

**Avaliação da fração alcaloidal de *Annona crassiflora* no modelo beta-amiloide de *Drosophila melanogaster* e investigação de seu mecanismo com base na farmacologia em rede**

**Aluno: Heitor Cappato Guerra Silva**

**Orientador: Foued Salmen Espindola**

**UBERLÂNDIA - MG**

**2020**

**Avaliação da fração alcaloidal de *Annona crassiflora* no modelo beta-amiloide de *Drosophila melanogaster* e investigação de seu mecanismo com base na farmacologia em rede**

**Aluno: Heitor Cappato Guerra Silva**

**Orientador: Foued Salmen Espindola**

**Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Uberlândia como parte dos  
requisitos para obtenção do  
Título de Mestre em Genética e  
Bioquímica (Área Bioquímica)**

**UBERLÂNDIA - MG**

**2020**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S586 2020	<p>Silva, Heitor Cappato Guerra, 1996- Avaliação da fração alcaloidal de <i>Annona crassiflora</i> no modelo beta-amiloide de <i>Drosophila melanogaster</i> e investigação de seu mecanismo com base na farmacologia em rede [recurso eletrônico] / Heitor Cappato Guerra Silva. - 2020.</p> <p>Orientador: Foued Salmen Espindola. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica. Modo de acesso: Internet. Disponível em: <a href="http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.771">http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.771</a> Inclui bibliografia.</p> <p>1. Genética. I. Espindola, Foued Salmen, 1957-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós- graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 575</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica  
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico - 05/2020 - PPGGB.				
Data:	Vinte e nove de dezembro de dois mil e vinte	Hora de início:	09:10h	Hora de encerramento:	09:40h
Matrícula do Discente:	11822GBI005				
Nome do Discente:	Heitor Cappato Guerra Silva				
Título do Trabalho:	Avaliação da fração alcaloidal de <i>Annona crassiflora</i> no modelo beta-amiloide de <i>Drosophila melanogaster</i> e investigação de seu mecanismo com base na farmacologia em rede.				
Área de concentração:	Bioquímica				
Linha de pesquisa:	Estrutura e Função de Proteínas				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Plantas medicinais, frutos do cerrado e Diabetes Mellitus.				

Aos vinte e nove dias do mês de dezembro de dois mil e vinte, às 09:10 horas, reuniu-se via web conferência pela plataforma Google Meet, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Professores Doutores: Foued Salmen Espindola (Orientador), Diones Caeran Bueno e Cássia Regina da Silva. A participação dos dois últimos se deu por epístola. Iniciando os trabalhos o (a) presidente Dr (a). Foued Salmen Espíndola apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença dos participantes, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente procedeu a leitura das epístolas enviadas pelos membros da banca. Em seguida os membros presentes, passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a leitura das epístolas e a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

( A ) PROVADO.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as

normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Diones Caeran Bueno, Usuário Externo**, em 29/12/2020, às 09:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Foued Salmen Espíndola, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/12/2020, às 10:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cassia Regina da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/12/2020, às 08:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2420321** e o código CRC **4A4DC4F6**.

Dedico este mestrado concluído aos meus pais, irmãos e toda a família com a qual estou a quase um ano sem poder ter qualquer tipo de contato e ainda sim me foquei para que essa etapa fosse concluída.

Dentro de muitos acontecimentos nesse ano de 2020, o que vai ficar marcado, realmente, é o sentimento de gratidão. Primeiro agradeço a Deus, porque foi um ano triste, longe de muita coisa e pessoas que fazem parte da minha vida. Foi aí que mais precisei, obrigado.

Agradeço a minha família, que por mais distante que estiveram e sem poder nos encontrar, me deram apoio e energia positiva para seguir e sempre acreditaram em mim. Walter, Silvana, Vinicius e Grazielle, obrigado por fazerem parte de mim.

Ao Sávio, de amigo de infância a parceiro de apartamento, você não sabe o quanto foi importante no momento depressivo que eu passei. Irmão de coração e de alma. Obrigado, champz.

Agradeço ao Professor Foued, são cerca de 6 anos de orientação, que com toda certeza, influenciou a minha carreira e o que eu sou hoje. Muito obrigado professor por fazer parte dessa minha caminhada.

Ao LABIBI, mais especificamente as pessoas que ali habitam, e que sinceramente, criaram um dos melhores ambientes de trabalho que vou ter na vida e que tenho certeza de que são ligações que vou levar para toda ela também. Douglas, Adrielle, Camila, Mariane, Leticia, Allisson, Rodrigo, Julia, Natalia, André, Renata. Só tenho a agradecer, e verdadeiramente, que saudades do meu time de vôlei.

Dentro desse time do laboratório agradeço também aos meus filhos científicos que tenho muito orgulho e ao orienta-los ganhei ânimo sem igual. Pedro, Victor, Isabela e Nicole, obrigado e continuem crescendo nessa caminhada de vocês.

Outro laboratório em que passei quase todo o mestrado e não posso deixar de agradecer é o LABGEN, parceria que deu muito certo e sou muito grato pela oportunidade dada pelo professor Carlos.

Outro time que agradeço de coração. Primeiro Serena, conciliou a parceria e fez acontecer o trabalho em um momento nada favorável pra ela ou para o grupo, são mais de seis anos de contato e que agradeço por ter mais esse ano contigo, obrigado jovem. Luiz, Alice, Natieli e Victoria, agradeço por fazerem

mais de 12h de laboratório seguidas serem proveitosas, como também por participarem dos melhores momentos do meu mestrado. Muito Obrigado.

À Universidade Federal de Uberlândia por tornar possível minha formação desde a graduação até a pós-graduação em uma universidade pública e de qualidade.

Ao Programa de Pós Graduação em Genética e Bioquímica por toda a assistência e apoio em todas as etapas desde a seleção até a defesa, obrigado a coordenação, funcionários e colegas.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida durante o mestrado.



## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

**Figura 1.** Alois Alzheimer, o médico psiquiatra que relatou e descreveu a doença de Alzheimer pela primeira vez.

**Figura 2.** Demonstração do desenvolvimento das placas amiloides e emaranhados neurofibrilares ao longo da DA, em que na fase inicial se encontra principalmente no lóbulo temporal e se intensifica em outras áreas com o progresso da doença.

**Figura 3.** Processamento proteolítico da PPA, desencadeando a via amiloidogênica e não amiloidogênica.

**Figura 4.** Neurotransmissão colinérgica a partir da biossíntese da acetilcolina no neurônio pré-sináptico, que com o aumento do  $Ca^{2+}$  intracelular pelos canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV) é liberada para a fenda sináptica e assim agir em seus receptores muscarínicos e nicotínicos (MACHRs e NACHRs). Na doença de Alzheimer também irá ocorrer a interação do peptídeo A $\beta$  comprometendo a neurotransmissão.

**Figura 5.** Desenvolvimento de um ovo fértil para uma mosca adulta durante um período de 10 dias. Após a eclosão, as larvas passam por três estágios antes de atingirem a pupa. Durante a pupa, ocorre uma metamorfose para a mosca adulta.

**Figura 6.** A planta *Annona crassiflora* Mart. A, Árvore; B, Tronco; C, Tronco e ramos; D, Folhas; E, Botões de flor; F, Flor; G, Flor com pétalas; H, Fruto não maduro; I, Fruto maduro; J, Secção transversal de fruta; K, Polpa; L, Sementes.

### Capítulo II

**Figure 1.** (A) Main 20 diseases related with PPI target network. Y-axis, the name of diseases, X-axis, the number of target genes related to the diseases. (B) PPI targets network with gray edges and alkaloid-targets network related to AD with red edges.

**Figure 2.** GO analysis of *Homo sapiens* targets. The Y-axis shows the semantic space X and the X-axis represents the Log<sub>10</sub> p-value. Darker color corresponds to a smaller log<sub>10</sub> p-value.

**Figure 3.** Analysis of the inhibition of the enzyme acetylcholinesterase by the AF and the rivastigmine control. Values expressed in percentage of inhibition of the acetylcholinesterase and concentration able to inhibit 50% of the enzyme activity. Values expressed as mean  $\pm$  standard error. Note: The same letters in each column mean no significant difference ( $p < 0.05$ ).

**Figure 4.** Evaluation of the motility of flies with untreated AD genotype (AD-like) and treated with the vehicle and with the alkaloidal fraction at C1, C2 and C3 concentrations. Values expressed as a percentage of fly motility. The same letters in each column mean no significant difference ( $p < 0.05$ ).

**Figure 5.** Evaluation of the AChE activity of control flies with Alzheimer genotype (AD-like) and flies without the Alzheimer genotype (Elav-Gal4 / +). AD-like flies treated with vehicle and with the alkaloidal fraction (AF) at C1- C3 concentrations. The same letters in each column mean no significant difference ( $p < 0.05$ ).

**Figure 6.** Toxicity test (% survival) of flies with AD genotype (AD-like) untreated and treated with the vehicle and the alkaloidal fraction (AF) at C1-C3 concentrations. Values expressed as percentage of fly survival. The same letters in each column mean no significant difference ( $p < 0.05$ ).

**Figure 7.** PPI network of AF acting on *Drosophila melanogaster* targets which the opacity of the edges between the nodes refers to the level of confident.

**Figure 8.** GO analysis of *D. melanogaster* targets. The Y-axis shows the semantic space X and the X-axis represents the Log10 p-value. Darker color corresponds to a smaller log10 p-value.

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo II

- S1.** The information of 79 targets predicted
- S2.** Biological process under GO terms
- S3.** The information of 53 D. melanogaster targets predicted
- S4.** Biological process under GO terms for D. melanogaster

## LISTA DE ABREVIATURAS

DA - Doença de Alzheimer

NT - Neurofibrilas da proteína tau

A $\beta$  - Peptídeos beta amiloide

PPA - Proteína precursora amiloide

SNC - Sistema nervoso central

$\alpha$ -secretase - Enzima alfa-secretase

$\gamma$ -secretase – Enzima gama-secretase

sPPA $\alpha$  - Peptídeo amiloide alfa solúvel

$\beta$ -secretase - Enzima beta-secretase

IL-6 - Interleucina 6

IL-1 $\beta$  - Interleucina 1 $\beta$

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa

ChAT - Colina acetiltransferase

AChE - Enzima acetilcolinesterase

ACh - Acetilcolina

CCDV - Canais de cálcio dependentes de voltagem

MACHRs – Receptores colinérgicos muscarínicos

NACHRs – Receptores colinérgicos nicotínicos

*D. melanogaster* – *Drosophila melanogaster*

Bace - Enzima de clivagem do sítio beta de PPA

NMDA – Receptor N-metil-D-aspartato

## Sumário

Apresentação .....	1
Capítulo I – Fundamentação teórica .....	2
1 Alzheimer .....	2
1.1 Conceito e história da doença de Alzheimer .....	2
1.2 Fisiopatologia .....	3
1.2.1 Fisiopatologia geral .....	3
1.2.2 Via amiloidal .....	4
1.2.3 Via colinérgica .....	6
1.3 Modelo experimental .....	9
1.3.1 <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo .....	9
1.3.2 Método de rede de interações .....	11
1.4 Tratamento .....	13
1.5 Produtos naturais e <i>Annona crassiflora</i> .....	14
Referências .....	16
Capítulo II .....	24
Resumo .....	24
Abstract .....	25
1 . Introduction .....	28
2. Materials and methods .....	29
2.1 Alkaloid fraction acquisition .....	29
2.1.1 Plant material .....	29
2.1.2 Ethanolic Extraction .....	29
2.1.3 Liquid-Liquid Partitioning .....	29
2.2 <i>Drosophila melanogaster</i> .....	30
2.3 <i>In silico</i> analysis .....	30
2.3.1 Target prospection and ortholog for <i>Drosophila melanogaster</i> .....	30
2.3.2 Network preparation .....	31
2.3.3 GO analysis .....	31
2.4 <i>In vitro</i> assays .....	31
2.4.1 Cholinesterase inhibition .....	31
2.5 <i>In vivo</i> assays .....	31

2.5.1 Motility evaluation .....	31
2.5.2 Cholinergic activity .....	32
2.5.3 Toxicity .....	32
2.6 Statistics .....	32
3. Results .....	33
3.1 Target prediction and network for <i>Homo sapiens</i> .....	33
3.2 GO enrichment analysis .....	33
3.3 Acetylcholinesterase inhibition <i>in vitro</i> .....	34
3.4 Motility assay.....	35
3.5 Acetylcholinesterase activity <i>in-vivo</i> .....	36
3.6 Toxicity .....	36
3.7 Network and GO analysis for <i>Drosophila melanogaster</i> .....	37
4. Discussion .....	39
References .....	42
SUPPLEMENTAL MATERIAL - S1. The information of 79 targets predicted ...	47
S2. Biological process under GO terms .....	48
S3. The information of 53 <i>D. melanogaster</i> targets predicted .....	49
S4 Biological process under GO terms for <i>D. melanogaster</i> .....	50

## **Apresentação**

Essa dissertação está organizada em dois capítulos, conforme detalhamento a seguir. O capítulo redigido especificamente para este documento está no idioma Português. O artigo que está em fase de submissão para periódico, está redigido no idioma Inglês.

O primeiro capítulo apresenta uma revisão dissertativa da literatura sobre a Doença de Alzheimer e sua fisiopatologia, bem como modelos de estudo e perspectivas de tratamento, principalmente a partir de produtos naturais e a planta *Annona Crassiflora* que contém alcaloides potenciais para a terapêutica. Os conceitos fundamentais e alguns destaques de estudos publicados na temática desta dissertação estão descritos neste capítulo.

O segundo capítulo é composto pelo artigo original intitulado “Evaluation of *Annona crassiflora* alkaloidal fraction in the *Drosophila melanogaster* beta-amyloid model and its mechanism investigation based on network pharmacology”, que está em processo de submissão para a revista *Bioorganic chemistry*, Qualis A2; Fator de Impacto 2019: 4.831

## Capítulo I – Fundamentação teórica

### 1 Alzheimer

#### 1.1 Conceito e história da doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer foi descrita em 4 de novembro de 1906 no 37º Encontro de Psiquiatras do Sudeste da Alemanha. O médico psiquiatra Alois Alzheimer (figura 1) apresentou um trabalho intitulado “Eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde” que pode ser traduzido para “Uma doença peculiar dos neurônios do córtex cerebral”, no qual é descrito um caso de uma mulher de 51 anos, Auguste Deter (ZILKA; NOVAK, 2006), que apresentou deficiência cognitiva, perda de memória e dificuldade em socialização como sintomas. Após a sua morte Alois pôde analisar o cérebro dessa paciente na escola médica de Munique. Usando o método de coloração de prata, observou novos tipos de fibras e placas neuríticas. A partir desta neuropatologia e de sintomas descritos que se direcionou os estudos posteriores para a patologia. Este evento ficou conhecido como a descoberta da doença de Alzheimer (HIPPIUS; NEUNDORFER, 2003).



Fonte: Hippius e Neundorfer, 2003



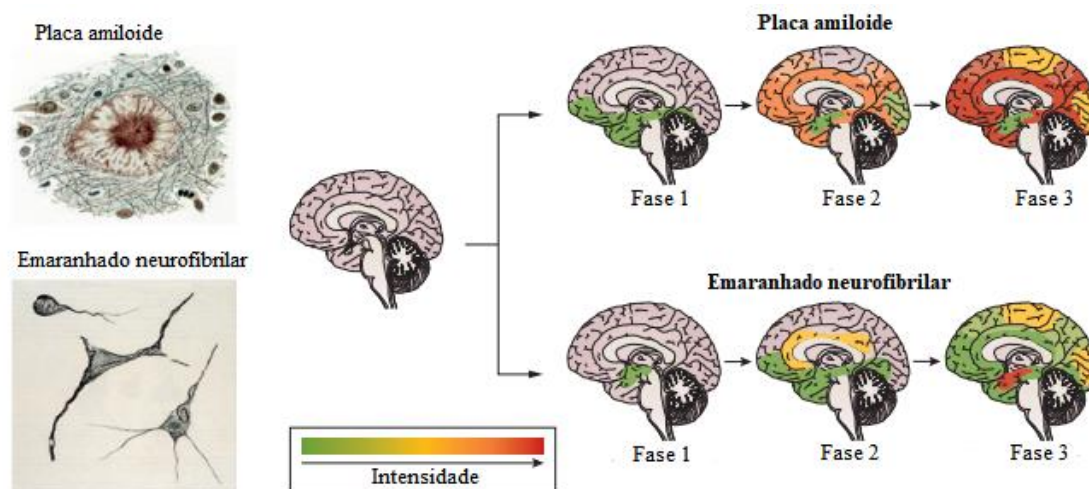
**Figura 1.** Alois Alzheimer, o médico psiquiatra que relatou e descreveu a doença de Alzheimer pela primeira vez.

## **1.2 Fisiopatologia**

### **1.2.1 Fisiopatologia geral**

A doença de Alzheimer (DA) é caracterizada por uma perda progressiva de sinapses e neurônios no córtex cerebral. A nível macroscópico, isto resulta em um típico padrão simétrico de atrofia cortical que afeta os lobos temporais mediais e os corticais motor, sensorial e visual primários. Devido a esta alteração estrutural no cérebro, os ventrículos laterais contendo líquido cefalorraquidiano são frequentemente encontrados maiores (DICKERSON; BAKKOUR; SALAT; FECZKO *et al.*, 2009).

As principais características fisiopatológicas da DA são o aumento da formação de placas amiloides no meio extracelular e neurofibrilas da proteína tau (NT) no meio intracelular. A deposição de placas precede as alterações neurofibrilares e neuríticas com origem aparente nos lóbulos frontal e temporal, hipocampo e sistema límbico; já as NT que formam o emaranhado neurofibrilar, começam nos lóbulos temporais mediais e hipocampo, e progressivamente se espalham para outras áreas como visto na figura 2 (MASTERS; BATEMAN; BLENNOW; ROWE *et al.*, 2015). As NT são formadas quando a proteína tau se desliga dos microtúbulos por excesso de atividade das quinases ou redução da atividade das fosfatases, sofrendo assim uma hiperfosforilação (CHENG; BAI, 2018). As NT são caracterizadas por filamentos helicoidais emparelhados, fibrilas de aproximadamente 10nm de diâmetro que se juntam numa conformação tridimensional helicoidal (CROWTHER, 1991). As NT provocam neurodegeneração como consequência da perda da função estrutural do citoesqueleto, comprometendo o transporte axonal, gerando disfunção sináptica e morte neuronal. Além da perda de função estrutural, também têm um efeito tóxico, desencadeando estresse oxidativo e processo inflamatório (FANI; AHMAD; IKRAM; GHANBARI *et al.*, 2020; HOFFMAN; HANNEMAN; MORENO, 2020).



Fonte: Masters; Bateman; Blennow; Rowe *et al.*, 2015

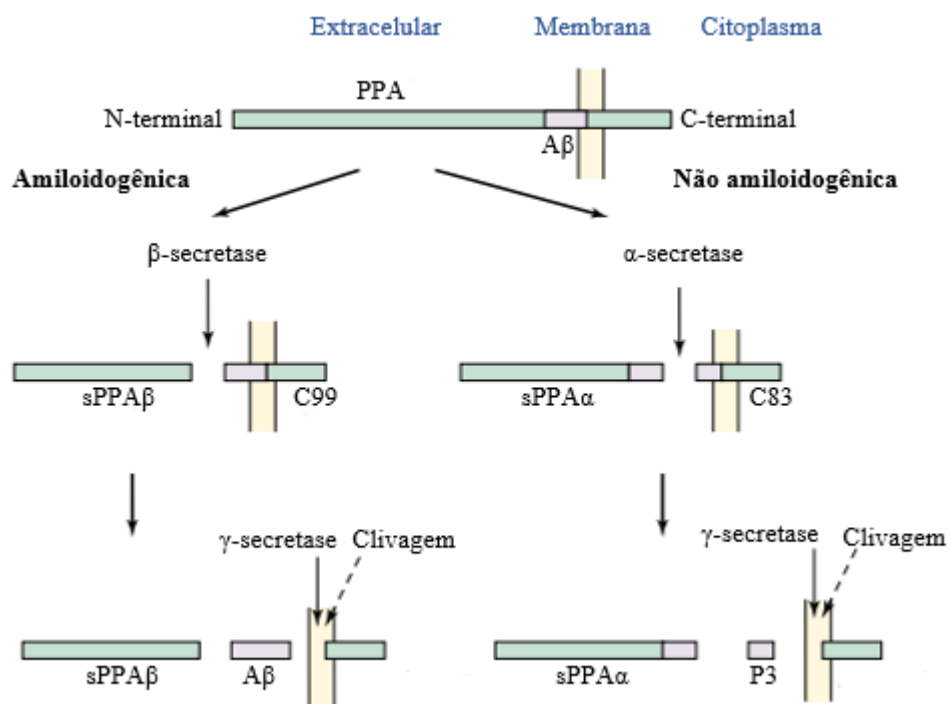
**Figura 2.** Demonstração do desenvolvimento das placas amiloides e emaranhados neurofibrilares ao longo da DA, em que na fase inicial se encontra principalmente no lóbulo temporal e se intensifica em outras áreas com o progresso da doença.

### 1.2.2 Via amiloide

As placas amiloides estão no meio extracelular e são formadas por acúmulo de peptídeos beta amiloide ( $A\beta$ ) que podem variar de 10 e 160nm de tamanho. Existem dois tipos diferentes de placas amiloides: placas difusas e as placas de núcleo denso. As placas de núcleo denso são normalmente neuríticas, rodeadas por neurites (axônios degenerados e dendritos). Encontram-se abundantemente no cérebro dos pacientes com DA. Por outro lado, placas difusas são normalmente encontradas no cérebro dos idosos cognitivamente normais (MASLIAH; TERRY; MALLORY; ALFORD *et al.*, 1990; ZHANG; LEI; LIU; ZHANG *et al.*, 2015). A estrutura das placas de núcleo denso consiste num núcleo central em forma de estrela. As fibras estendem-se até à periferia, onde são combinadas com astrócitos, micróglia e neurônios, também conhecidos como neurites distróficas. Essas neurites distróficas de origem axonal ou dendrítica, na maioria dos casos contêm filamentos helicoidais emparelhados, bem como mitocôndrias anormais abundantes e corpos densos de provável origem mitocondrial (OKAMOTO; YAMAGUCHI; HIRAI; SHOJI *et al.*, 1989).

Placas difusas podem demonstrar uma leve atividade A $\beta$ -imunorreativa sem um núcleo fibrilar compacto claro (JOACHIM; MORRIS; SELKOE, 1989).

A formação e deposição de placas amiloides no sistema nervoso central (SNC) ocorre por meio da proteína precursora amiloide (PPA), quando a mesma sofre uma clivagem anormal (UDDIN; KABIR; TEWARI; MAMUN *et al.*, 2020). A clivagem da PPA pode acontecer por duas vias principais, a via não amiloidogênica e a via amiloidogênica. A não amiloidogênica, também conhecida como via fisiológica, é a via mais recorrente, onde a PPA é clivada pela alfa-secretase ( $\alpha$ -secretase), e posteriormente clivada pela enzima gama-secretase ( $\gamma$ -secretase), gerando uma proteína precursora amiloide alfa solúvel (sPPA $\alpha$ ). Já na via amiloidogênica, a via menos comum, a clivagem da PPA é realizada por outra enzima, a beta secretase ( $\beta$ -secretase), e depois pela  $\gamma$ -secretase, gerando o peptídeo beta amiloide (A $\beta$ ), como visto na figura 3. A liberação do fragmento A $\beta$  no espaço extracelular é seguido por agregação destes peptídeos até a formação de placas amiloides. Esses fragmentos em excesso no meio extracelular formam agregados com efeitos neurotóxicos e neurodegenerativos (ANDREEVA; LUKIW; ROGAEV, 2017; VARDY; CATTO; HOOPER, 2005).



Fonte: Vardy, Catto e Hooper, 2005.

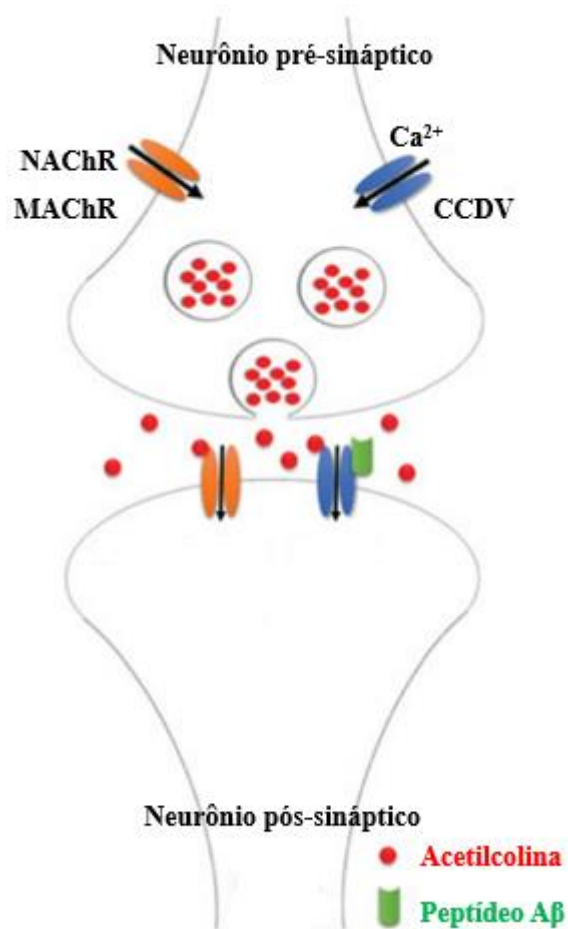
**Figura 3.** Processamento proteolítico da PPA, desencadeando a via amiloidogênica e não amiloidogênica.

A formação de placas amiloides é acompanhada pelo aumento de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo, o que aumenta ainda mais o processo de deposição de A $\beta$ . Adicionalmente, com o envelhecimento ocorre um comprometimento funcional da mitocôndria, levando a piora deste processo de estresse oxidativo, conseqüentemente, morte neuronal, assim entrando em um ciclo de estresse oxidativo e inflamação caracterizando, dessa forma, um efeito cascata (BARAGE; SONAWANE, 2015; DA MESQUITA; FERREIRA; SOUSA; CORREIA-NEVES *et al.*, 2016). Esta neuroinflamação, também descrita na fisiopatologia da DA e na hipótese da cascata amiloidal, ocorre ao redor dos depósitos de A $\beta$ , em que há um aumento de mediadores inflamatórios, como interleucinas IL-6 e IL-1 $\beta$ , fator de necrose tumoral TNF- $\alpha$  e também a presença de micróglia, ativadas quando o tecido cerebral sofre qualquer tipo de dano, atuando para remover células danificadas ou mortas deste tecido (DA MESQUITA; FERREIRA; SOUSA; CORREIA-NEVES *et al.*, 2016; SHIPPY; ULLAND, 2020). Com a formação das placas amiloides há uma perda do número de sinapses e, conseqüentemente, uma redução seletiva de neurônios colinérgicos nas vias do lobo frontal e hipocampo (PEI; DAVIES; ZHANG; ZHANG, 2020).

### **1.2.3 Via colinérgica**

Ao prejudicar seletivamente estes grupos de neurônios colinérgicos no hipocampo, córtex frontal, amígdala, núcleo basal e septo medial, ocorre déficit de funções importantes em processos de aprendizagem, concentração e memória. Assim, a via colinérgica tornou-se uma das primeiras teorias propostas na tentativa de explicar a doença de Alzheimer, proposta há mais de 30 anos (LIU; XIE; MENG; KANG, 2019). O sistema colinérgico é constituído principalmente por duas enzimas, a colina acetiltransferase (ChAT) e a acetilcolinesterase (AChE) responsáveis pela biossíntese da acetilcolina (ACh) e pela hidrólise da mesma, respectivamente, além dos receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos.

No neurônio pré-sináptico, pela ação da enzima colina ChAT, ocorre a biossíntese da ACh a partir de colina e o cofator acetil-CoA. Após sintetizada, ACh é transportada em vesículas pelo axônio através de estímulo elétrico e liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular pelos canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV). Esse impulso terá que atingir as extremidades do axônio da célula pré-sináptica, para então ocorrer à liberação de ACh no espaço sináptico (PEREDA, 2014). Então, a ACh pode ligar-se reversivelmente aos receptores colinérgicos, nicotínicos e muscarínicos, produzindo outro estímulo elétrico no órgão efector (CARLSON; KRAUS, 2020), processo esquematizado na figura 4.



Fonte: Adaptado de Hassan; Abbas; Seo; Shahzad *et al.*, 2018

**Figura 4.** Neurotransmissão colinérgica a partir da biossíntese da acetilcolina no neurônio pré-sináptico, que com o aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular pelos canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV) é liberada para a fenda sináptica e assim agir em seus receptores muscarínicos e nicotínicos (MACHRs

e NACHRs). Na doença de Alzheimer também irá ocorrer a interação do peptídeo A $\beta$  comprometendo a neurotransmissão.

Quando a ACh ativa os receptores muscarínicos (MACHRs) no sistema nervoso periférico, ela estimula o relaxamento de vasos sanguíneos periféricos, regulação da frequência cardíaca, e a constrição das vias respiratórias entre outros. No sistema nervoso central, ela é responsável por funções cognitivas como concentração, aprendizado, e modulação do estresse, dentre outros. No sistema nervoso central, a inervação colinérgica que atua através de NACHRs (receptores nicotínicos da acetilcolina) regula processos como a excitabilidade celular, liberação do transmissor, e integração neuronal, que são cruciais para as funções fisiológicas (CARLSON; KRAUS, 2020). Após o término do estímulo no receptor colinérgico, a ACh sofre uma reação de hidrólise, catalisada pela enzima AChE, formando acetato e colina. Esta última pode ser reutilizada para biossíntese de ACh no neurônio pré-sináptico, e assim inicia um novo ciclo de biossíntese da acetilcolina. Falhas em qualquer dessas etapas de neurotransmissão colinérgica interfere na ação biológica proporcionada pela ativação dos receptores colinérgicos, o que pode causar alterações neuropatológicas observadas em pacientes com Alzheimer, como por exemplo, redução da liberação de acetilcolina na região de sinapse neuronal, decréscimo da densidade de receptores muscarínicos, deficiências no transporte axonal e problemas de recaptção da colina para o neurônio pré-sináptico (MANUEL; LOMBARDERO; LAFERLA; GIMENEZ-LLORT *et al.*, 2016; OLIVEIRA; EDSALL; WOODS; BATES *et al.*, 2019).

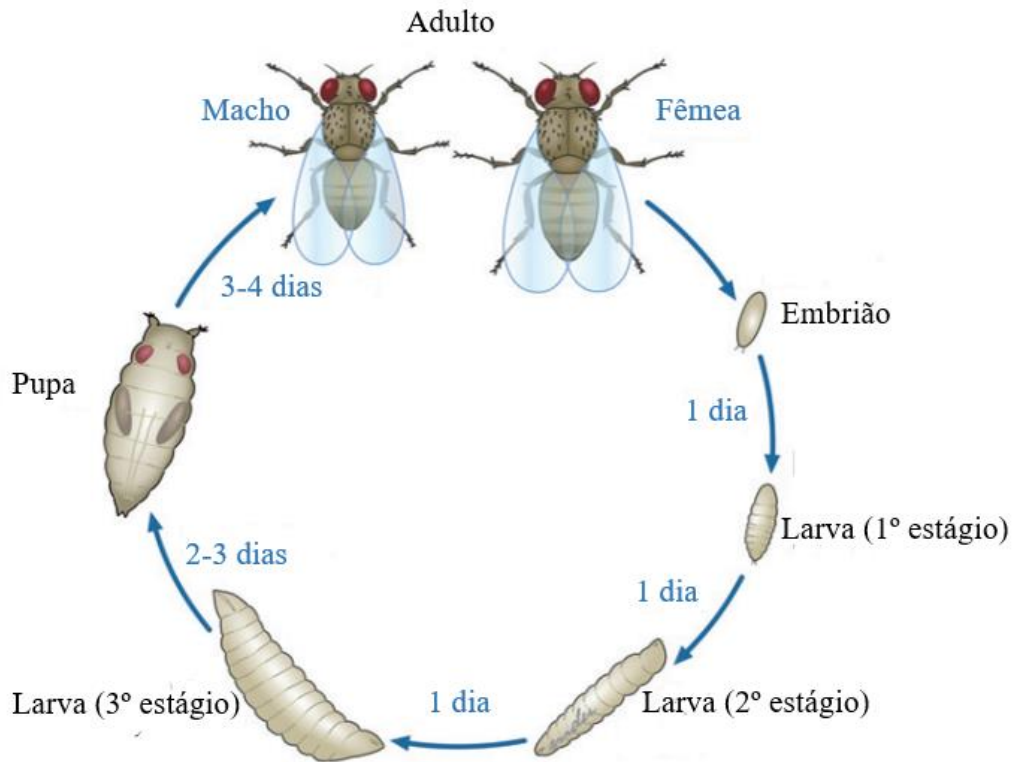
A disfunção colinérgica é uma das principais alterações patológicas na DA, embora a perda neural seja causada pela toxicidade das placas beta-amiloides e emaranhados neurofibrilares, existe uma relação entre comprometimento cognitivo e a diminuição da transmissão colinérgica no cérebro com DA, mas por si só a relação não estabelece a causalidade definitiva da doença de Alzheimer (KNAKKER; OLAH; TRUNK; LENDVAI *et al.*, 2021). A AChE é uma enzima classificada como serina hidrolase, que é encontrada na superfície de eritrócitos e tecido muscular, mas predominantemente no SNC (TRANG; KHANDHAR, 2020). O principal papel biológico da acetilcolinesterase é a hidrólise rápida da acetilcolina terminando a transmissão colinérgica. Além

disso, verificou-se que a AChE tem também uma função não colinérgica nas fases iniciais de DA. A AChE liga-se ao peptídeo A $\beta$ , e acelera a sua polimerização em oligômeros e fibrilas (GARCIA-AYLLON; SMALL; AVILA; SAEZ-VALERO, 2011). Assim, a sua inibição ainda é uma das estratégias mais bem sucedidas no reforço da transmissão colinérgica e se faz necessário mais estudos para conseguir menores efeitos adversos e uma ação em diferentes alvos, como já demonstrado em *Drosophila melanogaster* (BEG; JYOTI; NAZ; RAHUL *et al.*, 2018; WESTFALL; LOMIS; PRAKASH, 2019).

### **1.3 Modelo experimental**

#### **1.3.1 *Drosophila melanogaster* como modelo**

A mosca da fruta, *Drosophila melanogaster*, é um organismo bastante simples e tem sido amplamente utilizado para estudar doenças humanas e suas patologias para identificar os seus genes relacionados (BOLUS; CROCKER; BOEKHOFF-FALK; CHTARBANOVA, 2020). Uma análise do genoma de *D. melanogaster* demonstrou que mais de 75% dos genes relacionados com doenças humanas têm ortólogos em *D. melanogaster* (REITER; POTOCKI; CHIEN; GRIBSKOV *et al.*, 2001). O uso de moscas como modelo simula as principais características dos genes humanos, doenças neurodegenerativas, como DA, doença de Parkinson e doença de Huntington (BOLUS; CROCKER; BOEKHOFF-FALK; CHTARBANOVA, 2020). Estes modelos apresentam diversas vantagens; o cérebro da mosca é constituído por mais de 300.000 neurônios além de mostrar semelhanças com cérebros de mamíferos em termos de funções e componentes do tipo celular. São organizados em áreas separadas, e cada uma com funções especializadas como a memória, a aprendizagem, visão e olfato. As moscas, comparadas a outros modelos como roedores, são de baixo custo e fácil manutenção, além de ter um ciclo de vida curto com um tempo de geração de aproximadamente 10 dias (Figura 5).



Fonte: Adaptado de Ong; Yung; Cai; Bay *et al.*, 2015

**Figura 5.** Desenvolvimento de um ovo fértil para uma mosca adulta durante um período de 10 dias. Após a eclosão, as larvas passam por três estágios antes de atingirem a pupa. Durante a pupa, ocorre uma metamorfose para a mosca adulta.

O ciclo de vida da *Drosophila melanogaster* desde o desenvolvimento de um ovo fértil até uma mosca adulta, é de um período de 10 dias quando mantidas a 25 °C. Depois de eclodido, as larvas passam por três fases antes de atingirem a pupa. Durante a fase de pupa, ocorre a metamorfose para uma mosca adulta. Estes estoques de moscas são particularmente vantajosos devido à ampla bateria de ferramentas genéticas que foram desenvolvidas para a sua investigação. O sistema GAL4/UAS é um bom exemplo. Permite a expressão espaço-temporal de um gene alvo tal como o gene humano, que se relaciona com DA (CAYGILL; BRAND, 2016). Neste sistema, o ativador de transcrição de levedura GAL4 liga-se ao intensificador UAS e inicia a transcrição. Vários recursos públicos fornecem grandes coleções de linhagem de condutor de tecido ou tipo de celular específicos do GAL4, bibliotecas de linhagens para RNAi e transgênicas. A *Drosophila melanogaster* possui numerosos componentes



moleculares relacionados com processamento PPA: APPL (proteína precursora beta-amiloide, relacionada à PPA humana), Bace (enzima de clivagem do sítio beta de PPA, relacionada à BACE1 humana também conhecida como  $\beta$  secretase). No entanto, a APPL não contém a sequência geradora do  $\beta$  amiloide e A $\beta$  não foi encontrado em condições fisiológicas (ROSEN; MARTIN-MORRIS; LUO; WHITE, 1989). Mesmo assim, uma abordagem vem sendo utilizada para gerar moscas como modelo de AD. A abordagem consistiu na reconstituição do sistema PPA/secretase humano em *D. melanogaster*, em que Greeve et al. produziram moscas transgênicas tanto para BACE1 quanto para PPA humana. Deste modo, a mosca passou a dispor de um mecanismo de clivar corretamente a PPA humana, capazes então de replicar o processamento e a produção de PPA e peptídeos amiloides (GREEVE; KRETZSCHMAR; TSCHAPE; BEYN *et al.*, 2004). Neste modelo, houve a expressão sistêmica, levando a uma diminuição do tempo de vida e a defeitos no desenvolvimento de veias das asas das moscas. Quando os transgenes eram expressos no olho, foi observado o depósito de placas na retina, associadas à degeneração da retina e dos neurónios subjacentes no olho (GREEVE; KRETZSCHMAR; TSCHAPE; BEYN *et al.*, 2004). Também pode-se direcionar a expressão para o SNC, demonstrando efeitos neurodegenerativos (CHAKRABORTY; VEPURI; MHATRE; PADDOCK *et al.*, 2011). Este modelo relativamente complexo, baseado em PPA, é muito útil para a avaliação dos moduladores do metabolismo de BACE ou PPA, e todo o metabolismo envolvido na consequência dos A $\beta$  gerados (CHENG; SONG; DU; GAUR *et al.*, 2020; DISSEL; KLOSE; DONLEA; CAO *et al.*, 2017; KONG; LI; FU; WAN *et al.*, 2016).

### 1.3.2 Método de rede de interações

Além do modelo animal, métodos computacionais ganharam grande aporte para auxiliar nos experimentos, direcionando ou confirmando dados obtidos experimentalmente (HASSAN; ABBAS; SEO; SHAHZADI *et al.*, 2018). E para o Alzheimer não é diferente, desde modelagem molecular, *docking*, dinâmica e análise de rede (HASSAN; SHAHZADI; ALASHWAL; ZAKI *et al.*, 2018; WANG; TAN; TAN; YU, 2019; YOUSSEF; HAGGAG; ELSHAMY; RABEH *et al.*, 2019).

Ao se utilizar a análise em rede, e mais específica, uma farmacologia em rede, várias aplicações estão disponíveis, por exemplo descobrir qual experimento realizar para um conjunto de compostos. Partindo de moléculas identificadas, em plantas e seus extratos, pode-se prever *in silico* os alvos e dessa relação de alvos-compostos construir uma rede de interação. Essa rede alvos-compostos pode conter informações valiosas como vias metabólicas, processos biológicos e doenças associadas (SHI; LI; XIE; ZHOU *et al.*, 2020).

Outra forma de se utilizar esta metodologia, seria para avaliar somente uma doença específica. Em que construindo uma rede de interação proteína-proteína, com aquelas proteínas conhecidas relacionadas a doença, pode-se acrescentar outras informações para a doença com uma visão geral. Além disso, tem a possibilidade da associação de redes, por exemplo, a rede de alvos de compostos com a rede específica da doença, podendo assim obter relações diretas dos compostos com esta doença (GE; HE, 2020). A última funcionalidade para o uso desta metodologia é a validação ou elucidação do mecanismo biológico, tanto para confirmar um experimento já realizado ou para direcionar novos experimentos a partir do mecanismo mostrado (WU; HU, 2020).

O método de rede vem sendo muito utilizado para descobertas de alvos dos compostos bioativos presentes nas plantas usadas como chás e outras formulações pela medicina tradicional chinesa (MTC). O conhecimento associado às diversas plantas utilizadas na MTC tem proporcionado, pela abordagem de rede, e que contém diversas plantas muito bem descritas, bem como os chás utilizados popularmente, o que rendeu a desvendar o mecanismo de ação para doenças neurodegenerativas bem como a elucidação de novas aplicabilidades. (LUO; LU; YAN; XIAO *et al.*, 2020; WANG; ZHOU; HAN; ZHAI *et al.*, 2020; ZENG; LI; SIU; JIN *et al.*, 2019).

Como a DA é uma doença multifatorial, é de extrema importância considerar a complexidade de sua fisiopatologia. Com a metodologia de rede pode se ter uma visão generalizada do mecanismo de ação e direcionamento de futuros estudos para facilitar a descoberta de um tratamento eficaz (WANG; TAN; TAN; YU, 2019; ZENG; LI; SIU; JIN *et al.*, 2019; ZHANG; YI; YANG; HUANG *et al.*, 2020).

## 1.4 Tratamento

Atualmente, não se tem tratamento para DA capaz de oferecer cura efetiva da doença, mas sim uma resolução sintomática buscando atenuar os sintomas e/ou a evolução da doença, intervendo na formação de fragmentos insolúveis de peptídeo A $\beta$ ; recuperação cognitiva com inibição da AChE e a modulação de receptores colinérgicos; e receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (BENEK; KORABECNY; SOUKUP, 2020). No que tange o tratamento para estabilização da DA, são utilizadas várias abordagens, como: drogas anti-inflamatórias, terapias anti-amiloides, uso de agonistas muscarínicos antioxidantes, moduladores da transmissão de glutamato e agentes capazes de alterar o processo de fosforilação da proteína tau (BACHURIN; BOVINA; USTYUGOV, 2017; CAO; HOU; PING; CAI, 2018). Os fármacos atualmente aprovados pelo FDA são: donepezil, rivastigmina, galantamina e memantina (BENEK; KORABECNY; SOUKUP, 2020). A memantina é o único antagonista de receptores NMDA com uma inibição de forma moderada e não competitiva, o que ameniza a toxicidade do glutamato e gera uma ação protetora ao tecido cerebral (ROBINSON; KEATING, 2006). Devido ao seu mecanismo que evita o influxo excessivo de Ca<sup>2+</sup> para dentro do citoplasma dos neurônios, ela tem sido aplicada nos estágios moderados a graves da DA (PARSONS; DANYSZ; DEKUNDY; PULTE, 2013; ROBINSON; KEATING, 2006).

O donepezil é um inibidor da AChE com inibição reversível não competitiva que melhora significativamente os sintomas da DA. (KUMAR; SHARMA, 2020). Contudo, ao utilizar o sistema citocromo P450 na sua metabolização, favorece o desenvolvimento de interações medicamentosas, sendo então indicado o seu uso com cautela (KAGAWA; YAMAMOTO; UENO; MAEDA *et al.*, 2020).

A rivastigmina, também inibidor da AChE, é uma droga derivada da fisostigmina, com inibição pseudoirreversível da AChE e butirilcolinesterase

(BChE), o que prolonga não só a atividade desta droga no organismo mas também os benefícios desse tratamento. É uma droga que apresenta boa atividade e tolerância por parte dos portadores da DA e não envolve o sistema citocromo P450 na sua metabolização, reduzindo a possibilidade de ocorrerem interações medicamentosas com outras drogas, melhorando a cognição e gerando efeitos neuroprotetores nesses pacientes (HAAKE; NGUYEN; FRIEDMAN; CHAKKAMPARAMBIL *et al.*, 2020; RAY; MALONEY; SAMBAMURTI; KARNATI *et al.*, 2020).

O último deles, A galantamina, tem origem natural e é um alcaloide terciário extraído de várias espécies de Amarillidaceae, caracterizado como um inibidor competitivo e reversível da AChE. Além dessa inibição, demonstra baixa hepatotoxicidade e uma ação moduladora de receptores nicotínicos (HAAKE; NGUYEN; FRIEDMAN; CHAKKAMPARAMBIL *et al.*, 2020; LILIENFELD, 2002).

### **1.5 Produtos naturais e *Annona crassiflora***

Como a galantamina, produtos naturais são utilizados em diversas abordagens terapêuticas e têm se destacado na DA por geralmente apresentarem mais de um grupo ativo em suas moléculas, o que é uma vantagem em doenças multifatoriais como a DA. Várias substâncias de origem natural têm sido estudadas com potencial farmacológico anti-Alzheimer entre eles: alcaloides, flavonoides, terpenos, cumarinas, polifenóis e outros (ANDRADE; RAMALHO; LOUREIRO; PEREIRA, 2019). Os alcaloides apresentaram uma notável atividade inibitória da AChE bem como outros benefícios ao Alzheimer como efeito neuroprotetor, antioxidante e inibidor da morte celular induzida por peptídeos A $\beta$  (NG; OR; IP, 2015). Neste mesmo estudo foram demonstradas diversas espécies vegetais com potencial terapêutico, incluindo aquelas pertencentes à família *Papaveraceae*, *Amarillidaceae* e *Solanaceae*. Somado a isso, um estudo recente mostrou uma planta da família *Annonaceae* com alto potencial por conter diversos alcaloides, a *Annona crassiflora* (BASBOSA, 2018).



Fonte: Arruda e Pastore, 2019

**Figura 6.** A planta *Annona crassiflora* Mart. A, Árvore; B, Tronco; C, Tronco e ramos; D, Folhas; E, Botões de flor; F, Flor; G, Flor com pétalas; H, Fruto não maduro; I, Fruto maduro; J, Secção transversal de fruta; K, Polpa; L, Sementes.

*Annona crassiflora* Mart. (figura 6) é uma espécie nativa do Cerrado, ou savana brasileira, e seu fruto é popularmente conhecido como marolo ou araticum (EGYDIO; VALVASSOURA; SANTOS, 2013; PIMENTA; SILVA; ZUFFELLATO-RIBAS; KOEHLER, 2014). Pertencente à família *Annonaceae*, que inclui cerca de 27 gêneros e 290 espécies, integrando a fruta do Conde (*Annona squamosa*), a Graviola (*Annona muricata*) e o próprio Marolo ou Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) (ALMEIDA; PROENÇA; RIBEIRO, 1994). Essas plantas geralmente são consumidas *in natura* e são encontradas em áreas rurais (ALMEIDA; PROENÇA; RIBEIRO, 1994). Muitas espécies dessa família

são utilizadas na medicina popular, além de que têm sido estudadas com o objetivo de caracterizar as diversas classes de compostos, isolar e obter frações enriquecidas a fim de avaliar as suas propriedades farmacológicas (FORMAGIO; VIEIRA; VOLOBUFF; SILVA; *et al.*, 2015).

O uso popular da *Annona crassiflora* vai desde combate a piolhos, picada de cobra, bem como atividade inseticida, antimicrobiana e antirreumática (SILVA; RABELO; ENOQUE, 2015). Também já foram realizadas avaliações biológicas dos extratos das diferentes partes da planta, que comprovam as atividades: antioxidante e inibição de enzimas como alfa amilase (JUSTINO; PEREIRA; VILELA; PEIXOTO *et al.*, 2016). Os metabólitos secundários já identificados mostram uma variedade de compostos fenólicos (JUSTINO; PEREIRA; VILELA; PEIXOTO *et al.*, 2016), mas o principal avaliado neste trabalho são os alcaloides (BASBOSA, 2018). A família *Annonaceae* já apresenta um histórico de alcaloides que demonstraram as atividades como antimicrobianas, antitumoral, citotóxicas e antimaláricas (LUCIO; ALMEIDA; DA-CUNHA; TAVARES *et al.*, 2015). Mas os alcaloides presentes na casca do fruto de *A. crassiflora*, ainda foram poucos explorados, desde isolados com inibição da lipase, e ação antinociceptiva e inflamatória pela estefalagina (JUSTINO; BARBOSA; NEVES; SILVA *et al.*, 2020) como de inibição da acetil colinesterase *in vitro* (BARBOSA, 2018), sendo já identificado outros alcaloides como liriodenina, aterospermidina, dehidroeremina, dehidroestefalagina e xilopina. Essa fração alcaloidal ainda pode ser melhor explorada dado o seu potencial terapêutico.

### **Referências**

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; RIBEIRO, J. F. Cerrado: espécies vegetais úteis. Embrapa-CPAC, Planaltina, 1994

ANDRADE, S.; RAMALHO, M. J.; LOUREIRO, J. A.; PEREIRA, M. D. C. Natural Compounds for Alzheimer's Disease Therapy: A Systematic Review of Preclinical and Clinical Studies. **Int J Mol Sci**, 20, n. 9, May 10 2019.

ANDREEVA, T. V.; LUKIW, W. J.; ROGAEV, E. I. Biological Basis for Amyloidogenesis in Alzheimer's Disease. **Biochemistry (Mosc)**, 82, n. 2, p. 122-139, Feb 2017.

ARRUDA, H. S.; PASTORE, G. M. Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of nutrients and bioactive compounds for food and non-food purposes: A comprehensive review. **Food Res Int**, 123, p. 450-480, Sep 2019.

BACHURIN, S. O.; BOVINA, E. V.; USTYUGOV, A. A. Drugs in Clinical Trials for Alzheimer's Disease: The Major Trends. **Med Res Rev**, 37, n. 5, p. 1186-1225, Sep 2017.

BARAGE, S. H.; SONAWANE, K. D. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. **Neuropeptides**, 52, p. 1-18, Aug 2015.

BARBOSA, Marília Fontes. Estudo químico e avaliação anticolinesterásica dos alcaloides isolados da casca do fruto de *Annona crassiflora*. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018

BEG, T.; JYOTI, S.; NAZ, F.; RAHUL *et al.* Protective Effect of Kaempferol on the Transgenic *Drosophila* Model of Alzheimer's Disease. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, 17, n. 6, p. 421-429, 2018.

BENEK, O.; KORABECNY, J.; SOUKUP, O. A Perspective on Multi-target Drugs for Alzheimer's Disease. **Trends Pharmacol Sci**, 41, n. 7, p. 434-445, Jul 2020.

BOLUS, H.; CROCKER, K.; BOEKHOFF-FALK, G.; CHTARBANOVA, S. Modeling Neurodegenerative Disorders in *Drosophila melanogaster*. **Int J Mol Sci**, 21, n. 9, Apr 26 2020.

CAO, J.; HOU, J.; PING, J.; CAI, D. Advances in developing novel therapeutic strategies for Alzheimer's disease. **Mol Neurodegener**, 13, n. 1, p. 64, Dec 12 2018.

CARLSON, A. B.; KRAUS, G. P. Physiology, Cholinergic Receptors. *In: StatPearls*. Treasure Island (FL), 2020.

CAYGILL, E. E.; BRAND, A. H. The GAL4 System: A Versatile System for the Manipulation and Analysis of Gene Expression. **Methods Mol Biol**, 1478, p. 33-52, 2016.

CHAKRABORTY, R.; VEPURI, V.; MHATRE, S. D.; PADDOCK, B. E. *et al.* Characterization of a *Drosophila* Alzheimer's disease model: pharmacological rescue of cognitive defects. **PLoS One**, 6, n. 6, p. e20799, 2011.

CHENG, X.; SONG, C.; DU, Y.; GAUR, U. *et al.* Pharmacological Treatment of Alzheimer's Disease: Insights from *Drosophila melanogaster*. **Int J Mol Sci**, 21, n. 13, Jun 29 2020.

CHENG, Y.; BAI, F. The Association of Tau With Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease. **Front Neurosci**, 12, p. 163, 2018.

CROWTHER, R. A. Straight and paired helical filaments in Alzheimer disease have a common structural unit. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 88, n. 6, p. 2288-2292, Mar 15 1991.

DA MESQUITA, S.; FERREIRA, A. C.; SOUSA, J. C.; CORREIA-NEVES, M. *et al.* Insights on the pathophysiology of Alzheimer's disease: The crosstalk between amyloid pathology, neuroinflammation and the peripheral immune system. **Neurosci Biobehav Rev**, 68, p. 547-562, Sep 2016.

DICKERSON, B. C.; BAKKOUR, A.; SALAT, D. H.; FECZKO, E. *et al.* The cortical signature of Alzheimer's disease: regionally specific cortical thinning relates to symptom severity in very mild to mild AD dementia and is detectable in asymptomatic amyloid-positive individuals. **Cereb Cortex**, 19, n. 3, p. 497-510, Mar 2009.

DISSEL, S.; KLOSE, M.; DONLEA, J.; CAO, L. *et al.* Enhanced sleep reverses memory deficits and underlying pathology in *Drosophila* models of Alzheimer's disease. **Neurobiol Sleep Circadian Rhythms**, 2, p. 15-26, Jan 2017.

EGYDIO, A. P. M.; VALVASSOURA, T. A.; SANTOS, D. Y. A. C. Geographical variation of isoquinoline alkaloids of *Annona crassiflora* Mart. from cerrado, Brazil. **Biochemical Systematics And Ecology**, [S.L.], v. 46, p. 145-151, 2013.

FANI, L.; AHMAD, S.; IKRAM, M. K.; GHANBARI, M. *et al.* Immunity and amyloid beta, total tau and neurofilament light chain: Findings from a community-based cohort study. **Alzheimers Dement**, Nov 20 2020.

FORMAGIO, A. S. N.; VIEIRA, M. C.; VOLOBUFF, C. R. F.; SILVA, M. S.; MATOS, A. I.; CARDOSO, C. A. L.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E. In vitro biological screening of the anticholinesterase and antiproliferative activities of medicinal plants belonging to Annonaceae. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, [S.L.], v. 48, n. 4, p. 308-315, 2015.



GARCIA-AYLLON, M. S.; SMALL, D. H.; AVILA, J.; SAEZ-VALERO, J. Revisiting the Role of Acetylcholinesterase in Alzheimer's Disease: Cross-Talk with P-tau and beta-Amyloid. **Front Mol Neurosci**, 4, p. 22, 2011.

GE, C.; HE, Y. In Silico Prediction of Molecular Targets of Astragaloside IV for Alleviation of COVID-19 Hyperinflammation by Systems Network Pharmacology and Bioinformatic Gene Expression Analysis. **Front Pharmacol**, 11, p. 556984, 2020.

GREEVE, I.; KRETZSCHMAR, D.; TSCHAPE, J. A.; BEYN, A. *et al.* Age-dependent neurodegeneration and Alzheimer-amyloid plaque formation in transgenic Drosophila. **J Neurosci**, 24, n. 16, p. 3899-3906, Apr 21 2004.

HAAKE, A.; NGUYEN, K.; FRIEDMAN, L.; CHAKKAMPARAMBIL, B. *et al.* An update on the utility and safety of cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. **Expert Opin Drug Saf**, 19, n. 2, p. 147-157, Feb 2020.

HASSAN, M.; ABBAS, Q.; SEO, S. Y.; SHAHZADI, S. *et al.* Computational modeling and biomarker studies of pharmacological treatment of Alzheimer's disease (Review). **Mol Med Rep**, 18, n. 1, p. 639-655, Jul 2018.

HASSAN, M.; SHAHZADI, S.; ALASHWAL, H.; ZAKI, N. *et al.* Exploring the mechanistic insights of Cas scaffolding protein family member 4 with protein tyrosine kinase 2 in Alzheimer's disease by evaluating protein interactions through molecular docking and dynamic simulations. **Neurol Sci**, 39, n. 8, p. 1361-1374, Aug 2018.

HIPPIUS, H.; NEUNDORFER, G. The discovery of Alzheimer's disease. **Dialogues Clin Neurosci**, 5, n. 1, p. 101-108, Mar 2003.

HOFFMAN, T. E.; HANNEMAN, W. H.; MORENO, J. A. Network Simulations Reveal Molecular Signatures of Vulnerability to Age-Dependent Stress and Tau Accumulation. **Front Mol Biosci**, 7, p. 590045, 2020.

JOACHIM, C. L.; MORRIS, J. H.; SELKOE, D. J. Diffuse senile plaques occur commonly in the cerebellum in Alzheimer's disease. **Am J Pathol**, 135, n. 2, p. 309-319, Aug 1989.

JUSTINO, A. B.; BARBOSA, M. F.; NEVES, T. V.; SILVA, H. C. G. *et al.* Stephalagine, an aporphine alkaloid from *Annona crassiflora* fruit peel, induces antinociceptive effects by TRPA1 and TRPV1 channels modulation in mice. **Bioorg Chem**, 96, p. 103562, Mar 2020.

JUSTINO, A. B.; PEREIRA, M. N.; VILELA, D. D.; PEIXOTO, L. G. *et al.* Peel of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of antioxidant compounds with alpha-amylase, alpha-glucosidase and glycation inhibitory activities. **Bioorg Chem**, 69, p. 167-182, Dec 2016.

KAGAWA, Y.; YAMAMOTO, Y.; UENO, A.; MAEDA, T. *et al.* Impact of CYP2D6, CYP3A5, and ABCB1 Polymorphisms on Plasma Concentrations of Donepezil and its Metabolite in Patients with Alzheimer's Disease. **Ther Drug Monit**, Oct 14 2020.

KNAKKER, B.; OLAH, V.; TRUNK, A.; LENDVAI, B. *et al.* Delay-dependent cholinergic modulation of visual short-term memory in rhesus macaques. **Behav Brain Res**, 396, p. 112897, Jan 1 2021.

KONG, Y.; LI, K.; FU, T.; WAN, C. *et al.* Quercetin ameliorates Abeta toxicity in *Drosophila* AD model by modulating cell cycle-related protein expression. **Oncotarget**, 7, n. 42, p. 67716-67731, Oct 18 2016.

KUMAR, A.; SHARMA, S. Donepezil. *In*: **StatPearls**. Treasure Island (FL), 2020.

LILIENFELD, S. Galantamine--a novel cholinergic drug with a unique dual mode of action for the treatment of patients with Alzheimer's disease. **CNS Drug Rev**, 8, n. 2, p. 159-176, Summer 2002.

LIU, P. P.; XIE, Y.; MENG, X. Y.; KANG, J. S. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. **Signal Transduct Target Ther**, 4, n. 1, p. 29, Aug 23 2019.

LUCIO, A. S.; ALMEIDA, J. R.; DA-CUNHA, E. V.; TAVARES, J. F. *et al.* Alkaloids of the Annonaceae: occurrence and a compilation of their biological activities. **Alkaloids Chem Biol**, 74, p. 233-409, 2015.

LUO, T. T.; LU, Y.; YAN, S. K.; XIAO, X. *et al.* Network Pharmacology in Research of Chinese Medicine Formula: Methodology, Application and Prospective. **Chin J Integr Med**, 26, n. 1, p. 72-80, Jan 2020.

MANUEL, I.; LOMBARDERO, L.; LAFERLA, F. M.; GIMENEZ-LLORT, L. *et al.* Activity of muscarinic, galanin and cannabinoid receptors in the prodromal and advanced stages in the triple transgenic mice model of Alzheimer's disease. **Neuroscience**, 329, p. 284-293, Aug 4 2016.

MASLIAH, E.; TERRY, R. D.; MALLORY, M.; ALFORD, M. *et al.* Diffuse plaques do not accentuate synapse loss in Alzheimer's disease. **Am J Pathol**, 137, n. 6, p. 1293-1297, Dec 1990.

MASTERS, C. L.; BATEMAN, R.; BLENNOW, K.; ROWE, C. C. *et al.* Alzheimer's disease. **Nat Rev Dis Primers**, 1, p. 15056, Oct 15 2015.

NG, Y. P.; OR, T. C.; IP, N. Y. Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease. **Neurochem Int**, 89, p. 260-270, Oct 2015.

OKAMOTO, K.; YAMAGUCHI, H.; HIRAI, S.; SHOJI, M. *et al.* Immunogold electron microscopic study of cerebrovascular and senile plaque amyloid using anti-beta protein antibody. **Prog Clin Biol Res**, 317, p. 953-963, 1989.

OLIVEIRA, A. S. F.; EDSALL, C. J.; WOODS, C. J.; BATES, P. *et al.* A General Mechanism for Signal Propagation in the Nicotinic Acetylcholine Receptor Family. **J Am Chem Soc**, 141, n. 51, p. 19953-19958, Dec 26 2019.

ONG, C.; YUNG, L. Y.; CAI, Y.; BAY, B. H. *et al.* Drosophila melanogaster as a model organism to study nanotoxicity. **Nanotoxicology**, 9, n. 3, p. 396-403, May 2015.

PARSONS, C. G.; DANYSZ, W.; DEKUNDY, A.; PULTE, I. Memantine and cholinesterase inhibitors: complementary mechanisms in the treatment of Alzheimer's disease. **Neurotox Res**, 24, n. 3, p. 358-369, Oct 2013.

PEI, Y. A.; DAVIES, J.; ZHANG, M.; ZHANG, H. T. The Role of Synaptic Dysfunction in Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis**, 76, n. 1, p. 49-62, 2020.

PEREDA, A. E. Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. **Nat Rev Neurosci**, 15, n. 4, p. 250-263, Apr 2014.

PEREIRA, M. N.; JUSTINO, A. B.; MARTINS, M. M.; PEIXOTO, L. G.; VILELA, D. D.; SANTOS, P. S.; TEIXEIRA, T. L.; SILVA, C. V.; GOULART, L. G.; PIVATTO, M.; ESPINDOLA, F. S. Stephalagine, an alkaloid with pancreatic lipase inhibitory activity isolated from the fruit peel of *Annona crassiflora* Mart. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 324–329, 2017.

PIMENTA, A. C.; SILVA, P. S. da R. e; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; KOEHLER, H. S. Caracterização de plantas e de frutos de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart.) nativos no Cerrado Matogrossense. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S.L.], v. 36, n. 4, p. 892-899, 2014.

RAY, B.; MALONEY, B.; SAMBAMURTI, K.; KARNATI, H. K. *et al.* Rivastigmine modifies the alpha-secretase pathway and potentially early Alzheimer's disease. **Transl Psychiatry**, 10, n. 1, p. 47, Feb 3 2020.

REITER, L. T.; POTOCKI, L.; CHIEN, S.; GRIBSKOV, M. *et al.* A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. **Genome Res**, 11, n. 6, p. 1114-1125, Jun 2001.

ROBINSON, D. M.; KEATING, G. M. Memantine: a review of its use in Alzheimer's disease. **Drugs**, 66, n. 11, p. 1515-1534, 2006.

ROSEN, D. R.; MARTIN-MORRIS, L.; LUO, L. Q.; WHITE, K. A *Drosophila* gene encoding a protein resembling the human beta-amyloid protein precursor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 86, n. 7, p. 2478-2482, Apr 1989.

SHI, Y. Y.; LI, Y. Q.; XIE, X.; ZHOU, Y. T. *et al.* Homotherapy for heteropathy active components and mechanisms of Qiang-Huo-Sheng-Shi decoction for treatment of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Comput Biol Chem**, 89, p. 107397, Oct 1 2020.

SHIPPY, D. C.; ULLAND, T. K. Microglial Immunometabolism in Alzheimer's Disease. **Front Cell Neurosci**, 14, p. 563446, 2020.

SILVA, A. F.; RABELO, M. F. R.; ENOQUE, M. M. Diversidade de angiospermas e espécies medicinais de uma área de Cerrado. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, [S.L.], v. 17, n. 43, p. 1016-1030, 2015.

TRANG, A.; KHANDHAR, P. B. Physiology, Acetylcholinesterase. *In*: **StatPearls**. Treasure Island (FL), 2020.

UDDIN, M. S.; KABIR, M. T.; TEWARI, D.; MAMUN, A. A. *et al.* Revisiting the role of brain and peripheral Abeta in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **J Neurol Sci**, 416, p. 116974, Jun 7 2020.

VARDY, E. R.; CATTO, A. J.; HOOPER, N. M. Proteolytic mechanisms in amyloid-beta metabolism: therapeutic implications for Alzheimer's disease. **Trends Mol Med**, 11, n. 10, p. 464-472, Oct 2005.

WANG, Y.; ZHOU, Z.; HAN, M.; ZHAI, J. *et al.* The anti-inflammatory components from the effective fraction of *Syringae Folium* (ESF) and its mechanism investigation based on network pharmacology. **Bioorg Chem**, 99, p. 103764, Jun 2020.

WANG, Z. T.; TAN, C. C.; TAN, L.; YU, J. T. Systems biology and gene networks in Alzheimer's disease. **Neurosci Biobehav Rev**, 96, p. 31-44, Jan 2019.

WESTFALL, S.; LOMIS, N.; PRAKASH, S. A novel synbiotic delays Alzheimer's disease onset via combinatorial gut-brain-axis signaling in *Drosophila melanogaster*. **PLoS One**, 14, n. 4, p. e0214985, 2019.

WU, Q.; HU, Y. Integrated network pharmacology and molecular docking strategy to explore the mechanism of medicinal and edible *Astragali Radix-Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* acting on pneumonia via immunomodulation. **J Food Biochem**, p. e13510, Oct 6 2020.

YOUSSEF, K. A.; HAGGAG, E. G.; ELSHAMY, A. M.; RABEH, M. A. *et al.* Anti-Alzheimer potential, metabolomic profiling and molecular docking of green synthesized silver nanoparticles of *Lampranthus coccineus* and *Malephora lutea* aqueous extracts. **PLoS One**, 14, n. 11, p. e0223781, 2019.

ZENG, Q.; LI, L.; SIU, W.; JIN, Y. *et al.* A combined molecular biology and network pharmacology approach to investigate the multi-target mechanisms of Chaihu Shugan San on Alzheimer's disease. **Biomed Pharmacother**, 120, p. 109370, Dec 2019.

ZHANG, S.; LEI, C.; LIU, P.; ZHANG, M. *et al.* Association between variant amyloid deposits and motor deficits in FAD-associated presenilin-1 mutations: A systematic review. **Neurosci Biobehav Rev**, 56, p. 180-192, Sep 2015.

ZHANG, Z.; YI, P.; YANG, J.; HUANG, J. *et al.* Integrated network pharmacology analysis and serum metabolomics to reveal the cognitive improvement effect of Bushen Tiansui formula on Alzheimer's disease. **J Ethnopharmacol**, 249, p. 112371, Mar 1 2020.

ZILKA, N.; NOVAK, M. The tangled story of Alois Alzheimer. **Bratisl Lek Listy**, 107, n. 9-10, p. 343-345, 2006.

## Capítulo II

### Artigo em processo de submissão à revista “Bioorganic Chemistry”

#### Avaliação da fração alcaloidal de *Annona crassiflora* no modelo beta-amiloide de *Drosophila melanogaster* e investigação de seu mecanismo com base na farmacologia em rede

##### Resumo

Estudos da *Annona crassiflora* mostraram o potencial de seus metabólitos e uso terapêutico, dentre esses metabólitos os alcaloides foram identificados na casca do fruto de *A. Crassiflora*. Os alcaloides são conhecidos por seu papel na terapêutica de várias doenças e estão sendo investigados aqui usando um modelo de *Drosophila melanogaster* da doença de Alzheimer e uma abordagem *in silico* de farmacologia em rede. A abordagem de rede foi usada para prospectar todo o potencial da fração alcaloidal da *A. crassiflora*. Assim, este trabalho visa buscar possíveis alvos humanos para esses alcalóides, e a partir dos alvos encontrados avaliar o efeito do tratamento da fração alcaloide no modelo de Alzheimer utilizando *D. melanogaster* e predizer seu mecanismo de ação. A previsão de alvos foi realizada com as plataformas Swisstarget prediction e targetnet. Após a predição dos alvos, usamos STRING 11.0 para prever as interações entre os alvos. A elucidação das doenças potenciais que podem ser relacionadas foi feita com a plataforma DAVID 6.8, sendo que uma das doenças previstas foi o Alzheimer. Os inibidores da acetilcolinesterase (AChE) são atualmente o principal tratamento para Alzheimer, e a AChE foi um dos alvos previstos para a fração alcaloidal relacionado ao Alzheimer. Este alvo foi confirmado pela inibição *in vitro* de sua atividade. Um genótipo de *D. melanogaster*, que expressa APP e BACE humana, analisando assim a via amiloide da doença, foi usado para testar a fração alcaloidal avaliando sua intervenção na função motora com testes comportamentais e também a atividade da AChE *in vivo*. Observamos uma melhora no comportamento motor e uma diminuição na atividade da acetilcolinesterase. Em seguida, avaliamos qual mecanismo que afetou as moscas e para acessar o impacto no Alzheimer, analisamos uma rede com alvos ortólogos de *D. melanogaster* usando a ferramenta de previsão de ortólogos DRSC (Integrative Ortholog), mostramos outras vias relacionadas ao Alzheimer, como as de inflamação, de estresse oxidativo e de função cognitiva. Esses resultados sugeriram a AChE como alvo e mostraram a perspectiva de potencial da fração alcaloidal de *A. crassiflora* que poderia participar em vias distintas, podendo ser utilizada em estudos futuros sobre a doença de Alzheimer.

**Palavras chaves:** Farmacologia em rede, *Annonaceae*, Doença de Alzheimer e Alcaloide

## **Evaluation of *Annona crassiflora* alkaloidal fraction in the *Drosophila melanogaster* beta-amyloid model and its mechanism investigation based on network pharmacology**

### **Abstract**

Studies from *Annona crassiflora* has shown the potential of its metabolites and therapeutic use. One of these metabolites were alkaloids, which have been identified in the *A. crassiflora* fruit peel and were known for its role in the therapeutics of several neuronal diseases, therefore we aim to investigate these alkaloids using a *Drosophila melanogaster* model of Alzheimer disease and an approach of pharmacology *in silico* network to harness the full potential of the alkaloid fraction of *A. crassiflora*. Thus, this work aims to search possible human targets for these alkaloids, and from the found targets, evaluate the effect of the alkaloid fraction treatment on an Alzheimer model using *D. melanogaster* and predict its mechanism of action. Swisstargetprediction and targetnet platforms were used for predicting targets. After the interaction between these targets, we use STRING 11.0, to predicted the interactions. The elucidation of potential diseases that may be affected was done with DAVID 6.8 platform. One of the predicted diseases was Alzheimer's. Cholinesterase inhibitors are currently the main treatment for Alzheimer's, and AChE was a predicted target for the alkaloidal fraction and, confirmed *in vivo* an *in vitro* inhibition of its activity. A genotype of *D. melanogaster*, which expresses human APP and BACE, leading to the amyloidal pathway, was used to test the alkaloidal fraction by evaluating its motor function intervention with behavioral tests and acetylcholinesterase activity *in vivo* as well. We observed an improvement in motor behavior and a decrease in acetylcholinesterase activity. After that, we evaluated which mechanism affected *D. melanogaster* and to access the impact on Alzheimer's, we analyze a network with *D. melanogaster* ortholog targets using the DRSC prediction tool. Using Integrative Ortholog, and this network, we showed other pathways related to Alzheimer's, such as inflammation, oxidative stress, and cognitive function. These results suggested acetylcholinesterase as a target and showed a prospect of a potential of the *A. crassiflora* alkaloidal fraction that could participate in distinct pathways, and then used for future studies on Alzheimer's disease.

**Keywords:** Network Pharmacology, *Annonaceae*, Alzheimer's Disease and Alkaloid

**Evaluation of *Annona crassiflora* alkaloidal fraction in the *Drosophila melanogaster* beta-amyloid model and its mechanism investigation based on network pharmacology**

Heitor Cappato Guerra Silva<sup>1&</sup>, Serena Mares Malta<sup>1&</sup>, Alice Norberto de Carvalho<sup>1</sup>, Luiz Gabriel Alves Santos<sup>1</sup>, Natieli Saito<sup>1</sup>, Allisson Benatti Justino<sup>1</sup>, Carlos Ueira Vieira<sup>1</sup>, Foued Salmen Espindola<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate Program in Genetics and Biochemistry, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, 38408-100 Uberlândia (MG), Brazil.

<sup>&</sup>These authors contributed equally to this manuscript.

**\*Correspondent Author:** Foued Salmen Espindola. Post-Graduation Program in Genetics and Biochemistry, Biotechnology Institute, Federal University of Uberlândia, Av. Pará 1720 - Campus Umuarama, Jardim Umuarama - Bloco 2E, Office room 237, 38408-100 Uberlândia (MG), Brazil. phone +55(34)3225-8439; e-mail: foued@ufu.br.



## Abstract

Studies from *Annona crassiflora* has shown the potential of its metabolites and therapeutic use. One of these metabolites were alkaloids, which have been identified in the *A. crassiflora* fruit peel and were known for its role in the therapeutics of several neuronal diseases, therefore we aim to investigate these alkaloids using a *Drosophila melanogaster* model of Alzheimer disease and an approach of pharmacology *in silico* network to harness the full potential of the alkaloid fraction of *A. crassiflora*. Thus, this work aims to search possible human targets for these alkaloids, and from the found targets, evaluate the effect of the alkaloid fraction treatment on an Alzheimer model using *D. melanogaster* and predict its mechanism of action. Swisstargetprediction and targetnet platforms were used for predicting targets. After the interaction between these targets, we use STRING 11.0, to predicted the interactions. The elucidation of potential diseases that may be affected was done with DAVID 6.8 platform. One of the predicted diseases was Alzheimer's. Cholinesterase inhibitors are currently the main treatment for Alzheimer's, and AChE was a predicted target for the alkaloidal fraction and, confirmed *in vivo* an *in vitro* inhibition of its activity. A genotype of *D. melanogaster*, which expresses human APP and BACE, leading to the amyloid pathway, was used to test the alkaloidal fraction by evaluating its motor function intervention with behavioral tests and acetylcholinesterase activity *in vivo* as well. We observed an improvement in motor behavior and a decrease in acetylcholinesterase activity. After that, we evaluated which mechanism affected *D. melanogaster* and to access the impact on Alzheimer's, we analyze a network with *D. melanogaster* ortholog targets using the DRSC prediction tool. Using Integrative Ortholog, and this network, we showed other pathways related to Alzheimer's, such as inflammation, oxidative stress, and cognitive function. These results suggested acetylcholinesterase as a target and showed a prospect of a potential of the *A. crassiflora* alkaloidal fraction that could participate in distinct pathways, and then used for future studies on Alzheimer's disease.

**Keywords:** Network Pharmacology, *Annonaceae*, Alzheimer's Disease and Alkaloid

## 1 . Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a neurological disorder and part of neurodegeneration related to age. With the aging population growing and the treatment being highly costly, researchers have drawn the attention for this issue driving these research area [1]. The molecular mechanisms are still not fully elucidated but is known the role of genetic and environmental factors [2]. Factors that involve pathways related to mitochondrial dysfunction or amyloid- $\beta$  plaques formation lead to oxidative stress and signaling to defective protein quality-control, degradation pathways, and maladaptive immune responses [3, 4]. Those factors result in an extremely variable and complex disease that makes the treatment and use of models difficult.

*D. melanogaster* is an organism model that can be use to simulate the disease state and its conceptions, that could present the tau pathway or amyloidal, which explain two theories of the AD mechanism. The model of the amyloidal pathway has two human proteins responsible for generating the disease  $\beta$ -Secretase (BACE-1) and amyloid precursor protein (APP) [5].

In addition, many studies with the *D. melanogaster* model has been done to the tough mission to reach a treatment or a complement for current treatment [6, 7]. The FDA approves two kinds of medicines, acetylcholinesterase inhibitors and NMDA receptor antagonists. However, these drugs bring only temporary relief for the patients beside causing adverse effects [8].

Natural products play an important role in the search for a treatment for Alzheimer's disease. One of the most studied are alkaloids, mainly because of acetylcholinesterase inhibitory activities [9]. In addition, alkaloids can act in other ways, such as inflammation and cognitive dysfunction [10]. Among the natural products rich in alkaloids, the *Annonaceae* family has been the best characterized by the diversity and abundance of alkaloids [11]. In one of these species, *Annona crassiflora*, the peel of its fruit has been the subject of studies by our group. Liquid-liquid partitioning of its ethanolic extract yielded a fraction in the dichloromethane solvent where alkaloids have been isolated and characterized [12].

This study aimed to evaluate de potential of the *A. crassiflora* alkaloidal fraction (AF) for neurological disorders by network pharmacology approach and confirm the

effect in *D. melanogaster* AD model, which includes the acetylcholinesterase inhibitory activity, behavior, and mechanism that could act either.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Alkaloid fraction acquisition**

#### **2.1.1 Plant material**

The fruits of *Annona crassiflora* Mart. were collected in the northern region of the state of Minas Gerais from the natural resources of the Cerrado Biome in March 2015, located in Presidente Olegário city. The plant was identified by André Vito Scatigna of the Institute of Biology of the Federal University of Uberlândia, and the voucher (HUFU68467) was deposited in the herbarium of the institute. The bark was stored at -20°C until the moment of extractions and analysis, and no oxidation of the plant material was observed.

#### **2.1.2 Ethanolic Extraction**

To obtain the ethanolic extract of the peel of the *A. crassiflora* fruit, the maceration process was used, in which 1.0 kg of peel was used for 5.0 L of ethanol 98% (proportion of 1/5 m/v). This macerated material remains immersed for decantation for six days on average, after this process, the material with the extractives was filtered and the remaining solvent was removed in a rotaevaporator (Buchi Rotavapor R-210, Flawil, Switzerland) with pressure reduced and temperature of 40°C. The residue of the plant material has been macerated and its metabolites extracted twice more. The extract obtained was frozen and lyophilized for water removal (L101, Liobras, SP, Brazil) [12].

#### **2.1.3 Liquid-Liquid Partitioning**

The freeze-dried extract was used for liquid-liquid fractionation to obtain a separation of the present metabolites according to the polarity of the solvent used. The 20g mass of the extract was dissolved in 200 mL of a methanol:water solution (9:1) to continue the fractionation. In the fractioning process, solvents were used in increasing order of polarity being hexane and dichloromethane. In this order, 200 mL of each solvent was added. Then the solvent was removed from each fraction in a rotaevaporator (Buchi Rotavapor R-210, Flawil, Switzerland), then frozen and lyophilized (L101, Liobras, SP, Brazil). This present work used only the fraction of dichloromethane containing alkaloids:

stephalagine, liriodenine, atherospermidine, dehydroaporheine, dehydrostephalagine and xylopine that was shown in a previous study by our group [13]. This dichloromethane fraction was quoted as an alkaloidal fraction (AF) for subsequent tests. AF, was diluted in DMSO 0.3%, in increasing order of concentration, 0.4, 0.8 and 1.2 mg / mL and indicated as C1, C2, and C3, respectively, for *in vivo* tests. For the *in vitro* test AF was serially diluted to obtain an IC50 value.

## 2.2 *Drosophila melanogaster*

In this work, genetically modified flies (*Drosophila melanogaster*) that expresses human BACE-1 and APP proteins were used. This genotype was obtained from the crossing between two strains acquired through the Bloomington stock bank: P{w[+mW.hs]=GawB}elav[C155],{w[+mC]=UASmCD8::GFP.L}Ptp4E[LL4],P{ry[+t7.2]=hsFLP}1,w[\*] (BL#5146) and w[1118];P{w[+mC]=UASBACE1.Exel}7b,P{w[+mC]=UASAPP.695.Exel}1/TM6B,Tb[1] (BL#33797) the fly obtained from this crossing will then be the AD (AD-like) genotype fly used for control and also all treatment groups. Additional flies as a non-Alzheimer's control (Elav-Gal4/+), which would be the cross of (BL#5146) with w<sup>[1118]</sup> (BL# 3605) were used, because it maintains the same genetic background as the AD-like control. All flies were kept at 25°C with a 12/12h light and dark circadian cycle.

## 2.3 *In silico* analysis

### 2.3.1 Target prospection and ortholog for *Drosophila melanogaster*

The alkaloids structures and information were collected from PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) and KNApSAcK ([http://www.knapsackfamily.com/KNApSAcK\\_Family/](http://www.knapsackfamily.com/KNApSAcK_Family/)). The molecules in SMILES format were used to predict proteins target with SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) and TargetNet web server (<http://targetnet.scbdd.com/home/index/>) that predict targets for the active compounds that have not collected targets in SymMap databases by prob > 0.6. After that, we decided to work with *D. melanogaster* model, to understand the mechanism of action, we evaluated which targets in this model could have an effect, using the DRSC prediction tool - Integrative Ortholog ([https://www.flyrnai.org/cgi-bin/DRSC\\_orthologs.pl](https://www.flyrnai.org/cgi-bin/DRSC_orthologs.pl)) which selected the orthologs targets with best diopt scores based on the previously predicted targets.

### **2.3.2 Network preparation**

The protein-protein interactions (PPI) of each target for the two organisms, *H. sapiens* and *D. melanogaster* were generated from STRING database which provides both experimental and predicted interaction information following the systematic detection of shared selective signals across genomes, automated text-mining of the scientific literature and co-expression analysis [17]. The interactions with a probabilistic association confidence score  $\geq 7$  were selected in this study. All networks were constructed using Cytoscape v3.8.2 [18].

### **2.3.3 GO analysis**

Gene Ontology (GO) enrichment analysis were performed using the online functional annotation and enrichment tool DAVID [19]. GO terms with  $-\log_{10} p$  value  $> 1.5$  were considered statistically significant. All the data was visualized by REViGO platform [20].

## **2.4 *In vitro* assays**

### **2.4.1 Cholinesterase inhibition**

The effect of the AF under the activity of acetylcholinesterase was measured with the modified Ellman colorimetric assay [14, 15]. We added in a microplate, 25  $\mu$ L of each solution of AF in serial dilution, 25  $\mu$ L of acetylthiocholine iodide solution 1 mM in water, 50  $\mu$ L of Tris-HCl buffer 50 mM pH 8,0 (buffer A), 125  $\mu$ L of DTNB 3 Mm diluted in buffer A containing 0.1 M NaCl and 0.02 MgCl<sub>2</sub> and 25  $\mu$ L of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) at 0.2 U/mL of buffer A containing 0.1% BSA. The absorbance reading was performed at 405nm for 20 min with a 30 sec interval. (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA)

## **2.5 *In vivo* assays**

### **2.5.1 Motility evaluation**

The fly motility test was performed based on the RING methodology (rapid interactive negative geotaxis), which consists of geotaxis as an innate response of the flies to escape when subjected to an impact against the base of a tube [16]. The flies were tested in transparent vials of dimensions 9.5 cm high by 2.3 cm in diameter, which were allocated in supports and after a 30 min acclimation period, the support containing the

vials was beaten and then evaluated how many flies climbed beyond the 5 cm demarcation strip of the vial. The test was performed five times in triplicate, with at least ten flies each vial, for each treatment and control group. The trial was performed at 15 days after hatching. The whole process was analyzed with the Quicktime® software. As a final result, the percentage of flies that passed the demarcation range was calculated.

### **2.5.2 Cholinergic activity**

The activity of acetylcholinesterase *in vivo* was evaluated according to the modified Ellman colorimetric assay [14]. The homogenized was prepared in proportion of one head to 10  $\mu$ L of phosphate buffer pH 7.4. In which 5  $\mu$ L of the homogenized was added, 20  $\mu$ L of acetylthiocholine iodide solution 1 mM in water, 20  $\mu$ L of Tris-HCl buffer 50 mM pH 8.0 (buffer A), 20  $\mu$ L of DTNB 3 mM diluted in buffer A containing NaCl 0.1 M and MgCl<sub>2</sub> 0.02 M, and 195  $\mu$ L of deionized water. Subsequently, the reading was taken at 405nm for 20 min with a 30 sec interval. (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA)

### **2.5.3 Toxicity**

In order to define the behavior of the AF, its toxicity to flies with the AD genotype was evaluated. The newly hatched flies were separated into vials containing thirty flies for each vial. These flies were subjected to the same treatment as the other *in-vivo* tests, being treated with the concentrations of the previously tested C1, C2 and C3, the vehicle at 0,3% and water for control. The treatment was performed for a period of 18 days, in which the number of deaths in each treatment group was quantified and the result was presented in survival percentage.

### **2.6 Statistics**

Results are presented as mean  $\pm$  S.E.M. Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-wilk test were used to check the normal distribution of samples and the data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by tukey post hoc test and unpaired t-test for parametric analysis. For non-parametric analysis, Kruskal-Wallis followed by dunn post hoc test were used. All graphs were generated and statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). P values lower than 0.05 were considered significant.

### 3. Results

#### 3.1 Target prediction and network for *Homo sapiens*

For each of the six alkaloids it was estimated which would be their human protein targets. From two prediction platforms, 79 targets were found which are described in the supplementary material S1. Fig. 1A shows the top 20 related diseases related with the targets according with DAVID database, most of which involve neurological disorders. Among the 3 main diseases is AD, which involves 24 targets out of 79 predicted. These predicted targets were also used to create a network between the targets and the previously observed AD-related target alkaloids, shown in Fig. 1B with red edges. With that, we started to evaluate the biological process involved.

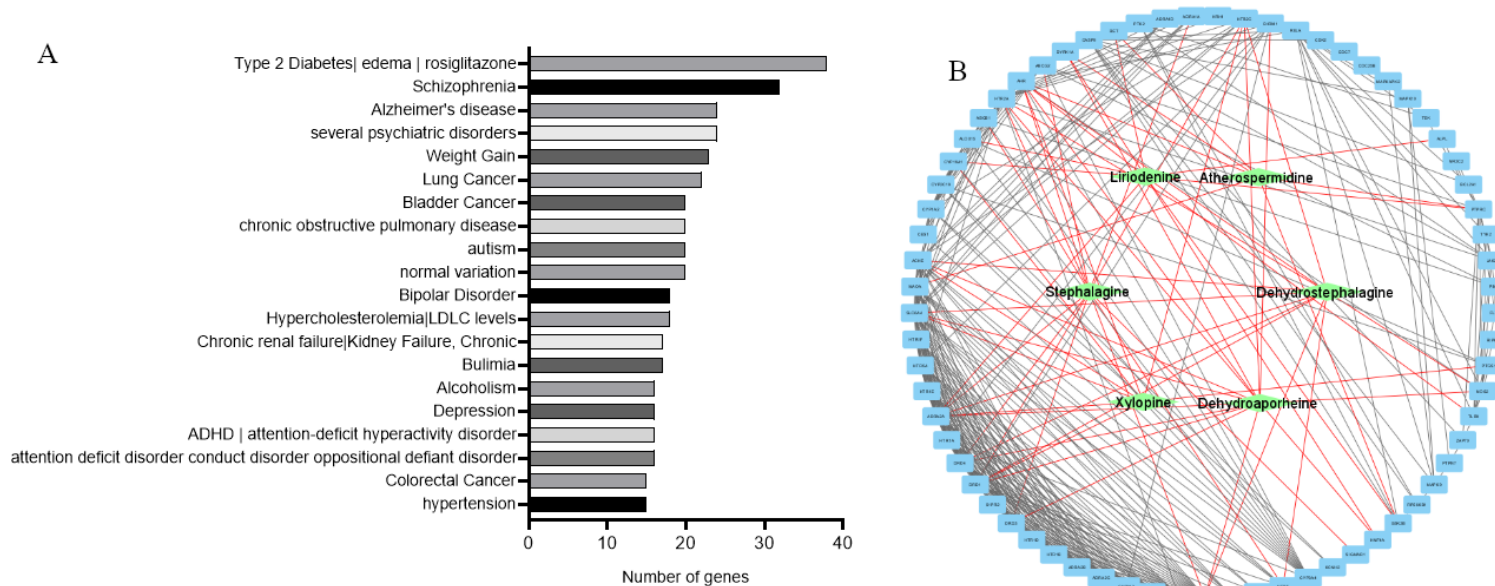


Fig 1. (A) Main 20 diseases related with PPI target network. Y-axis, the name of diseases, X-axis, the number of target genes related to the diseases. (B) PPI targets network with gray edges and alkaloid-targets network related to AD with red edges.

#### 3.2 GO enrichment analysis

The targets biological process was analyzed using the DAVID database. GO enrichment showed important biological processes related to AD. These include regulation of behavior, aging, chemical synaptic transmission and inflammatory response, highlighted in Fig. 2. And all the biological process can be viewed in supplementary material S2. These data confirmed the potential for relationship with AD, which led to

the search for an *in vitro* confirmation and in a biological model, in which *D. melanogaster* was investigated.

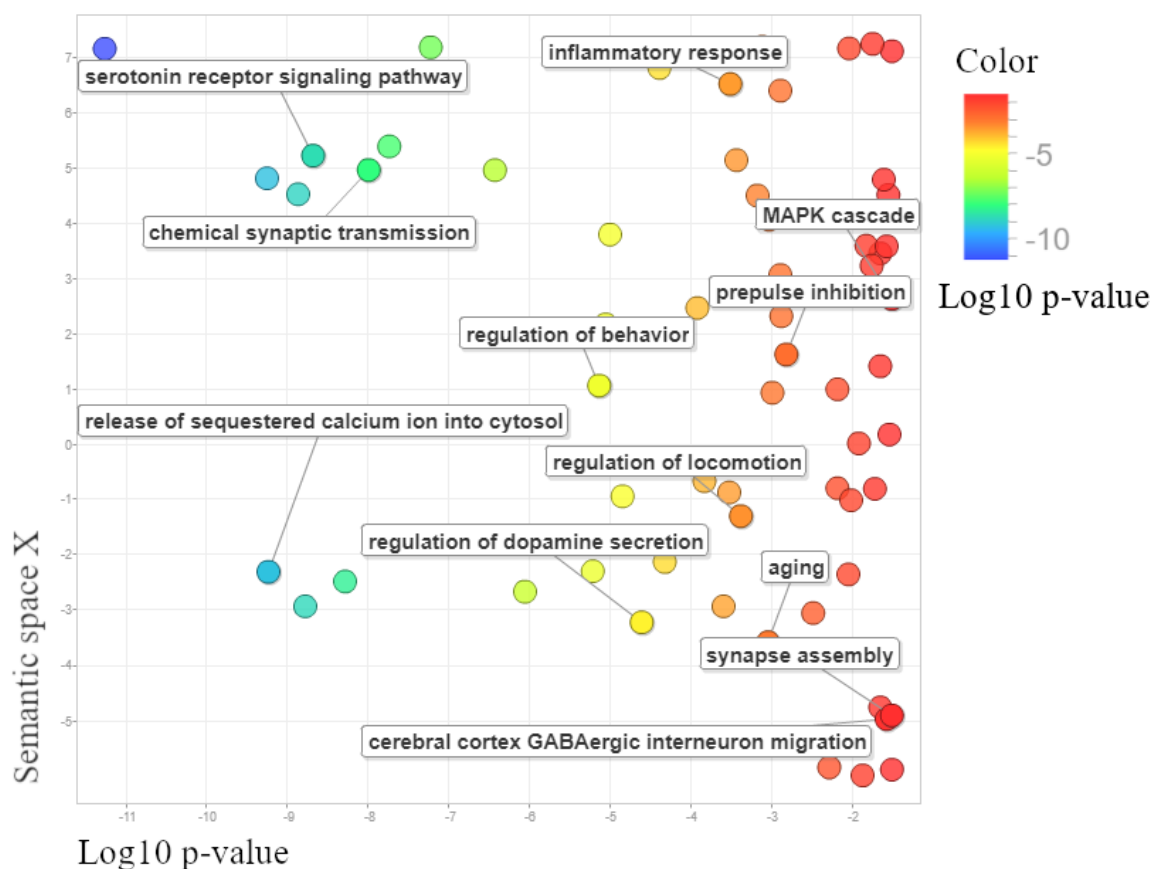


Fig 2. GO analysis of *Homo sapiens* targets. The Y-axis shows the semantic space X and the X-axis represents the Log10 p-value. Darker color corresponds to a smaller log10 p-value.

### 3.3 Acetylcholinesterase inhibition *in vitro*

The enzymatic assay for acetylcholinesterase inhibition showed that the AF present an IC<sub>50</sub> value of 25.7 µg/mL. Comparing to the control rivastigmine with an IC<sub>50</sub> of 443.6 µg/mL, has a higher inhibition capacity than the positive control used, as seen in the fig. 3.



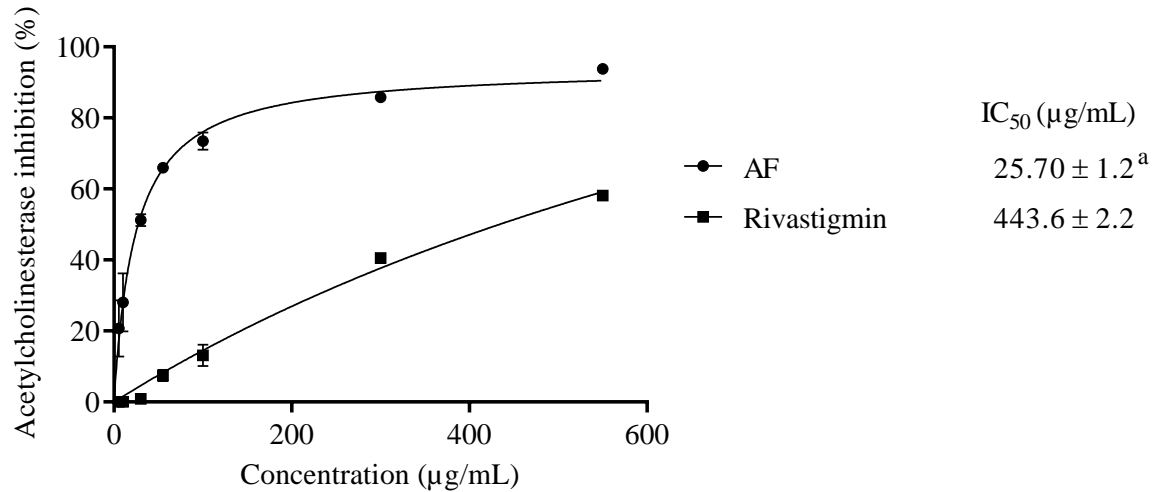


Fig 3. Analysis of the inhibition of the enzyme acetylcholinesterase by the AF and the rivastigmine control. Values expressed in percentage of inhibition of the acetylcholinesterase and concentration able to inhibit 50% of the enzyme activity. Values expressed as mean ± standard error. Note: The same letters in each column mean no significant difference ( $p < 0.05$ ).

### 3.4 Motility assay

To evaluate the fly motility, the RING trial was done with flies 15 days after hatching. with 15 days the vehicle had no difference, but the treatments showed a dose-dependent effect on the behavior in which the flies treated with the higher concentration showed a higher motility when compared to the control, as showed in fig. 4.

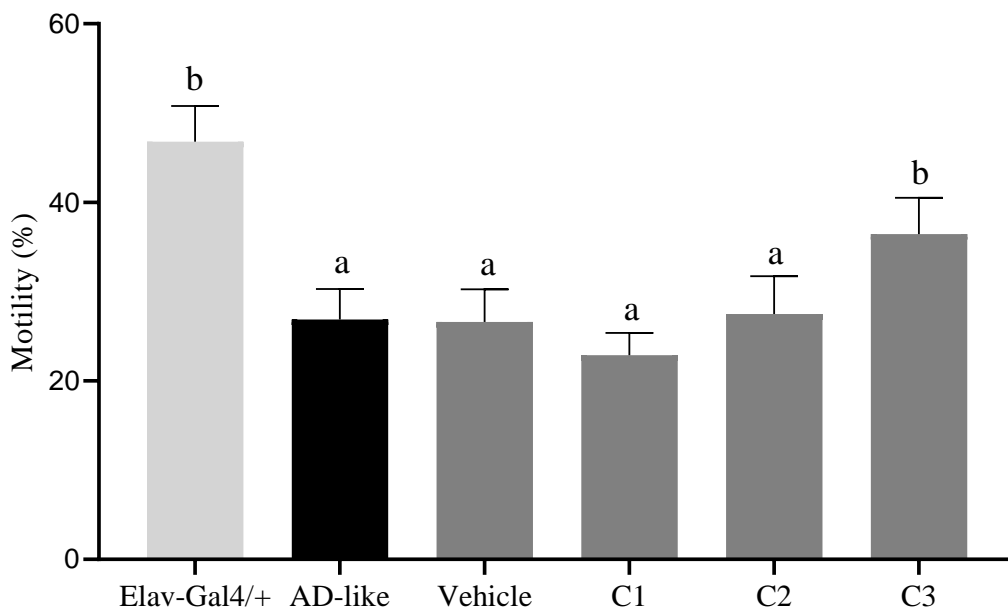


Fig 4. Evaluation of the motility of flies with untreated AD genotype (AD-like) and treated with the vehicle and with the alkaloidal fraction at C1, C2 and C3 concentrations. Values expressed as a percentage of fly motility. The same letters in each column mean no significant difference ( $p < 0.05$ ).

### 3.5 Acetylcholinesterase activity *in-vivo*

In addition to subjecting the flies to a motility test, an evaluation of the activity of acetylcholinesterase in the homogenate of these flies was carried out. The data in Fig.5 show that there was a reduction in the AChE activity of AD-like flies treated with the alkaloid fraction in the C1 concentration equivalent to 0.4 mg / mL of AF.

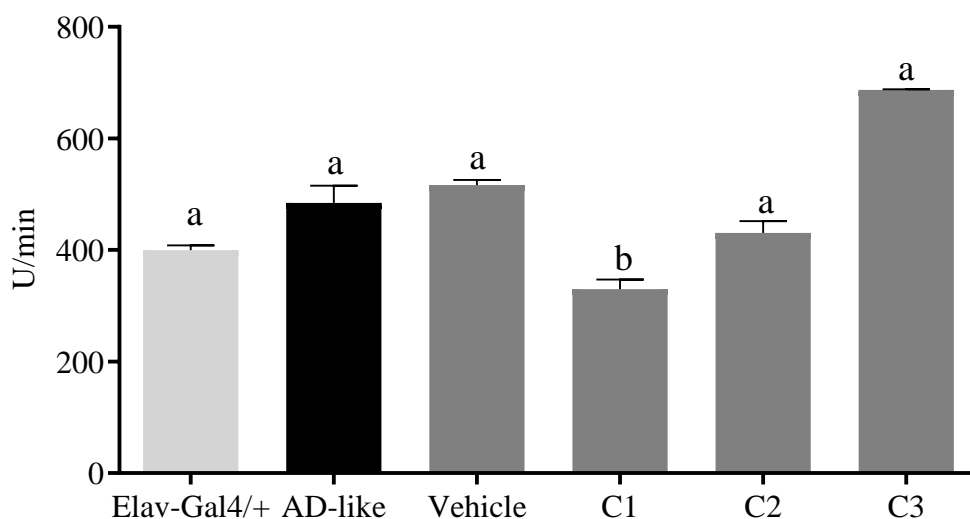


Fig 5. Evaluation of the AChE activity of control flies with Alzheimer genotype (AD-like) and flies without the Alzheimer genotype (Elav-Gal4 / +). AD-like flies treated with vehicle and with the alkaloidal fraction (AF) at C1- C3 concentrations. The same letters in each column mean no significant difference ( $p < 0.05$ ).

### 3.6 Toxicity

To evaluate the toxicity of the treatment to the flies with the AD genotype (AD-like) with the alkaloidal fraction (AF) obtained from the ethanolic extract of *A. crassiflora*, the survival rate was observed, as mentioned above. After 18 days of flies hatching, it was found that those treated with the highest concentrations of AF (C2 and C3) had more deaths when compared to untreated AD-like flies. On the other hand, AD-like flies treated with the lowest concentration of AF (C1) or only with the vehicle showed

no difference in relation to the survival rate of the untreated AD-like group, suggesting that AF in lower concentration as well as vehicle are not toxic to the survival of *D. melanogaster* (Fig. 6).

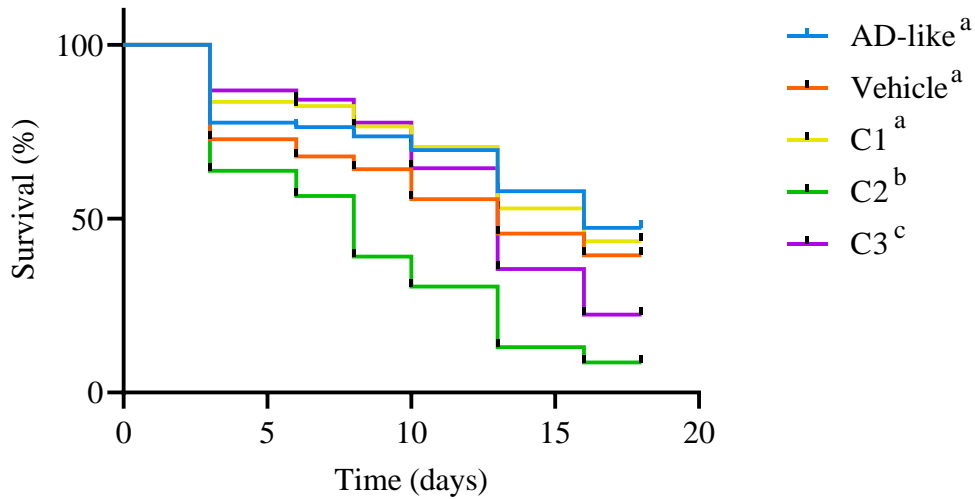


Fig 6. Toxicity test (% survival) of flies with AD genotype (AD-like) untreated and treated with the vehicle and the alkaloidal fraction (AF) at C1-C3 concentrations. Values expressed as percentage of fly survival. The same letters in each column mean no significant difference ( $p < 0.05$ ).

### 3.7 Network and GO analysis for *Drosophila melanogaster*

In order to visualize the AF mechanism on *D. melanogaster*, a PPI with the orthologs genes and respective proteins was performed, showed in fig. 7, and all the targets analyzed on supplemental material S3. In addition to the biological processes through GO analyses that may be influenced by the AD-like model of *D. melanogaster* were predicted. In an effort to the mechanism related with AD biological processes were highlighted in Fig. 8. Such as learning and related gene *dop1R1*, immune response with main gene related *Dredd*, development of the nervous system with *hop* gene and the response to oxidative stress with *bsk*. Others orthologs biological processes can be viewed in the supplemental material S4

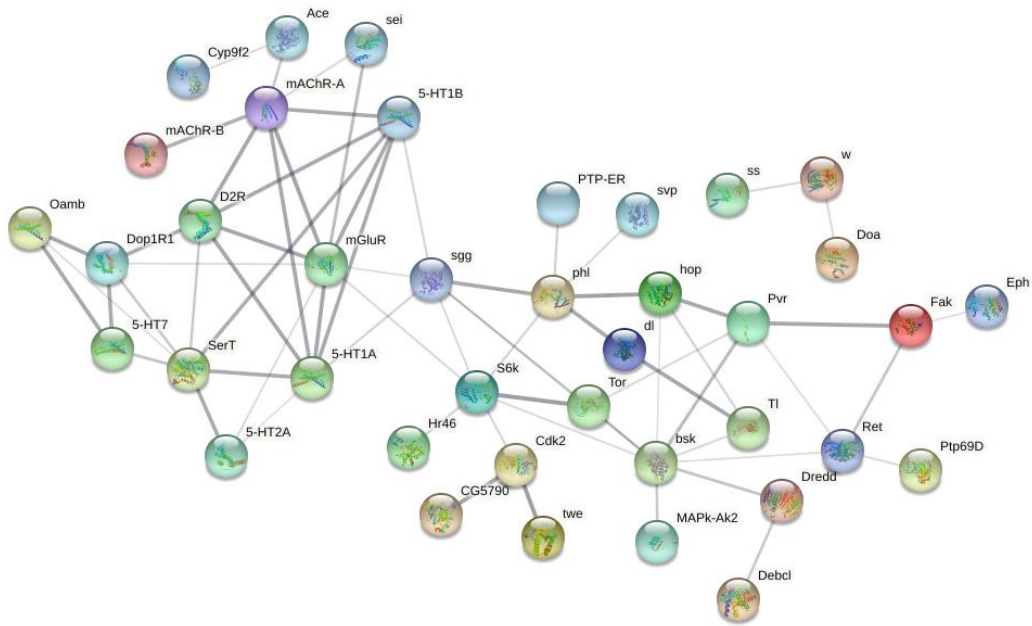


Fig 7. PPI network of AF acting on *Drosophila melanogaster* targets which the opacity of the edges between the nodes refers to the level of confident.

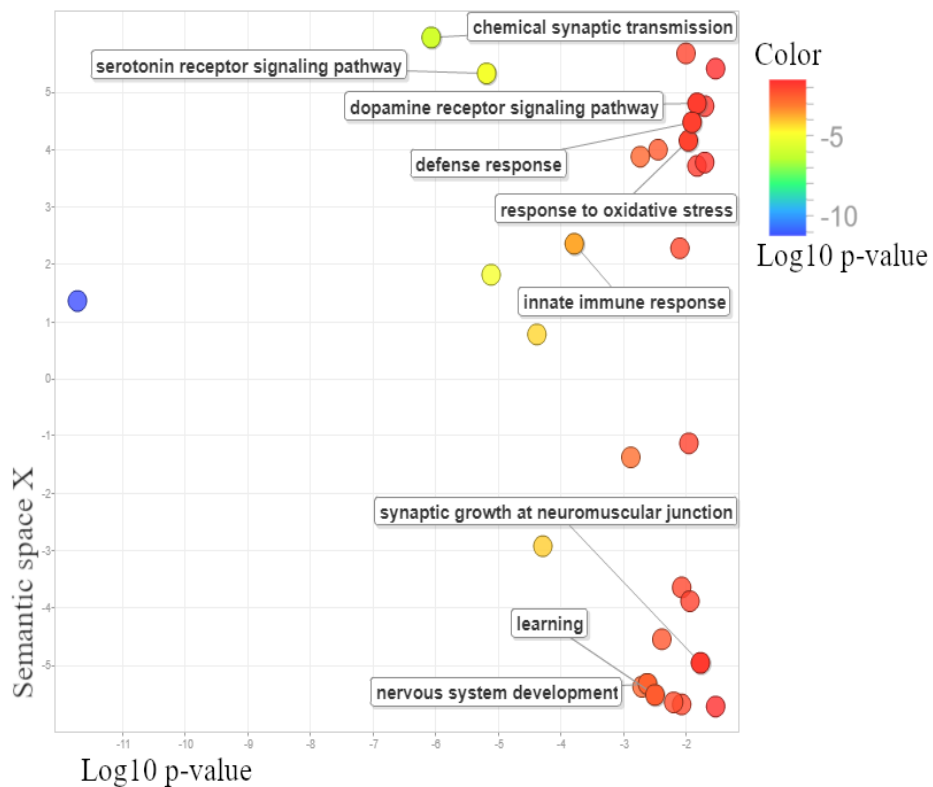


Fig 8. GO analysis of *D. melanogaster* targets. The Y-axis shows the semantic space X and the X-axis represents the Log10 p-value. Darker color corresponds to a smaller log10 p-value.

#### 4. Discussion

*A. crassiflora* has been used in traditional medicine as an antimicrobial and antirheumatic agent and for the treatment of fever, wounds and venereal diseases [21-23]. Experimental studies have demonstrated several properties of the bioactive compounds present in this species and especially in the fruit peel, such as antinociceptive and anti-inflammatory and the ability to reduce liver oxidative stress induced by diabetes [12, 24]. Among these compounds, there are alkaloids characteristic of the family *Annonaceae* and present in the *A. crassiflora* AF, evaluated here in the *D. melanogaster* model of AD for neurological disorders. AD flies were treated with AF and evaluated for the effects of AF on acetylcholinesterase activity and motility behavior. These alkaloids were also analyzed using a network pharmacology approach. This approach has been used to discover targets and complement the treatment of various diseases [25, 26].

The predicted targets for AF alkaloids involve neurotransmitter receptors in both organisms, *Homo sapiens* and *D. melanogaster*, such as acetylcholine, serotonin and dopamine receptors. For histidine receptors and adrenergic receptors, the predicted targets were only for *H. sapiens*. Processes observed in GO analyzes (fig. 2) and reports in the literature are related to these receptors, such as aging, behavior regulation and memory [27, 28].

Acetylcholinesterase proved to be a potential target for AF in the target prediction and network analysis. In the test of its *in vitro* inhibition by AF, the IC<sub>50</sub> value was 17.2 times lower for AF than the control rivastigmine value. Compared to another study using alkaline fraction, it obtained a lower IC<sub>50</sub> [29]. In the assay with AD flies, the inhibitory activity of AF on AChE activity *in vivo* was effective only in the treatment with the lowest C1 concentration of 0.4 mg / mL of AF. The AF lowest concentration did not show toxicity for *D. melanogaster* as observed for higher concentrations C2 and C3 (fig. 6). That toxicity in higher concentration can be explained by the aporphine alkaloids toxicity [30]

The alkaloids galantamine and rivastigmine, derived from phytochemicals, act on the cholinergic pathway to treat AD and have been widely used and their relevance has been reported [31]. The alkaloids liriodenine and xylopine present in *A. crassiflora* AF, are known to have acetylcholinesterase inhibitory activity [32, 33]. Pro-cholinergic drugs, which act as AChE inhibitors, blocking the reduction in the level of acetylcholine, have been the standard treatment for AD. [34].

When assessing motility in *D. melanogaster* with AD genotype, it was considered that impaired motility is a common factor related to AD in addition to cognitive dysfunction, and a marker for neurodegeneration [35]. This effect on motility was more pronounced at the highest C3 concentration over 15 days when compared to flies in the AD-like control group. It is speculated that this phenomenon is not due only to the cholinergic pathway. Perhaps it could involve other mechanisms such as synaptic growth at the neuromuscular junction, inflammatory process, oxidative stress, and development of the nervous system, as demonstrated in the GO analysis of the biological process in *D. melanogaster* (fig. 8) [36].

The main action of the immune system for *D. melanogaster* must be related to the Caspase *Dredd* gene, predicted as a target. This caspase has a role in inflammation and studies with the knockout of this gene have shown reduced neurodegeneration [37]. Another related gene is *hop*, which expresses the protein Tyrosine kinase JAK. The JAK pathway is associated with the development of the nervous system and long-term memory [38]. Also, according to the results of the GO analysis, another present mechanism involves the stress activated protein kinase (JNK), encoded by the *bsk* gene. This pathway contributes to cell death mediated by beta-amyloid peptide associated with oxidative stress [39]. In addition, different alkaloids have demonstrated an influence on AD, including the aforementioned pathways such as: modulation of neurotransmission [40], protection against oxidative damage [41], decreased inflammation [42] and promotion of neurogenesis [43].

This multi-target approach was used to complement the AF treatment data of AD flies. Alzheimer's disease involves different approaches and pathways depending on the stage of the disease [44]. For this, with the use of network pharmacology, it was possible to show the potential of AF activity in flies with AD genotype, probably involving the inflammation, oxidative stress and neurogenesis pathways.

In conclusion, the present study predicted alkaloids-target-disease interactions and multi-target mechanisms of the *A. crassiflora* alkaloidal fraction in the treatment of AD using the network pharmacology strategy, as well as validating the protective effect of AF against the *D. melanogaster* AD model. Further studies are also necessary in order to deepen the knowledge about the interaction pathways and mechanisms of action of the alkaloids described for AF on AD, which may lead to the development of AF or its alkaloids as a potential candidate for the treatment of patients with AD.

## **Acknowledgments**

This study was supported by grants from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). The fellowships from CNPq, CAPES and Foundation for Research Support of the State of Minas Gerais (FAPEMIG) are also acknowledged.

## **Disclosure of potential conflicts of interest**

The authors declare no potential conflicts of interest with respect to the authorship and/or publication of this article.

## References

1. Gerovska, D., et al., Genealogy of the neurodegenerative diseases based on a meta-analysis of age-stratified incidence data. *Sci Rep*, 2020. 10(1): p. 18923. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75014-8>
2. Murray, M.E., et al., Neuropathologically defined subtypes of Alzheimer's disease with distinct clinical characteristics: a retrospective study. *Lancet Neurol*, 2011. 10(9): p. 785-96. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70156-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70156-9)
3. Monzio Compagnoni, G., et al., The Role of Mitochondria in Neurodegenerative Diseases: the Lesson from Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol*, 2020. 57(7): p. 2959-2980. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01926-1>
4. Popiolek, A.K., et al., Biochemical Parameters in Cognitive Functions. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2020. 16: p. 2479-2489. <https://doi.org/10.2147/NDT.S267673>
5. Tan, F.H.P. and G. Azzam, *Drosophila melanogaster*: Deciphering Alzheimer's Disease. *Malays J Med Sci*, 2017. 24(2): p. 6-20. 10.21315/mjms2017.24.2.2
6. Scholes, H.M., et al., Dynamic changes in the brain protein interaction network correlates with progression of Abeta42 pathology in *Drosophila*. *Sci Rep*, 2020. 10(1): p. 18517. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74748-9>
7. Cheng, X., et al., Pharmacological Treatment of Alzheimer's Disease: Insights from *Drosophila melanogaster*. *Int J Mol Sci*, 2020. 21(13). <https://doi.org/10.3390/ijms21134621>
8. Cuttler, J.M., et al., Update on a Patient With Alzheimer Disease Treated With CT Scans. *Dose Response*, 2017. 15(1): p. 1559325817693167. <https://doi.org/10.1177/1559325817693167>
9. Zhu, Y., et al., Current anti-Alzheimer's disease effect of natural products and their principal targets. *J Integr Neurosci*, 2019. 18(3): p. 327-339. 10.31083/j.jin.2019.03.1105
10. Ng, Y.P., T.C. Or, and N.Y. Ip, Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, 2015. 89: p. 260-70. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.07.018>



11. Lucio, A.S., et al., Alkaloids of the Annonaceae: occurrence and a compilation of their biological activities. *Alkaloids Chem Biol*, 2015. 74: p. 233-409. <https://doi.org/10.1016/bs.alkal.2014.09.002>
12. Justino, A.B., et al., Stephalagine, an aporphine alkaloid from *Annona crassiflora* fruit peel, induces antinociceptive effects by TRPA1 and TRPV1 channels modulation in mice. *Bioorg Chem*, 2020. 96: p. 103562. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103562>
13. Fontes, M.B., Chemical study and evaluation of the anticholinesterase activity of the alkaloids isolated from the fruit peels of *Annona crassiflora*. Dissertation (Master in Chemistry of Natural Products) – Federal University of Uberlândia, Uberlândia, 2018. Available in: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.1239>
14. Ellman, G.L., et al., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 1961. 7: p. 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
15. Rhee, I.K., et al., Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *J Chromatogr A*, 2001. 915(1-2): p. 217-23. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00624-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00624-0)
16. Gargano, J.W., et al., Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*. *Exp Gerontol*, 2005. 40(5): p. 386-95. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.02.005>
17. Szklarczyk, D., et al., STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res*, 2019. 47(D1): p. D607-D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>
18. Shannon, P., et al., Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*, 2003. 13(11): p. 2498-504. <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.1239303>
19. Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*, 2009. 4(1): p. 44-57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>
20. Supek, F., et al., REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One*, 2011. 6(7): p. e21800. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021800>

21. Mesquita, M.L., et al., Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2005. 100(7): p. 783-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762005000700019>
22. Schiassi, M., et al., Fruits from the Brazilian Cerrado region: Physico-chemical characterization, bioactive compounds, antioxidant activities, and sensory evaluation. *Food Chem*, 2018. 245: p. 305-311. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.104>
23. Silva, J.J., et al., In vitro screening antibacterial activity of *Bidens pilosa* Linne and *Annona crassiflora* Mart. against oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* (ORSA) from the aerial environment at the dental clinic. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 2014. 56(4): p. 333-40. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652014000400011>
24. Justino, A.B., et al., B procyanidins of *Annona crassiflora* fruit peel inhibited glycation, lipid peroxidation and protein-bound carbonyls, with protective effects on glycated catalase. *Sci Rep*, 2019. 9(1): p. 19183. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55779-3>
25. Yang, L., et al., Exploration in the Mechanism of Kaempferol for the Treatment of Gastric Cancer Based on Network Pharmacology. *Biomed Res Int*, 2020. 2020: p. 5891016. <https://doi.org/10.1155/2020/5891016>
26. Yin, B., et al., Molecular Mechanism of the Effect of Huanglian Jiedu Decoction on Type 2 Diabetes Mellitus Based on Network Pharmacology and Molecular Docking. *J Diabetes Res*, 2020. 2020: p. 5273914. <https://doi.org/10.1155/2020/5273914>
27. El-Ghundi, M., B.F. O'Dowd, and S.R. George, Insights into the role of dopamine receptor systems in learning and memory. *Rev Neurosci*, 2007. 18(1): p. 37-66. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.2007.18.1.37>
28. Labus, J., et al., Amelioration of Tau pathology and memory deficits by targeting 5-HT7 receptor. *Prog Neurobiol*, 2020: p. 101900. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101900>
29. Hoang, T.H.X., et al., Effects of *Hippeastrum reticulatum* on memory, spatial learning and object recognition in a scopolamine-induced animal model of Alzheimer's disease. *Pharm Biol*, 2020. 58(1): p. 1098-1104. <https://doi.org/10.1080/13880209.2020.1841810>

30. Moreno, P.R., et al., Genotoxicity of the boldine aporphine alkaloid in prokaryotic and eukaryotic organisms. *Mutat Res*, 1991. 260(2): p. 145-52. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(91\)90002-4](https://doi.org/10.1016/0165-1218(91)90002-4)
31. Marucci, G., et al., Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 2020: p. 108352. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108352>
32. Cavallaro, V., et al., Aporphinoid Alkaloids Derivatives as Selective Cholinesterases Inhibitors: Biological Evaluation and Docking Study. *Mol Inform*, 2020. <https://doi.org/10.1002/minf.201900125>
33. Galarce-Bustos, O., et al., Detection and identification of acetylcholinesterase inhibitors in *Annona cherimola* Mill. by effect-directed analysis using thin-layer chromatography-bioassay-mass spectrometry. *Phytochem Anal*, 2019. 30(6): p. 679-686. <https://doi.org/10.1002/pca.2843>
34. Knakker, B., et al., Delay-dependent cholinergic modulation of visual short-term memory in rhesus macaques. *Behav Brain Res*, 2021. 396: p. 112897. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112897>
35. Schirinzi, T., et al., The continuum between neurodegeneration, brain plasticity, and movement: a critical appraisal. *Rev Neurosci*, 2020. 31(7): p. 723-742. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2020-0011>
36. Beg, T., et al., Protective Effect of Kaempferol on the Transgenic *Drosophila* Model of Alzheimer's Disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2018. 17(6): p. 421-429. <https://doi.org/10.2174/1871527317666180508123050>
37. Chinchore, Y., G.F. Gerber, and P.J. Dolph, Alternative pathway of cell death in *Drosophila* mediated by NF-kappaB transcription factor Relish. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109(10): p. E605-12. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110666109>
38. Copf, T., et al., Cytokine signaling through the JAK/STAT pathway is required for long-term memory in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108(19): p. 8059-64. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012919108>
39. Tare, M., et al., Activation of JNK signaling mediates amyloid-ss-dependent cell death. *PLoS One*, 2011. 6(9): p. e24361. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024361>
40. Wang, C., et al., Piperine attenuates cognitive impairment in an experimental mouse model of sporadic Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem*, 2019. 70: p. 147-155. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.05.009>

41. Fakhri, S., et al., Attenuation of Nrf2/Keap1/ARE in Alzheimer's Disease by Plant Secondary Metabolites: A Mechanistic Review. *Molecules*, 2020. 25(21). <https://doi.org/10.3390/molecules25214926>
42. Chen, L., et al., Gelsemine, a natural alkaloid extracted from *Gelsemium elegans* Benth. alleviates neuroinflammation and cognitive impairments in Aβ oligomer-treated mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 2020. 237(7): p. 2111-2124. <https://doi.org/10.1007/s00213-020-05522-y>
43. Sperling, L.E., et al., Galantamine improves functional recovery and reduces lesion size in a rat model of spinal cord injury. *Brain Res*, 2019. 1724: p. 146424. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146424>
44. Licher, S., et al., Alzheimer's disease as a multistage process: an analysis from a population-based cohort study. *Aging (Albany NY)*, 2019. 11(4): p. 1163-1176. <https://doi.org/10.18632/aging.101816>

## SUPPLEMENTAL MATERIAL - S1. The information of 79 targets predicted

No.	Gene name	Protein name	No.	Gene name	Protein name
1	ADRA2B	Alpha-2B adrenergic receptor	40	NR3C2	Mineralocorticoid receptor
2	DRD5	D(1B) dopamine receptor	41	NOS2	Nitric oxide synthase
3	DRD4	D(4) dopamine receptor	42	NR2F2	Nuclear receptor subfamily 2
4	ADRA2A	Alpha-2A adrenergic receptor	43	TYK2	Non-receptor tyrosine-protein kinase TYK2
5	HTR2A	5-hydroxytryptamine receptor 2A	44	CHRM2	Muscarinic acetylcholine receptor M2
6	DRD1	D(1A) dopamine receptor	45	HTR1D	5-hydroxytryptamine receptor 1D
7	DRD2	D(2) dopamine receptor	46	CLK4	Dual specificity protein kinase CLK4
8	DRD3	D(3) dopamine receptor	47	HRH1	Histamine H1 receptor
9	HTR5A	5-hydroxytryptamine receptor 5A	48	DYRK1A	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A
10	SIGMAR1	Sigma non-opioid intracellular receptor 1	49	CHRM1	Muscarinic acetylcholine receptor M1
11	CASP9	Caspase-9	50	MAPK10	Mitogen-activated protein kinase 10
12	HTR1A	5-hydroxytryptamine receptor 1A	51	HTR1F	5-hydroxytryptamine receptor 1F
13	HTR2C	5-hydroxytryptamine receptor 2C	52	PTK2	Focal adhesion kinase 1
14	ADRA2C	Alpha-2C adrenergic receptor	53	JAK2	Tyrosine-protein kinase JAK2
15	CHRM4	Muscarinic acetylcholine receptor M4	54	CYP3A4	Cytochrome P450 3A4
16	RIPK2	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2	55	ZAP70	Tyrosine-protein kinase ZAP-70
17	HTR1E	5-hydroxytryptamine receptor 1E	56	RET	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor Ret
18	HTR7	5-hydroxytryptamine receptor 7	57	TEK	Angiopoietin-1 receptor
19	AHR	Aryl hydrocarbon receptor	58	RPS6KB1	Ribosomal protein S6 kinase beta-1
20	KCNH2	Potassium voltage-gated channel subfamily H member 2	59	MAOA	Amine oxidase [flavin-containing] A
21	ADRA1D	Alpha-1D adrenergic receptor	60	PTPRC	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C
22	ADRA1A	Alpha-1A adrenergic receptor	61	FLT3	Receptor-type tyrosine-protein kinase FLT3
23	ABCB1	ATP-dependent translocase ABCB1	62	HNF4A	Hepatocyte nuclear factor 4-alpha
24	CYP1A2	Cytochrome P450 1A2	63	GSK3B	Glycogen synthase kinase-3 beta
25	HTR1B	5-hydroxytryptamine receptor 1B	64	CDK2	Cyclin-dependent kinase 2
26	RORA	Nuclear receptor ROR-alpha	65	MAPK9	Mitogen-activated protein kinase 9
27	TAAR1	Trace amine-associated receptor 1	66	PTPN7	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 7
28	CLK1	Dual specificity protein kinase CLK1	67	EPHB4	Ephrin type-B receptor 4
29	MIF	Macrophage migration inhibitory factor	68	CDC25B	M-phase inducer phosphatase 2
30	CA6	Carbonic anhydrase 6	69	PLIN5	Perilipin-5
31	SLC6A4	Sodium-dependent serotonin transporter	70	ALOX15	Arachidonate 15-lipoxygenase
32	ABCG2	ATP-binding cassette sub-family G member 2	71	PIM1	Serine/threonine-protein kinase pim-1
33	ACHE	Acetylcholinesterase	72	CES1	Liver carboxylesterase 1
34	BCL2A1	Bcl-2-related protein A1	73	RELA	Transcription factor p65
35	CYP19A1	Cytochrome P450 19A1	74	CDC7	Cell division cycle 7-related protein kinase
36	CYP2C19	Cytochrome P450 2C19	75	ALPL	Alkaline phosphatase
37	PTGS1	Prostaglandin G/H synthase 1	76	MAPKAPK2	MAP kinase-activated protein kinase 2
38	TLR9	Toll-like receptor 9	77	GRM4	Metabotropic glutamate receptor 4
39	S1PR2	Sphingosine 1-phosphate receptor 2	78	CDK2	Cyclin-dependent kinase 2

## S2. Biological process under GO terms

Biological process	<b>-log10 p-value</b>	Protein name	<b>-log10 p-value</b>
Response to drug	11.26091705	Response to toxic substance	4.386014601
Phospholipase C-activating G-protein coupled receptor signaling pathway	9.250843357	Regulation of smooth muscle contraction	4.320357591
Release of sequestered calcium ion into cytosol	9.23442593	Adenylate cyclase-inhibiting G-protein coupled receptor signaling pathway	4.224569522
G-protein coupled receptor signaling pathway, coupled to cyclic nucleotide second messenger	8.865528946	Adenylate cyclase-inhibiting serotonin receptor signaling pathway	4.218460824
Peptidyl-tyrosine phosphorylation	8.776433399	Response to histamine	4.218460824
Serotonin receptor signaling pathway	8.68217802	Cellular calcium ion homeostasis	4.19835689
Protein autophosphorylation	8.283035097	Epidermal growth factor-activated receptor transactivation by G-protein coupled receptor signaling pathway	3.918708361
Chemical synaptic transmission	7.990375036	Norepinephrine-epinephrine vasoconstriction involved in regulation of systemic arterial blood pressure	3.918708361
Adenylate cyclase-activating adrenergic receptor signaling pathway	7.735447038	Negative regulation of epinephrine secretion	3.918708361
Xenobiotic metabolic process	7.222229446	Activation of MAPK activity by adrenergic receptor signaling pathway	3.918708361
Synaptic transmission, dopaminergic	6.570947691	Negative regulation of adenylate cyclase activity	3.830229706
Behavioral response to cocaine	6.426311021	Regulation of dopamine uptake involved in synaptic transmission	3.69813673
Vasoconstriction	6.054641385	Adenylate cyclase-inhibiting dopamine receptor signaling pathway	3.69813673
Positive regulation of cell proliferation	5.949790113	Peptidyl-serine phosphorylation	3.592708494
Regulation of vasoconstriction	5.750396518	Monoterpenoid metabolic process	3.523322173
Protein phosphorylation	5.212624966	Heterocycle metabolic process	3.523322173
Regulation of behavior	5.13435164	Inflammatory response	3.509557259
Behavioral fear response	5.073416507	Negative regulation of blood pressure	3.479812737
Activation of MAPK activity	5.053061528	Circadian rhythm	3.432704544
G-protein coupled receptor signaling pathway	4.99992876	Regulation of locomotion	3.378470425
Response to amphetamine	4.954248657	Aging	3.042083245
Positive regulation of vasoconstriction	4.897745485	Prepulse inhibition	2.816244097
Positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade	4.849750557	Cerebral cortex GABAergic interneuron migration	1.570985772
Dopamine metabolic process	4.843980974	MAPK cascade	1.508661836
Regulation of dopamine secretion	4.6079319	Synapse assembly	1.506530968

### S3. The information of 53 *D. melanogaster* targets predicted

No.	Gene name	Protein name	No.	Gene name	Protein name
1	Dop1R1	Dopamine receptor 1	28	Hr3	nuclear hormone receptor HR3
2	Dop2R	Dopamine D2-like receptor	29	Nos	Nitric oxide synthase
3	5-HT2A	5-hydroxytryptamine receptor 2A	30	svp	Steroid receptor seven-up
4	Dredd	Caspase-8	31	hop	Tyrosine-protein kinase hopscotch
5	5-HT1A	-hydroxytryptamine receptor 1A	32	mAChR-B	Muscarinic acetylcholine Receptor, B-type
6	mAChR-A	Muscarinic acetylcholine receptor DM1	33	mnb	Minibrain (Mnb) Ser/Thr protein kinase
7	Raf	Raf homolog serine/threonine-protein kinase phl	34	bsk	Stress-activated protein kinase JNK
8	5-HT1B	5-hydroxytryptamine receptor 1B	35	Fak	Focal Adhesion Kinase (FAK)
9	5-HT7	5-hydroxytryptamine receptor 7	36	Cyp9f2	Probable cytochrome P450 9f2
10	ss	Spineless, isoform C	37	Shark	Tyrosine-protein kinase shark
11	sei	Putative potassium channel subunit homolog	38	tor	Serine/threonine-protein kinase Tor
12	TyrRII	Tyramine receptor II	39	S6k	Ribosomal protein S6 kinase
13	Oamb	Octopamine receptor Oamb	40	Ptp69D	Protein tyrosine phosphatase 69D
14	Mdr50	Multi drug resistance 50	41	Pvr	PDGF-and VEGF-receptor related
15	Hr3	Probable nuclear hormone receptor HR3	42	Hnf4	Transcription factor HNF-4 homolog
16	Doa	Serine/threonine-protein kinase Doa	43	sgg	Protein kinase shaggy
17	spok	Spookier	44	Cdk2	Cyclin-dependent kinase 2
18	mAChR-C	Muscarinic acetylcholine Receptor, C-type	45	PTP-ER	Protein tyrosine phosphatase-ERK
19	SerT	Sodium-dependent serotonin transporter	46	twe	Cdc25-like protein phosphatase twine
20	w	Protein white	47	Lsd-1	Lipid storage droplet-1
21	Ace	Acetylcholinesterase	48	CG6414	Carboxylic ester hydrolase
22	Debcl	Death executioner Bcl-2 homologue	49	dl	Embryonic polarity protein dorsal
23	Cyp4ac1	Probable cytochrome P450 4ac1	50	CG5790	Uncharacterized protein
24	CG4009	Uncharacterized protein	51	Alp1	Alkaline phosphatase
25	Tl	Protein toll	52	MAPk-Ak2	MAP kinase-activated protein kinase 2
26	Amy-p	Alpha-amylase B	53	mGluR	Metabotropic glutamate receptor
27	ERR	Estrogen-related receptor	54		

### S4 Biological process under GO terms for *D. melanogaster*

Biological process	-log10 p-value	Protein name	-log10 p-value
Protein phosphorylation	11.71653	Actin filament organization	2.071696
Chemical synaptic transmission	6.068642	Adenylate cyclase-inhibiting serotonin receptor signaling pathway	2.00091
Serotonin receptor signaling pathway	5.18608	Protein phosphorylation	11.71653
Protein autophosphorylation	5.112525	Phospholipase C-activating serotonin receptor signaling pathway	2.00091
Peptidyl-tyrosine autophosphorylation	4.382416	Ovarian follicle cell development	1.96396
Regulation of hemocyte differentiation	4.287047	Response to oxidative stress	1.96396
Innate immune response	3.784588	Positive regulation of cell size	1.955926
Hemopoiesis	3.709156	Cell adhesion	1.938671
Synaptic transmission, dopaminergic	3.063147	Defense response	1.905212
Hemocyte proliferation	2.881876	Dopamine receptor signaling pathway	1.825886
Regulation of glucose metabolic process	2.73204	Regulation of response to drug	1.825886
Male courtship behavior	2.704585	Regulation of cell shape	1.809699
Nervous system development	2.618084	Synaptic growth at neuromuscular junction	1.770369
Immune response	2.610417	Negative regulation of JUN kinase activity	1.702013
Heart development	2.521717	G-protein coupled acetylcholine receptor signaling pathway	1.702013
Learning	2.497055	Oogenesis	1.694556
Steroid hormone mediated signaling pathway	2.447294	Negative regulation of synaptic growth at neuromuscular junction	1.673723
Border follicle cell migration	2.386845	Lamellocyte differentiation	1.606168
Gastrulation	2.199412	Synapse assembly	1.541114
Phototaxis	2.099175	Wing and notum subfield formation	1.528052
Memory	2.099175	Negative regulation of macroautophagy	1.528052
Ventral cord development	2.071696		