento, e conseqüentemente, tratamento da DA. No entanto, os tratamentos atuais estão longe de ser satisfatórios. A exploração de novos mecanismos, como o proposto neste trabalho, leva diretamente à descoberta de novos medicamentos que possam retardar ou mesmo bloquear a evolução da doença.

1.2. 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 (micróglias 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 DA, 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 (BUCCIANINI 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. O principal mecanismo é pela montagem do inflamassomo pela via NLRP3 na microglia. O A β oligomérico e estresse oxidativo da DA 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 inflamassomo NLRP3 para iniciar o processamento de pró-caspase-1 em caspase-1 e subsequente conversão de pró-IL-1 β em fator inflamatório IL-1 β ativo. Detalhes dessas vias estão apresentados a seguir.

1.2.1. 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 torná-las ativas. É bastante estudada em várias patologias, como Infecções bacterianas e virais, além de esclerose lateral amiotrófica (RAWLINGS et al., 2018).

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

Inflamassomos são complexos proteicos citosólicos que causam a liberação de mediadores da imunidade inata. 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 similares a NOD. Um domínio central, o NATCH, favorece a oligomerização do receptor, de forma dependente de ATP. Em sua porção N-terminal, o receptor contém um domínio de recrutamento de caspase (CARD) ou um domínio pirina (PYD),

que estão implicados na interação proteína-proteína. Desta forma, os receptores, quando ativados, recrutam pró-caspases (DAVIS; WEN; TING, 2011).

O inflamassomo proteína 3 contendo porção C-terminal rica em repetições de NOD-leucina e domínio pirina (NLRP3) é um complexo que contém, além de NLRP3, a proteína similar a *speck* associada à apoptose, contendo um domínio CARD (ASC) e pró-caspase-1. Em condições normais, NLRP3 é mantido na sua forma inativa no retículo endoplasmático e o ASC localizado na mitocôndria. Quando ativado, ocorre a interação entre as NLRP3 e ASC pela polimerização de filamentos de PYD e ASC, e esse complexo leva ao recrutamento da pró-caspase-1 via CARD, levando a clivagem e ativação, e consequente liberação de caspase-1, que por sua vez irá ativar o fator nuclear- κ B (NF- κ B), resultando no aumento da expressão de citocinas pró-IL-1 β e pro-IL-18 (HANSLIK; ULLAND, 2020; ZHANG et al., 2020).

Uma outra via de montagem do inflamassomo e ativação de caspase-1 é a ruptura dos lisossomos e/ou disfunção mitocondrial, que resulta na liberação de espécies reativas de oxigênio, cálcio e DNA mitocondrial, que ativam o inflamassomo (STROWIG et.al, 2012).

A ativação do inflamassomo e consequente liberação de mediadores inflamatórios tem sido descrita em várias células do sistema nervoso central, como micróglia, neurônios e astrócitos. A liberação prolongada de citocinas causa neurotoxicidade, e por isso está relacionada a várias doenças do sistema nervoso central, como DA, trauma cerebral, injúria da medula espinhal e epilepsia (FREEMAN; TING, 2016).

O inflamassomo NLRP3 foi co-localizado em placas amiloides em paciente com a DA. 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 inflamassomo (ZHANG et al., 2020).

A figura 1 ilustra as vias de ativação e formação do complexo pelos peptídeos amiloides e proteína Tau.

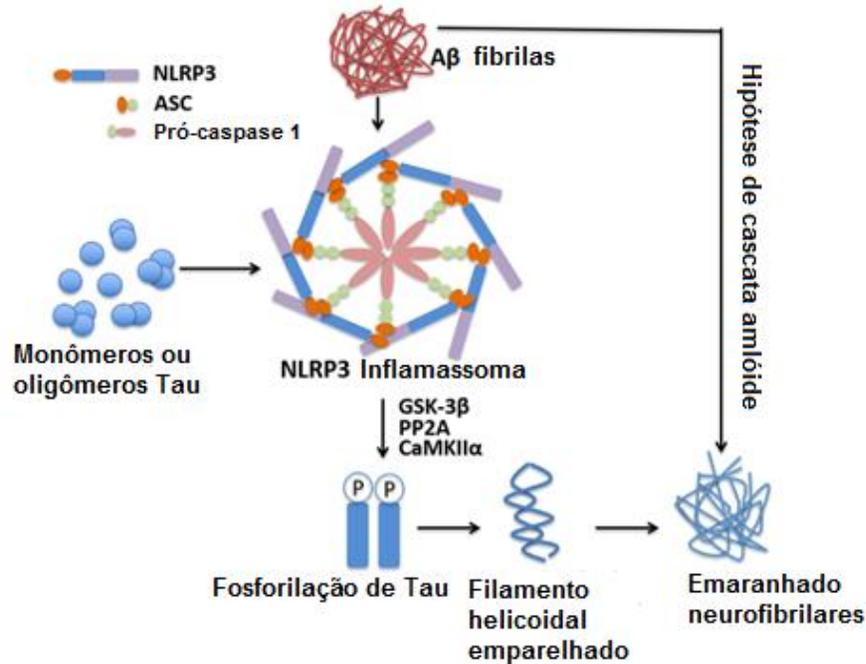


FIGURA 1 – Formação do inflamassomo após a ativação de NLRP3 por oligômeros amiloides Aβ e proteína Tau, causadores da Doença de Alzheimer. FONTE: Adaptado de Zhang et al. (2020).

1.2.2. Catepsinas B

As catepsinas são subdivididas em clãs, baseadas na composição do sítio ativo, que confere específicas atividades catalíticas. Esses clãs 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 cisteínopeptidases de mamíferos, presentes na maioria das células e tecidos. São enzimas lisossomais que 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 em 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 DA, hemorragias intracerebrais e lesões cerebrais traumáticas (CATALDO; NIXON, 1990; HOOK et al., 2005, 2014; MUELLER-STEINER et al., 2006; KINDY et al., 2012).

Em condições fisiológicas, a catepsina B é ativa em endossomos iniciais e lisossomos (TARALP et al., 1995), porém em pH baixo exerce atividade de carboxipeptidase na proteína precursora amiloide (APP) e A β (MACKAY et al., 1997).

A formação intracelular de peptídeos amiloides causa rompimento na membrana dos lisossomos, que leva ao extravasamento da enzima do compartimento para o citosol. Foi visto que em humano que possui a DA, a concentração de catepsina B está aumentada em localização citoplasmática, em contraste com a sua localização nos lisossomos, sendo a enzima redistribuída na patologia (ZANG, 2006).

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).

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).

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).

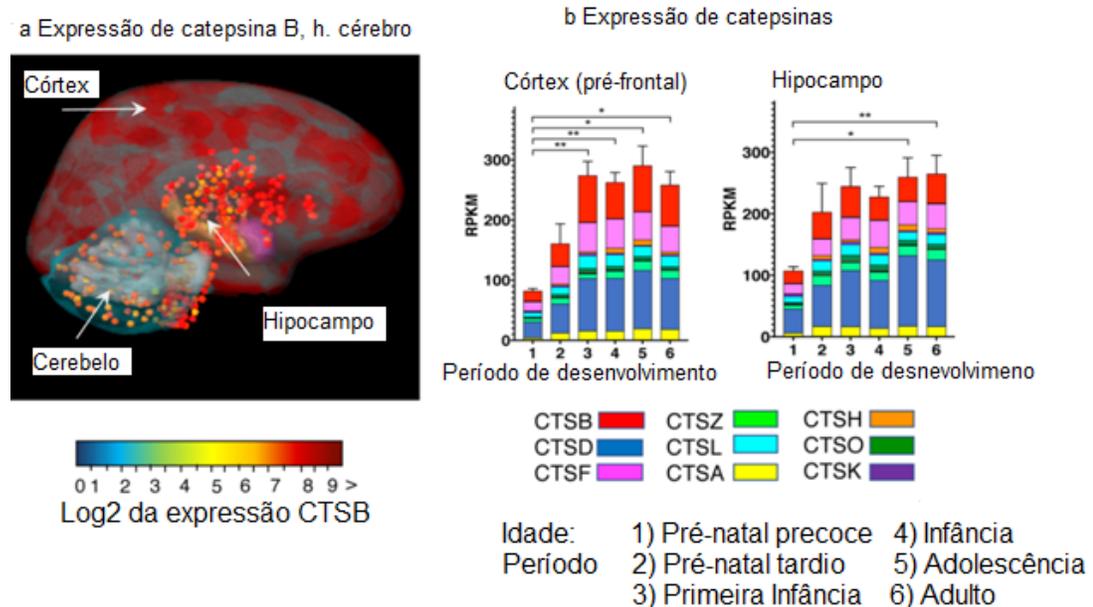


FIGURA 2-Superexpressão da catepsina B no cérebro de humanos. (A) Expressão de catepsina B no córtex, cerebelo e hipocampo de humano adulto. (B) Aumento dos níveis de mRNA de catepsina B no córtex e hipocampo em períodos de desenvolvimento, em comparação com expressão de outras catepsinas. Fonte: Adaptado de 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).

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).

1.3. Animais marinhos como fonte de novas moléculas bioativas

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 (CUNHA, 2019)

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).

Devido ao insucesso da indústria de encontrar novas estruturas químicas derivadas dos modelos de *design* racional de moléculas e da química combinatória, 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 consequentemente 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 dos medicamentos mais vendidos no mundo são derivados de produtos naturais, dentre elas plantas e animais, e diversos outros 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	Nome popular	Doença
Trabectedina	<i>Ecteinascidia turbinata</i>	Tunicado de mangue	Câncer
Ziconotídeo	<i>Conus magus</i>	Cone mágico	Dor neuropática
Hemiasterlina	<i>Hemiasterella vasiformis var.</i>	Esponja	Câncer
Ziduvudina (AZT)	<i>Algas vermelhas</i>	Algas	Vírus da Imunodeficiência humana
Briostatina	<i>Bugulaneritina</i>	Briozoário marrom	Câncer
Discodermolídeo	<i>Dicodermia dissoluta</i>	Esponja marinha	Câncer
Aplidina	<i>Aplidium albicans</i>	Ascídia	Câncer
kahalatido F	<i>Elysia rufescens</i>	Lesma do mar	Câncer
Halichondrina B	<i>Halichondria okadai</i>	Esponja marinha	Câncer
Jamaicamidas A-D	<i>Lyngbya majuscula</i>	Cianobactéria filamentosa	Câncer

Fonte: Adaptado de 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. A Trabectedina (ET-743, Yondelis®) é um alcalóide tetra-hidroquinolínico isolado da ascídia caribenha *Ecteinascidia turbinata* e cujo mecanismo de alquilação de DNA difere da grande maioria dos outros agentes alquilantes (COSTA-LOTUFO et al., 2009).

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 (COSTA-LOTUFO et al., 2009).

O ziconotídeo ou ω -conotoxina MVIIA (Prialt®) é um peptídeo de 25 aminoácidos isolado do molusco *Conus magus*, com propriedades analgésicas. Este fármaco é administrado para o

controle da dor severa, incluindo aqueles pacientes refratários a tratamentos com opioides (COSTA-LOTUFO et al., 2009).

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. 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 DA (COSTA et al., 2015).

A Doença de Alzheimer acometeu 48 milhões de pessoas no mundo em 2015, sendo a 7ª causa de morte e estima-se que esse número chegue a 131,5 milhões em 2050 (Organização Mundial da Saúde, 2015). 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.

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).

Desta forma, a busca por novas moléculas, e que atuem em novos alvos terapêuticos é essencial para uma alternativa ao tratamento da DA. Inibidores de caspases-1 e catepsinas B são estudados para outras doenças, e pouco considerados para a DA.

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 amostram que a biodiversidade marinha tem um

grande potencial par o fornecimento de novas moléculas inibidoras de enzimas, o que proporciona grandes chances de novas opções de terapia.

3. OBJETIVOS

Prospectar novas moléculas com atividade inibidora de caspase-1 e/ou catepsina 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, visando a obtenção de moléculas ativas puras;
- Analisar as frações por espectrometria de massas para avaliação de pureza e identificação molecular;
- Testar extratos e moléculas isoladas em ensaios enzimáticos de inibição de caspase-1 e catepsina B.

4. MATERIAL 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 em 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 das enzimas caspase-1 e catepsina B

Espécie	Nome popular	Foto
Cnidaria – Anthozoa		
<i>Aiptasia pallida</i>	Anêmona-do-mar	

Antholoba achates

Anêmona-do-mar



Anthopleura cascaia

Anêmona-do-mar



Carijoa riisei

Coral floco de neve



Palythoa caribbaeorum

Hexacoralia baba-de-boi



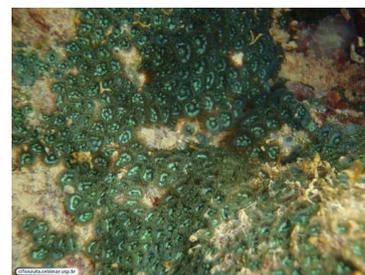
Renilla reniformis

Octocoral rim-do-mar



Zoanthus sociatus

Hexacoralia



Cnidaria - Hydrozoa

Eudendrium carneum

Hidroide



Cnidaria - Cubozoa

Chiropsalmus quadrumanus

Água-viva de caixa



Equinodermos

Lytechinus variegatus

Ouriço-do-mar lilás



Fotos: Cifonauta – Banco de imagens de biologia marinha ou arquivo pessoal.

4.2. Ensaio de viabilidade celular

Os extratos provenientes de animais marinhos foram testados em cultura de neurônios SH-SY5Y por 48 horas, em concentrações de 0,1 a 100 µg/mL. As células foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ambiente úmido em meio de cultura DMEM/F12 contendo 10% de soro fetal bovino, 2 mM glutamina e 1% de penicilina / estreptomicina. As células foram diferenciadas pela adição de 10 µM de ácido retinóico por 10 dias. Após isso, foram avaliados pelo método do MTT (em triplicata e dois experimentos independentes), para verificar se as amostras teriam capacidade de induzir alguma toxicidade.

Para essa avaliação, uma solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) 5 mg/mL foi adicionada às células e mantido por 3 horas. O meio de cultura foi retirado e à solução foi adicionado dimetilsulfóxido (DMSO) para dissolução dos cristais de formazan. A densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro, em um comprimento de onda de 540 nm.

O cálculo utilizado para determinar a porcentagem das células viáveis foi:

$$100 \times [(TA-T0)/(T1-T0)]$$

sendo TA = absorbância final, T0 = absorbância inicial e T1 = absorbância do controle negativo.

Um grupo controle (células sem tratamento), foi comparado aos grupos tratados pelo teste ANOVA, com pós teste de Tukey, para avaliação de significância estatística. A significância foi estabelecida se $p < 0,05$.

Esse teste foi feito em colaboração com o Dr. Hugo Vigerelli, do Instituto Butantan.

4.3. Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

Foram coletadas frações dos extratos dos animais marinhos após cromatografia líquida de alta eficiência, em um equipamento Agilent 1260 Infinity. Alíquotas de 80 µL foram inseridas no equipamento, com uma coluna Phenomenex C18 (4,6 x 250 mm, 300 Å) acoplada. A eluição se deu pelo gradiente de 0 a 100% B 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 1,0 mL/min. O conteúdo eluído foi monitorado por absorbância em 214 nm e os picos foram coletados manualmente, de acordo com o cromatograma obtido.

No caso do re-fração, o mesmo equipamento foi utilizado, porém a coluna foi C8 (4,6 x 150 mm, 300 Å), com fluxo constante de 1,0 mL/min e eluição isocrática, utilizando ácido trifluoroacético 0,1% em água ultrapura. A detecção foi feita pela medida da absorbância em 214 nm e os picos foram coletados manualmente, de acordo com o cromatograma obtido.

4.4. Espectrometria de massas

As frações coletadas após a cromatografia foram analisadas por espectrometria de massa (Xevo GS nQToF, Waters, Co). Alíquotas de 5 µL 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.

Os dados brutos foram analisados pelo software Progenesis QI (Waters Co.) para identificação de compostos de baixa massa por meio de comparação com banco de dados GNPS ou Vaniya/Fiehn Natural Products, ambos com tolerância de até 5 ppm para o precursor.

4.5. Ensaio enzimáticos

Os ensaios em caspase-1 foram conduzidos em placas de 384 poços, em triplicata, com um volume final de reação de 20 µL usando o kit de ensaio de triagem de inibidor de Caspase-1 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA). As amostras (10 µg) 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 µM). Um conhecido inibidor de caspase-1, Z-VEID-CHO (10 µM, Cayman Chemical), 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:

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

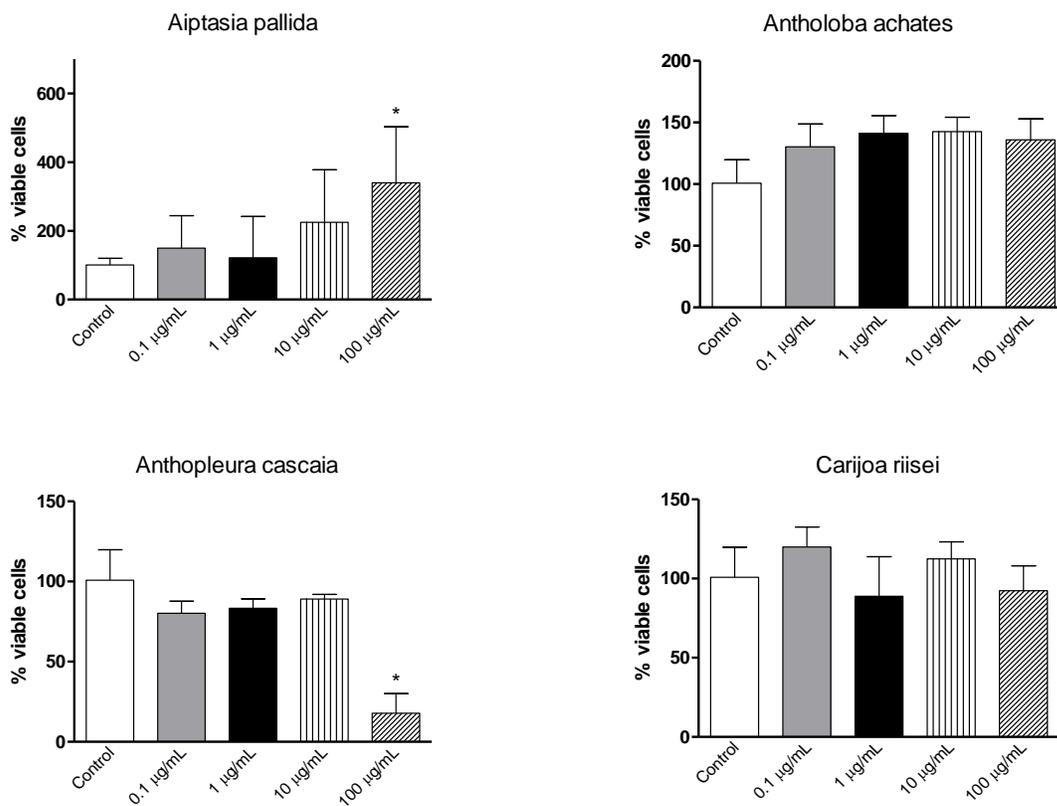
Os ensaios de catepsina B foram conduzidos em placas de 384 poços, em triplicata, com volume final de reação de 20 μ L, utilizando o Cathepsin B Inhibitor Screening Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As amostras (10 μ g) foram previamente incubadas com enzima (catepsina B recombinante humana) tratada 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, FFMK (10 μ M), foi usado como controle positivo. O aumento da fluorescência 50 minutos 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. O cálculo foi realizado conforme mencionado acima para a caspase-1 (SCIANI et al., 2013).

Os resultados estão mostrados como porcentagem de inibição \pm erro padrão de 3 experimentos.

5. RESULTADOS

5.1. Viabilidade de neurônios (*neuron-like*) com o tratamento com extratos de animais marinhos

As células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico foram incubadas com 4 concentrações de extratos marinhos e as células foram avaliadas quanto à sua viabilidade, como mostrado na figura 3. Foi verificado que 8 extratos não causaram toxicidade celular, e alguns deles aumentaram a viabilidade dos neurônios. Somente 2 deles causaram diminuição da viabilidade celular, porém somente com uma alta concentração (100 µg/mL).



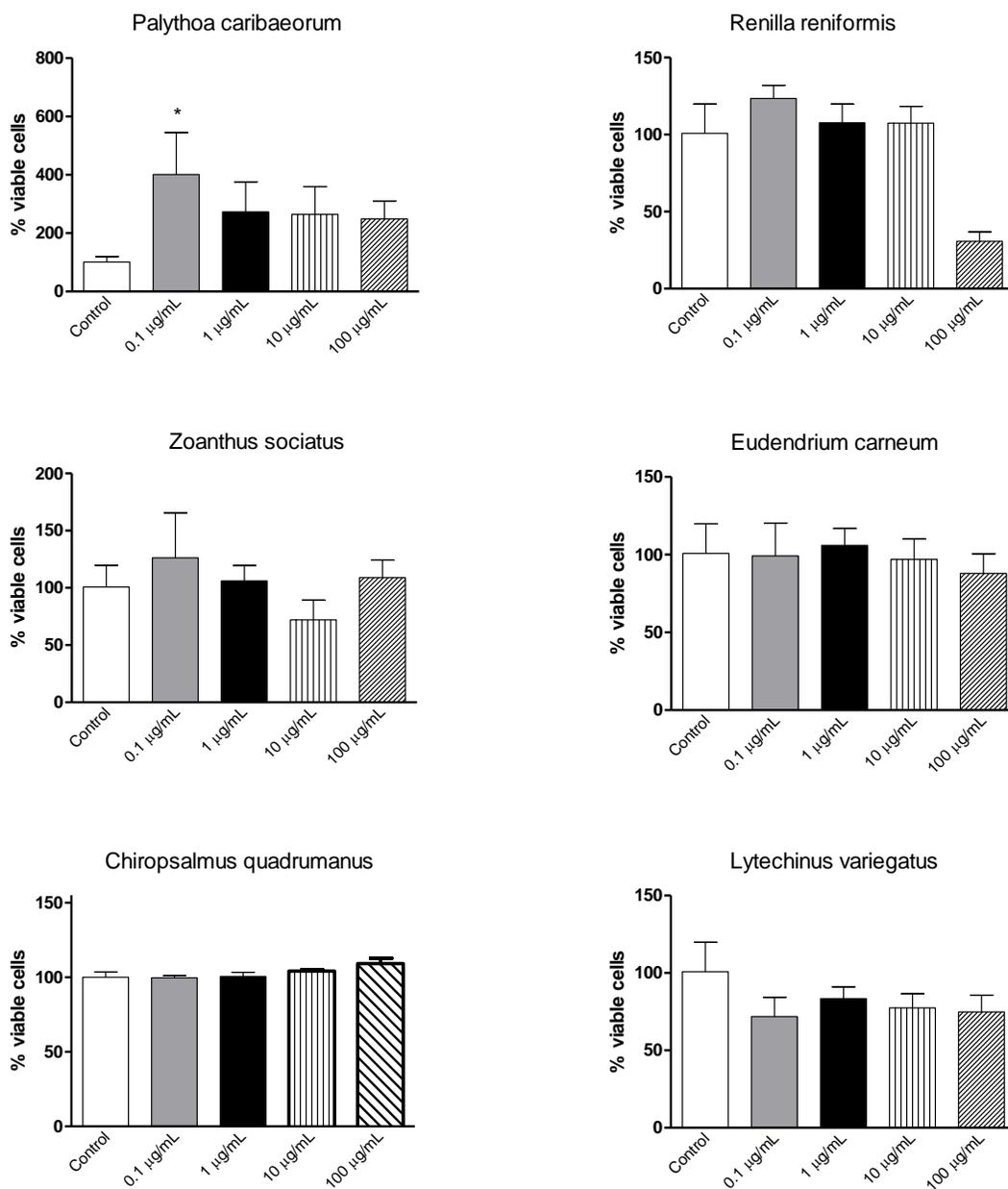


Figura 3 – Ensaio de viabilidade celular após incubação dos extratos de animais marinhos em neurônios SH-SY5Y diferenciadas. Os dados estão mostrados como média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$.

5.2. Efeito da inibição da caspase -1 por extratos de animais marinhos

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.

Com o ensaio enzimático foi possível identificar 2 extratos que inibiram a caspase-1: *C. quadrumanus* e *E. carneum* (figura 4).

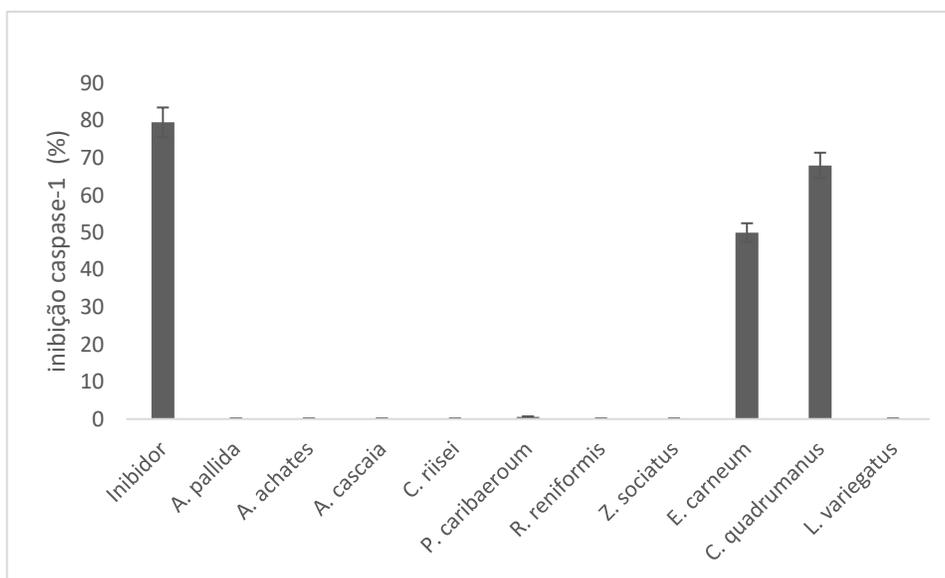


FIGURA 4 - Atividade enzimática de extratos de invertebrados marinhos sobre caspase-1

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:

5.2.1. *C. quadrumanus*

O perfil cromatográfico e as frações coletadas após separação por HPLC do extrato de *C. quadrumanus* estão 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.

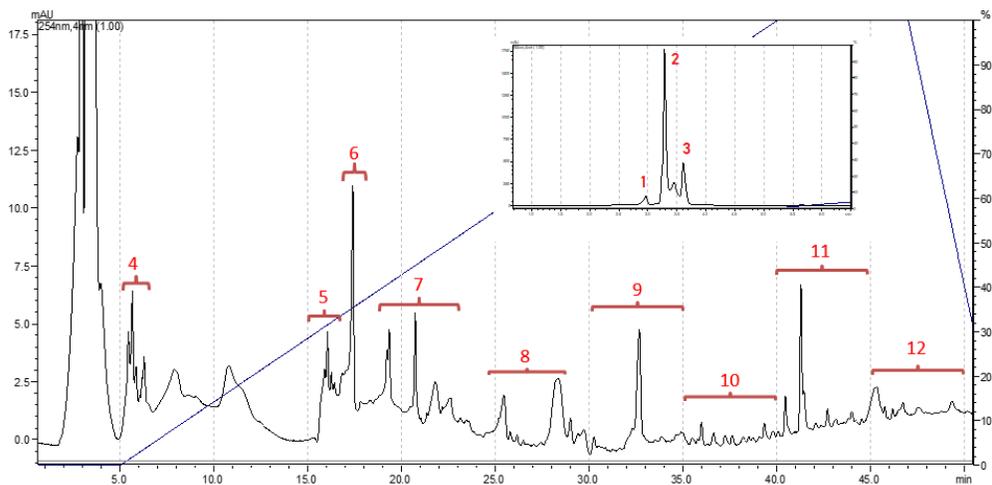
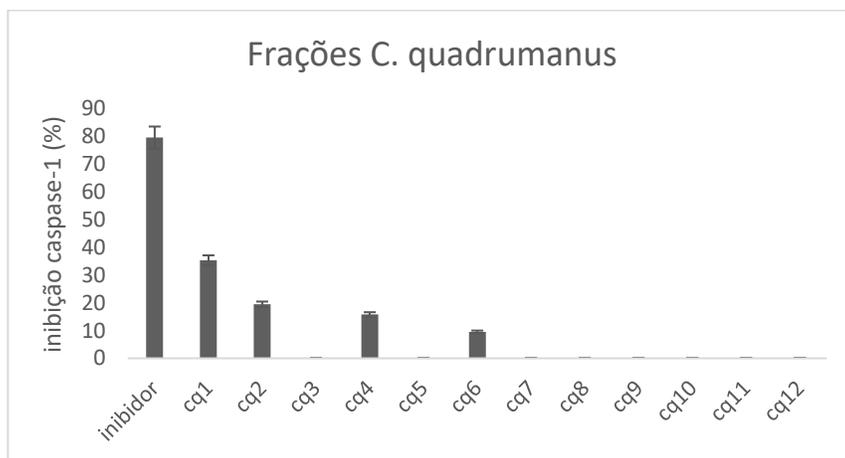
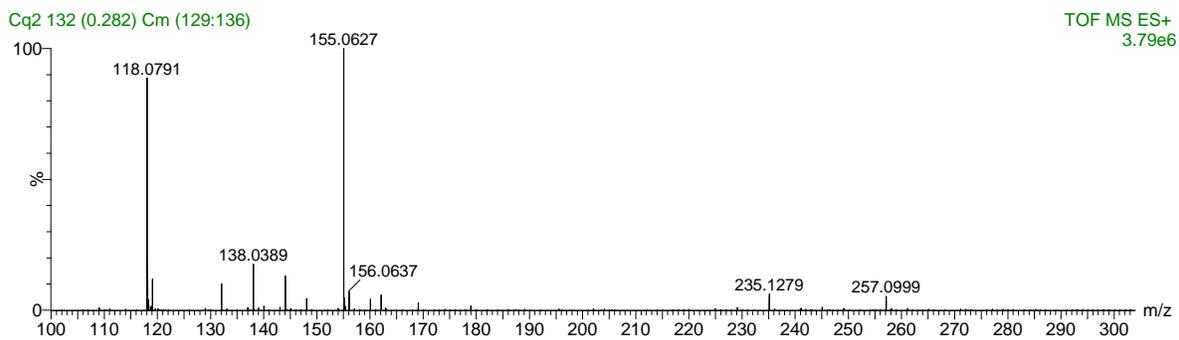
Dentre as 12 frações de *C. quadrumanus*, 4 foram identificadas como inibidoras (frações 1, 2, 4 e 6), como mostra a figura 5B. As frações 1 e 2 estão próximas e pode ter ocorrido contaminação cruzada durante a coleta.

A fração 2, por ser a mais intensa no cromatograma, foi analisada por espectrometria de massas. Foi possível verificar que não estava pura, tendo a presença de vários íons (figura 5C), apesar do pico ser intenso, simétrico e estreito.

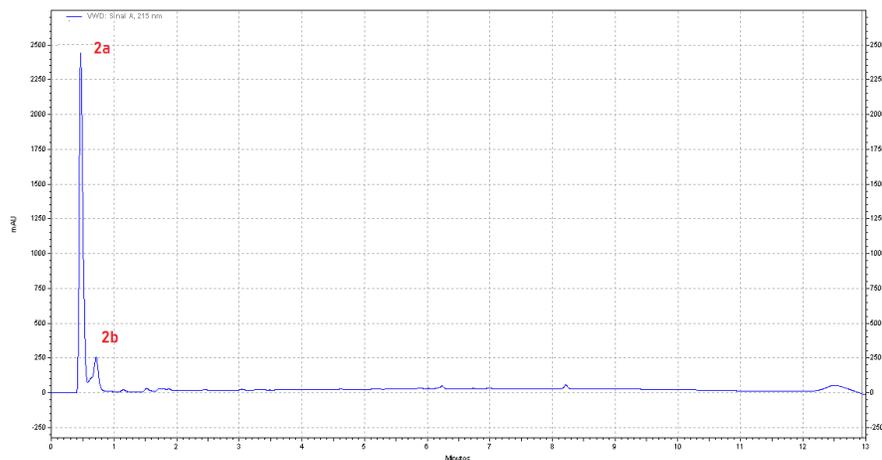
Essa fração foi então submetida a uma nova etapa cromatográfica, em coluna C8, utilizando eluição isocrática em 0% B. O cromatograma obtido está mostrado na figura 5D, em que dois picos foram coletados (2a e 2b) e testados novamente na inibição da caspase-1 (figura 5E). Foi possível observar que somente uma delas, a de menor intensidade no cromatograma, nomeada Cq2b, foi a que causou inibição da caspase-1.

Essa fração foi analisada por espectrometria de massas, e foi visto que os íons 118 e 155 m/z se mantiveram, sendo agora o 155 mais intenso. O íon 118 m/z também foi detectado no pico 2^a, que se mostrou inativo na inibição da caspase-1. Portanto, o íon 155,0627 foi analisado por comparação com banco de dados para identificação.

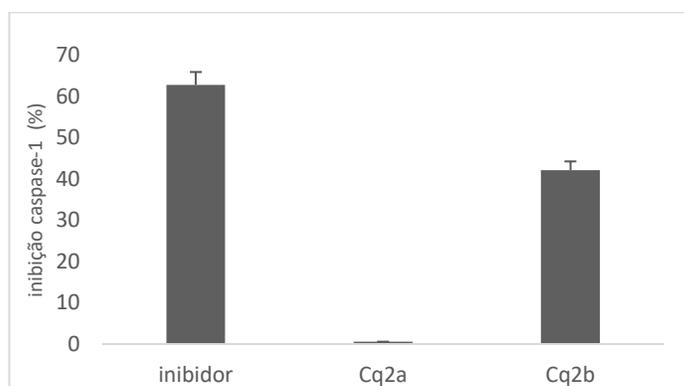
O software indicou o ácido N-metilnicotínico, conhecido como trigonelina ($C_7H_7NO_2$) como o composto de maior score (39), com erro de 2,02 ppm.

A**B****C**

D



E



F

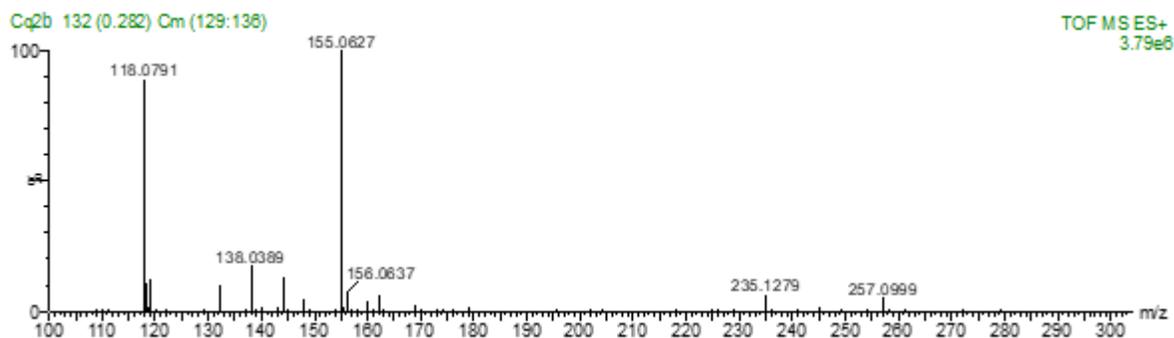


FIGURA 5 – Fracionamento e atividade de moléculas de *C. quadrumanus*. A = Perfil cromatográfico por HPLC e fracionamento (os números indicam as frações coletadas). B = Atividade das frações de *C. quadrumanus*, após RP-HPLC na inibição de caspase-1. C = Análise por espectrometria de massa da fração 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 na inibição da caspase-1. F = Análise por espectrometria de massa da fração 2b.

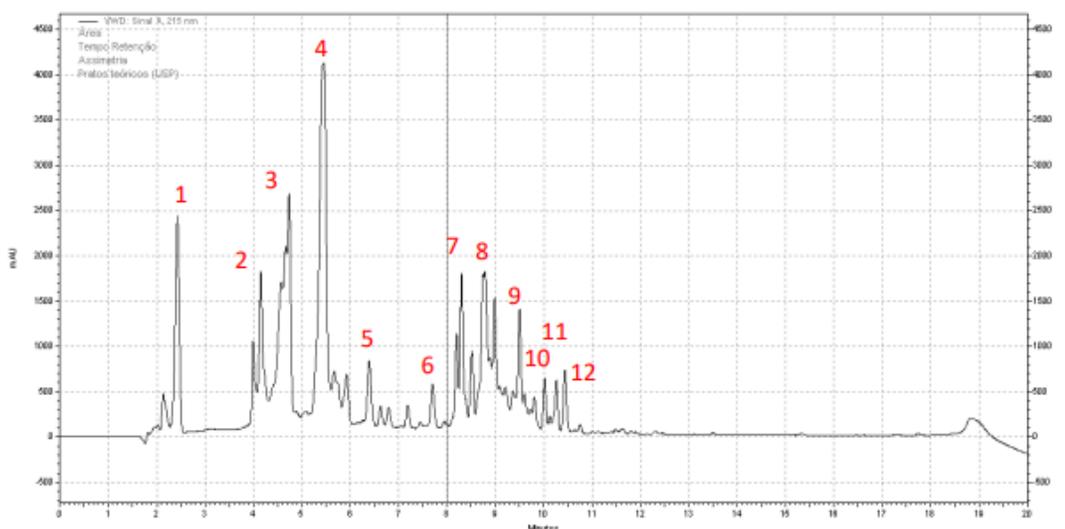
5.2.2. *E. carneum*

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 o esquema de coleta das frações. Como o *C. quadrumanus*, os picos foram bem separados, e 12 frações puderam ser coletadas.

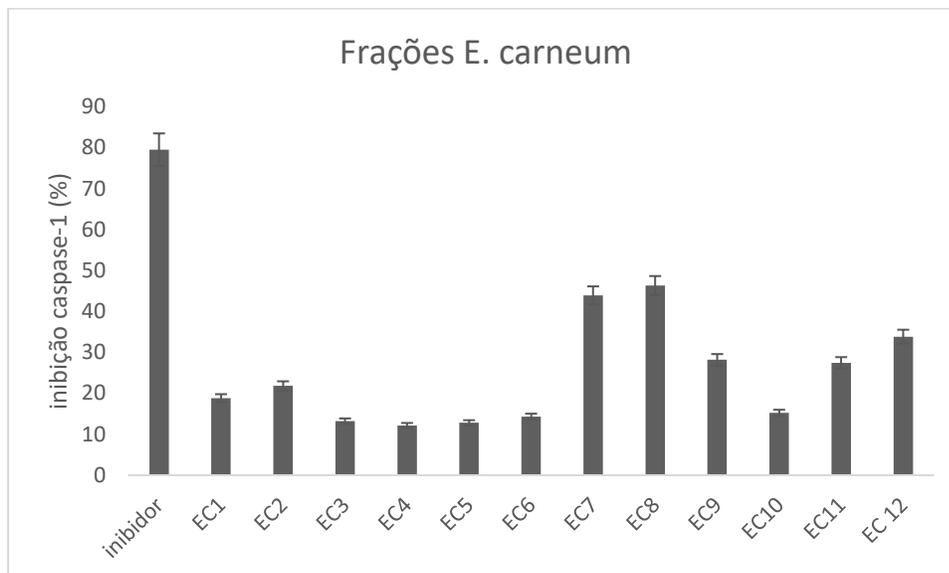
As frações foram testadas na atividade enzimática da caspase-1, e algumas frações foram identificadas como ativas, ou seja, inibiram a enzima, conforme figura 6B. As frações 7 e 8 foram as mais potentes e foram conduzidas para análise por espectrometria de massas.

As duas frações tiveram espectros muito parecidos, sendo o íon mais intenso o 308,9160 m/z, indicando essa como provavelmente a molécula ativa (figura 6C). Por meio de comparação com banco de dados, não foi possível se obter uma identificação. Este íon então foi analisado no software MassLinx para dedução da fórmula molecular. Foi estimada a fórmula C_3HO_{17} , com massa calculada em 308,9214, diferença de 17,5 ppm da massa experimental.

A



B



C

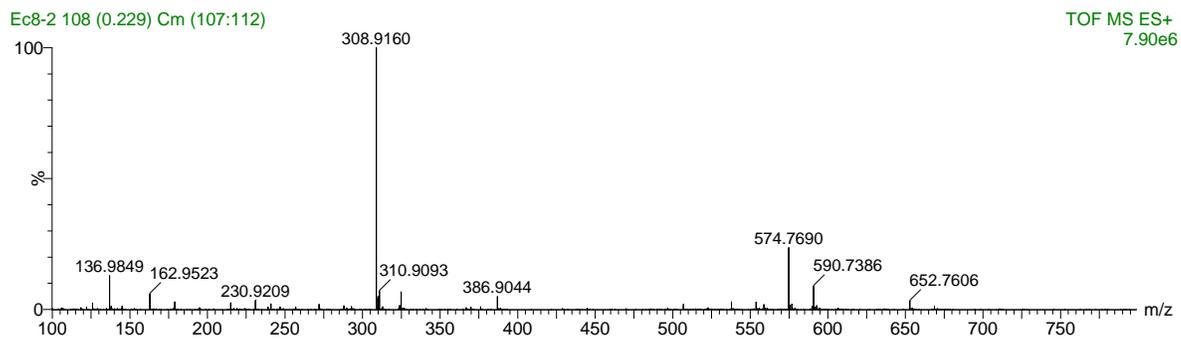


FIGURA 6 – Fracionamento e atividade de moléculas de *E. carneum*. A = Perfil cromatográfico por HPLC e fracionamento (os números indicam as frações coletadas). B = Atividade das frações de *E. carneum*, após RP-HPLC na inibição de caspase-1. C = Análise por espectrometria de massa da fração 8.

5.3. Efeito da inibição da catepsina B com extratos de animais marinhos

Os mesmos extratos foram testados quanto à sua capacidade de inibição da 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.

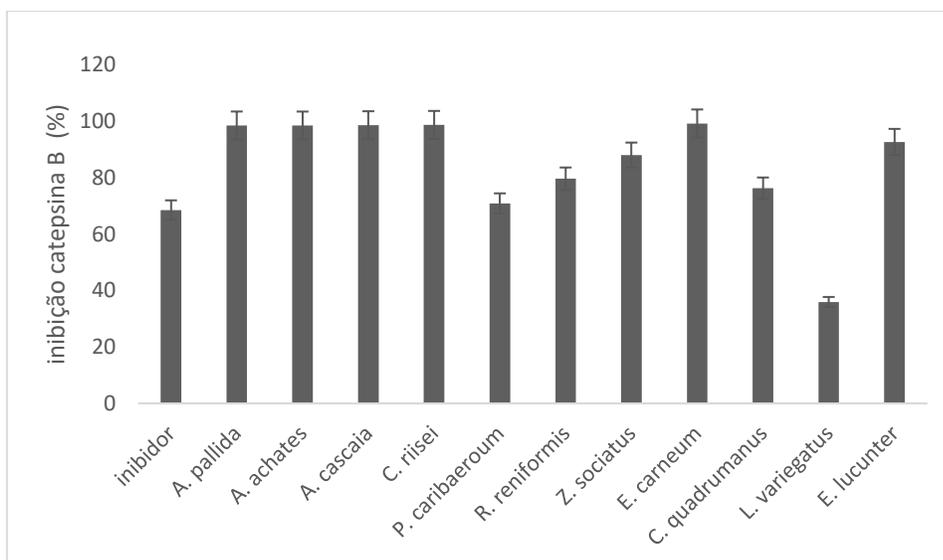


FIGURA 7 -Atividade enzimática de extratos de invertebrados marinhos sobre a inibição da catepsina B.

Considerando essa importante inibição, dois extratos foram escolhidos para posterior avaliação, devido à abundância de material disponível: *Zoanthus sociatus* e *Aptasia pallida*. Estes foram fracionados por HPLC, conforme cromatogramas apresentados a seguir.

5.3.1. *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 e foi observada 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.

Maiores investigações são necessárias para aliar o pico 1, o de maior atividade, para realmente avaliar o seu potencial inibitório.

5.3.2. *A. pallida*

Em relação ao *A. pallida*, foram coletadas 11 frações, conforme mostrado no cromatograma da figura 9A. Uma importante inibição da catepsina B foi observada com a incubação da fração 1 (figura 9B), além de serem identificadas outras frações ativas. A fração 1 foi analisada por espectrometria de massas (Figura 9C), sendo pouco complexa, com íon mais abundante 118,0887 m/z.

Este íon foi submetido a análises para identificação, e foi observada uma correlação com betaína, em alto score (38,43) e similaridade de espectros, além de erro de 2,96 ppm.

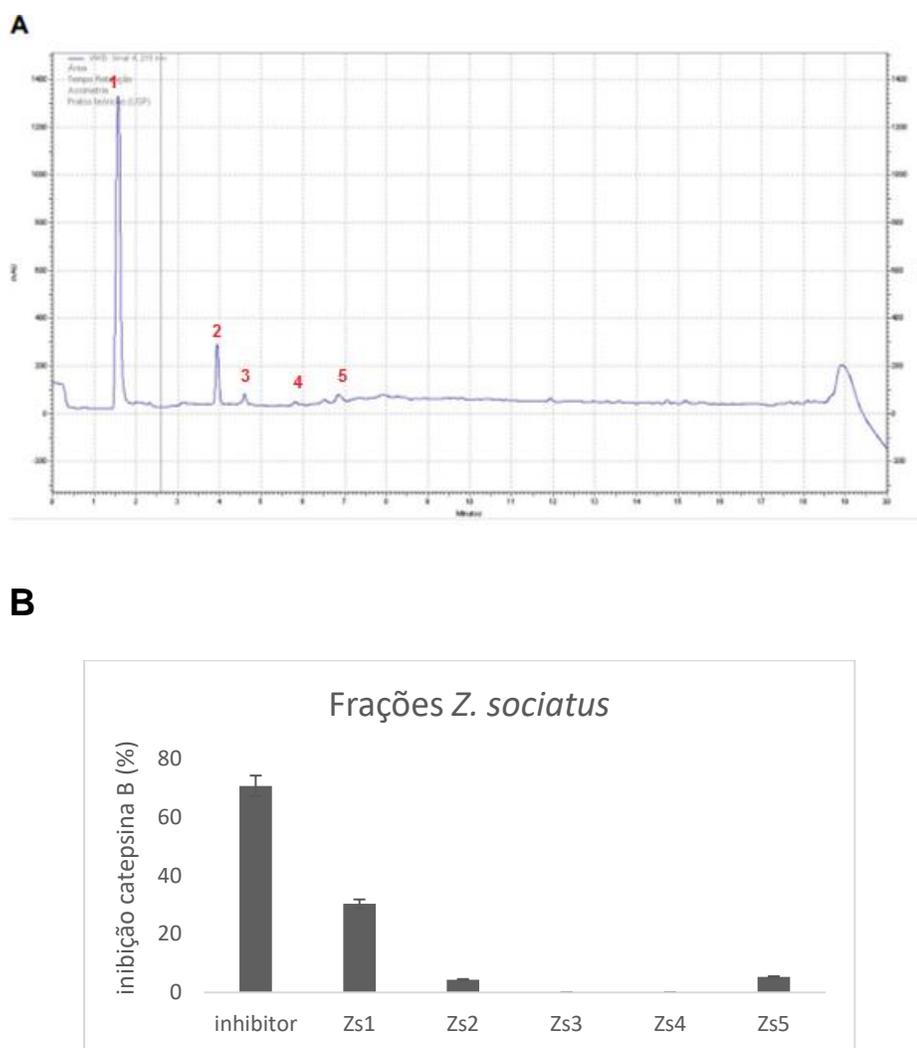
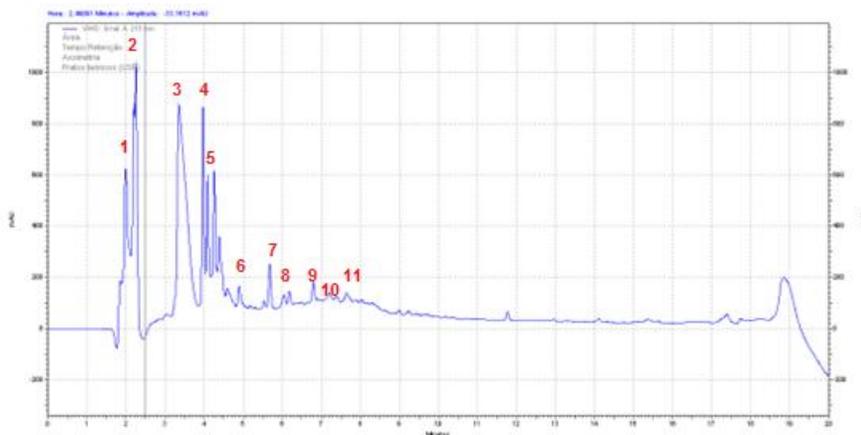
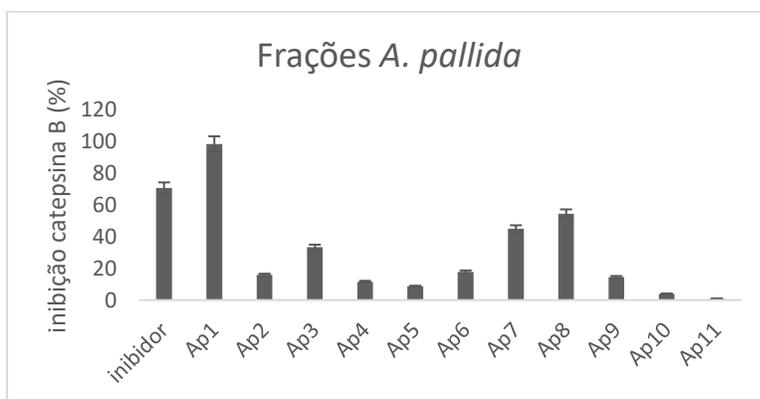


FIGURA 8 – Fracionamento e atividade de moléculas de *Z. sociatus*. A = Perfil cromatográfico por HPLC e fracionamento (os números indicam as frações coletadas). B = Atividade das frações de *Z. sociatus*, após RP-HPLC na inibição de catepsina B.

A



B



C

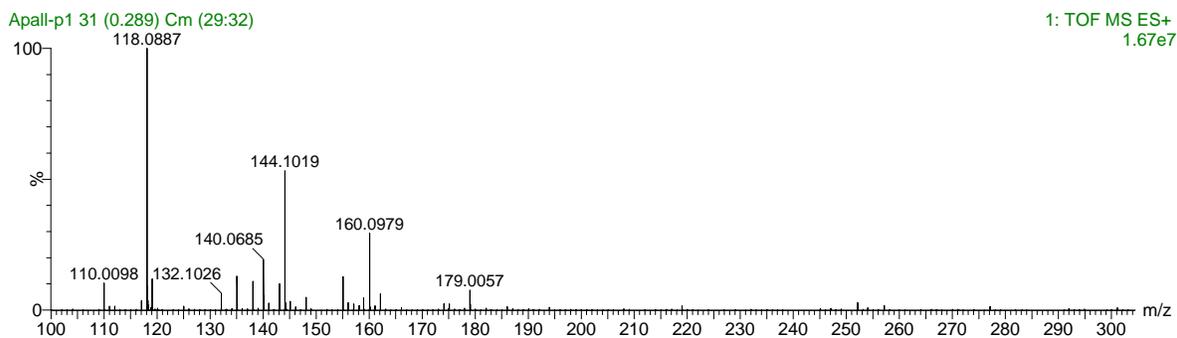


FIGURA 9 – Fracionamento e atividade de moléculas de *A. pallida*. A = Perfil cromatográfico por HPLC e fracionamento (os números indicam as frações coletadas). B = Atividade das frações de *A. pallida*, após RP-HPLC na inibição de catepsina B. C = Análise por espectrometria de massa da fração 1, ativa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

6. DISCUSSÃO

Moléculas provenientes de animais marinhos estão em estudo, em nível pré-clínico e clínico para o tratamento da DA, com a interação com diferentes alvos moleculares. Muitas delas tem enzimas como alvos, principalmente colinesterase.

A anabaseina, um alcaloide isolado de um verme marinho, por meio da sua atuação como agonista parcial de receptores nicotínicos de acetilcolina ($\alpha 7$ -nAChR), melhorou a função cognitiva de animais. O peptídeo A β tem a capacidade de se ligar a este receptor, causando a sua inibição, além de induzir a hiperfosforilação de a proteína Tau. Desta forma, um agonista pode ser efetivo no tratamento da DA (BRIGGS et. al, 1997).

Diterpenoides da classe das gracilinas, derivados da esponja marinha *Spongionella gracilis* demonstrou efeito inibitório da fosfolipase A₂, exercendo uma atividade anti-inflamatória. Além disso, exerce efeito neuroprotetor e antioxidante por ter como alvo proteínas antioxidantes, como superóxido dismutase, glutaciona peroxidase e catalase (NIRMAL; PRABA; VELMURUGAN, 2008).

A neuroinflamação é uma condição presente na Doença de Alzheimer, causada pela liberação de mediadores inflamatórios após uma cascata de sinalização, disparada por peptídeos amiloides. A inflamação associada à DA interfere no metabolismo da APP e mecanismos de agregação do peptídeo amiloide (HENEKA, 2007). Assim, a busca por novos compostos que diminuam a neuroinflamação é essencial para o tratamento da doença. Para isso, dois alvos moleculares foram considerados neste trabalho: caspase-1 e catepsina B.

A ativação da caspase-1 é controlada pelo inflamassomo, formado após a ativação de NLRP3 pelo peptídeo amiloide (HALLE, et. al, 2008). De fato, a caspase-1 já foi observada em alta atividade no cérebro de pacientes com DA, comparado ao grupo controle, sem a doença, resultado consistente com a ativação do inflamassomo (HENEKA, et. al, 2013).

Experimentos utilizando camundongos knockout para caspase-1, APP, PS1 e NLRP3 demonstraram que a inflamação mediada pela via NLRP3 e caspase-1 contribuem com a disfunção cognitiva e comportamental da DA (HENEKA, et. al, 2013). Desta forma, acredita-se que terapias que causem a inibição da formação do inflamassomo podem contribuir com a diminuição da progressão da DA.

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). A partir disso, outros inibidores começaram a ser descobertos e estudados.

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 DA. 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 especial 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).

Em um modelo de esclerose múltipla, o VX-765 reduziu a formação do inflamassomo no sistema nervoso central, prevenindo injúria de axônio, com consequente melhora do comportamento (MCKENZIE et. al, 2018). No momento, essa molécula está sendo testada em estudos clínicos para epilepsia e psoríase, e tem demonstrado efeitos adversos leves. Estudos para Alzheimer ainda não foram iniciados com esse composto.

Esta é a primeira vez, ao nosso conhecimento, que moléculas extraída de animais marinhos mostraram efeitos inibitórios de caspase-1. Este trabalho demonstrou a presença de uma molécula proveniente de uma água-viva (*C. quadrumanus*), 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* (Cq) 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 (ARRUDA et al., 2021). 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 inflamassomo 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).

A molécula de *C. quadrumanus* identificada neste trabalho como inibidora da caspase-1 foi a trigonelina, que é um alcaloide do grupo das piridinas, comumente encontrado em plantas, e tem uma conhecida propriedade de diminuição da glicemia (MATHUR; KAMAL, 2012).

Este composto já foi encontrado em animais marinhos. Na anêmona-do-mar *Anemonia sulcata* (ACKERMANN, 1953), em ouriço-do-mar da espécie *Arabacia pustullosa* e na água-viva *Verella spirans* (O'NEIL, 2013). Em hidroides do gênero *Hydractinia*, ele se mostrou ser importante para a metamorfose (BERKING, 1987). Como uma importante molécula de defesa contra predadores, está presente na esponja *Xestospongia* sp e em nudibrânquio *Jorunna funebris* por recaptação a partir da esponja (WU et al., 2021), e no siri-azul *Callinectus sapidus* (POULIN et al., 2019).

A trigonelina foi capaz de inibir a caspase-3, e proteger células beta pancreática a entrarem em apoptose. Além disso, demonstrou efeito anti-inflamatório, com a redução de IL-6 e IL-1 β . Além disso, teve ação no aumento da atividade de enzimas antioxidantes (LIU et al., 2018).

No sistema nervoso, aumentou a porcentagem de axônios e tamanho de dendritos (TOHDA et al., 2005), assim como vimos no extrato de *C. quadrumanus* em nossos estudos anteriores. Também já foi relatado efeito na inibição da atividade da acetilcolinesterase, alvo de tratamento atual da DA (GRABOWSKA et al., 2010).

Por ser um alcaloide polar, é solúvel em água e álcool, e insolúvel em clorofórmio e éter (MOHAMADI et al., 2017). Nosso extrato foi preparado com metanol e ácido acético, solventes

compatíveis para a solubilização do composto. Além disso, por ser polar, é esperado que o composto tenha pouca interação com a coluna C18, o que justifica a sua eluição logo no início do gradiente.

Inicialmente, foi testada uma condição de gradiente de 0 a 100% de solvente B em um coluna C18, um método genérico para separação de moléculas bioativas, segundo a experiência do grupo nesse tipo de material. Nestas condições foi possível se obter uma separação adequada, e, portanto, o método não foi modificado. No entanto, para a re-purificação da molécula de *C. quadrumanus*, foi utilizada uma outra coluna, a C8, que possui menor hidrofobicidade, uma vez que a fração ativa era pouco hidrofóbica (segundo pico coletado). Desta forma, a trigonelina pôde ser separada e identificada por espectrometria de massas.

Sua massa neutra é 137,0480, também foi observada no espectro obtido, sendo o íon presente de 138,0389 m/z. O íon 155 m/z, portanto, é observado na forma de aduto.

Uma prova de conceito com a molécula sintética ainda se faz necessário para confirmação da atividade por esse composto.

O extrato de *E. carneum* também 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 *Macrorhynchia philipina*, 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).

Recentemente nosso grupo verificou a abundância de compostos no extrato metanólico ácido dessa espécie, alguns deles com atividades biológica relacionadas a reações inflamatórias, compatíveis com o quadro de envenenamento pela espécie, de forma branda (BANAGOURO et al., 2022). Não foram descritas moléculas isoladas desta espécies com atividade inibidora de qualquer enzima.

Pelas técnicas de espectrometria de massas, não foi possível se obter a identificação da molécula, e portanto, deve se tratar de uma nova estrutura, ainda não depositada em banco de dados. Desta forma, experimentos espectroscópicos serão necessários para a dedução da estrutura da molécula.

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

Tem sido estabelecida uma correlação entre a montagem do inflamassomo e a catepsina B. Trabalhos mostram que a catepsina B citosólica, decorrente do rompimento dos lisossomos após a ação de peptídeo amiloide, causa ativação da caspase-1 (HENTZE, 2003). Outros estudos apontam para a liberação da catepsina B para o citoplasma somente após a ativação do inflamassomo NLRP3 (ANGÉLIQUE et. al., 2020). De qualquer forma, foi demonstrado que a interação entre catepsina B e NLRP3 ocorre fora do lisossomo ou mitocôndria, de forma transiente, e não como parte do inflamassomo ou com ligação com ASC ou pró-caspase-1 (HENSTZE, et. al, 2003).

A catepsina B ainda pode induzir o estresse oxidativo, conhecido na DA, e que pode permitir a interação da proteína tioredoxina (TRX) com o NLRP3, e o ativar, o que reforça a interação entre as duas enzimas objeto do estudo na neuroinflamação (ZHOU, 2010).

Estudos mostram que as catepsinas B são ativas nas micróglia 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; TANEIO et al., 2015).

A hipótese de que o vazamento lisossomal de catepsina B patogênica para o citosol resulta em neurodegeneração e déficits comportamentais de DA, é apoiado por amplas evidências de estudos em modelos clínicos e animais com DA (HOOK et al., 2020).

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 = pirolutamato). 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).

Algumas moléculas inibidoras de catepsinas B já foram identificadas a partir de animais marinhos. A shishicrellastatina A e B, dois esteroides isolados da esponja marinha *Crellaspinulata*, demonstraram inibição da enzima com valor de IC50 de 8 µg/mL.

A partir de uma outra esponja, a *Theonellaaff. Mirabilis*, um outro inibidor foi identificado, com IC50 de 29.0 ng/mL.

Neste trabalho identificamos, por espectrometria de massas, a presença de betaína como um possível inibidor da catepsina B. De acordo com o PubChem, a fórmula molecular da betaína é C₅H₁₀NO₂ e massa monoisotópica 117,078978594, 0,0098 Da de diferença para a massa experimental encontrada, 117,0887 Da.

A betaína já foi descrita em animais marinhos do filo Cnidaria (o qual pertence a *A. pallida*): em corais, águas-vivas e anêmonas, inclusive do gênero *Aiptasia*. Alguns trabalhos apontam a presença do composto também em algas simbiotes. Nesses animais, a betaína exerce uma função de regular a pressão osmótica celular (YANCEY et al., 2010).

A betaína já foi descrita como inibidora da atividade de algumas enzimas, como colinesterase (ZHUKOVSKII et al., 1996). Trabalhos também mostram a inibição de catepsinas K pela betaína, atenuando a osteoartrite, uma vez que essa catepsina está envolvida na reabsorção óssea e osteoclastogênese (YAJUN et al., 2021).

Além disso, um trabalho mostrou que a betaína inibiu a agregação do peptídeo amiloide e toxicidade causada por enzimas transglutaminase e lisil oxidase, in vitro, o que demonstra o seu potencial de diminuir a formação de fibrilas mediada por enzimas de matriz extracelular e estresse oxidativo (ISMAIL et al., 2018).

A redução do estresse oxidativo tem sido bastante descrita pelo uso da betaína. Em um modelo animal de Parkinson, a administração de 1,5% w/w de betaína por via oral aumentou a concentração de homocisteína, glutatona e melhorou a atividade de glutatona peroxidase, superóxido dismutase e catalase. Esses efeitos foram atribuídos às propriedades de transferência de grupo metil via enzima betaína homocisteína metil transferases (ALIREZAEI et al., 2015).

A estrutura da betaína se assemelha em partes do E-64, o principal inibidor da catepsina B, o que indica a sua atividade. No entanto, uma prova de conceito é importante para fundamentar essa descoberta.

A crescente compreensão do sistema proteolítico da catepsina B na micróglia pode contribuir para o desenvolvimento de inibidores específicos da catepsina B permeáveis à barreira

hematoencefálica, de compostos oralmente ativos como intervenções terapêuticas contra doenças inflamatórias cerebrais e envelhecimento cerebral, como a DA.

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 na Doença de Alzheimer.

Duas moléculas conhecidas foram identificadas - trigonelina para caspase-1 e betaína para catepsina B. No entanto, outras moléculas não puderam ter a sua estrutura elucidada, por se tratar de compostos inéditos, que serão explorados em um próximo estudo.

Desta forma, novos protótipos foram obtidos como inibidores de enzimas pouco consideradas para a DA, e que podem se tornar importantes alvos terapêuticos, e poderão contribuir para o controle dessa doença sem cura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMANN D. The occurrence of homarine, trigonelline and a new anemonine base in the Anthozoan *Anemonia sulcata*. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.*; v. 295, p. 1-9, 1953.

AlirEZAEI, M., KHOSHDEL, Z., DEZFOULIAN, O. et al. Beneficial antioxidant properties of betaine against oxidative stress mediated by levodopa/benserazide in the brain of rats. *J Physiol Sci*, v. 65, p. 243–252, 2015.

Alzheimer's Drug Discovery Foundation -
 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. *Arch Biochem Biophys.*; v. 670, p 32–42, 2019.

APRAHAMIAN, IVAN; MARTINELLI, JOSÉ EDUARDO; YASSUDA, MÔNICA SANCHES. Doença de Alzheimer: revisão da epidemiologia e diagnóstico. *Ver Bras Clín 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.* v. 2021, p. 8855248, 2021.

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.*; v. 371, Suppl:211–22, 1990.

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.; REINASC, K.M.; DE CAMILLI, P. The leukodystrophyprotein FAM126A (hyccin) regulates PtdIns (4) P synthesis at the plasma membrane. *Nature Cell Biology*, v. 18, n. 1, pp. 132–138, 2016.

MCKENZIE BA, MAMIK MK, SAITO LB, BOGHOZIAN R, MONACO MC, MAJOR EO, LU JQ, BRANTON WG, POWER C. Caspase-1 inhibition prevents glial inflammasome activation and pyroptosis in models of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci*; v. 115(26), p. E6065-E6074, 2018.

BERKING, S. Homarine (N-methylpicolinic acid) and trigonelline (N-methylnicotinic acid) appear to be involved in pattern control in a marine hydroid. *Development.*; v. 99, p. 211-220, 1987.

BRIX, K.; DUNKHORST, A.; MAYER, K.; JORDANS, S. Cysteine cathepsins: cellular road map to different functions. *Biochimie*, v. 90, p. 194-207, 2008.

BUCCIANTINI M, GIANNONI E, CHITI F. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature.*; n. 416, p.507–511, 2002.

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 quadumanus* extracts in sympathetic nervous system. *Toxicon*, v.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.

CUNHA, ADMILSON APARECIDO. *Prospecção de moléculas com atividade antioxidante em ouriços-do-mar*, 2019.

DISABATO DJ, QUAN N, Godbout JP. Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem.*; v. 139, p. 136-153, 2016.

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. Caspase-1 inhibition alleviates cognitive impairment and neuropathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Nat Commun*, v. 9, p. 3916, 2018.

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.

GRABOWSKA I, RADECKA H, BURZA A, RADECKI J, KALISZAN M, KALISZAN R. Association constants of pyridine and piperidine alkaloids to amyloid β peptide determined by electrochemical impedance spectroscopy. *Curr Alzheimer Res.*; v.7(2), p.165–172, 2010.

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.

HARDY, J.; SELKOE, D.J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, v. 297, p. 353–356, 2002.

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.*; v. 283(12), p.7745–53, 2008.

HOOK V, YOON M, MOSIER C, ITO G, PODVIN S, HEAD BP, RISSMAN R, O'DONOGHUE AJ, HOOK G. Cathepsin B in neurodegeneration of Alzheimer's disease, traumatic brain injury, and related brain disorders. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.*; v.1868(8), p.140428, 2020.

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.

ISMAIL T, VANCHA SR, KANAPATHIPILLAI M. L-proline and betaine inhibit extracellular enzymes mediated abeta 1-42 aggregation, oxidative stress, and toxicity. *Pept Sci.* 2018; 110:e24093.

LIMA, D. 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.

LIU L, DU X, ZHANG Z, ZHOU J. Trigonelline inhibits caspase 3 to protect β cells apoptosis in streptozotocin-induced type 1 diabetic mice. *Eur J Pharmacol.* 2018 Oct 5;836:115-121

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.

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

MATHUR M, KAMAL. Studies on trigonelline from *Moringa oleifera* and its in vitro regulation by feeding precursor in cell cultures. *Rev. bras. farmacogn.* 22 (5), 2012.

MOHAMADI, N., SHARIFIFAR, F., POURNAMDARI, M., ANSARI, M. (2017). A Review on Biosynthesis, Analytical Techniques, and Pharmacological Activities of Trigonelline as a Plant Alkaloid. *Journal of Dietary Supplements*, 15(2), 207–222.

MORROW, T.; FELCONE, L.H. Defining the difference: What Makes Biologics Unique. *Biotechnol Healthc.* 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.*;280(2):307–10, 1991.

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.

O'Neil MJ, ed; *The Merck Index*. 15th ed., Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, p. 1796 (2013)

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

POULIN, RX, LAVOIE, S; SIEGEL, K, GAUL, DA; WEISSBURG, MJ; KUBANEK J. Chemical encoding of risk perception and predator detection among estuarine invertebrates. *PNAS*. 115 (4) 662-667, 2018.

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.

SERENIKI ADRIANA, VITAL MARIA. *A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos*, 2008.

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. *Biochem Biophys 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

TOHDA C, KUBOYAMA T, KOMATSU K. Search for natural products related to regeneration of the neuronal network. *Neurosignals.* 2005;14(1–2):34–45.

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.

YAJUN W, JIN C, ZHENGRONG G, CHAO F, YAN H, WEIZONG W, XIAOQUN L, QIRONG Z, HUIWEN C, HAO Z, JIAWEI G, XINCHEN Z, SHIHAO S, SICHENG W, XIAO C AND JIACAN S (2021) Betaine Attenuates Osteoarthritis by Inhibiting Osteoclastogenesis and Angiogenesis in Subchondral Bone. *Front. Pharmacol.* 12:723988.

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.

YANCEY PH, HEPPENSTALL M, LY S, ANDRELL RM, GATES RD, CARTER VL, HAGEDORN M. Betaines and dimethylsulfoniopropionate as major osmolytes in cnidaria with endosymbiotic dinoflagellates. *Physiol Biochem Zool.* 2010 Jan-Feb;83(1):167-73.

ZHANG, 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>

ZHANG 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).

ZHUKOVSKII IUG, KUZNETSOVA LP, SOCHILINA EE, DMITRIEVA EN, GOLOLOBOV IUG, BYKOVSKAIA EIU: [Inhibition of cholinesterases of varying origin by ordinary and betaine vinylphosphates]. *Ukr Biokhim Zh* (1978). 1996 Sep-Oct;68(5):15-20.

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.

WU, Q., LI, SW., DE VOOGD, N.J. et al. Marine alkaloids as the chemical marker for the prey–predator relationship of the sponge *Xestospongia* sp. and the nudibranch *Jorunna funebris*. *Mar Life Sci Technol* 3, 375–381 (2021).