

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

**KARINE CRISTIE QUAGLIO BANAGOURO**

**PEPTÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DE MACRORHYNCHIA  
PHILIPPINA, INIBIDORES DE BETA-SECRETASE 1, PARA O  
TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

Bragança Paulista  
2022

**KARINE CRISTIE QUAGLIO BANAGOURO - RA:001202010038**

**PEPTÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DE MACRORHYNCHIA  
PHILIPPINA, INIBIDORES DE BETA-SECRETASE 1, PARA O  
TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

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: Profa. Dra. Juliana Mozer Sciani

Bragança Paulista  
2022

<p>WT 155 B16p</p>	<p><b>Banagouro, Karine Cristie Quaglio</b>          Peptídeos obtidos a partir de <i>Macrorhynchia Philippina</i>,          inibidores de Beta-Secretase 1, para o tratamento da          Doença de Alzheimer / Karine Cristie Quaglio Banagouro. --          Bragança Paulista, 2022.          50 p.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação  <i>Stricto Sensu</i> em Ciências da Saúde da Universidade São          Francisco.          Orientação de: Juliana Mozer Sciani.</p> <p>1. Doença de Alzheimer. 2. Peptídeos. 3. Inibidores.          4. <i>Macrorhynchia Philippina</i>. 5. Beta-Secretase 1. I. Sciani,          Juliana Mozer. II. Título.</p>
------------------------	--



Educando  
para a paz

**BANAGOURO, Karine Cristie Quaglio.** "Peptídeos obtidos a partir de *macrorhynchia philippina*, inibidores de beta-secretase 1, para o tratamento da doença de alzheimer". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 22 de fevereiro de 2022 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Profa. Dra. Juliana Mozer Sciani - Orientadora e Presidente  
Universidade São Francisco

Prof. Dr. Fernando Augusto de Lima Marson  
Universidade São Francisco

Prof. Dr. Paulo Sérgio Carvalho  
Instituto Federal de São Paulo

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente à Deus pela oportunidade.  
Aos meus pais, por sempre acreditarem em mim.  
À minha tia Adriana, por sua preocupação, carinho  
e vibração por cada conquista. A meu amado  
marido Renan por todo amor, incentivo, apoio,  
compreensão e tardes de estudo. À Renata Boldin  
minha coordenadora pelo incentivo e  
compreensão, à orientadora Professora Juliana,  
por ter me orientado e guiado até esse presente  
momento. Nada disso teria sentido se vocês não  
existissem na minha vida.*

## RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é um transtorno neurodegenerativo crônico e progressivo manifestado por deterioração da memória e perda significativa das funções cognitivas, que acomete principalmente pacientes idosos, tendo como sua principal característica a demência. Devido ao aumento da expectativa de vida, o número de casos em 2015 foi de 46,8 milhões de pessoas, sendo hoje a 7<sup>a</sup> causa de morte no mundo. A expectativa é que em 2050 se tenha 131,5 milhões de casos. A doença é caracterizada pela formação de placas amiloides, emaranhados neurofibrilares e neuritos distróficos, o que causa perda neuronal significativa em regiões específicas do cérebro (e conseqüentemente perda de contato sináptico), além de inflamação crônica e dano oxidativo. Acredita-se que a atividade de secretases sobre a proteína APP gera certos peptídeos  $\beta$ -amiloides (A $\beta$ ) que se agregam e acumulam em regiões do cérebro, causando disfunção mitocondrial, lisossomal, inflamação e apoptose. Até o momento, não há cura para a doença, sendo que os tratamentos clínicos mais comuns são baseados em anticolinesterásicos, agonistas de receptores 5-HT e dopamina, e antagonistas de receptores NMDA, que prolongam o tempo de vida dos pacientes em alguns anos. Inibidores de secretases têm sido estudados como alternativa ao tratamento, por inibir a formação de A $\beta$ , porém têm se mostrado pouco seletivo. Nesse sentido, inibidores baseados em peptídeos podem ser uma alternativa, uma vez que esse tipo de molécula é altamente seletivo e eficaz, pouco explorado pela indústria. Animais secretam uma grande variedade de peptídeos para sua defesa, o que representa uma importante fonte de tais compostos. Este trabalho tem como objetivo identificar e sequenciar novos peptídeos a partir do extrato metanólico de *Macrorhynchia philippina* e testá-los *in sílico* quanto a inibição de beta-secretase 1, visando a obtenção de novas moléculas para o tratamento da Doença de Alzheimer. O animal foi coletado e a secreção obtida por imersão em metanol e ácido acético. Os peptídeos foram separados por RP-HPLC e analisados por espectrometria de massas, seguido por análise para sequenciamento *de novo*. Os peptídeos foram analisados por ancoragem molecular em beta-secretase 1 e avaliados quanto às suas propriedades físico-químicas. Foram obtidos 19 peptídeos inéditos, e deles 10 estiveram localizados no sítio ativo da secretase, com uma distância adequada entre ligante e receptor, caracterizando uma inibição. Após avaliação em relação as propriedades físico-química relevantes, como, hidrofobicidade e estabilidade, parâmetros apropriados para um possível tratamento farmacológico da Doença de Alzheimer, o peptídeo nomeado 19 mostrou-se ideal para um protótipo de possível inibição da progressão da doença, considerando sua atividade inibidora de BACE-1 e características que permitem o sucesso da molécula como medicamento.

**Palavras-chave:** Doença de Alzheimer. *Macrorhynchia philippina*. Peptídeos. Inibidor. Beta-secretase 1.

## ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AD) is a chronic and progressive neurodegenerative disorder manifested by memory deterioration and significant loss of cognitive functions, which mainly affects elderly patients, with dementia as its main characteristic. Due to the increase in life expectancy, the number of cases in 2015 was 46.8 million of people, and today it is the 7th leading cause of death in the world. The expectation is that in 2050 there will be 131.5 million cases. The disease is characterized by the formation of amyloid plaques, neurofibrillary tangles and dystrophic neurites, which cause significant neuronal loss in specific regions of the brain (and consequently loss of synaptic contact), in addition to chronic inflammation and oxidative damage. It is believed that the activity of secretases on the APP protein generates certain  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) peptides that aggregate and accumulate in regions of the brain, causing mitochondrial and lysosomal dysfunction, inflammation and apoptosis. So far, there is no cure for the disease, and the most common clinical treatments are based on anticholinesterases, 5-HT and dopamine receptor agonists, and NMDA receptor antagonists, which prolong the lifespan of patients by a few years. Secretase inhibitors have been studied as an alternative to treatment, as they inhibit the formation of  $A\beta$ , but they have been shown to be poorly selective. In this sense, inhibitors based on peptides can be an alternative, since this type of molecule is highly selective and effective, little explored by the industry. Animals secrete a wide variety of peptides for their defense, which represents an important source of such compounds. This work aims to identify and sequence new peptides from the methanol extract of *Macrorhynchia philippina* and test them in silico for beta-secretase 1 inhibition, aiming to obtain new molecules for the treatment of Alzheimer's Disease. The animal was collected and the secretion obtained by immersion in methanol and acetic acid. Peptides were separated by RP-HPLC and analyzed by mass spectrometry, followed by de-sequencing analysis. Peptides were analyzed by molecular anchoring in beta-secretase 1 and evaluated for their physicochemical properties. Nineteen novel peptides were obtained, and 10 of them were located in the active site of secretase, with an adequate distance between ligand and receptor, characterizing an inhibition. After evaluating the relevant physicochemical properties, such as hydrophobicity and stability, relevant parameters for a possible pharmacological treatment of Alzheimer's Disease, peptide termed 19 proved to be ideal for a prototype of possible inhibition of disease progression, considering its inhibitory activity of BACE-1 and characteristics that allow the success of the molecule as a medicine.

**Keywords:** Alzheimer's disease. *Macrorhynchia philippina*. Peptides. Inhibitor. Beta-secretase 1.

## Lista de Símbolos e Abreviações

A $\beta$ : peptídeo beta amiloide

ALC (Average Local Confidence): média da confiança local

APP (Amyloid precursor protein): Proteína precursora do peptídeo  $\beta$ -amiloide

BACE 1 ( $\beta$ -site APP cleaving enzyme 1):  $\beta$ -secretase 1

BACE 2 ( $\beta$ -site APP cleaving enzyme 2):  $\beta$ -secretase 2

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool): Ferramenta para busca de alinhamento local básico

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

DA: Doença de Alzheimer

DDA (data dependent analysis): aquisição dependente de dados

DMSO (Dimethyl Sulfoxide Solution): Solução de dimetilsulfóxido

FA (Formic Acid): Ácido Fórmico

FDA: food and drug administration

FWHM (Full Width at Half Maximum): metade de sua altura máxima

GRAVY (Grand average of hydropathicity index): Grande media do índice de hidropaticidade

ICMBio: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

*M. philippina*: *Macrorhynchia philippina*

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

$\mu$ L: microlitro

mL: mililitros

m/z: massa sobre carga

kDa: kilo Dalton

NF-kB (nuclear factor-kappa B): fator nuclear kB

NMDA (N-methyl-D-aspartate): N-metil-D-aspartato

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

PBS (phosphate-buffered saline): tampão fosfato-salina

PDB (Protein DataBank): Banco de dados de proteínas

RMSD (Root Mean Square deviation): valor médio para o desvio médio dos átomos de uma estrutura X, relativamente a uma segunda estrutura Y

RNS (Reactive Nitrogen Species): espécies reativas ao nitrogênio

ROS (Reactive Oxygen Species): espécies reativas ao oxigênio

RPMI: Roswell Park Memorial Institute – meio de cultura

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

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> – Geração de agregados de A $\beta$ pelo processamento da APP por secretases.....	15
<b>FIGURA 2</b> – Esquema representativo da formação de agregados de A $\beta$ .....	16
<b>FIGURA 3</b> – Sequência da APP (P05067) com representação dos peptídeos gerados após clivagem proteolítica por secretases.....	17
<b>FIGURA 4</b> – Estrutura da BACE-1.....	19
<b>FIGURA 5</b> – Ilustração da lacuna preenchida por peptídeo, entre medicamentos compostos por pequenas moléculas (abaixo de 500 Da) e medicamentos biológicos (acima de 5000 Da). .....	20
<b>FIGURA 6</b> – <i>Macrorhynchia philippina</i> .....	29
<b>FIGURA 7</b> - Perfil bioquímico da secreção metanólica de <i>Macrorhynchia philippina</i> .....	30
<b>FIGURA 8</b> – Porcentagem de células SH-SY5Y viáveis, determinado pelo método do MTT, após a incubação com o extrato de <i>Macrorhynchia philippina</i> , testado em 3 concentrações.....	31
<b>FIGURA 9</b> – Proteína BACE-1 selecionada a partir do PDB para análise de ancoragem molecular.....	33
<b>FIGURA 10</b> – Ancoragem molecular entre Peptídeo 1 (magenta) e BACE-1 (azul) (PDB 2VKM) .....	34
<b>FIGURA 11</b> – Ancoragem molecular entre Peptídeo 3 (magenta) e BACE-1 (azul) (PDB 2VKM) .....	35
<b>FIGURA 12</b> – Ancoragem molecular entre Peptídeo 5 (magenta) e BACE-1 (azul) (PDB 2VKM) .....	35
<b>FIGURA 13</b> – Ancoragem molecular entre Peptídeo 6 (magenta) e BACE-1 (azul) (PDB 2VKM) .....	36
<b>FIGURA 14</b> – Ancoragem molecular entre Peptídeo 8 (magenta) e BACE-1 (azul) (PDB 2VKM) .....	36

<b>FIGURA 15</b> – Ancoragem molecular entre Peptídeo 10 (magenta) e BACE-1 (azul) (PDB 2VKM).....	37
<b>FIGURA 16</b> – Ancoragem molecular entre Peptídeo 12 (magenta) e BACE-1 (azul) (PDB 2VKM) .....	37
<b>FIGURA 17</b> – Ancoragem molecular entre Peptídeo 16 (magenta) e BACE-1 (azul) (PDB 2VKM) .....	38
<b>FIGURA 18</b> – Ancoragem molecular entre Peptídeo 17 (magenta) e BACE-1 (azul) (PDB 2VKM) .....	38
<b>FIGURA 19</b> – Ancoragem molecular entre Peptídeo 19 (magenta) e BACE-1 (azul) (PDB 2VKM) .....	39

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – Peptídeos sequenciados a partir do extrato de <i>Macrorhynchia philippina</i> .....	32
<b>TABELA 2</b> – Parâmetros físico-químicos de peptídeos inibidores da BACE-1, de <i>M. philippina</i> .....	40

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	13
1.1. Placas amiloides.....	13
1.2. Beta-secretases.....	18
1.3. Peptídeos como medicamentos.....	19
1.4. <i>Macrorhynchia philippina</i> .....	21
2. Justificativa.....	22
3. Objetivos.....	24
4. Materiais e Métodos.....	25
4.1. Obtenção do extrato de <i>M. philippina</i> .....	25
4.2. Viabilidade celular.....	25
4.3. Sequenciamento de peptídeos.....	26
4.4. Análise de similaridade.....	27
4.5. Ancoragem molecular.....	28
4.6. Análise físico-química.....	28
5. Resultados.....	29
5.1. Coleta do animal, obtenção e análise do extrato de <i>M. philippina</i> .....	29
5.2. Viabilidade celular após incubação com o extrato.....	30
5.3. Peptídeos.....	31
5.4. Atividade inibidora de BACE-1.....	33
6. Discussão.....	41
7. Conclusão.....	45
Referências Bibliográficas.....	46

## 1. INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) foi descrita pela primeira vez em 1906 por um psiquiatra e neuropatologista alemão, Alois Alzheimer. Na época, ele relatou o caso de uma paciente com a qual fez o acompanhamento médico por 5 anos até seu falecimento em 1906, aos 55 anos (1,2). Durante muito tempo a DA foi considerada um tipo raro de demência que atingia o período pré-senil (tendo surgimento dos sintomas antes dos 65 anos), e que pacientes que apresentassem esses sintomas após a referida idade sofriam de demência comum. No entanto, esse conceito foi modificado com o passar dos anos, até o ponto em que se caracterizou a Doença de Alzheimer (1; 3).

A DA é um transtorno neurodegenerativo crônico e progressivo manifestado por deterioração da memória e perda significativa das funções cognitivas, que acomete principalmente pacientes idosos, tendo como sua principal característica a demência (4).

Devido ao aumento da expectativa de vida, o número de casos tem aumentado ao longo dos anos: em 2015 foi relatado 46,8 milhões de pessoas, sendo hoje a 7ª causa de morte no mundo. A expectativa é que em 2050 se tenha 131,5 milhões de casos (5).

Um cérebro adulto tem cerca de 100 bilhões de neurônios, com ramificações que se conectam em mais de 100 trilhões de pontos. Sinais são transmitidos pelos neurônios por meio de uma célula nervosa individual, como uma carga elétrica. Duas células entram em contato por meio da sinapse após a liberação de substâncias químicas, denominadas neurotransmissores, que por sua vez transportam sinais para outras células. Nosso corpo funciona por meio desse 'padrão', é dessa forma que ele codifica nosso pensamento, lembranças, habilidades etc. (6).

A DA atrapalha o modo como as cargas elétricas e químicas são transmitidas entre as células, uma vez que a doença causa morte nos neurônios e perda de tecido em todo o cérebro, iniciando-se pelo hipocampo. Com o passar dos anos, o cérebro é encolhido, afetando assim, todas as funções (6).

### 1.1. Placas amiloides

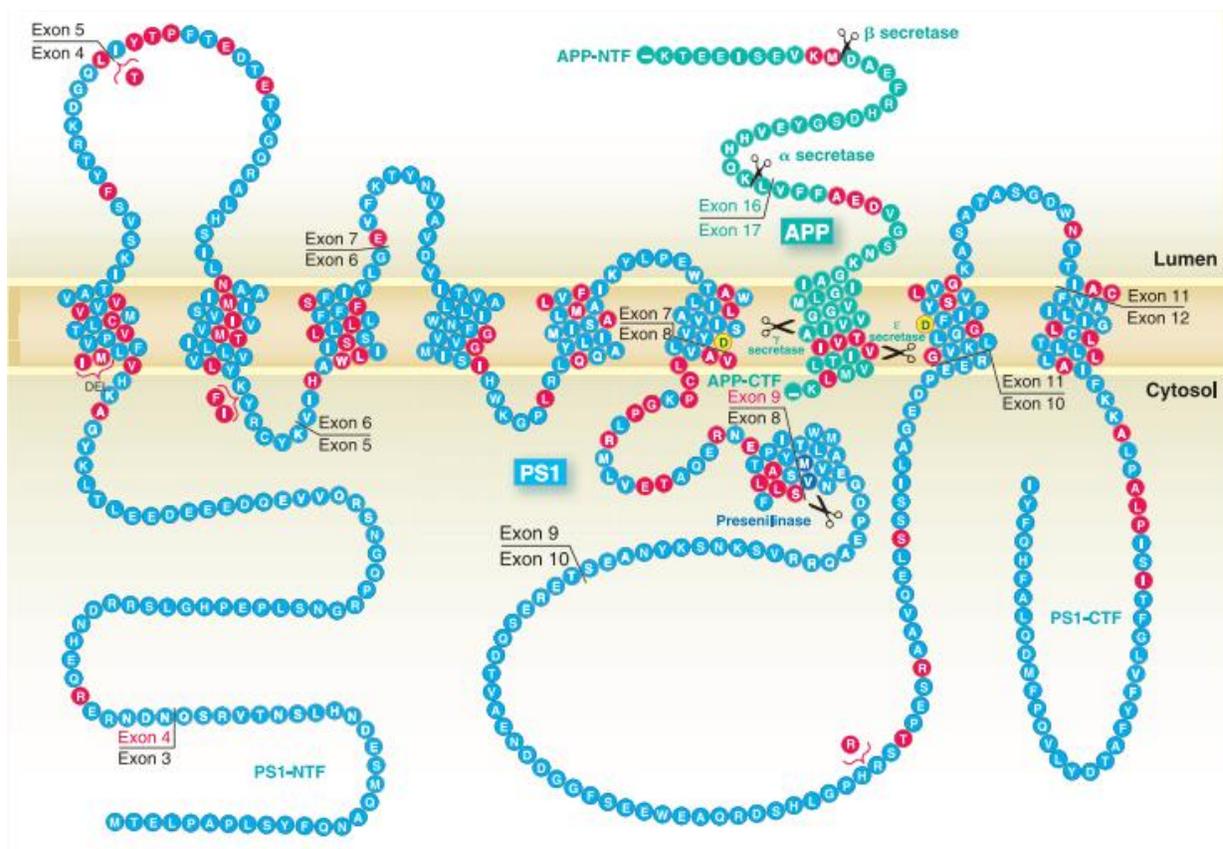
A teoria mais aceita é que a DA tem início após a formação de placas amiloides, emaranhados neurofibrilares e neuritos distróficos, o que causa perda neuronal significativa em regiões específicas do cérebro (e conseqüentemente perda de contato sináptico), além de inflamação crônica e dano oxidativo (7).

As placas amiloides se formam após o processamento da proteína precursora amiloide (APP). Em condições fisiológicas (sem a doença), a APP é processada próxima à membrana celular na porção C-terminal da proteína por enzimas  $\alpha$ -secretases. Os fragmentos N-terminal gerados por  $\beta$  e  $\gamma$ -secretases são neuroprotetores e neurotróficos (8) (Figura 1).

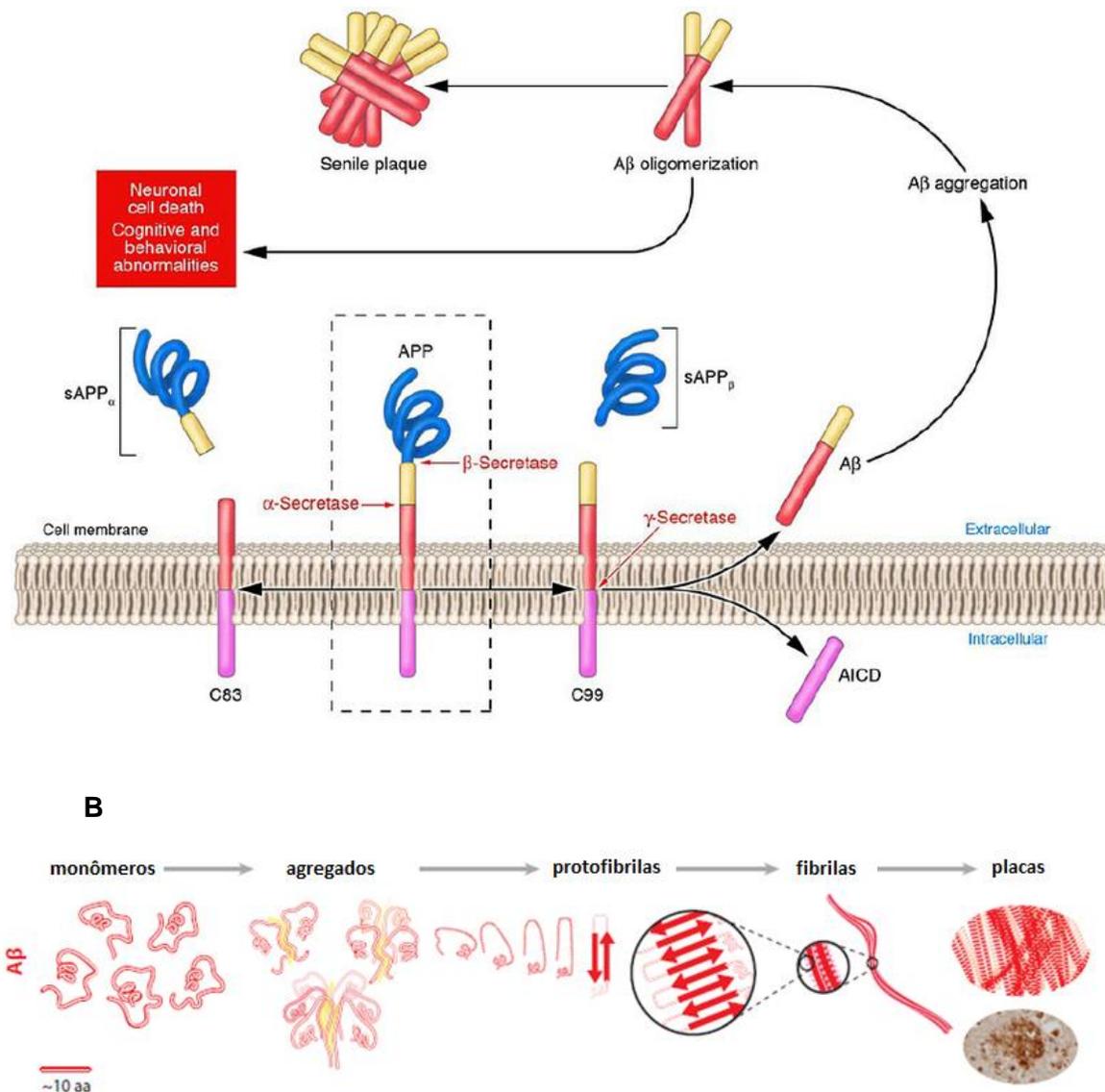
No entanto, mutações em um gene nos cromossomos 1, 14 e/ou 21 causam modificações na APP,  $\gamma$ -secretase-1 e 2, respectivamente. Essas mutações levam à formação de peptídeos amiloides  $A\beta$ , que se oligomerizam devido à sua natureza hidrofóbica na presença de um ambiente aquoso, que é o cerebral. Esses peptídeos insolúveis agregados, conhecidos como placas amiloides, se acumulam em regiões extracelulares específicas do cérebro e são recaptados pelos neurônios por endocitose, causando citotoxicidade (7; 9) (Figura 2).

Esses pequenos agrupamentos podem bloquear a sinalização entre as células nas sinapses. Eles também podem ativar as células do sistema imunológico que causam inflamações (6).

O peptídeo  $A\beta$  tem ~4 kDa e é gerado após o processamento sequencial da APP por  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretases. Primeiramente há a clivagem pela  $\beta$ -secretase, que gera um fragmento de 99 aminoácidos (C99) e o sAPP $\beta$ . A partir do C99 ocorre uma nova clivagem pela  $\gamma$ -secretase para liberação do fragmento  $A\beta$  (Figura 1 e 2A). Essa última clivagem é inespecífica, o que pode resultar na obtenção de diferentes fragmentos C-terminal: a que termina na posição do aminoácido 40 ( $A\beta$ 40) e no aminoácido 42 ( $A\beta$ 42) (Figura 3). O  $A\beta$ 40 é o mais abundante (80 a 90%), porém o  $A\beta$ 42 tem se demonstrado mais tóxico por ser mais hidrofóbico e fibrilogênico, sendo depositado mais facilmente no cérebro (Figura 2B) (10).



**FIGURA 1 – Geração de agregados de A $\beta$  pelo processamento da APP por secretases.** Os círculos azuis representam a sequência da PS1 e verdes a porção C-terminal da proteína APP. Mutações estão representadas pelos círculos vermelhos. O local de clivagem da proteína está marcado com as tesouras, com o nome da enzima responsável ao lado. Fonte: Hardy & Selkoe (7).



**FIGURA 2 – Esquema representativo da formação de agregados de Aβ.** (A) Clivagem proteolítica por secretases. (B) geração de agregados e formação de placas amiloides. Fonte: figura adaptada de Graham et al. (11).

Outros mecanismos também contribuem para o desenvolvimento da doença. Um deles é a hiperfosforilação da proteína tau, causada por mutações no cromossomo 17, levando à agregação da proteína dentro do neurônio, que causa morte celular. Estudos mostram que a formação de Aβ causa aumento da hiperfosforilação da tau *in vivo* (12).

A proteína tau é responsável por estabilizar os microtúbulos, sistema de transporte celular responsável pela movimentação de cílios e flagelos, transporte intracelular de partículas, deslocamento dos cromossomos na mitose e estabelecimento e manutenção da forma das células. Os peptídeos A $\beta$  destroem esse sistema de transporte por converterem a tau em filamentos torcidos, que se rompem e se desintegram. Nutrientes e outros suprimentos essenciais não conseguem mais se movimentar através das células, que acabam morrendo (6).

```

>sp|P05067|18-770
LEVPTDGNAGLLAEPQIAMFCGRLNMHMNVQNGKWSDPSGKTCIDTK
EGILQYCQEVPELQITNVEANQPVTIQNWCKRGRKQCKTHPHFVIPYRCLVGE
FVSDALLVPDKCKFLHQERMDVCETHLHWHTVAKETCSEKSTNLHDYGMLPCG
IDKFRGVFVCCPLAEESDNVDSADAEEDSDVWWGGADTDYADGSEDKWVEV
AEEEEVAEVEEEEADDEDEDGDEVVEEEAEEPYEEATERTTSIATTTTTTTSV
EEVREVCSEQAETGPCRAMISRWFYFDVTEGKCAPFFYGGCGGNRNNFDTEEY
CMAVCGSAMSQSLLKTTQEPLARDPVKLPTTAASTPDAVDKYLETPGDENEHAH
FQKAKERLEAKHRERMSQVMREWEEAERQAKNLPKADKKAVIQHFQEKVESLE
QEAANERQQLVETHMARVEAMLNDRRRLALENYITALQAVPPRPRHVFNMLKKY
VRAEQKDRQHTLKHFEHVRMVDPKKAAQIRSQVMTHLRVIYERMNQSLSLYNV
PAVAEEIQDEVDELLQKEQNYSDDLANMISEPRISYGNDALMPSLTETKTTVELL
PVNGEFSLLDLQPWHSFGADSVANTENEVEPVDARPAADRGLTTRPGSGLTNI
KTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIVMI
TLVMLKKKQYTSIHGVEVDAAVTPEERHLSKMQQNGYENPTYKFFEQMQN

```

**FIGURA 3 – Sequência da APP (P05067) com representação dos peptídeos gerados após clivagem proteolítica por secretases.** Linha vermelha = A $\beta$ 40 (sp|P05067|672-711), linha azul = A $\beta$ 42 (sp|P05067|672-713), linha verde = C99 (sp|P05067|672-770). Fonte: autor.

Proteínas desformes e agregados são frequentemente removidos por um complexo catalítico denominado sistema ubiquitina-proteassomo. Na DA, devido ao tamanho dos produtos agregados, a eliminação pelo sistema de ubiquitina-proteassomo é inviável, uma vez que os produtos não são capazes de atingir o sítio catalítico desse complexo (13). Uma alternativa é o sistema autofagia-lisossomal, em que proteínas indesejáveis são dirigidas aos lisossomos, onde

são clivadas por enzimas proteolíticas (catepsinas) e eliminadas (14). A função e atividade de catepsinas é controversa na DA, especialmente quanto ao seu papel na eliminação ou mesmo na contribuição para a formação de A $\beta$  (14, 15). No entanto, catepsinas B e D foram encontradas em placas senis de cérebros afetados com DA, sendo colocalizadas com APP e proteína tau. Portanto, acredita-se que as enzimas participam do processamento das proteínas, contribuindo para a doença (16,17).

Além da citotoxicidade, os depósitos de A $\beta$  induzem a ativação de micróglia, células essenciais para a manutenção e homeostase do cérebro, uma vez que resultam na ativação de NF- $\kappa$ B e produção de citocinas pró-inflamatórias, para a remoção de PAMPs e DAMPs ao ativarem receptores TLR. No entanto, os peptídeos amiloides causam uma condição de neuroinflamação e conseqüentemente apoptose (18).

A inflamação crônica está relacionada com disfunção mitocondrial, com alterações das enzimas da cadeia respiratória, o que leva ao comprometimento do potencial de membrana e conseqüente estresse ou dano oxidativo. Todos esses processos já foram intimamente associados ao desenvolvimento da DA (19,20). Níveis elevados de ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS) foram observados no cérebro, no líquido cefalorraquidiano, no sangue e na urina de pacientes com DA, intimamente relacionados aos A $\beta$  (21).

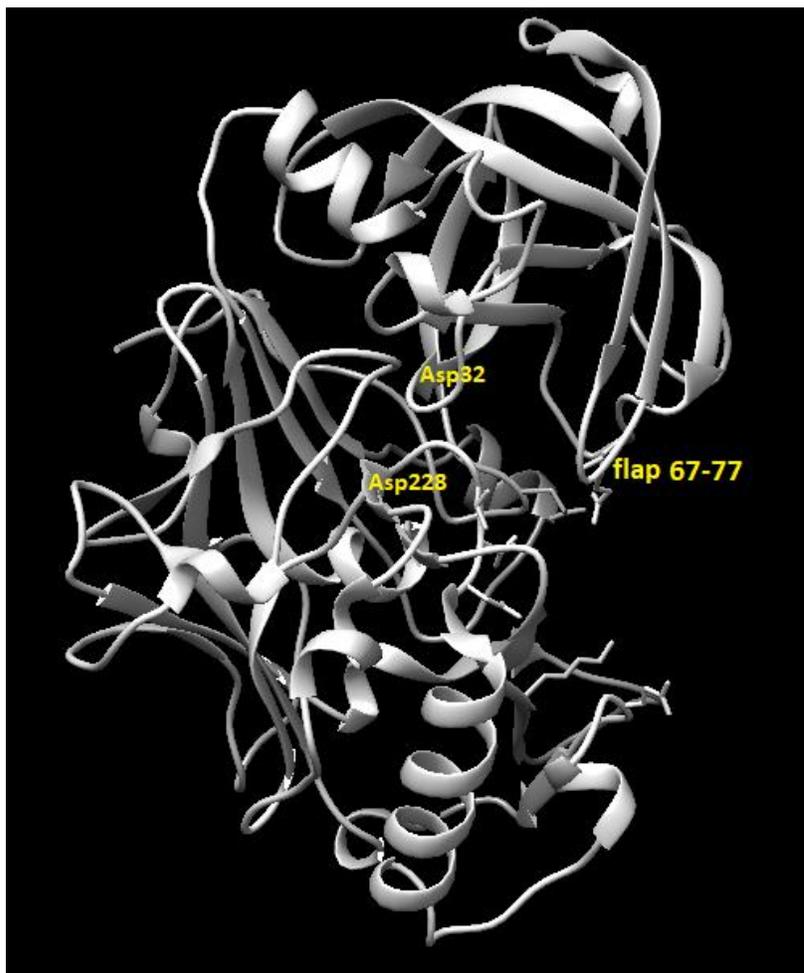
Sendo assim, a doença é considerada multifatorial, com o comprometimento de sistemas de degradação proteolítica, neuroinflamação, estresse oxidativo e apoptose.

## 1.2. Beta secretases

A  $\beta$ -secretase, conhecida como BACE 1 ( $\beta$ -site APP cleaving enzyme 1) é uma enzima peptidase do tipo aspártico peptidase transmembrana tipo 1, pertencente à família das pepsinas, e contém dois *motifs* de ácidos aspárticos no domínio catalítico, que formam o sítio ativo da enzima (Asp-Thr/Ser-Gly-Ser/Thr) (22).

A BACE-2 é uma enzima com 64% de similaridade, mas que não parece estar relacionada com a formação de A $\beta$  tóxica no cérebro, não sendo, portanto, considerada como alvo terapêutico para a DA (23).

A estrutura da BACE-1 está mostrada na figura 4, em que os aminoácidos importantes para a atividade catalítica estão mostrados: Asp32, Asp228 e a região de alça dos aminoácidos 67 a 77.



**FIGURA 4 – Estrutura da BACE-1.** Em amarelo estão mostrados os aminoácidos importantes para a atividade catalítica da enzima. Fonte: Protein Data Bank

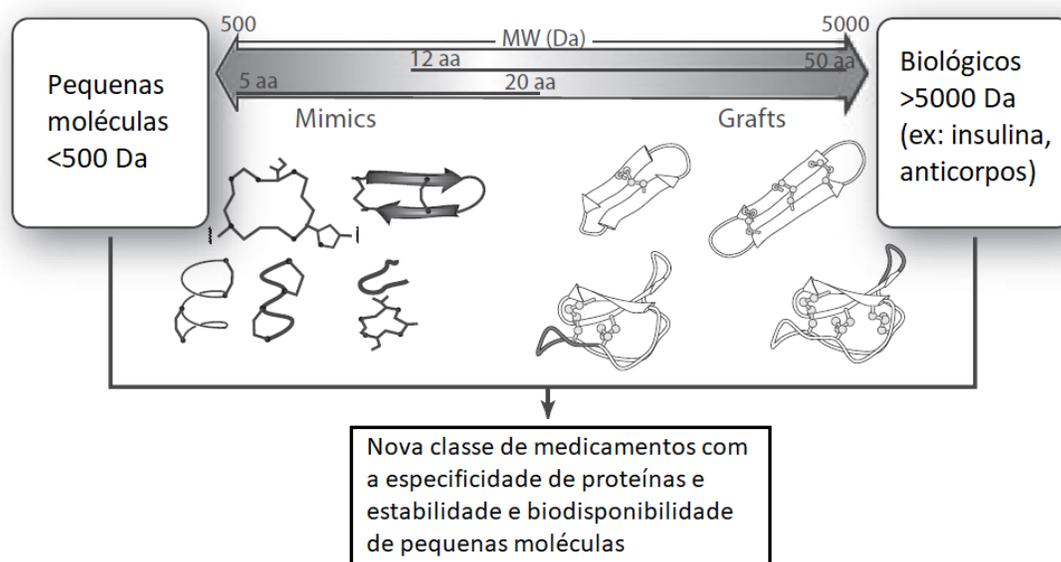
### 1.3. Peptídeos como medicamentos

Peptídeos são biomoléculas que contém de dois a dezenas de resíduos de aminoácidos unidos entre si através de ligações peptídicas. Comparados às proteínas, são quimicamente mais versáteis, pois podem conter amidas ou ésteres em suas carboxilas terminais, acetilados em seus grupos amino terminais, fosforilados ou sulfatados em um ou mais resíduos (serina, treonina ou tirosina), lineares, semicíclicos (geralmente via uma ou mais ligações dissulfeto intra- ou intercadeias peptídicas) ou cíclicos (via ligação entre os grupos amino e carboxila dos aminoácidos terminais) (24).

Em termos de tamanho, ficam posicionados entre moléculas de baixa massa (menores que 500 Da) e proteínas (maiores que 5000 Da), que representam os medicamentos comercializados

atualmente. Os peptídeos, portanto, preenchem essa lacuna de moléculas de interesse farmacêutico, com as vantagens que as duas classes apresentam: a especificidade que a proteína tem em seu alvo molecular, e ao mesmo tempo é estável e tem boa disponibilidade, assim como as moléculas de baixa massa (Figura 5) (25).

Por essas razões, mais de 100 medicamentos baseados em peptídeos já foram desenvolvidos e comercializados. Os mais conhecidos são oxitocina (8 aa, parto), calcitonina (32 aa, hipercalcemia, osteoporose), teriparatide (34 aa, análogo de hormônio da paratireoide, osteoporose), Fuzeon (36 aa, antiretroviral), hormônio liberador de corticotrofina (41 aa), hormônio liberador de hormônio do crescimento (44 aa, Lipodistrofia) (26).



**FIGURA 5 – Ilustração da lacuna preenchida por peptídeo, entre medicamentos compostos por pequenas moléculas (abaixo de 500 Da) e medicamentos biológicos (acima de 5000 Da).** Fonte: Figura adaptada de CRAIK et al. (25).

Venenos animais são fontes ricas em biomoléculas, incluindo peptídeos, que já ofereceram seus esqueletos carbônicos como protótipo de medicamentos conhecidos hoje na clínica (25).

O captopril é um deles, com a descoberta e parte do desenvolvimento feito no Brasil, a partir da peçonha da serpente *Bothrops jararaca*. O princípio ativo é um derivado de 3 aminoácidos, utilizado no tratamento da hipertensão, por ser inibidor da enzima conversora de angiotensina (27).

Outro exemplo é o Prialt® (Ziconotídeo,  $\omega$  – conotoxina MVIIA), um peptídeo analgésico que possui 25 aminoácidos em sua composição, isolado do molusco *Conus Magnus*, o ziconotídeo é sintetizado a partir de aminoácidos naturais. Ele é estudado desde a década de 80, porém seu uso foi aprovado apenas em 2004, para pacientes com dor severa com administração intratecal, já que esse fármaco é 50 vezes mais forte que morfina e não causa dependência (28).

#### **1.4. *Macrorhynchia philippina***

A espécie *Macrorhynchia philippina* é um animal pertencente à classe Hydrozoa, e está distribuída nas águas do Oceano Atlântico, área Indo-Pacífico (Mediterrâneo e Vermelho Mar) e Moçambique. É comumente encontrada em costões rochosos ao longo da costa brasileira (29).

Suas colônias se parecem com plantas, causando confusão nos banhistas que acidentalmente tocam no animal e sofrem acidentes após a liberação de toxinas. Em geral, os acidentes causados por *M. philippina* são caracterizados por queimaduras agudas e locais, dor variando de leve a grave intensidade, e pode ser acompanhada por edema, eritema e prurido, mas sem efeitos sistêmicos (30). Assim, embora não seja letal, suas toxinas tornam esta espécie prejudicial a mergulhadores e banhistas (31).

A classe Hydrozoa, assim como todos os Cnidários, compreende animais que possuem toxinas de origem proteica e peptídica, utilizadas para captura e digestão de presas e defesa contra predadores, que eventualmente atinge humanos (32).

As toxinas de cnidários mais conhecidas são as peptidases, fosfolipases, citolisinas, neurotoxinas e toxinas que atuam em canais iônicos (33). Com relação à atividade enzimática, metalopeptidases, serinopeptidases e fosfolipases A<sub>2</sub> foram identificadas, sendo a atividade de fosfolipase comparável ao de serpentes (34).

Peptídeos desempenham um papel importante no desenvolvimento dos cnidários, com função hormonal e de neurotransmissão, regulando a reprodução, metamorfose, contração muscular, atividade sensorial, entre outras atividades biológicas fundamentais (35).

Toxinas de *M. philippina* são pouco estudadas do ponto de vista bioquímico, e a composição do veneno deste animal desconhecida. Considerando que a espécie causa diversos sintomas de envenenamento, é fato que ocorre a produção e liberação de toxinas. Sendo assim, o veneno deste animal representa uma biblioteca de moléculas desconhecidas para serem exploradas.

## 2. Justificativa

A Doença de Alzheimer (DA), dentre as diversas formas de demência, é a mais frequente, correspondendo a até 70% do total da prevalência das demências. É uma doença caracterizada por perda de memória e déficit cognitivo. É comum em idosos: aproximadamente 1% nos indivíduos com idade entre 60-65 anos e 30 – 35% na população acima dos 80 anos. Devido ao aumento da expectativa de vida, o número de casos tem aumentado consideravelmente, sendo previsto que em 2050 se tenha 131,5 milhões de acometidos pela doença (5)

Somente quatro medicamentos estão atualmente aprovados e são utilizados no tratamento da DA. Três deles (donepezil, galantamina e rivastigmina) atuam no sistema nervoso central em vias colinérgicas, como anticolinesterásicos, sendo que a galantamina também atua como um modulador alostérico de receptores nicotínicos de acetilcolina. A memantina, um outro medicamento utilizado, atua em receptores de N-methyl-D-aspartate (NMDA) e vias glutamatérgicas, uma vez que a diminuição de recaptação de glutamato por micróglia com consequente aumento de glutamato em sinapses excitatórias estão associadas com citotoxicidade, e podem contribuir para o desenvolvimento da DA. (36).

No entanto, é importante ressaltar que esse tratamento somente aumenta a sobrevivência do paciente em alguns anos, não representando uma cura para a doença (37).

Recentemente foi aprovado pelo FDA um anticorpo monoclonal, o donanemab, que tem como alvo um epítipo do peptídeo amiloide e é capaz de impedir a formação de placas amiloides em pacientes em estágios iniciais da doença, diminuindo o déficit cognitivo. No entanto, apesar de aprovado, o medicamento ainda está sob investigação para comprovação da eficácia e segurança (38).

Atualmente, tem-se buscado reduzir a formação de A $\beta$  modificando a atividade das enzimas  $\beta$  e  $\gamma$ -secretases (39), especialmente a BACE 1, por ser a primeira enzima a clivar a APP e gerar os peptídeos A $\beta$  (40).

No entanto, a administração de inibidores de  $\gamma$ -secretases tende a produzir efeitos adversos (41). De 4 medicamentos que entraram em fase clínica, 3 foram descontinuados por causar severa toxicidade hepática, incapacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, efeitos adversos graves ou falta de eficácia clínica. Hoje, 1 medicamento está em fase clínica III e 5 medicamentos estão em fase clínica II (42).

Apesar de muitos estudos terem sido descontinuados, a inibição de  $\beta$  e  $\gamma$ -secretases tem resultado na efetiva redução da produção de placas amiloides, sendo considerado, ainda, bons alvos terapêuticos (41).

Cerca de um terço das drogas mais vendidas no mundo são derivadas de produtos naturais, dentre elas plantas e animais. Animais marinhos têm contribuído para o fornecimento de moléculas que hoje são comercializadas para várias indicações terapêuticas, como câncer, infecções virais e dor (43,44,45).

Animais marinhos possuem uma vasta diversidade de moléculas para defesa química contra predadores, microrganismos e digestão da presa. Neste sentido, podemos utilizar essa “biblioteca de moléculas” previamente selecionada ao longo de anos de evolução, ainda pouco exploradas, em favor da descoberta de novas estruturas funcionais (46).

É importante ressaltar que, ao conhecimento do grupo, nenhum estudo foi publicado com a ação de novas moléculas desses animais na Doença de Alzheimer, portanto a biodiversidade brasileira pode fornecer novas possibilidades para a redução das placas amiloides que causam a doença.

### 3. OBJETIVOS

#### Objetivo geral

Identificar e sequenciar peptídeos a partir do extrato metanólico de *Macrorhynchia philippina* e testá-los quanto a inibição de beta-secretase 1, visando a obtenção de novas moléculas para o tratamento da Doença de Alzheimer.

#### Objetivos específicos

- Obter extrato metanólico de *Macrorhynchia philippina*;
- Analisar peptídeos por espectrometria de massas e sequenciá-los;
- Verificar o potencial citotóxico do extrato de *Macrorhynchia philippina* em neurônios;
- Verificar a capacidade dos peptídeos de inibir a BACE-1 em métodos *in silico*;
- Verificar as propriedades físico-químicas dos peptídeos ativos, para desenvolvimento de medicamento.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Obtenção de extrato de *M. philippina*

Espécimes de *M. philippina* foram coletados na Ponta do Jarobá, São Sebastião, São Paulo, Brazil (23°49'44''S; 45°25'23''W), com licença emitida pelo ICMBio (#68917-1). Após a coleta, os animais foram lavados com água do mar filtrada para remoção de outros animais e plantas.

Os animais (6 colônias) foram imersos em uma solução contendo metanol e 0,1% de ácido acético por 24 horas em temperatura ambiente para descarga de nematocistos e consequente liberação de secreção, e também para preservação das moléculas liberadas e precipitação de proteínas, privilegiando peptídeos. As estruturas foram observadas em estereomicroscópio antes e após a extração para controle da liberação dos compostos.

O conteúdo extraído foi centrifugado a 10000 x g por 10 minutos e o sobrenadante concentrado em rotaevaporador para remoção do solvente. O extrato foi ressuscitado em água contendo 0,1% ácido fórmico e armazenado em freezer -20°C para posterior análise (47,48).

### 4.2. Viabilidade celular

Células SH-SY5Y foram cultivadas em frascos T75 em meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino, 2 mM glutamina e 1% de penicilina / estreptomicina, mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e ambiente úmido para a obtenção de 4 passagens.

Após isso, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com tampão PBS, para então ser adicionado 1 mL de tripsina para descolamento das células. O meio de cultura foi adicionado novamente e as células, agora em suspensão, foram removidas e contadas pelo método do azul de tripan (Gibco®), em câmara de Neubauer.

Com isso, uma quantidade de 5x10<sup>4</sup> células/mL foi inoculada em placas de 96 poços, em que cada poço continha 100 µL de células suspensas em meio RPMI, conforme mencionado acima. Após a adesão (24 horas), as células foram tratadas com 3 concentrações de extrato

metanólico de *M. philippina* (0,1; 1 e 10 µg/mL) por 48 horas, sempre mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e ambiente úmido.

Para avaliar a viabilidade celular, foi utilizado o método colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil-2H-tetrazólio), que avalia indiretamente a viabilidade celular por meio da atividade da enzima redutase mitocondrial (49). Com esse método, 100 µL de sal MTT 0,25 mg/mL (Sigma®) foram adicionados a cada poço e incubados por 4h horas. A solução de MTT contendo meio RPMI foi descartada e em seguida os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO (100 µL/poço). As placas foram homogeneizadas e a absorbância determinada por um espectrofotômetro (SpectraMax, Molecular Devices), em comprimento de onda de 570 nm.

Como controle positivo de morte celular foi utilizado Triton 0,5% e como controle negativo as células sem qualquer tratamento. Para cada experimento foi utilizada triplicata e dois experimentos independentes foram realizados.

Para verificar diferenças foi feita análise estatística por one-way ANOVA para comparação dos grupos experimentais (controle negativo, controle positivo e as diferentes concentrações de extrato). Foi feito pós-teste de Tukey e diferenças foram consideradas significativas se  $p < 0,05$ .

### 4.3. Sequenciamento de peptídeos

Uma alíquota do extrato de *M. philippina* foi carregada em uma coluna C18 (ACE C18, 5 µm, 100Å, 2.0 mm × 50 mm) acoplada em um sistema de cromatografia líquida de ultra performance (Acquity, Waters co., USA), operando em fase reversa. A eluição foi feita em um sistema binário, sendo (A) ácido fórmico (FA)/H<sub>2</sub>O (1:1000) e (B) FA/acetonitrila/ H<sub>2</sub>O (1:900:100), com fluxo constante de 0,2 mL/min e gradiente de 0 a 100%B em 40 minutos, com 5 minutos iniciais de eluição isocrática a 0%B.

O conteúdo eluído foi automaticamente inserido no espectrômetro de massas (Q-ToF Xevo GS, Waters Co.), em modo positivo de ionização. Os espectros foram adquiridos em uma janela de 200 a 1800 m/z no modo DDA e a resolução foi setada em 40000 FWHM.

Os íons mais abundantes foram automaticamente selecionados para fragmentação pelo gás argônio para o modo MS/MS, com intensidade em rampa, dependendo do estado de carga do peptídeo. Para o MS/MS os íons foram monitorados em uma janela de 100 a 1500 m/z.

O controle do equipamento e a aquisição dos dados foram feitos pelo MassLynx 4.2. Os dados brutos foram processados pelo software Progenesis QI (Waters Co.) para análise do cromatograma e mapa de intensidade de íons, e pelo software PEAKS®7.0 (Bioinformatics Solution Inc., Canada), para a obtenção de sequenciamento *de novo* de peptídeos.

As sequências peptídicas obtidas foram manualmente analisadas, além de serem avaliadas quanto ao seu *Average Local Confidence* (ALC %), em que os peptídeos foram considerados somente quando > 50.

#### 4.4. Análise de similaridade

Os peptídeos sequenciados foram submetidos ao *protein BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*), para verificação de sequências similares já depositadas. Para essa busca foi considerada a base de dados de sequências proteicas não redundantes, sem seleção de organismo e algoritmo blast, com parâmetros de limiar esperado de 10, matrix BLOSUM62 e gaps existence 11.

Além da busca pelo BLASTp, foi utilizado o banco de dados PepBank para verificação de estruturas similares e correlação com atividade biológica (50).

#### 4.5. Ancoragem molecular

Para avaliar a capacidade de inibição da BACE-1 pelos peptídeos de *M. philippina*, primeiramente foi selecionada a proteína BACE-1 do PDB (Protein DataBank). As enzimas foram analisadas para ser selecionada aquela com aproximadamente 2 Å de resolução por método de difração de raio-X, que pertencesse à família 1 (BACE-1), isolada de humano. Ainda foi selecionada uma proteína com estrutura experimental determinada juntamente com um inibidor, de forma que pudesse ser utilizado como modelo de ancoragem.

Após ser selecionada, a proteína foi inserida no servidor MDockPeP no formato pdb, para predição do complexo proteína-peptídeo a partir das sequências e estruturas tridimensionais. A sequência do peptídeo foi inserida em formato FASTA. O limite para RMSD para restrição da

conformação do peptídeo foi de 5,5 Å e não foi adicionada nenhuma coordenada X, Y, Z para busca orientada, sendo, portanto, feita uma busca global (51).

Os resultados foram manualmente checados e selecionados os peptídeos posicionados no bolsão catalítico. Esses foram analisados pelo software Chimera 1.15v para cálculo das distâncias entre átomos.

#### **4.6. Análise físico-química**

Peptídeos posicionados no sítio catalítico da BACE-foram selecionados para uma avaliação das suas propriedades físico-química, a fim de se avaliar parâmetros para um desenvolvimento a medicamentos.

Para isso, foram feitas predições por meio da ferramenta ProtParam tool, do ExPASy, em que valores de pI, número de resíduos positiva ou negativamente carregados foram calculados, além da fórmula molecular, meia-vida *in vivo* (com predição para humanos), estabilidade, índice alifático e hidrofobicidade (52).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Coleta do animal, obtenção e análise do extrato de *M. philippina*

Colônias de *M. philippina* foram coletadas e o extrato metanólico pôde ser obtido com sucesso. A figura 6A mostra o animal no seu local de coleta. Para confirmar que a secreção tinha sido liberada após o contato com metanol e ácido acético, a estrutura do animal foi avaliada por um estereomicroscópio. Foi possível observar que antes da imersão em solvente o conteúdo estava presente nas estruturas (Figura 6B), e depois de 24 horas nos solventes, a secreção não estava mais presente, sendo toda solubilizada (Figura 6C).

A



B

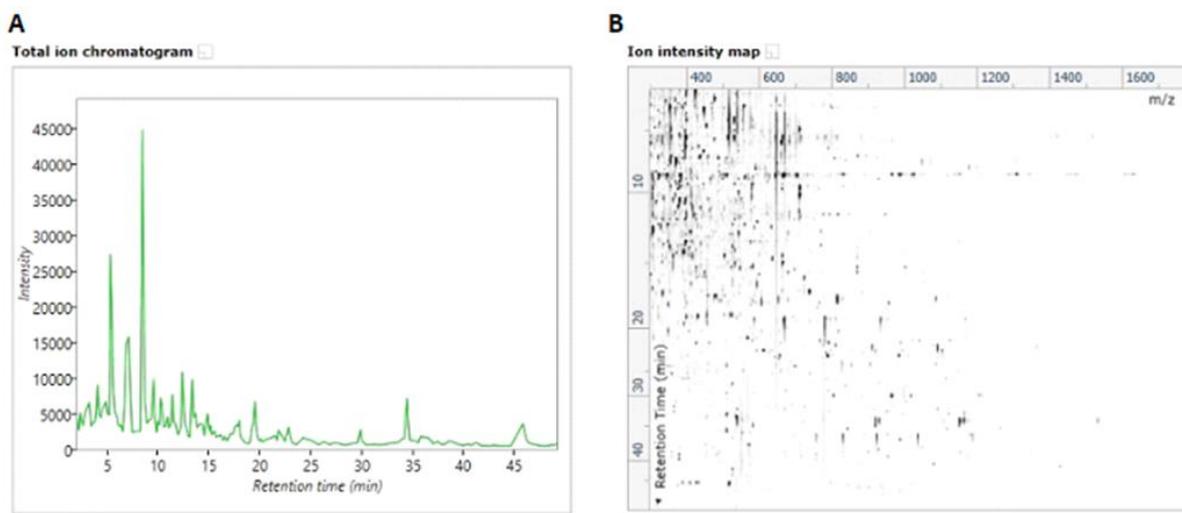


C



**FIGURA 6 – *Macrorhynchia philippina*.** A = Colônia de *Macrorhynchia philippina* em seu habitat natural. B = Detalhe da estrutura final do ramo (hidroteca) antes da extração. C = Detalhe da hidroteca após extração dos compostos com solvente orgânico, mostrando a liberação do conteúdo. Foto Marcelo V. Kitahara.

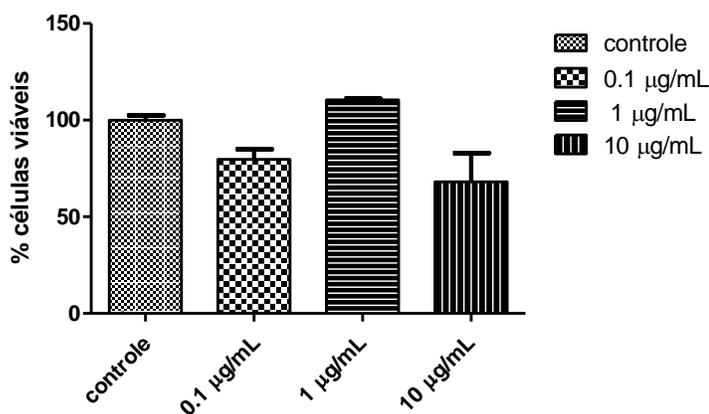
O conteúdo foi analisado por espectrometria de massas, após a eluição por UPLC em coluna C18, conforme mostra a figura 7. Foi possível observar a presença de diversos picos ao longo do cromatograma, indicando a abundância de moléculas que puderam ser extraídas (figura 7A). Além disso, foi visto que há muitas moléculas de baixa massa, mas também muitos íons entre 600 e 1400 m/z entre 15 e 40 minutos, típico tempo de eluição de peptídeos, nas condições empregadas de análise (figura 7B).



**FIGURA 7 - Perfil bioquímico da secreção metanólica de *Macrorhynchia philippina*.** A = Perfil cromatográfico mostrando picos ao longo do gradiente de acetonitrila. B = Mapa de intensidade de íons, de acordo com m/z, de moléculas eluídas pelo gradiente de acetonitrila.

## 5.2. Viabilidade celular após incubação com o extrato

A figura 8 mostra o gráfico de viabilidade celular do extrato de *M. philippina*, testado em 3 concentrações: 0,1, 1 e 10  $\mu\text{g/mL}$ . O extrato metanólico, rico em peptídeos, não causou morte celular estatisticamente significativa, sendo os valores  $80\pm 4$ ,  $110\pm 1$  e  $68\pm 25$  % de células viáveis, respectivamente. O controle positivo, por outro lado, foi capaz de induzir 70% de morte celular. Esse é um primeiro ensaio para avaliar se os peptídeos poderiam causar algum dano aos neurônios, antes de seguir com o estudo dessas moléculas. Sendo assim, em termos de toxicidade, os peptídeos se mostraram adequados ao modelo de Doença de Alzheimer.



**FIGURA 8 –** Porcentagem de células SH-SY5Y viáveis, determinado pelo método do MTT, após a incubação com o extrato de *Macrorhynchia philippina*, testado em 3 concentrações. Os dados representam as médias de valores de triplicata e dois experimentos independentes.

### 5.3. Peptídeos

Dezenove peptídeos naturais foram identificados e sequenciados a partir do extrato de *M. philippina*, conforme mostrados na tabela 1. É importante ressaltar que, conforme mencionado nos métodos, somente os peptídeos com ALC acima de 50% foram considerados.

O tamanho dos peptídeos variou de 481 a 1658 Da, sendo observados no espectrômetro de massas com 1 ou 2 cargas ( $z$ ), o que justifica o  $m/z$  menor que a massa molecular, em alguns casos. Esses dados estão de acordo com o mapa de intensidade de íons (figura 6C), em que foi observada abundância de íons correspondente a essas massas moleculares.

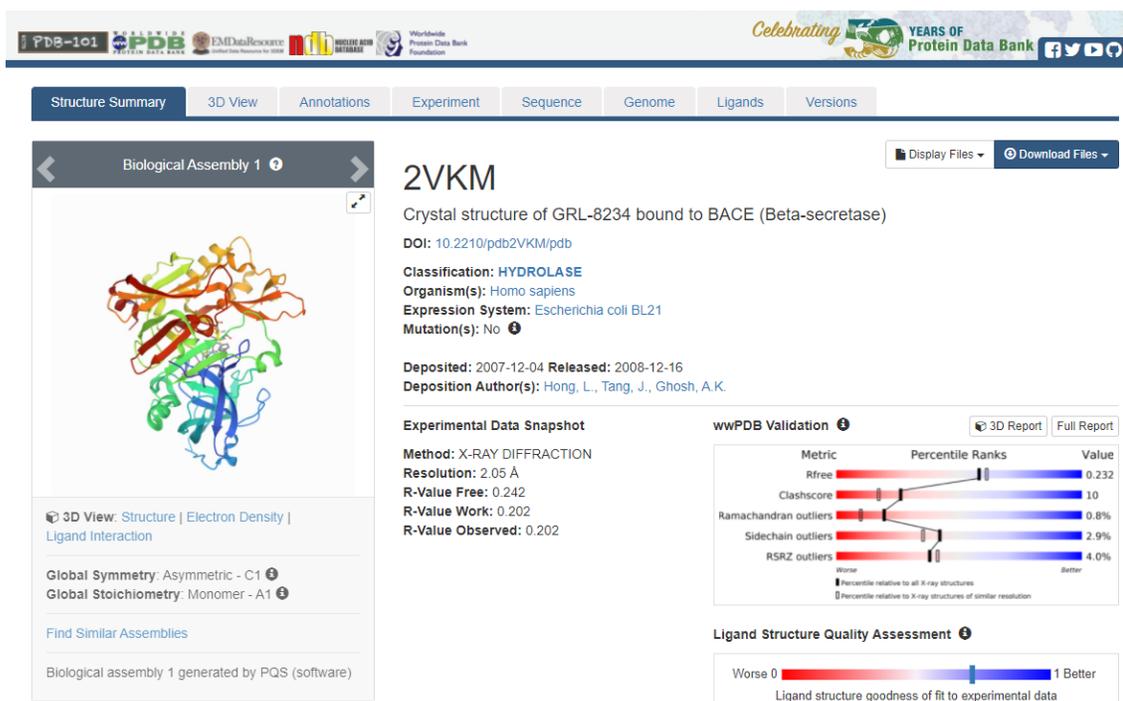
**TABELA 1** – Peptídeos sequenciados a partir do extrato de *Macrorhynchia philippina*

#	Sequência	ALC	m/z	z	Massa molecular
1	LPLYKNLH	85	499.3150	2	996.5756
2	VPPFLFEPV	81	522.7990	2	1043.5691
3	PMHPLFAYP	75	536.8000	2	1071.5212
4	LGSMCSNAVLGP	73	574.7790	2	1147.5366
5	NPGQPLYKGGLH	73	640.8870	2	1279.6672
6	HSCDCM	72	695.2530	1	694.1873
7	DPVDLDDGPPL	70	576.7980	2	1151.5347
8	DRPPLYKGGLH	70	626.8920	2	1251.6724
9	EEEEEPDGN	68	588.7440	2	1175.4102
10	FDCYD	66	662.2050	1	661.2054
11	SSQFAFEEVEY	64	668.2630	2	1334.5667
12	MNDLPKPA	62	885.5470	1	884.4426
13	HAPLVVEGLVAVMKN	61	788.9920	2	1575.8806
14	MFAN	57	482.2047	1	481.1995
15	APPMVKYW	56	496.3000	2	990.4997
16	PVTLKKKC	53	458.7680	2	915.5576
17	CHAAPLCLTHLGVLVL	53	830.4670	2	1658.8999
18	PAGEPTWF	52	452.6725	2	903.4127
19	PETGALCVGAVSHC	51	672.3540	2	1342.6008

#### 5.4. Atividade inibidora de BACE-1

Os 19 peptídeos obtidos de *M. philippina* foram testados computacionalmente quanto à sua capacidade de inibir a BACE-1.

Várias enzimas foram analisadas no PDB, e foi selecionada a de código 2VKM, uma BACE-1 de humano (figura 9). A proteína não contém nenhuma mutação, e possui 4 cadeias, com sua estrutura analisada por raio-X após ser obtida em um sistema recombinante em *E. coli*, juntamente com um ligante, com uma potência de K(i) 1.8 nM em inibição enzimática e IC(50) 1 nM em células de ovário de hamster (40).

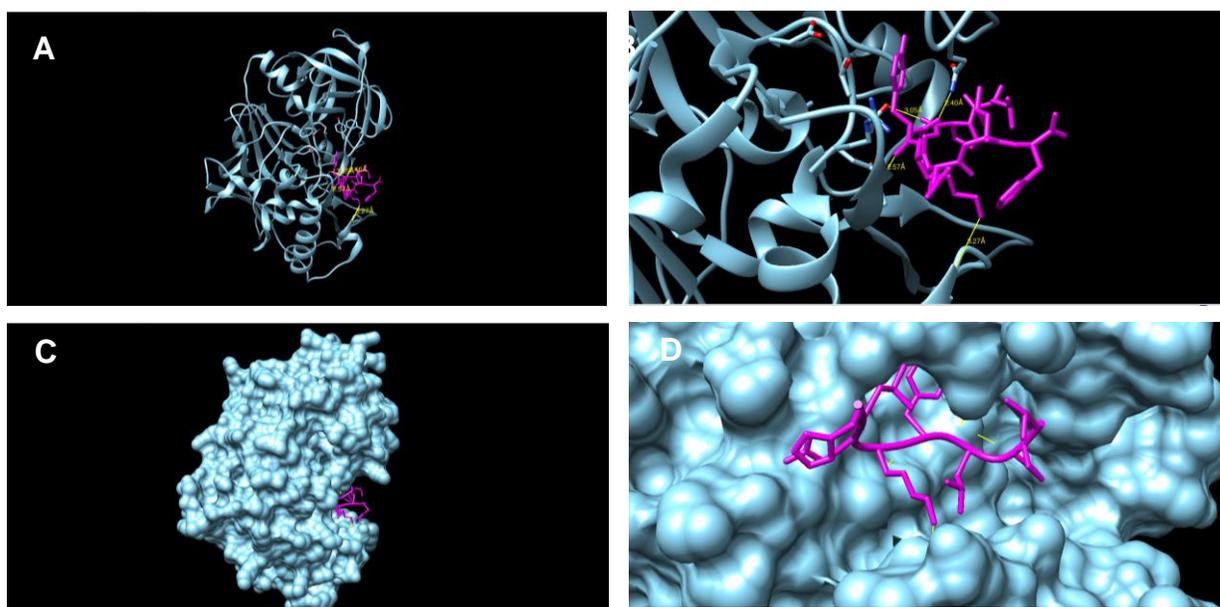


**FIGURA 9 – Proteína BACE-1 selecionada a partir do PDB para análise de ancoragem molecular.**

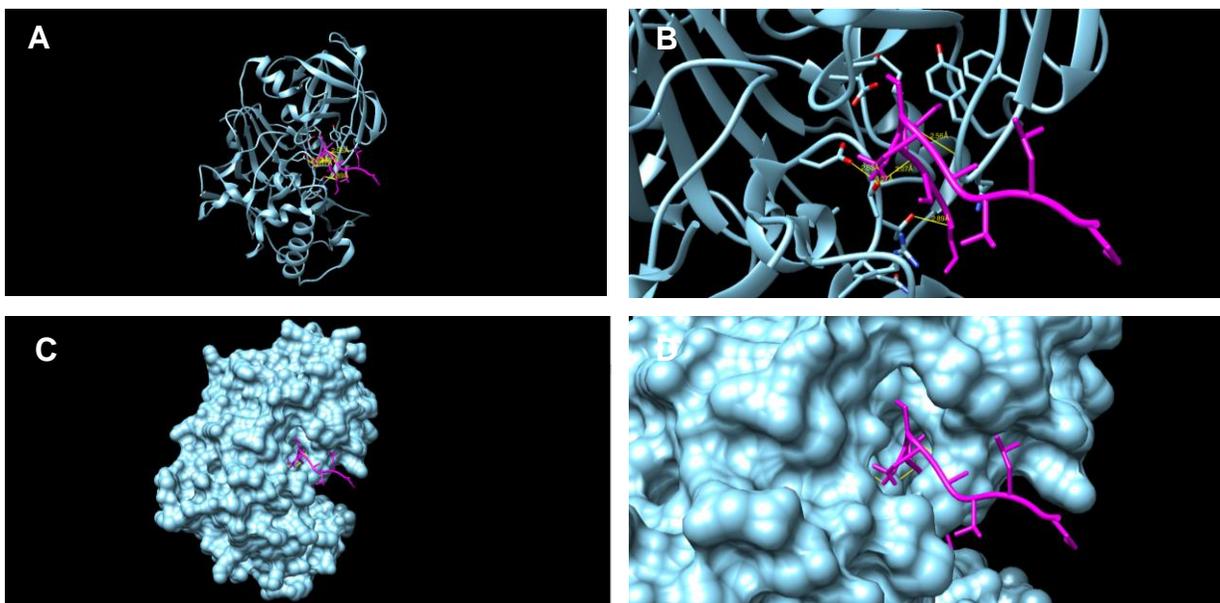
No nosso modelo, de 19 peptídeos avaliados, 10 foram selecionados pela sua boa localização no bolsão catalítico e distância para a proteína menor de 3 Å, e são eles: 1, 3, 5, 6, 8, 10, 12, 16, 17 e 19. Os modelos estão mostrados nas figuras 10 a 19, em que são apresentados os formatos de proteína em fita e em superfície, para visualização do posicionamento do peptídeo na enzima. Também são apresentados detalhes das ligações, marcadas em amarelo. Os aminoácidos de ligação estão mencionados nas legendas de cada figura.

É importante frisar que todos esses peptídeos mostrados estão interagindo com algum aminoácido do sítio ativo, com uma distância menor que 3 Å, caracterizando uma estabilização do peptídeo na região que abriga o substrato. Portanto, a ligação do peptídeo no sítio ativo caracteriza uma inibição da enzima, que não conseguirá se ligar ao seu substrato natural (proteína APP), uma vez que aminoácidos da tríade catalítica estão em ligação com outro composto (inibidor).

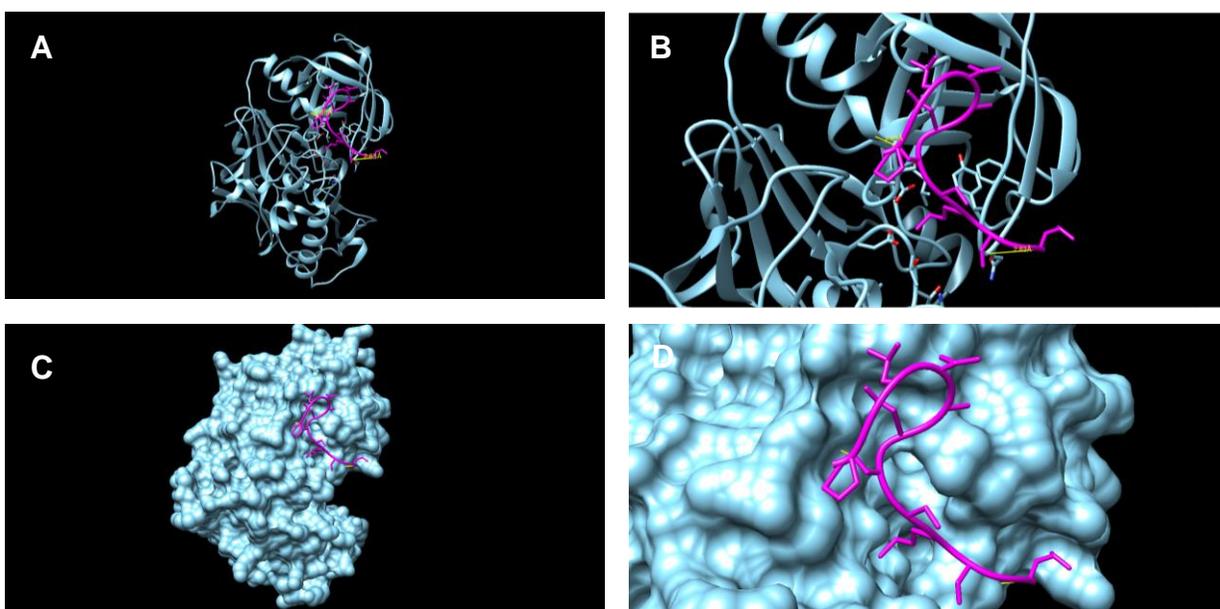
As ligações foram observadas como ligações de hidrogênio, uma vez que átomos eletronegativos (O ou N) participaram das ligações.



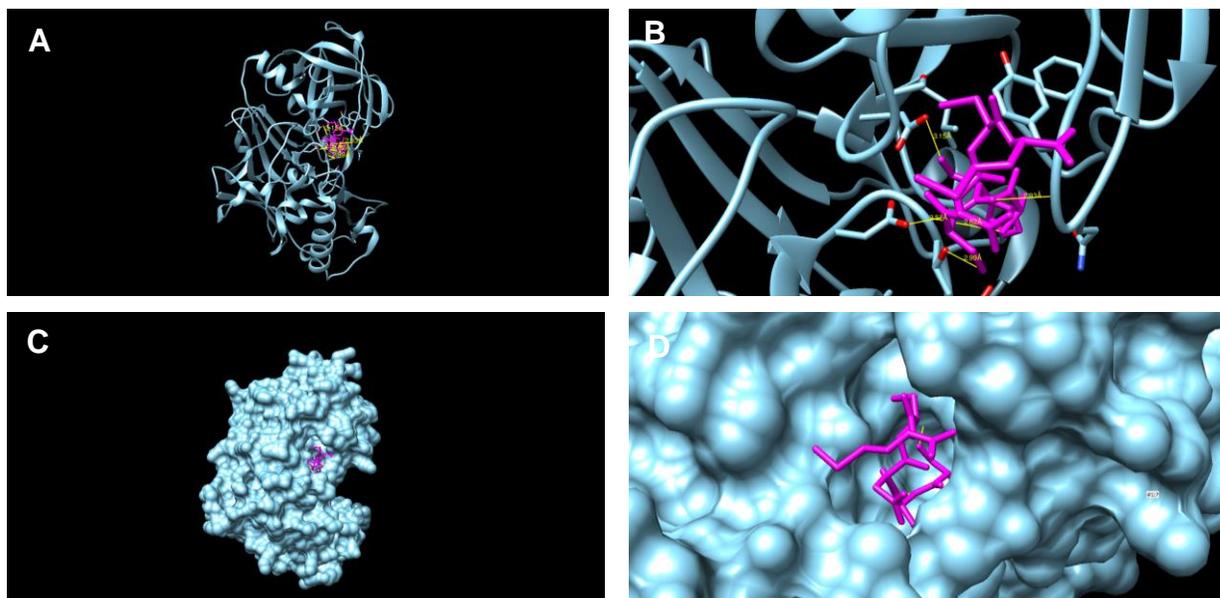
**FIGURA 10 – Ancoragem molecular entre Peptídeo 1 (magenta) e BACE-1 (azul) (PDB 2VKM).** A = proteína inteira e peptídeo em formato de fita. B = aproximação da região de interação. C = visão da proteína total em superfície. D = detalhe do posicionamento do peptídeo em superfície. Ligações = Gln73 NE2 + Leu3 O = 2,40 Å; Ser325 O + Tyr4 O = 2,57 Å; Tyr232 O + Pro2 O = 3,05Å.



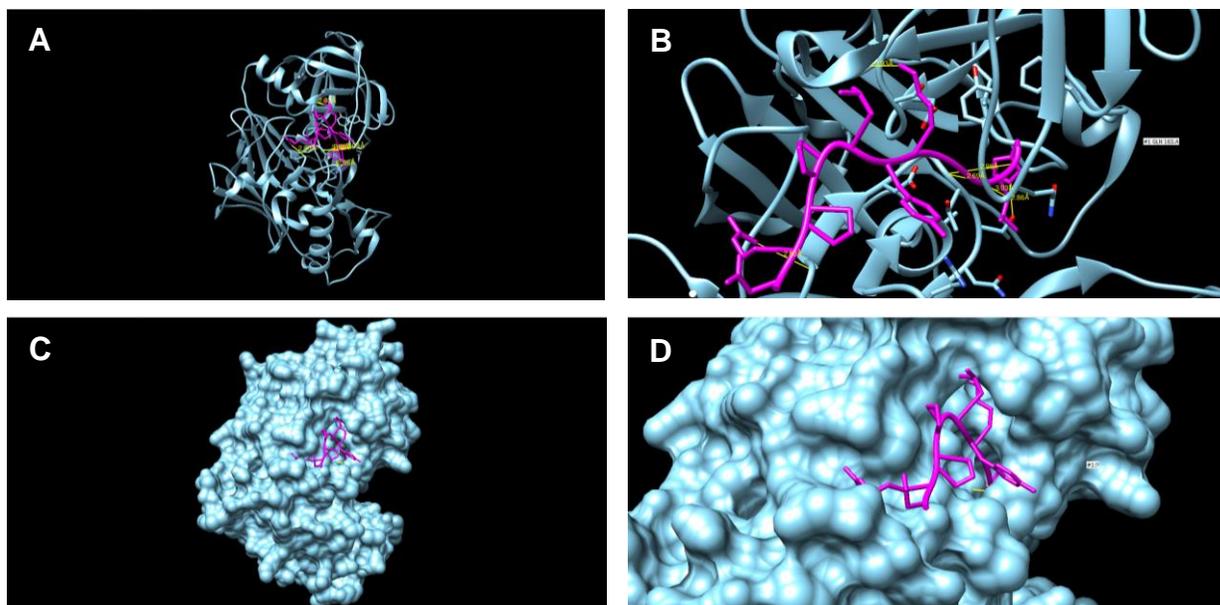
**FIGURA 11 – Ancoragem molecular entre Peptídeo 3 (magenta) e BACE-1 (azul) (PDB 2VKM).** A = proteína inteira e peptídeo em formato de fita. B = aproximação da região de interação. C = visão da proteína total em superfície. D = detalhe do posicionamento do peptídeo em superfície. Ligações = Asp228 O + Cys5 S = 2,53 Å; Thr231 O + Met4 N = 3,07 Å; Thr232 O + Leu1 N = 2,89 Å; Thr72 N + Cys5 O = 2,56Å.



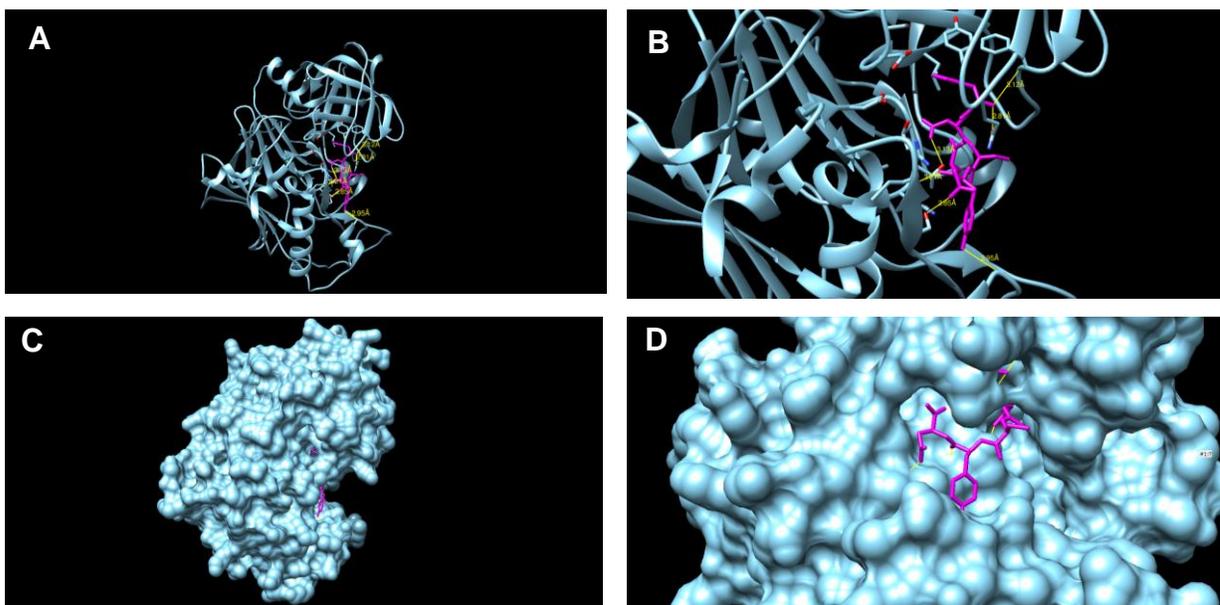
**FIGURA 12 – Ancoragem molecular entre Peptídeo 5 (magenta) e BACE-1 (azul) (PDB 2VKM).** A = proteína inteira e peptídeo em formato de fita. B = aproximação da região de interação. C = visão da proteína total em superfície. D = detalhe do posicionamento do peptídeo em superfície. Ligações = Glu125 O + Ser6 O = 2,85 Å; Thr72 O + Leu1 N = 2,83 Å.



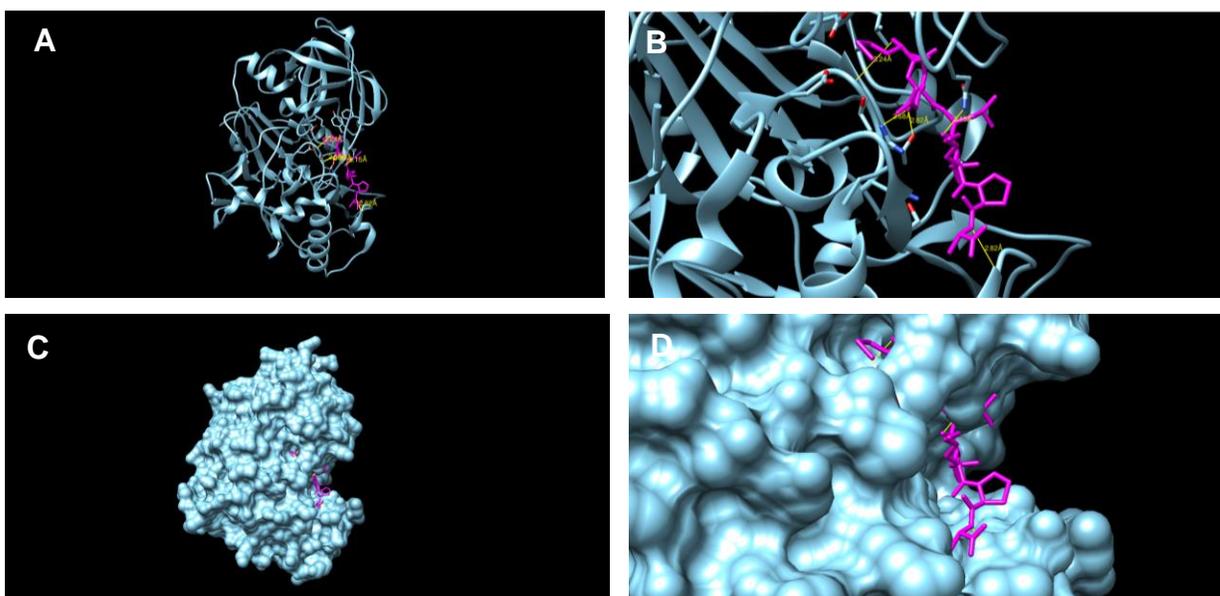
**FIGURA 13 – Ancoragem molecular entre Peptídeo 6 (magenta) e BACE-1 (azul) (PDB 2VKM).** A = proteína inteira e peptídeo em formato de fita. B = aproximação da região de interação. C = visão da proteína total em superfície. D = detalhe do posicionamento do peptídeo em superfície. Ligações = Thr72 N + Ser2 O = 2,93 Å; Gly230 N + His1 O = 2,82 Å; Asp228 O + Cys3 N = 2,57 Å; Thr231 O + Cys 3 S = 2,99 Å.



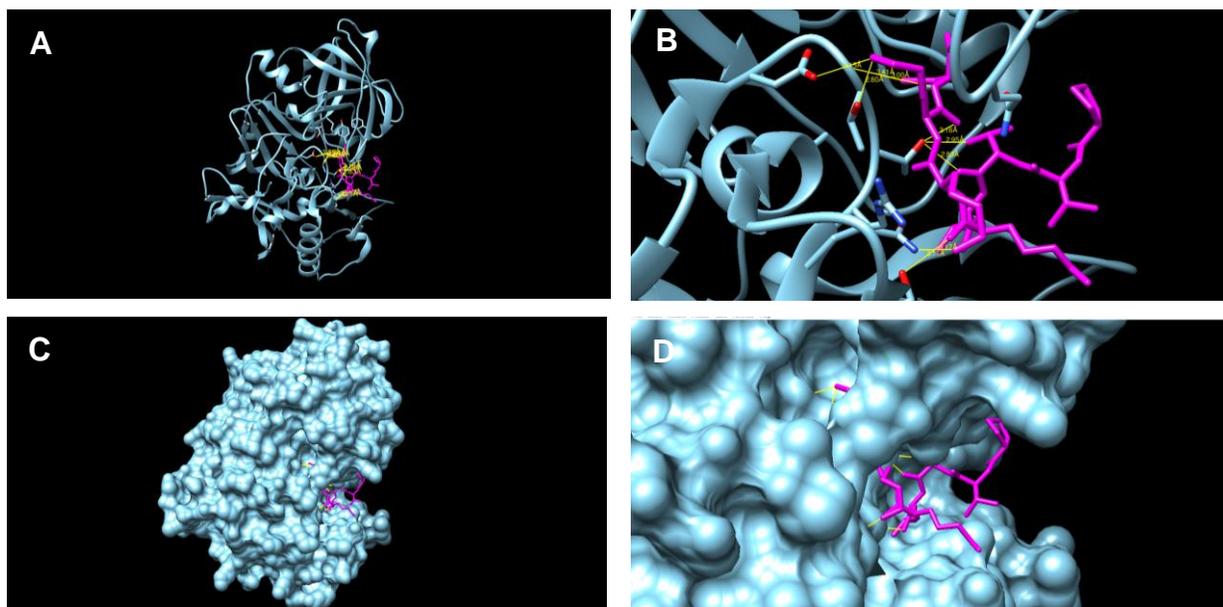
**FIGURA 14 – Ancoragem molecular entre Peptídeo 8 (magenta) e BACE-1 (azul) (PDB 2VKM).** A = proteína inteira e peptídeo em formato de fita. B = aproximação da região de interação. C = visão da proteína total em superfície. D = detalhe do posicionamento do peptídeo em superfície. Ligações = Arg2 N + Asp223 O = 2,80 Å; Thr232 O + His11 N = 2,86 Å; Gly230 O + Leu10 N = 2,69 Å; Gly230 O + Lys11 N = 2,98 Å; Ile126 O + Lys7 N = 2,93 Å.



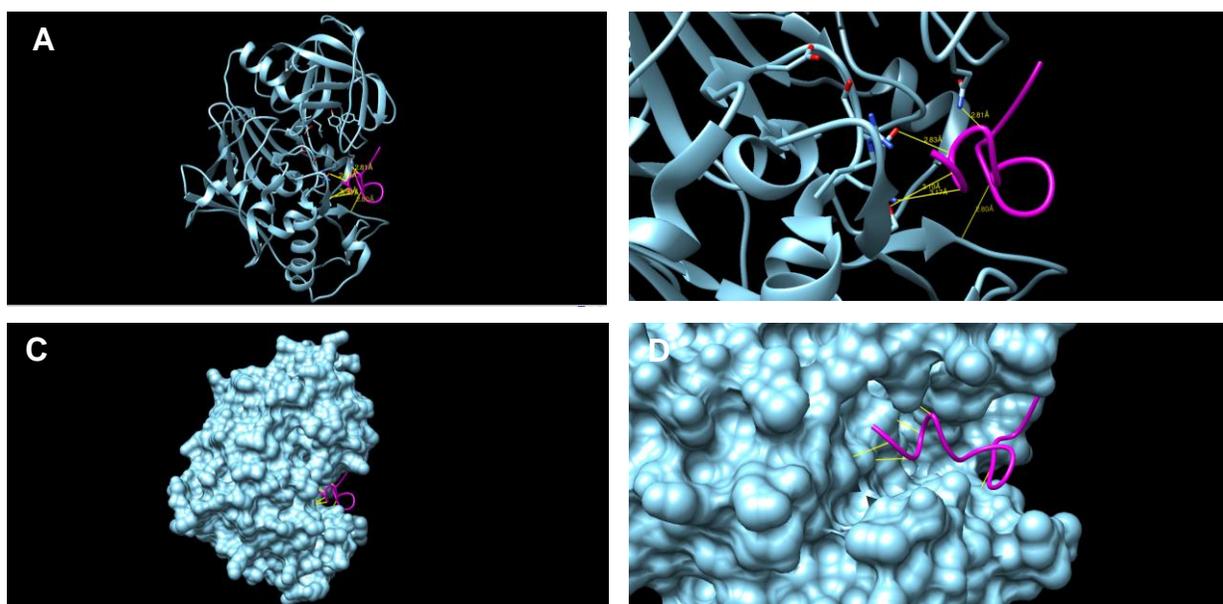
**FIGURA 15 – Ancoragem molecular entre Peptídeo 10 (magenta) e BACE-1 (azul) (PDB 2VKM).** A = proteína inteira e peptídeo em formato de fita. B = aproximação da região de interação. C = visão da proteína total em superfície. D = detalhe do posicionamento do peptídeo em superfície. Ligações = Gln73 O+ Phe1 N = 2,81 Å; Thr232 O + Cys2 N = 3,13 Å; Ser325 O+ Asp1 N = 2,85 Å; Gly264 H + Tyr4 = 2,95 Å.



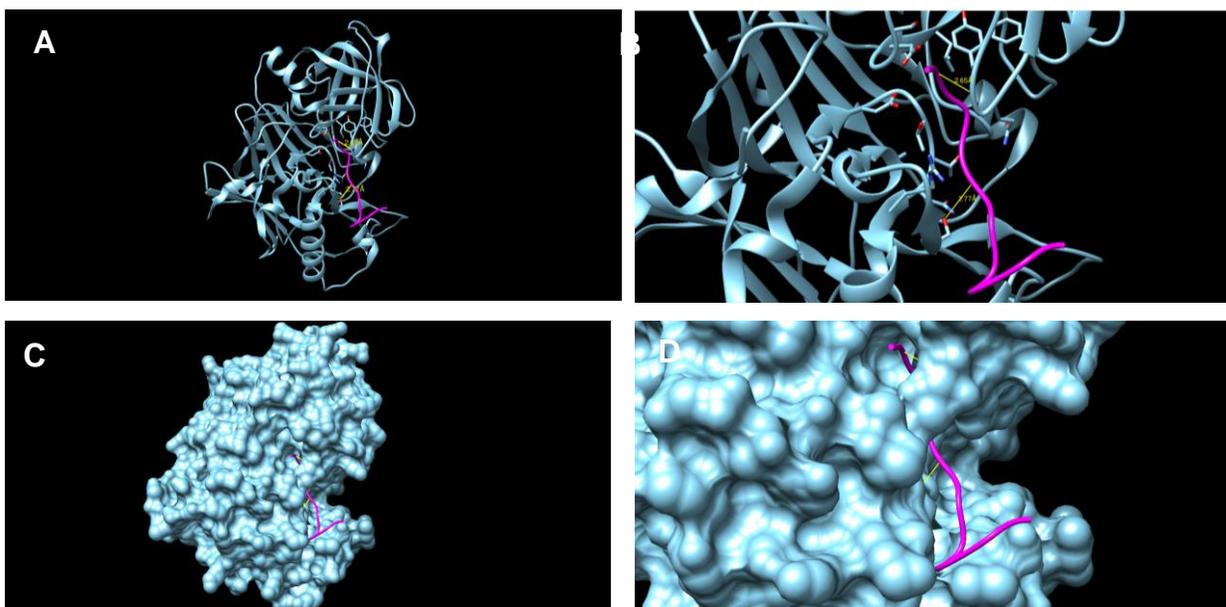
**FIGURA 16 – Ancoragem molecular entre Peptídeo 12 (magenta) e BACE-1 (azul) (PDB 2VKM).** A = proteína inteira e peptídeo em formato de fita. B = aproximação da região de interação. C = visão da proteína total em superfície. D = detalhe do posicionamento do peptídeo em superfície. Ligações = Thr232 N+ Asn2 O = 2,68 Å; Thr232 O+ Asn2 O = 2,82 Å; Leu263 O + Ala8 N = 2,82 Å.



**FIGURA 17 – Ancoragem molecular entre Peptídeo 16 (magenta) e BACE-1 (azul) (PDB 2VKM).** A = proteína inteira e peptídeo em formato de fita. B = aproximação da região de interação. C = visão da proteína total em superfície. D = detalhe do posicionamento do peptídeo em superfície. Ligações = Thr 231 N+ Lys 7 O = 2,80 Å; Gly 230 O+ Cys 8 N = 3,00 Å; Thr 232 O + Thr 3 O = 2,83 Å.



**FIGURA 18 – Ancoragem molecular entre Peptídeo 17 (magenta) e BACE-1 (azul) (PDB 2VKM).** A = proteína inteira e peptídeo em formato de fita. B = aproximação da região de interação. C = visão da proteína total em superfície. D = detalhe do posicionamento do peptídeo em superfície. Ligações = Gln 73 N + Gly 12 O = 2,81 Å; Thr 232 O + Val 13 O = 2,83 Å; Glu 310 N + Pro 5 O = 2,80 Å.



**FIGURA 19 – Ancoragem molecular entre Peptídeo 19 (magenta) e BACE-1 (azul) (PDB 2VKM).** A = proteína inteira e peptídeo em formato de fita. B = aproximação da região de interação. C = visão da proteína total em superfície. D = detalhe do posicionamento do peptídeo em superfície. Ligações = Thr 72 N + Ser 12 O = 2,65 Å; Ser 325 O + Val 8 O = 2,77 Å.

Após a seleção de peptídeos inibidores da BACE-1, estes foram avaliados quanto as suas propriedades físico-químicas.

A tabela 2 mostra diversos parâmetros calculados, importantes para uma avaliação do peptídeo quanto à sua estrutura, e refletem dados importantes para a farmacocinética dos compostos.

Os valores de ponto isoelétrico (pI) foram bastante divergentes entre os peptídeos, variando de 3,56 a 9,81, conforme a composição de resíduos positivos e negativos, mostrados na tabela.

A meia-vida estimada dos peptídeos também foi bastante diversa entre eles, de 1,1 h a mais de 20 horas.

Quatro peptídeos foram calculados como estáveis, e sua composição determinou, além desse parâmetro, o índice alifático. Dados de hidrofobicidade também foram calculados, sendo somente 3 peptídeos com valores positivos, indicando uma hidrofobicidade e conseqüentemente, capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica.

**TABELA 2** – Parâmetros físico-químicos de peptídeos inibidores da BACE-1, de *M. philippina*.

Peptídeo	pl	Resíduos negativos	Resíduos positivos	Fórmula	Meia-vida (mamífero)	Estabilidade	Índice alifático	Hidrofobicidade
1	8,60	0	1	C <sub>48</sub> H <sub>76</sub> N <sub>12</sub> O <sub>11</sub>	5,5 h	32,83 (estável)	146,25	-0,263
3	7,17	0	0	C <sub>53</sub> H <sub>73</sub> N <sub>11</sub> O <sub>11</sub> S <sub>1</sub>	>20 h	74,67 (instável)	54,44	0,111
5	8,60	0	1	C <sub>58</sub> H <sub>89</sub> N <sub>17</sub> O <sub>16</sub>	1,4 h	26,03 (estável)	65,00	-1,017
6	5,08	1	0	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> N <sub>8</sub> O <sub>10</sub> S <sub>3</sub>	3,5 h	149,10 (instável)	0	-0,100
8	8,60	1	2	C <sub>57</sub> H <sub>89</sub> N <sub>17</sub> O <sub>15</sub>	1,1 h	40,75 (instável)	70,91	-1,164
10	3,56	2	0	C <sub>29</sub> H <sub>35</sub> N <sub>5</sub> O <sub>11</sub> S <sub>1</sub>	1,1 h	80,04 (instável)	0	-0,600
12	5,59	1	1	C <sub>38</sub> H <sub>64</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S <sub>1</sub>	30 h	47,48 (instável)	61,25	-0,825
16	9,81	0	3	C <sub>41</sub> H <sub>77</sub> N <sub>11</sub> O <sub>10</sub> S <sub>1</sub>	>20 h	11,60 (estável)	85,00	-0,438
17	6,90	0	0	C <sub>75</sub> H <sub>126</sub> N <sub>20</sub> O <sub>18</sub> S <sub>2</sub>	1,2 h	53,83 (instável)	170,62	1,681
19	5,25	1	0	C <sub>55</sub> H <sub>90</sub> N <sub>16</sub> O <sub>19</sub> S <sub>2</sub>	>20 h	-7,94 (estável)	83,57	0,729

## 6. DISCUSSÃO

Embora haja relatos de envenenamento, a natureza bioquímica do veneno dos hidroides é pouco explorada, pois as moléculas não são facilmente acessadas, tanto pela dificuldade de se obter os animais quanto na remoção das moléculas, sem a presença de conteúdos celulares. Ruffin e colaboradores (30) mostraram que a administração de ácido acético desencadeou a descarga dos nematocistos (células que liberam o veneno) de *Lytocarpus philippinus*. Da mesma forma, Joauei e colaboradores (32) usou etanol para induzir a descarga de nematocistos, ao avaliar o conteúdo de veneno da água-viva *Chironex fleckeri*.

Em trabalhos anteriores do grupo, mostramos que o metanol contendo 0,1% de ácido acético foi o suficiente para induzir a extração de moléculas das águas-vivas *Chiropsalmus quadrumanus* e *Olindias sambaquiensis* (47,48). Os solventes também foram capazes de extrair vários peptídeos e pequenas moléculas de *M. philippina*, mostrado aqui, com polaridade moderada, que não seriam facilmente dissolvidas na água do mar. Além disso, as imagens obtidas das estruturas de *M. philippina* antes e após a extração confirmam o sucesso na obtenção da secreção e de moléculas bioativas.

Desta forma, várias moléculas foram extraídas, muitas delas de baixa massa molecular, conforme as análises por espectrometria de massas. Além disso, foram encontrados e sequenciados 19 peptídeos inéditos, uma vez que nenhuma sequência similar foi encontrada nos bancos de dados. O tamanho dos peptídeos encontrados foi bem variado, bem como sua composição de aminoácidos, ressaltado a diversidade dessa classe de moléculas no animal.

Este é o primeiro relato de peptídeos presentes em *M. philippina*. Dentre o grupo de cnidários, peptídeos são conhecidos na classe Anthozoa, e o principal representante são as anêmonas-do-mar. No peptidoma da anêmona marinha *Phymanthus crucifer*, diversas atividades biológicas associadas, e revelaram 504 peptídeos naturais secretados (53). Em Hydra e outros cnidários, os peptídeos desempenham um papel importante no desenvolvimento como hormônios e neurotransmissores, regulando a reprodução, metamorfose, contração muscular, atividade sensorial, entre outras atividades biológicas cruciais (35).

Alguns compostos de baixa massa molecular (<700 Da) já foram isolados do veneno de *M. philippina*. Um isolololídeo descrito por Lima et al (54) apresentou atividade antitripanossômica, sem induzir citotoxicidade para células de mamíferos. A citotoxicidade foi observada por um isolololídeo descrito por Vizetto-Duarte et al (55), com apoptose em linhagem de células tumorais.

Zlotkowski et al (56) mostraram que a *Macrophilona A* aumentou os níveis de espécies reativas de oxigênio intracelular e causou citotoxicidade em células de adenocarcinoma de pulmão. Outros estudos mostraram que outras macrofilonas também causaram citotoxicidade (57). As *Lytophilippinas* foram capazes de induzir atividades antibacteriana, antiviral e antitumoral, além de apresentar letalidade em camarões (58).

O extrato de *M. philippina* obtido neste trabalho foi testado em células neuronais, para avaliação de sua toxicidade. Nas concentrações testadas, não foi encontrada atividade significativa de redução da viabilidade celular, o que mostra que os peptídeos são adequados ao estudo da Doença de Alzheimer, uma doença neurodegenerativa que causa perda de células neuronais. Desta forma, o uso de moléculas que causam citotoxicidade não seria adequado para o tratamento de tal doença, e se tornaria inviável a continuidade do estudo.

Os peptídeos foram então avaliados quanto à sua capacidade de inibir a enzima beta-secretase-1, importante para a formação de peptídeos amiloides causadores da Doença de Alzheimer. Para isso, foram utilizadas ferramentas de ancoragem molecular, que prediz a ligação entre o peptídeo e a proteína de forma rápida e de baixo custo.

A predição *in silico* da estrutura do complexo proteína-peptídeo é útil para a investigação de mecanismos de ação desses processos, pensando em uma abordagem terapêutica. O método utilizado leva em conta a flexibilidade do peptídeo, de modo a ser ajustado para uma melhor ligação nos átomos da proteína. Para isso, algoritmos foram criados de modo a se avaliar a ancoragem molecular de peptídeo flexível em amostra global ou orientada. Neste algoritmo, é possível fazer a modelagem peptídica, selecionar modos de ligação proteína-peptídeo flexível ou global e selecionar as melhores ancoragens a partir de scores e rankings (59).

A ferramenta utilizada neste trabalho (MDockPep) se mostrou confiável em análises prévias: 103 peptídeos foram avaliados, e em 95% dos casos, os modos de ligação foram próximos ao peptídeo nativo (60), o que indica alto índice de acerto do perfil de ligação entre o peptídeo e uma proteína.

Fármacos que impedem a elevação da concentração da  $\beta$ -amiloide são de grande interesse e a BACE -1 é um importante alvo terapêutico, uma vez que é uma enzima com atividade  $\beta$ -secretase implicada na via amiloide, levando à formação de  $\beta$ -amiloide. Nesse contexto, são necessários estudos em inibidores dessas enzimas para reduzir significativamente os níveis do peptídeo neurotóxico, ocorrendo as melhoras no controle da progressão da doença (61).

É essencial que os inibidores de BACE-1 sejam seletivos e que inibam exatamente a clivagem de APP e a produção de A $\beta$  sem interferir nas outras clivagens da enzima (61).

Desta forma, foram encontrados 10 peptídeos com sequência inédita, com potencial inibição da BACE-1, por ter se encaixado exatamente no sítio ativo da enzima, de forma estável, em uma análise global, que não favorece nenhum local pré-estabelecido da enzima. Assim, os resultados reforçam o bom perfil de ligação dos peptídeos e sua ação inibidora.

Além disso, esses peptídeos foram avaliados quanto às suas propriedades físico-químicas, importante para o desenvolvimento de moléculas a medicamentos, principalmente no que diz respeito a peptídeos, que tem uma estrutura complexa e muitas vezes instável, comparada com molécula de baixa massa.

O ponto isoelétrico (pI) e a quantidade de resíduos positivo ou negativamente carregados diz respeito à carga do peptídeo e a possível interação iônica com outros compostos. O pI é o pH em que um peptídeo tem uma carga líquida igual a zero (pela somatória da carga dos R dos aminoácidos), e se estiver em uma solução mais ácida ou básica, pode ter a capacidade de se protonar ou desprotonar, propiciando ligações entre átomos.

O valor normal de pH de neurônios de hipocampo varia de 7,03 a 7,76 (62), e moléculas com valores de pI muito diferentes desses podem sofrer protonação ou desprotonação, podendo ter sua atividade biológica alterada, como é o caso dos peptídeos 6, 10 e 16.

A predição de meia-vida diz respeito ao tempo que o peptídeo leva para reduzir em metade a sua quantidade dentro da célula. Para nossa análise, foi selecionado um modelo de mamíferos (humano). Cada aminoácido tem uma meia-vida experimentalmente definida para esse modelo, e a disposição desses aminoácidos em um peptídeo reflete em valores que podem ser calculados (63). Os peptídeos 8, 10 e 17 tem uma meia-vida curta (1,1 ou 1,2 h), sendo rapidamente eliminado, e dificilmente chegariam em uma alta concentração no alvo terapêutico.

O cálculo de estabilidade fornece uma estimativa após cálculos baseados em peptídeos experimentais, estáveis e instáveis, para a criação de algoritmos. Assim, valores abaixo de 40 são considerados peptídeos estáveis, e acima de 40, instáveis (64). Aqui, os peptídeos 1, 5, 16 e 19 foram considerados estáveis após esse cálculo.

O índice alifático é definido como um volume relativo ocupado pelas cadeias laterais dos aminoácidos alanina, valina, isoleucina e leucina, e refletem um fator positivo para a estabilidade térmica de proteínas (65).

Os valores de hidrofobicidade são calculados pelo índice GRAVY (*Grand average of hydropathicity index*), e representa valores de hidrofobicidade de um peptídeo. O cálculo é feito pela soma de valores hidropáticos de todos os aminoácidos, dividido pelo número de aminoácidos. Valores positivos indicam peptídeo hidrofóbico, enquanto valores negativos refletem peptídeos hidrofílicos (66). Os peptídeos 3, 17 e 19 apresentaram valores positivos, sendo hidrofóbicos e com pouca ou nenhuma carga e, portanto, com capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, parâmetro essencial no desenvolvimento de moléculas para o tratamento de doenças que tem alvos terapêuticos o sistema nervoso central, como a Doença de Alzheimer.

A avaliação físico-química foi através de, valor adequado de pI, poucas cargas, hidrofóbico, estável e com baixa eliminação, sendo então considerado apenas um dos 19 peptídeos avaliados.

## 7. CONCLUSÃO

Foram obtidos 19 peptídeos inéditos de *M. philippina*, sendo 10 deles identificados como inibidores de BACE-1. Um deles demonstrou parâmetros físico-químicos desejáveis, em termos de hidrofobicidade, carga, estabilidade e meia-vida, adequado para o desenvolvimento da molécula em um medicamento.

Após toda a avaliação físico-química, o peptídeo 19, foi considerado o protótipo ideal para possível inibidor da progressão da Doença de Alzheimer, considerando sua importante atividade inibidora de BACE-1 e características que permitem o sucesso da molécula como medicamento.

Desta forma, a partir de um extrato desconhecido, de um animal pouco estudado, foi possível obter novos peptídeos, com sequência de aminoácidos inéditas, sendo um deles com atividade importante inibidora da BACE-1 e com propriedades promissoras, que pode ser considerado para o tratamento de uma doença ainda sem cura, que é a Doença de Alzheimer.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BERRIOS, G. E. Alzheimer's disease: a conceptual history. *International Journal of Geriatric Psychiatry*. 1990; 5(6):355-365.
2. HIPPIUS, H.; NEUNDÖRFER, G. The Discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2003; 5 (1):101.
3. BERCHTOLD, N. C.; COTMAN, C. W. Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s. *Neurobiology of aging*. 1998; 19 (3):173-189.
4. ARAUJO, R. S.; PONDE, M. P. Eficácia da Memantina na doença de Alzheimer em seus estágios moderado a grave. *J. Bras. Psiquiatria*. 2006; 55 (2):148-153.
5. ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL [Internet]. c2018 [Acesso em 22 de Março de 2018]. Disponível em [http://www.who.int/mental\\_health/neurology/dementia/en](http://www.who.int/mental_health/neurology/dementia/en)
6. ALZHEIMER'S ASSOCIATION [Internet].c2021 [Acesso em 21 de Janeiro de 2021]. Disponível em [https://www.alz.org/brain\\_portuguese/links.asp](https://www.alz.org/brain_portuguese/links.asp)
7. HARDY, J.; SELKOE, D.J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002; 297 (5580): 353–356.
8. WAKABAYASHI, T.; De STROOPER, B. Presenilins: members of the gamma-secretase quartets, but part-time soloists too. *Physiology*. 2008; 23:194–204.
9. JIN S., KEDIA N., ILLES-TOTH E., HARALAMPIEV I., PRISNER S., HERRMANN A., WANKERT E. and BIESCHKE J. Amyloid-(1– 42) Aggregation Initiates Its Cellular Uptake and Cytotoxicity. *The Journal Of Biological Chemistry*. 2016; 291 (37):19590–19606.
10. MURPHY MP, LEVINE H 3RD. Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. *J Alzheimers Dis*. 2010; 19:311-323.
11. GRAHAM, W. V., BONITO-OLIVA, A., & SAMAR, T. P. Update on Alzheimer's Disease Therapy and Prevention Strategies. *Annual Review of Medicine*. 2017; 68 (1):413-30.
12. XIA, W.  $\gamma$ -Secretase and its modulators: Twenty years and beyond. *Neurosci Lett*. 2019; 701:162-169.

13. DOMENICO, F.; TRAMUTOLA, A.; PERLUIGI, M. Cathepsin D as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *Expert Opin. Ther. Targets*. 2016; 20:1393-1395.
14. STOKA, V.; TURK, V.; TURK, B. Lysosomal cathepsins and their regulation in aging and neurodegeneration. *Ageing Research Rev*. 2016; 32:22–37.
15. WANG, C.; TELPOUKHOVSKAIA, M.A.; BAHR, B.; CHEN, X.; GAN, L. Endolysosomal dysfunction: a converging mechanism in neurodegenerative diseases. *Curr. Opin. Neurobiol*. 2018; 48:52-58.
16. KENESSEY, A.; NACHARAJU, P.; KO, L.W. YEN, S.H. Degradation of tau by lysosomal enzyme cathepsin D: implication for Alzheimer neurofibrillary degeneration. *J Neurochem*. 1997; 69:2026-2038.
17. YADAV, M.; AVASTHI, A.S. Cathepsin B: a controversial target for Alzheimer's Disease. *Int J Pharm Bio Sci*. 2017; 8 (2):369-373.
18. HANSLIK, K. L., ULLAND, T. K. The Role of Microglia and the Nlrp3 Inflammasome in Alzheimer's Disease. *Front. Neurol*. 2020; 11:570711.
19. ALIEV, G., OBRENOVICH, M. E., REDDY, V. P., SHENK, J. C., MOREIRA, P. I., NUNOMURA, A., et al., Antioxidant Therapy in Alzheimer's Disease: Theory and Practice. *Mini Rev Red Chem*. 2008; 8 (13):1395–1406.
20. FENG, R., WANG, P., LIU, G., JIANG, Y., CHEN, X., SONG, H., CHEN, Z. Cell adhesion molecules contribute to Alzheimer's disease: multiple pathway analyses of two genome wide association studies. *Journal of Neurochemistry*. 2011; 120 (1):190-8.
21. CARRILLO-MORA, P.; LUNA, R., COLÍN-BARENQUE, L. Amyloid Beta: Multiple Mechanisms of Toxicity and Only Some Protective Effects *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2014; 2014:15.
22. RAWLINGS, N.D., BARRETT, A.J., THOMAS, P.D., HUANG, X., BATEMAN, A., FINN, R.D. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res*. 2018; 46:D624-D632.
23. YAN, R, VASSAR, R. Targeting the beta secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. *Lancet Neurol*. 2014; 13:319–29.

24. GUTTE, B.; Peptides: Synthesis, Structure, and Applications, Academic Press: New York. 1995; 289:313-336.
25. CRAIK, D. J., FAIRLIE, D. P., SPIROS L., PRICE, D. The Future of Peptide-based Drugs. *Chem Biol Drug Des.* 2013; 81:136–147.
26. DANHO W., SWISTOK J., KHAN W., CHU X. J., CHEUNG A., FRY D., SUN H., KURLKO G., RUMENNIK L., CEFALU J., CEFALU G., NUNN P. Opportunities and challenges of developing peptide drugs in the pharmaceutical industry. *Adv Exp Med Biol.* 2009; 611:467–469.
27. CUSHMAN, D. W., ONDETTI, M. A. History of the Design of Captopril and Related inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Hypertension.* 1991;17:589–592.
28. OLIVEIRA, B. M.; CRUZ, L. J.; DE SANTOS, V.; LECHEMINANT, G. W.; GRIFFIN, D.; ZEIKUS, R.; MCINTOSH, J. M.; GALYEAN, R.; VARGA, J.; GRAY, W. R.; RIVIER, J.; *Biochemistry.* 1987; 26:2086.
29. DI CAMILLO, C.G., PUCE, S., BAVESTRELLO, G. *Macrorhynchia* species (Cnidaria: Hydrozoa) from the Bunaken Marine Park (North Sulawesi, Indonesia) with a description of two new species. *Italian Journal of Zoology.* 2009; 76 (2):208-228.
30. RUFFIN, V. A., SALAMEH, A. I., BORON, W. F., PARKER, M. D. Intracellular pH regulation by acid-base transporters in mammalian neurons. *Front. Physiol.* 2014; 5:1-11.
31. BÉDRY, R., DE HARO, L., BENTUR, Y., SENECHAL, N., GALIL, B. S. Toxicological risks on the human health of populations living around the Mediterranean Sea linked to the invasion of non-indigenous marine species from the Red Sea: A review. *Toxicon.* 2021; 191:69-82.
32. JOUIAEI, M., CASEWELL, N., YANAGIHARA, A., NOUWENS, A., CRIBB, B., WHITEHEAD, D., JACKSON, T., ALI, S., WAGSTAFF, S., KOLUDAROV, I., ALEWOOD, P., HANSEN, J., FRY, B. Firing the Sting: Chemically Induced Discharge of Cnidaria Reveals Novel Proteins and Peptides from Box Jellyfish (*Chironex fleckeri*) Venom. *Toxins.* 2015; 7 (3):936-950.
33. WESTON, A. J., CHUNG, R., DUNLAP, W. C., MORANDINI, A. C., MARQUES, A. C., MOURA-DA-SILVA, A. M., WARD, M., PADILLA, G., DA SILVA, L. F., ANDREAKIS, N., LONG, P. F. Proteomic characterisation of toxins isolated from nematocysts of the South Atlantic jellyfish *Olindias sambaquiensis*. *Toxicon.* 2013; 71:11-17.
34. KNITTEL, P. S., LONG, P. F., BRAMMALL, L., MARQUES, A. C., ALMEIDA, M. T., PADILLA, G., MOURA-DA-SILVA, A. M. Characterising the enzymatic profile of crude

- tentacle extracts from the South Atlantic jellyfish *Olindias sambaquiensis* (Cnidaria: Hydrozoa). *Toxicon*. 2016; 119:1-17.
35. TAKAHASHI, T. Comparative Aspects of Structure and Function of Cnidarian Neuropeptides. *Frontiers in Endocrinology*. 2020; 11:339.
36. WINBLAD, B, PORITIS, N. Memantine in severe dementia: results of the 9M-Best Study (benefit and efficacy in severely demented patients during treatment with memantine). *Int. J. Geriatr. Psychiatry*. 1999; 14:135–46.
37. 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 $\beta$ -activated Microglial Cells Using a Functional Genomics Approach. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279:5565–5572.
38. MINTUN, M. A., LO, A. C., DUGGAN, E. C. et al. Donanemab in early Alzheimer’s disease. *N. Engl J. Med*. 2021; 384 (18):1691-1704.
39. DEWJI, N.N.; SINGER, S.J.; MASLIAH, E.; ROCKENSTEIN, E.; KIM, M.; HARBER, M. Peptides of Presenilin-1 Bind the Amyloid Precursor Protein Ectodomain and Offer a Novel and Specific Therapeutic Approach to Reduce  $\beta$ -Amyloid in Alzheimer’s Disease. *PLoS ONE*. 2015; 10:122451.
40. GHOSH, A. K., KUMARAGURUBARAN, N., HONG, L., KULKARNI, S., XU, X., MILLER, H. B., REDDY, D. S., WEERASENA, V., TURNER, R., CHANG, W., KOELSCH, G., TANG, J., Potent Memapsin 2 (Beta-Secretase) Inhibitors: Design, Synthesis, Protein-Ligand X-Ray Structure, and in Vivo Evaluation. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008;18:1031.
41. BUGNO, R. Beta Secretase Inhibitors to Treat Alzheimer’s Disease. 1<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Elsevier, 2015. 784 p. Inclui índice. ISBN: 9780128039601.
42. HUNG, S.Y.; FU, W.M. Drug candidates in clinical trials for Alzheimer’s disease. *J Biom Sci*. 2017; 24:47.
43. MALVE, H. Exploring the ocean for new drug developments: marine pharmacology. *J. Pharm. Bioallied. Sci*. 2016; 8:83-91.
44. RAWAT, D.S.; JOSHI, M.C.; JOSHI, P.; ATHEYAYA, H. Marine peptides and related compounds in clinical trial. *AntiCancer Agents Med. Chem*. 2006; 6:33-40.

45. NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* 2007; 70:461–477.
46. 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; 1:390.
47. ARRUDA, G. L. M., VIGERELLI, H., BUFALO, M. C., LONGATO, G. B., VELOSO, R. V., ZAMBELLI, V. O., PICOLO, G., CURY, Y., MORANDINI, A. C., MARQUES, A. C., SCIANI, J. M. Box Jellyfish (Cnidaria, Cubozoa) Extract Increases Neuron's Connection: A Possible Neuroprotector Effect. *Biomed Res Int.* 2021; 12:2021.
48. BUENO, T. C., COLLAÇO, R. 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.* 2021; 199:127-138.
49. MOSMANN, T., Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of immunological Methods.* 1983; 65:55-63.
50. SHATLAND T., GUETTLER D., KOSSODO M, PIVOVAROV M., WEISSLEDER R. PepBank – a database of peptides based on sequence text mining and public peptide data sources. *BMC Bioinformatics.* 2007; 8:280.
51. XU X., ZOU X. MDockPeP: A Web Server for Blind Prediction of Protein–Peptide Complex Structures. In: Kihara D. (eds) *Protein Structure Prediction. Methods in Molecular Biology.* Humana Press. New York, NY. 2020; 2020:2165
52. GASTEIGER, E., HOOGLAND, C., GATTIKER, A., DUVAUD, S., WILKINS, M.R., APPEL R. D., BAIROCH, A. *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In)* John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press. 2005; 2005:571-607.
53. RODRIGUEZ, A., GARATEIX, A., SALCEDA, E., PEIGNEUR, S., ZAHARENKO, A., PONS, T., SANTOS, Y., ARREGUIN, R., STÄNKER, L., FORSSMANN, W.-G., TYTGAT, J., VEGA, R., SOTO, E., PhcTx2, a New Crab-Paralyzing Peptide Toxin from the Sea Anemone *Phymanthus Crucifer*. 2018; 10 (2):72.

54. LIMA, M. L., Romanelli, M. M., Borborema, S. E. T., Johns, D. M., Migotto, A. E., Lago, J. H. G., Tempone, A. G. Antutrypanosomal activity of isololiolide isolated from the marine hydroid *Macrorhynchia philippina* (Cnidaria, Hydrozoia). *Bioorg Chem.* 2019; 89:103002.
55. VIZETTO-DUARTE, C., CUSTÓDIO, L., GANGDHAR, K. N., LAGO, J. H. G., DIAS, C., MATOS, A. M., NENG, N., NOGUEIRA, J. M. F., BARREIRA, L., ALBERICIO, F., RAUTER, A. P., VARELA, J. Isololiolide, a carotenoid metabolite isolated from the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*, is cytotoxic and able to induce apoptosis in hepatocarcinoma cells through caspase-3 activation, decreased Bcl-2 levels, increased p53 expression and PARP cleavage. *Phytomedicine.* 2016; 4:e1704.
56. 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. Macrophilone A: Structure Elucidation, Total Synthesis, and Functional Evaluation of a Biologically Active Iminoquinone from the Marine Hydroid *Macrorhynchia philippina*. *Organic Letters.* 2017; 22 (6):760-766.
57. YAN, P., RITT, D. A., ZLOTKOWSKI, K., BOKESCH, H. R., REINHOLD, W. C., SCHNEEKLOTH, J. S., MORRISON, D. K., GUSTAFSON, K. R. Macrophilones from the Marine Hydroid *Macrorhynchia philippina* Can Inhibit ERK Cascade Signaling. *Journal of Natural Products.* 2018; 81 (7):1666-1672.
58. ŘEZANKA, T., HANUS, L. O., DEMBITSKY, V. M. Lytophilippines A–C: novel macrolactones from the Red Sea hydroid *Lytocarpus philippinus*. *Tetrahedron.* 2004; 60:12191-12199.
59. XU X., YAN, C., ZOU X. MDockPeP: An ab-initio protein-peptide docking server. *J Comput Chem.* 2018; 39:2409-2413.
60. YAN C., XU X., Zou X.. Fully Blind Docking at the Atomic Level for Protein-Peptide Complex Structure Prediction. *Structure.* 2016; 2:1842-1853.
61. HALIMA, S. B.; MISHRA, S.; RAJA, K. M. P.; WILLEM, M.; BAICI, A.; SIMONS, K.; BRÜSTLE, O.; KOCH, P.; HAASS, C.; CAFLISCH A.; RAJENDRAN, L. - Specific Inhibition of  $\beta$ -Secretase Processing of the Alzheimer Disease Amyloid Precursor Protein. *Cell Reports.* 2016; 2016:2127–2141.
62. RUFKIN, V. A., SALAMEH, A. I., BORON, W. F., PARKER, M. D. Intracellular pH regulation by acid-base transporters in mammalian neurons. *Front. Physiol.* 2014; 5:43.

63. BACHMAIR, A., FINLEY, D. and VARSHAYSKY, A. In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science*. 1986; 234:179-186.
64. GURUPRASAD, K., REDDY, B.V.B. and PANDITI, M.W. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Eng.* 1990; 4:155-161.
65. IKAI, A. J. Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *J. Biochem.* 1980; 88:1895-1898.
66. CHANG K. Y., YANG, Jr. Analysis and prediction of highly effective antiviral peptides based on random forests. *PLoS One*. 2013; 8(8):70166.