

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**LILIAN DO AMARAL**

**Neuritogênese induzida pela doxiciclina: estudo das vias de  
sinalização e do efeito protetor em modelo *in vitro* associado à  
doença de Parkinson**

**Ribeirão Preto**  
**2021**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**LILIAN DO AMARAL**

**Neuritogênese induzida pela doxiciclina: estudo das vias de  
sinalização e do efeito protetor em modelo *in vitro* associado à  
doença de Parkinson**

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia  
da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de  
Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título  
de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

**Orientador: Prof. Dr. Antonio Cardozo dos  
Santos**

Ribeirão Preto

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Amaral, Lilian do

Neuritogênese induzida pela doxiciclina: estudo das vias de sinalização e do efeito protetor em modelo *in vitro* associado à doença de Parkinson. Ribeirão Preto, 2021.

73 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Santos, Antonio Cardozo dos

1. Doxiciclina. 2. Neuritogênese. 3. Doença de Parkinson. 4. Células PC12. 5. Neuroplasticidade Axonal.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Lilian do Amaral

Neuritogênese induzida pela doxiciclina: estudo das vias de sinalização e do efeito protetor em modelo *in vitro* associado à doença de Parkinson

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Cardozo dos Santos

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*Dedico este trabalho à minha família  
e aos meus verdadeiros amigos.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente aos meus pais, Yieda e Daelcio, por todo o apoio, amor e dedicação. Sinto uma gratidão enorme por todo o incentivo incondicional que me ajudou a chegar até aqui. O acolhimento de vocês nos momentos difíceis foi fundamental durante todo esse período. Vocês são o meu porto seguro.

À minha irmã Cíntia, por toda a paciência e companheirismo. Obrigada pela força, confiança e momentos divertidos que vivemos.

A toda a minha família, pelo suporte e torcida dedicados a mim apesar da distância.

Aos meus amigos de longa data, Júlia, Marcela, Marina e Vinícius por acreditarem e torcerem por mim desde a época da escola. Cada um está seguindo seu caminho, mas sempre poderemos contar uns com os outros. Nossos encontros trouxeram uma energia boa que me ajudou a chegar aqui. Obrigada por todos os abraços.

Aos amigos que conheci em Ribeirão Preto, pelo apoio, compreensão e tantas conversas incríveis.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Cardozo dos Santos, pela oportunidade e confiança depositada em mim. Os ensinamentos, conselhos e experiências compartilhadas foram essenciais para a minha formação profissional.

À Neife, por toda a atenção, ajuda e confiança dedicadas a mim. Sua experiência foi fundamental para o andamento deste trabalho. Obrigada pela dedicação.

Às minhas colegas de laboratório, pelo suporte diário, tanto em momentos de sucesso quanto de frustração, sempre buscando o bom humor nestes casos. Agradeço pelas experiências compartilhadas dentro e fora do laboratório.

A todos os funcionários da FCFRP-USP por toda a assistência. Em especial à Rose, pela paciência, competência, disponibilidade e atenção que me ajudaram a passar por todas as fases desta pós-graduação.

A todas as pessoas que direta e indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Às agências financiadoras CNPq e CAPES pelo apoio financeiro concedido.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*“Um cientista em seu laboratório não é apenas um técnico: ele também é uma criança diante de fenômenos naturais que o impressionam como um conto de fadas.”*

*Marie Curie*

## RESUMO

AMARAL, L. **Neuritogênese induzida pela doxiciclina: estudo das vias de sinalização e do efeito protetor em modelo *in vitro* associado à doença de Parkinson.** 2021. 73 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

As tetraciclina de segunda geração, como a doxiciclina, foram introduzidas nos anos 60, sendo amplamente usadas como antibióticos até hoje. A doxiciclina é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e induzir efeitos distintos da sua atividade antibiótica. Estudos anteriores sugerem o potencial neuroprotetor da doxiciclina, porém o envolvimento da atividade neurotrófica nesse efeito não foi ainda avaliado. O efeito neurotrófico é uma ferramenta importante na neuroproteção, considerando-se o papel da degeneração axonal nos estágios iniciais das doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Parkinson. Assim, este estudo visou investigar a ação da doxiciclina nas vias de sinalização da neuritogênese, bem como seu possível efeito neuroprotetor em modelo *in vitro* de neurotoxicidade induzida pela neurotoxina dopaminérgica MPP<sup>+</sup> em células PC12. Essas células constituem um modelo apropriado para a avaliação da diferenciação neuronal, pois respondem ao NGF (fator de crescimento neuronal) emitindo neuritos (precursores de axônios e dendritos) e adquirindo características de neurônios simpáticos. Os resultados indicam que a doxiciclina induz a neuritogênese através da ativação do receptor trkA e das vias de sinalização neurotrófica PI3K/Akt e MAPK/ERK, promovendo o aumento da expressão de proteínas associadas à plasticidade axonal e sináptica (sinapsina I, GAP-43 e NF-200). Ainda, a doxiciclina protege as células PC12 contra a regulação negativa induzida pelo MPP<sup>+</sup> em proteínas axonais (GAP-43, NF-200) e do citoesqueleto ( $\beta$ III-tubulina). Sinaptofisina, F-actina e moduladores da bioenergética não são alvos moleculares da doxiciclina. Em conjunto, os resultados indicam o potencial neurotrófico da doxiciclina, bem como a participação desse mecanismo de ação na sua atividade neuroprotetora. Esses achados são promissores e sugerem que a doxiciclina pode promover regeneração axonal nos processos neurodegenerativos. Estudos adicionais são necessários para comprovar esse efeito.

Palavras-chave: doxiciclina, neuritogênese, doença de Parkinson, células PC12, neuroplasticidade axonal.

## ABSTRACT

AMARAL, L. **Neuritogenesis induced by doxycycline: study of signaling pathways and the protective effect in an *in vitro* model associated with Parkinson's disease.** 2021. 73 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Second-generation tetracyclines, such as doxycycline, were introduced in the 1960s and are widely used as antibiotics until today. Doxycycline is able to cross the blood-brain barrier and induce distinct effects from its antibiotic activity. Previous studies suggest the neuroprotective potential of doxycycline, but the involvement of neurotrophic action in this effect has not yet been evaluated. The neurotrophic effect is an important tool for neuroprotection, considering the role of axonal degeneration in the early stages of neurodegenerative diseases, including Parkinson's disease. Thus, this study aimed to investigate the action of doxycycline on neurotrophic signaling pathways, as well as its possible neuroprotective effect in an *in vitro* model of neurotoxicity induced by the dopaminergic neurotoxin MPP<sup>+</sup> in PC12 cells. These cells constitute an appropriate model for the assessment of neuronal differentiation, as they respond to NGF (Nerve Growth Factor) by emitting neurites (precursors of axons and dendrites) and acquiring characteristics of sympathetic neurons. The results indicate that doxycycline induces neuritogenesis through activation of the trkA receptor and neurotrophic signaling pathways PI3K/Akt and MAPK/ERK, promoting increased expression of proteins associated with axonal and synaptic plasticity (synapsin I, GAP-43 and NF-200). In addition, doxycycline protects PC12 cells against negative regulation induced by MPP<sup>+</sup> in axonal (GAP-43, NF-200) and cytoskeletal ( $\beta$ III-tubulin) proteins. Synaptophysin, F-actin and bioenergetic modulators are not molecular targets of doxycycline. Altogether the results indicate the neurotrophic potential of doxycycline, as well as the participation of this action mechanism in its neuroprotective activity. These findings are promising and suggest that doxycycline might induce axonal regeneration in neurodegenerative processes. Further studies are needed to confirm this effect.

Keywords: doxycycline, neuritogenesis, Parkinson's disease, PC12 cells, axonal neuroplasticity.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Estrutura química da doxíciclina.....	1
Figura 2 – Efeito da doxíciclina na viabilidade de células PC12.....	21
Figura 3 – Efeito da doxíciclina na neuritogênese de células PC12 não estimuladas com NGF.....	22
Figura 4 – Efeito do antagonista do receptor trkA (K252a) na neuritogênese induzida pela doxíciclina em células PC12.....	24
Figura 5 – Efeito do LY294002 (inibidor da via PI3K/Akt) na neuritogênese induzida pela doxíciclina em células PC12.....	26
Figura 6 – Efeito do U0126 (inibidor da via MAPK/ERK) na neuritogênese induzida pela doxíciclina em células PC12.....	28
Figura 7 – Efeito da doxíciclina na expressão de fosfo-TrkA em células PC12 não estimuladas com NGF.....	30
Figura 8 – Efeito da doxíciclina na expressão de sinapsina I em células PC12 não estimuladas com NGF.....	31
Figura 9 – Efeito da doxíciclina na expressão de sinaptofisina em células PC12 não estimuladas com NGF.....	32
Figura 10 – Efeito da doxíciclina na expressão de GAP-43 em células PC12 não estimuladas com NGF.....	33
Figura 11 – Efeito da doxíciclina na expressão de $\beta$ III-tubulina em células PC12 não estimuladas com NGF.....	34
Figura 12 – Efeito da doxíciclina na expressão de F-actina em células PC12 não estimuladas com NGF.....	35
Figura 13 – Efeito da doxíciclina na expressão do NF-200 em células PC12 não estimuladas com NGF.....	36
Figura 14 – Efeito da doxíciclina na neuritogênese em modelo de neurotoxicidade induzida pelo MPP <sup>+</sup> .....	38

Figura 15 – Efeito da doxíciclina na expressão de sinapsina I em modelo de neurotoxicidade induzida pelo MPP <sup>+</sup> .....	40
Figura 16 – Efeito da doxíciclina na expressão de sinaptofisina em modelo de neurotoxicidade induzida pelo MPP <sup>+</sup> .....	41
Figura 17 – Efeito da doxíciclina na expressão de GAP-43 em modelo de neurotoxicidade induzida pelo MPP <sup>+</sup> .....	42
Figura 18 – Efeito da doxíciclina na expressão de $\beta$ III-tubulina em modelo de neurotoxicidade induzida pelo MPP <sup>+</sup> .....	43
Figura 19 – Efeito da doxíciclina na expressão de F-actina em modelo de neurotoxicidade induzida pelo MPP <sup>+</sup> .....	44
Figura 20 – Efeito da doxíciclina no neurofilamento NF-200 em modelo de neurotoxicidade induzida pelo MPP <sup>+</sup> .....	45
Figura 21 – Efeito da doxíciclina na captação da glicose em (A) células PC12 não estimuladas com NGF e em (B) modelo de neurotoxicidade induzida pelo MPP <sup>+</sup> ....	47
Figura 22 – Efeito da doxíciclina na expressão de SIRT1 em células PC12 não estimuladas com NGF .....	49
Figura 23 – Efeito da doxíciclina na expressão de AMPK $\alpha$ em células PC12 não estimuladas com NGF .....	50
Figura 24 – Efeito da doxíciclina na expressão de fosfo-AMPK $\alpha$ em células PC12 não estimuladas com NGF .....	51

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

6-OHDA	6-hidroxi-dopamina
AMPK	Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BSA	Soro-albumina bovina
CPM	Contagem por minuto
FCTC	Fluorescência celular total corrigida
DA	Doença de Alzheimer
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densitometria ótica
DP	Doença de Parkinson
EPM	Erro padrão da média
ERK	Quinase extracelular regulada
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FBS	Soro fetal bovino
GAP-43	Proteína associada ao crescimento axonal
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia
GLUT	Transportador de glicose
LPS	Lipopolissacarídeo

MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MMP-9	Metaloproteinase-9
MPP <sup>+</sup>	1-metil-4-fenilpiridíneo
MPTP	1-metil-4-fenil-1;2;3;6-tetrahidropiridina
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NF-200	Neurofilamento de 200 kDa
NGF	Fator de crescimento neuronal
NT-3	Neurotrofina-3
NT 4/5	Neurotrofina 4/5
PBS	Tampão fosfato-salino
PI3K/Akt	Fosfatidilinositol 3-quinase
PKC	Proteína quinase C
RPM	Rotação por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SIRT1	Sirtuína 1
SNC	Sistema Nervoso Central
trk	Receptor tropomiosina quinase
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b>	<b>i</b>
<b>Abstract</b>	<b>ii</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>iii</b>
<b>Lista de abreviaturas e siglas</b>	<b>v</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Tetraciclinas	1
1.2 Doxíciclina	2
1.3 Doença de Parkinson	3
1.4 Degeneração axonal e doenças neurodegenerativas	4
1.5 Neuritogênese e proteínas relacionadas à neuroplasticidade axonal	5
1.6 Neurotrofinas e vias de sinalização neurotrófica	7
1.7 Marcadores da bioenergética celular	8
1.8 Células PC12	9
1.9 Estratégias de neuroproteção	10
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>13</b>
3.1 Reagentes	13
3.2 Cultura celular	13
3.3 Contagem de células em câmara de Neubauer	14
3.4 Ensaio de viabilidade celular	14
3.5 Diferenciação celular	14
3.6 Tratamento com inibidores das vias de sinalização neurotrófica	15
3.7 Western blot (fosfo-TrkA, sinapsina I, sinaptofisina, GAP-43, $\beta$ III-tubulina, F-actina, SIRT1, AMPK $\alpha$ e fosfo-AMPK $\alpha$ )	15
3.7.1 Preparo do lisado celular	15
3.7.2 Dosagem de proteínas do lisado celular	16
3.7.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	16
3.7.4 Transferência gel-membrana	17
3.7.5 Reação imune	17
3.8 Diferenciação celular no modelo de neurotoxicidade/neuroproteção	18

3.9 Western blot no modelo de neurotoxicidade/neuroproteção (sinapsina I, sinaptofisina, GAP-43, $\beta$ III-tubulina e F-actina) .....	18
3.10 Determinação de neurofilamento NF-200 por imunofluorescência .....	18
3.11 Captação de glicose .....	19
3.12 Análise estatística .....	19
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>21</b>
4.1 Viabilidade celular .....	21
4.2 Efeito da doxíciclina na neuritogênese de células PC12 .....	22
4.3 Tratamento com inibidores das vias de sinalização neurotrófica .....	24
4.4 Efeito da doxíciclina na expressão de fosfo-TrkA, sinapsina I, sinaptofisina, GAP-43, $\beta$ III-tubulina e F-actina em células PC12 não estimuladas com NGF .....	30
4.5 Efeito da doxíciclina na expressão de NF-200 em células PC12 .....	36
4.6 Efeito da doxíciclina na neuritogênese em modelo de neurotoxicidade induzida por MPP <sup>+</sup> .....	38
4.7 Efeito da doxíciclina na expressão de sinapsina I, sinaptofisina, GAP-43, $\beta$ III-tubulina e F-actina no modelo de neurotoxicidade induzida por MPP <sup>+</sup> .....	40
4.8 Efeito da doxíciclina no neurofilamento NF-200 em modelo de neurotoxicidade induzida pelo MPP <sup>+</sup> .....	45
4.9 Captação de glicose .....	47
4.10 Efeito da doxíciclina sobre a expressão de SIRT1, AMPK $\alpha$ e fosfo-AMPK $\alpha$ em células PC12 não estimuladas com NGF .....	49
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>52</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>60</b>
<b>7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	<b>61</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>62</b>

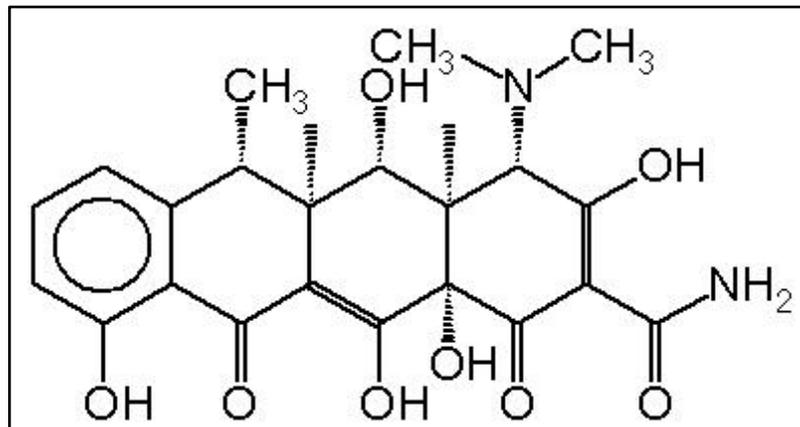
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Tetraciclinas

Tetraciclinas formam um grupo de antibióticos de amplo-espectro que inclui dentre outros, a tetraciclina, doxiciclina e minociclina. A primeira tetraciclina, denominada clortetraciclina ou aureomicina, foi descoberta por Benjamin Duggar em 1948 e tratava-se de um produto de fermentação natural da bactéria *Streptomyces aureofaciens* (DUGGAR, 1948; SAPADIN; FLEISCHMAJER, 2006).

Todas as tetraciclinas são formadas por um núcleo tetracíclico linear, sendo essa uma característica importante para sua atividade antibacteriana. A estrutura dos anéis é circundada por regiões que contém vários grupos químicos funcionais que determinam cada exemplar, alterações nessas regiões podem reduzir as propriedades antibióticas ou não-antibióticas (NELSON, 1998). Como exemplo, a Figura 1 traz a estrutura química característica da doxiciclina.

**Figura 1** – Estrutura química da doxiciclina.



Em humanos, tratamentos de longa duração com tetraciclinas são geralmente seguros (ORSUCCI et al., 2012). Entre 1966 e 2003, o número de publicações de efeitos adversos causados pela doxiciclina (130 casos) foi consideravelmente menor do que o número reportado em relação à minociclina (333 casos). Porém, ambos os medicamentos se provaram eficientes e seguros contra muitas doenças infecciosas e no tratamento de acne vulgaris (SMITH; LEYDEN, 2005; DEL ROSSO, 2015).

## 1.2 Doxiciclina

As tetraciclinas de segunda geração, como a doxiciclina, foram introduzidas nos anos 60 (CUNHA; COMER; JONAS, 1982) e permanecem sendo amplamente usadas como antibióticos (DEL ROSSO, 2015). A doxiciclina possui alta efetividade antibiótica e baixo-custo, além de estar na Lista de Medicamentos Essenciais da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2017). Trata-se de um dos antibióticos sistêmicos mais recomendados no tratamento da acne (SMITH; LEYDEN, 2005, DEL ROSSO, 2015). Dentre as tetraciclinas, o tratamento com doxiciclina contra infecções do sistema nervoso central aparece como um dos mais eficientes (NAU; SÖRGEL; EIFFERT, 2010).

A doxiciclina apresenta características lipofílicas e é altamente absorvida, com uma biodisponibilidade maior que 80% (AGWUH; MacGOWAN, 2006), sendo capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica (ZHANG et al., 2015). É lentamente absorvida por via oral, levando de 2 a 3 horas para atingir concentrações de pico. Sua ligação com proteínas plasmáticas é maior que 80% e a meia-vida no plasma é longa, variando de 12-25 horas, o que permite um regime de dosagem menor que outros antibióticos (AGWUH; MacGOWAN, 2006).

Estudos demonstram que a doxiciclina afeta diversas funções celulares induzindo efeitos distintos da sua função antibiótica. Yao et al. (2007) relataram os efeitos antiangiogênicos da doxiciclina e minociclina, capazes de impedir a migração de células musculares lisas de aorta humana induzidas por VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) através da inibição da metaloproteinase-9 (MMP-9), o que seria benéfico em patologias em que a ação de metaloproteinases contribui para o processo inflamatório (BORTOLANZA et al., 2018). A capacidade da doxiciclina de atenuar diferentes desordens neurológicas tem sido demonstrada por diversos estudos em modelos animais. Girgenrath et al. (2009) descreveram os efeitos benéficos da doxiciclina em ratos deficientes em laminin- $\alpha$ -2 (Lama2<sup>-/-</sup>), um modelo para a doença humana Distrofia Muscular Congênita tipo 1A. Um estudo com *Drosophila melanogaster* sugeriu o potencial terapêutico para doença de Alzheimer (DA) ao mostrar que a doxiciclina modula o acúmulo de peptídeo  $\beta$ -amilóide no cérebro (COSTA et al., 2011). Paldino et al. (2020) demonstraram que a doxiciclina aumenta a sobrevivência e atenua os sinais de disfunção neurológica em modelo de doença de Huntington com camundongos, associando o efeito

neuroprotetor à atividade anti-inflamatória da doxiciclina. Também foi demonstrado que a doxiciclina reduz a degeneração de neurônios dopaminérgicos em modelo de ratos com doença de Parkinson induzida por LPS (lipopolissacarídeo) (ZHANG et al., 2015). Ainda, a doxiciclina inibe a degeneração dos neurônios dopaminérgicos induzida pela neurotoxina 6-OHDA em camundongos (modelo de doença de Parkinson), e esse efeito foi associado à diminuição da ativação da microglia (LAZZARINI et al., 2013). Este mesmo grupo de pesquisa demonstrou que doses subantibióticas da doxiciclina são capazes de remodelar *in vitro* a agregação de  $\alpha$ -sinucleína (evento chave da doença de Parkinson), promovendo a formação de oligômeros não citotóxicos e quebrando o círculo vicioso no qual agregados de  $\alpha$ -sinucleína ativam as células da glia, induzem fatores pró-inflamatórios, dano mitocondrial e formação de espécies reativas de oxigênio, que promovem, além de danos celulares diretos, maior agregação de  $\alpha$ -sinucleína (GONZALEZ-LIZARRAGA et al., 2017).

### 1.3 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é uma forma de neurodegeneração muito comum, caracterizada pela morte progressiva de neurônios dopaminérgicos na substância *nigra pars compacta* (SNc) e que se manifesta clinicamente por distúrbios motores, como bradicinesia, rigidez muscular, postura instável e tremor (GARRET, 2004; KUMMER; TEIXEIRA, 2009 e SON et al. 2012). Além da degeneração de neurônios dopaminérgicos, outros marcadores neuropatológicos da DP são os corpos de Lewy, inclusões citoplasmáticas compostas principalmente de agregados anormais de  $\alpha$ -sinucleína (SPILLANTINI et al., 1998; WEIL et al., 2017). Trata-se de uma doença multifatorial, para a qual contribuem fatores genéticos, fatores ambientais e a interação entre ambos, porém os mecanismos envolvidos ainda não são claros. O envelhecimento é considerado o maior fator de risco para DP (POWERS et al., 2017). Passaram-se mais de 200 anos desde que James Parkinson descreveu os sintomas motores da “Paralisia Agitante” (*An Essay on the Shaking Palsy*, 1817) e apesar de todo o progresso alcançado pela ciência, ainda não há uma cura para DP (DEL REY et al., 2018).

No campo da pesquisa, modelos tratados com 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) possibilitaram alguns avanços nos estudos sobre DP. O

MPTP é uma droga capaz de causar em humanos uma síndrome aguda semelhante à DP, com todos os sintomas motores característicos e alguns não motores. Como a sua ação havia sido observada em humanos, a aplicação dessa toxina em modelos animais para pesquisa se tornou uma ferramenta útil na busca de estratégias de prevenção e tratamento da DP (LANGSTON, 2017; DEL REY et al., 2018). A neurotoxina dopaminérgica 1-metil-4-fenilpiridíneo (MPP<sup>+</sup>) é utilizada em modelos *in vitro* para o estudo da DP e trata-se do metabólito ativo do MPTP. O MPP<sup>+</sup> serve como substrato para o transportador de membrana da dopamina e acumula-se nas mitocôndrias, onde inibe o complexo I da cadeia transportadora de elétrons, levando à depleção de ATP e à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Assim, o MPP<sup>+</sup> tem como alvos preferenciais os neurônios dopaminérgicos e seus efeitos tóxicos caracterizam-se pela degeneração axonal e sináptica seguida da degeneração dos corpos celulares e perda neuronal (STORCH; LUDOLPH; SCHWARZ, 2004; SERULLE et al., 2007; SANTOS, 2014; DEL REY et al., 2018).

#### **1.4 Degeneração axonal e doenças neurodegenerativas**

Atualmente, há um consenso de que alterações dos axônios estão presentes no envelhecimento e nos estágios iniciais de doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer e doença de Parkinson (TAGLIAFERRO; BURKE, 2016; SALVADORES et al., 2017). Atrofia de neuritos, degeneração axonal e disfunção sináptica são eventos que precedem a morte somática dos neurônios e têm sido associados a déficits cognitivos e motores na DA e DP (TERRY, 2000; PICCONI et al., 2012).

A etiologia das doenças neurodegenerativas relacionadas à idade é multifatorial, sendo que a degeneração axonal presente nessas doenças parece estar associada à disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, falhas na bioenergética, inflamação, alterações do citoesqueleto, dentre outros fatores (KANAAN et al. 2013). Há evidências neuropatológicas de que a disfunção axonal e a perda de conectividade neuronal precedem a morte neuronal da DP, e que os axônios do sistema dopaminérgico nigroestriatal são os primeiros alvos do acúmulo de  $\alpha$ -sinucleína na DP (SERULLE et al., 2007; CAMINITI et al., 2017).

Portanto, no desenvolvimento de terapias neuroprotetoras, onde é crítico atingir os eventos iniciais, os mecanismos e moduladores da degeneração axonal

devem ser considerados como potenciais alvos moleculares (TAGLIAFERRO; BURKE, 2016). Compostos que induzem a plasticidade axonal são potenciais candidatos para a proteção ou restauração das redes neuronais perdidas nos processos neurodegenerativos (TOHDA; KUBOYAMA; KOMATSU, 2005; BURKE; O'MALLEY, 2013).

### **1.5 Neuritogênese e proteínas relacionadas à neuroplasticidade axonal**

A formação e crescimento de extensões neuronais denominadas neuritos fazem parte da etapa primária na formação de axônios e dendritos, crucial não apenas para a diferenciação neuronal e estabelecimento de uma rede de comunicação sináptica funcional, mas também para processos regenerativos (ARIMURA; KAIBUCHI, 2007; SAINATH; GALLO, 2015). Neuritos são marcadores de diferenciação celular *in vitro* e são usados para avaliar o potencial de drogas e compostos químicos para modular a plasticidade neuronal (MITCHELL et al., 2007; CALABRESE, 2008). A degeneração axonal pode ser avaliada *in vitro* através dos efeitos na neuritogênese, um processo que envolve a iniciação de neuritos seguida pelo alongamento dos axônios e ramificação dendrítica (KIRYUSHKO; BEREZIN; BOCK, 2004).

Neurônios imaturos apresentam um formato arredondado até que uma assimetria celular interna é gerada através de sinalizadores que determinam os locais da formação de neuritos. Projeções ricas em actina surgem e são estabilizados por microtúbulos, desfazendo a morfologia simétrica e levando à polarização neuronal. Durante o prolongamento dos neuritos, alterações na membrana, transporte intracelular e síntese de proteínas são essenciais para a diferenciação dos neuritos em axônio e múltiplos dendritos (SAINATH; GALLO, 2015; BENNISON et al., 2020). A exatidão durante a neuritogênese é fundamental para os demais estágios da morfogênese, como arborização, formação de sinapses, orientação do axônio e estabelecimento da conectividade neuronal adequada (BENNISON et al., 2020).

Dentre as inúmeras proteínas localizadas nos terminais pré-sinápticos, têm-se as sinapsinas e sinaptofisina que estão associadas a vesículas sinápticas, modulam a secreção de neurotransmissores e a formação de novas sinapses (ZHANG et al., 2014; MIRZA; ZAHID, 2018). Como todas as atividades biológicas dependem da

transmissão neuronal, alterações na atividade das sinapsinas podem contribuir para o desenvolvimento de desordens neurológicas (MIRZA; ZAHID, 2018).

A proteína associada ao crescimento axonal (GAP-43) é o principal constituinte do cone de crescimento dos axônios centrais e periféricos. Os neurônios, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, expressam níveis elevados de GAP-43 durante o crescimento de neuritos (DANI; ARMSTRONG; BENOWITZ, 1991; SHEA et al., 1991; BENOWITZ; ROUTTENBERG, 1997; DAS; FREUDENRICH; MUNDY, 2004).

Além das proteínas diretamente relacionadas ao crescimento axonal e comunicação sináptica, a neuritogênese é dependente das proteínas do citoesqueleto, incluindo neurofilamentos, tubulina e F-actina (ABOU-DONIA, LAPADULA; SUWITA, 1988; ABOU-DONIA, 1993). Um dos principais eventos durante a formação dos neuritos é o rearranjo do citoesqueleto para o surgimento de prolongamentos compostos de filamentos de actina na periferia do corpo celular, que contribuem para a motilidade e guiam o cone de crescimento; enquanto os microtúbulos formam feixes cilíndricos paralelos compostos de  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina, altamente dinâmicos que asseguram o crescimento e ramificação de axônios. Microtúbulos e filamentos de actina se coordenam para a formação de neuritos (SAINATH; GALLO, 2015; KOUNAKIS; TAVERNARAKIS, 2019).

Filamentos intermediários formam uma família de proteínas do citoesqueleto que são expressas de forma variada dependendo do tipo celular. No geral, promovem resistência mecânica e estabilidade às células. Filamentos intermediários neuronais ou neurofilamentos são componentes estruturais importantes durante o desenvolvimento de neuritos e seu nível de expressão pode ser utilizado como marcador da diferenciação neuronal, pois representam o principal elemento do citoesqueleto de neurônios maduros (SCHIMMELPFENG; WEIBEZAHN; DERTINGER, 2004; XU et al., 2012; KOUNAKIS; TAVERNARAKIS, 2019).

A formação e a retração de neuritos estão respectivamente associadas com o desenvolvimento e a patogênese no sistema nervoso (HAGG, 2009). A reconstrução das sinapses e redes neuronais pode contribuir para a recuperação das funções cerebrais perdidas com a neurodegeneração e pode constituir uma estratégia de tratamento das doenças neurodegenerativas (TOHDA; KUBOYAMA; KOMATSU, 2005). Por muito tempo acreditou-se que a degeneração do sistema nervoso central fosse irreversível, mas já foi evidenciado que os neurônios danificados se regeneram

através de um processo ativo, na presença de substâncias com propriedades neurotróficas (FILBIN, 2000).

### 1.6 Neurotrofinas e vias de sinalização neurotrófica

As neurotrofinas são uma família de pequenas proteínas que regulam a sobrevivência e o crescimento de neuritos, a diferenciação de neurônios durante o desenvolvimento e a manutenção da conectividade sináptica no sistema nervoso central, sendo cruciais para a sobrevivência e preservação da integridade dos neurônios durante a vida do indivíduo (MCALLISTER, 2001; SOFRONIEW; HOWE; MOBLEY, 2001).

O fator de crescimento neuronal, NGF (do inglês, *Nerve Growth Factor*) foi o primeiro fator de crescimento descoberto e caracterizado. Outros fatores neurotróficos incluem o fator de crescimento derivado do cérebro (BDNF, do inglês, *Brain Derived Neurotrophic Factor*), neurotrofina-3 (NT-3) e neurotrofina 4/5 (NT-4/5) (CUNHA et al., 2009). As neurotrofinas tem um papel central na organização sináptica que é um processo chave em muitas funções cerebrais, incluindo a aprendizagem (LUO; MILLER, 1998; CUNHA et al., 2009).

Existem dois tipos de receptores nos quais as neurotrofinas se ligam: p75<sup>NTR</sup> e os receptores da família trk (receptor tropomiosina quinase), que inclui os receptores trkA, trkB e trkC (LONGO; MASSA, 2013). Cada forma se liga seletivamente a uma diferente neurotrofina; o NGF se liga ao receptor trkA, que é encontrado em neurônios simpáticos, na raiz do gânglio dorsal e no prosencéfalo basal colinérgico. Os neurônios nessas regiões, principalmente no prosencéfalo basal colinérgico, são responsáveis pela memória, consciência, aprendizado e atenção. A sinalização do trk ocorre por três principais vias: a via da MAPK/ERK, a PI3K/Akt e a da fosfolipase Cγ1-PKC. Os efeitos desencadeados através da ativação dessas vias são predominantemente relacionados à sobrevivência e diferenciação celular (HUANG; REICHARDT, 2003).

Há um número crescente de evidências de que a redução do suporte neurotrófico esteja envolvida na patogênese das doenças neurodegenerativas tais como doença de Alzheimer, doença de Parkinson e esclerose amiotrófica lateral. Portanto, agentes neurotróficos são potenciais candidatos para o tratamento dessas doenças (MCALLISTER, 2001; SOFRONIEW; HOWE; MOBLEY, 2001).

## 1.7 Marcadores da bioenergética celular

Neurônios possuem uma alta demanda de energia e a glicose é o principal substrato de energia para o cérebro adulto. O metabolismo da glicose está envolvido em funções importantes relacionadas à neurotransmissão, armazenamento de energia, biossíntese e defesa oxidativa (DIENEL, 2012; POWERS et al., 2017).

Neuromoduladores e neurotransmissores não atravessam a barreira hematoencefálica e, portanto, são produzidos endogenamente com derivados da quebra da glicose (DIENEL, 2012). A captação da glicose do meio extracelular para o interior das células é realizado pelos transportadores de glicose (GLUT). No sistema nervoso são encontrados os tipos GLUT1 e GLUT3, presentes em astrócitos e neurônios, respectivamente (MUECKLER, 1994; THOUIDIS et al., 1999). Portanto, os neurônios são sensíveis a flutuações dos níveis de glicose. O transporte e a utilização de glicose no cérebro são reduzidos em pacientes idosos com comprometimento cognitivo leve e o envelhecimento é um dos principais fatores de risco para doenças neurodegenerativas. De fato, alterações no metabolismo energético foram observadas em estágios iniciais de doenças neurodegenerativas, como doença de Parkinson (LIN; BEAL, 2006; SPASIĆ; CALLAERTS; NORGA, 2009; POWERS et al., 2017).

A sirtuína-1 (SIRT1) é uma desacetilase de histonas dependente de  $\text{NAD}^+$  associada ao metabolismo energético celular, crescimento de neuritos, sobrevivência celular e prevenção da degeneração axonal (ARAKI; SASAKI; MILBRANDT, 2004; GUO et al., 2011; CETRULLO et al., 2015). Devido à sua capacidade de modificar e controlar diversos fatores de transcrição e cofatores envolvidos na homeostase, a SIRT1 é conhecida como um regulador metabólico e tem sido associada à longevidade. Assim, estudos sobre alterações dessa proteína podem contribuir para novas estratégias terapêuticas para doenças metabólicas e envelhecimento (LI, 2013; SINGH; HANSON; MORRIS, 2017).

Como os neurônios não são capazes de armazenar grande quantidade de energia, existe uma margem estreita entre a energia que é gerada e a demanda energética da atividade neuronal. Nesse sentido, entende-se a importância da AMPK (proteína quinase ativada por adenosina monofosfato), que funciona como um sensor de energia celular presente em todas as espécies eucarióticas, capaz de regular diversas vias metabólicas. Geralmente, AMPK é ativada em resposta ao

estresse causado pelo aumento das razões AMP/ATP e ADP/ATP, restaurando o balanço energético ao inibir processos anabólicos, enquanto promove processos catabólicos que produzem ATP. AMPK é composta por uma subunidade catalítica (subunidade  $\alpha$ ) e duas subunidades regulatórias (subunidade  $\beta$  e  $\gamma$ ). A fosforilação de uma treonina (Thr172) na subunidade  $\alpha$  é o principal evento necessário para a ativação total de AMPK (GARCIA; SHAW, 2017; BENNISON et al., 2020). Logo, como a formação de neuritos é dependente de uma grande quantidade de energia, pois requer um aumento da síntese de proteínas, membranas e transporte intracelular, a AMPK pode agir no sentido de permitir que a neuritogênese prossiga ou impedir sua continuidade caso o estado energético da célula não seja ideal (BENNISON et al., 2020). A ativação aguda de AMPK favorece a captação de glicose, enquanto a sua ativação constante reprograma a célula para limitar a síntese de glicose e lipídeos e incentivar a oxidação de ácidos graxos como fonte de energia (GARCIA; SHAW, 2017).

## **1.8 Células PC12**

As células PC12 são derivadas de tumor da medula adrenal (feocromocitoma) de ratos (GRENNE; TISCHLER, 1976). Quando cultivadas, as células PC12 adotam uma morfologia arredondada e possuem uma alta taxa de proliferação. Essas células também expressam receptores do tipo trkA e na presença do NGF, cessam a divisão celular, emitem neuritos, se tornam eletricamente excitáveis e adquirem características semelhantes às de neurônios simpáticos (TENG et al., 2006). Além disso, as células PC12 são simples de cultivar, respondem aos estímulos de forma homogênea e são adequadas para manipulação genética. Por todas essas características, a linhagem de células PC12 é um modelo comumente usado em estudos de desenvolvimento e função neuronal (GRENNE; TISCHLER, 1976; TENG et al., 2006). Muitos dos mecanismos que levam à neuritogênese das células PC12 estão presentes na diferenciação de neurônio primários (BENNISON et al., 2020). Adicionalmente, as células PC12 sintetizam, armazenam e secretam dopamina, sendo utilizadas para estudos de neurotoxicidade e neuroproteção relacionados aos neurônios dopaminérgicos, principal população neuronal afetada na doença de Parkinson (GRAU; GREENE, 2012).

## 1.9 Estratégias de neuroproteção

Apesar do aumento da prevalência de doenças neurodegenerativas na população mundial, não há ainda tratamentos eficazes para prevenir o aparecimento ou restaurar as funções cerebrais afetadas pela perda de populações neuronais específicas de cada uma dessas doenças. Até agora, as pesquisas tem focado na perda de neurônios e, conseqüentemente, as abordagens de neuroproteção tem como alvo os mecanismos de degeneração somática e a regeneração neuronal (TAGLIAFERRO; BURKE, 2016). Por outro lado, os mecanismos de degeneração dos axônios são distintos daqueles que levam à morte neuronal e são pouco conhecidos. Assim, dados acerca dos mecanismos envolvidos em processos de degeneração e regeneração axonal podem contribuir para novas estratégias de neuroproteção (BURKE; O'MALLEY, 2013).

O desenvolvimento de novos medicamentos costuma ser demorado e de alto custo, por isso, alternativamente, busca-se o reposicionamento de compostos já utilizados clinicamente – como é o caso do antibiótico doxiciclina – para outras finalidades terapêuticas, pois as informações sobre cinética, dinâmica, efeitos adversos e segurança destes compostos já estão disponíveis (BORTOLANZA et. al., 2018; PAPAPETROPOULOS; SZABO, 2018). Estudos têm sugerido efeitos neuroprotetores da doxiciclina em modelos *in vitro* e *in vivo*, e têm associado esses efeitos à propriedade antioxidante, anti-apoptótica e anti-inflamatória (CHO et al., 2009; YU et al., 2016; REGLODI et al., 2017). No entanto, os efeitos da doxiciclina na plasticidade axonal e sináptica e a participação desse mecanismo na neuroproteção ainda não foram avaliados.

A terapia com fatores neurotróficos como NGF, BDNF e GDNF é limitada pela sua fraca estabilidade plasmática, dificuldade de transpor a barreira hematoencefálica e pelos seus efeitos pleiotrópicos resultantes da ativação de múltiplas vias. Mas, apesar dos receptores neurotróficos possuírem padrões de expressão e algumas funções semelhantes, alguns mecanismos neuronais são modulados por sistemas específicos. Assim, a descoberta de agentes capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e ativar receptores neurotróficos e vias de sinalização específicas possibilitaria o desenvolvimento de novas terapias para doenças neurodegenerativas (LONGO; MASSA, 2013).

Com base nessas premissas, neste estudo investigou-se a hipótese de que a doxiciclina, por si só, ativa as mesmas vias de sinalização neurotrófica induzidas pelo NGF e que a indução da neuritogênese contribui para o efeito neuroprotetor da doxiciclina.

## 2. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo investigar a ação da doxiciclina nas vias de sinalização neurotrófica, bem como o possível efeito neuroprotetor da doxiciclina em células PC12 tratadas com a neurotoxina dopaminérgica MPP<sup>+</sup>, modelo associado à doença de Parkinson.

Para tal, foi proposto:

1 – Avaliar (i) a neuritogênese induzida pela doxiciclina na presença e na ausência de inibidores farmacológicos do receptor neurotrófico trkA e das vias de sinalização neurotróficas PI3k/Akt e MAPK/ERK; (ii) as alterações na expressão de proteínas relacionadas à plasticidade sináptica (sinapsina I e sinaptofisina) e axonal (GAP-43,  $\beta$ III-tubulina, F-actina e NF-200), e de (iii) moduladores da bioenergética (captação de glicose, SIRT1, AMPK  $\alpha$  e fosfo-AMPK  $\alpha$ ) em células PC12 não estimuladas pelo NGF.

2 – Em modelo de neurotoxicidade induzida pelo MPP<sup>+</sup>, investigar os efeitos da doxiciclina na (i) neuritogênese e nos moduladores da (ii) plasticidade sináptica e axonal, como mecanismo de neuroproteção.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Reagentes

Doxiciclina, coquetel inibidor de proteases, coquetel inibidor de fosfatases, colágeno tipo IV, poli-L-lisina, soro fetal bovino e inibidores das vias neurotróficas foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (MO, USA). Meio de cultura, soro equino e a solução de antibióticos foram obtidos da GIBCO® (Life Technologies Corporation, USA). Os reagentes para Western Blot (tampões, membranas e géis para SDS-PAGE) foram adquiridos da Bio-Rad Laboratories® (Hercules, CA, USA). Anticorpos primários e secundários foram obtidos da Abcam ou Sigma-Aldrich®. A glicose marcada com radionuclídeo (<sup>3</sup>H), o líquido de cintilação (Ultima Gold™) e a solução de lise celular (SOLVABLE™) foram obtidos da PerkinElmer (Boston, MA, USA). Todos os demais reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich®.

As soluções foram preparadas com água tipo I (ultra-pura) obtida em sistema de purificação Direct Q® - 3UV (Millipore, Bedford, USA). Foram preparadas soluções estoque de doxiciclina 2mM e MPP<sup>+</sup> 10mM. As soluções de trabalho foram diluídas no momento do ensaio.

#### 3.2 Cultura celular

Foram utilizadas células de feocromocitoma de rato (PC12), adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC), mantidas em meio de cultura *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM high glucose, GIBCO®, Life Technologies Corporation, USA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (FBS, heat inactivated, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), 10% de soro equino (GIBCO®, Life Technologies Corporation, USA), 1% de solução antibiótica contendo 5 mg/mL de penicilina, 5 mg/mL de estreptomicina e 10 mg/mL de neomicina (PNS, GIBCO®, Life Technologies Corporation, USA), mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> (Thermo Scientific® Forma Water Jacketed CO<sub>2</sub> Incubator).

A troca do meio foi realizada a cada 2 dias. Para a realização dos experimentos, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com PBS (solução salina tamponada com fosfato) para inativação do soro e incubadas a 37°C por 3 minutos com 3mL de solução de tripsina (Sigma-Aldrich®, diluída 1:10 em

PBS). Para inativação da tripsina foi utilizado o dobro de volume de meio DMEM. O pellet contendo as células foi obtido por centrifugação (1000 rpm por 5 minutos) e as células foram retomadas no meio de reação apropriado e na densidade específica para cada experimento, após contagem em Câmara de Neubauer.

Os experimentos foram realizados com células de terceira passagem.

### **3.3 Contagem de células em câmara de Neubauer**

As células foram centrifugadas, retomadas com meio de cultura e contadas nos quadrantes laterais da câmara de Neubauer (10µL da suspensão de células foram colocados em microtubo contendo 90µL de azul de trypan 0,4%). Somente foram utilizados nos experimentos lotes de células com viabilidade superior a 80%.

### **3.4 Ensaio de viabilidade celular**

Foi utilizado o ensaio colorimétrico de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) baseado em procedimento descrito na literatura (HANSEN; NIELSEN; BERG, 1989) com pequenas modificações. As células ( $2 \times 10^4$  células/poço) foram incubadas em placa de 96 poços revestidas com poli-L-lisina por 24 horas para adesão. Após este período, foi realizado o tratamento com diferentes concentrações de doxiciclina e a placa foi novamente incubada por 72 horas (37°C). Então, 20µL de solução de MTT 5 mg/mL foram adicionados a cada poço e a placa permaneceu incubada por 3 horas a 37°C. Foram feitos um controle negativo (células + solução de MTT) e um controle positivo (células + Triton X-100 0,2% + solução de MTT). Após a incubação, o sobrenadante foi desprezado e 200µL de DMSO foram adicionados a cada poço. Depois de homogeneizada (10 minutos), a absorbância da solução foi determinada a 570nm em leitor de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific).

### **3.5 Diferenciação celular**

As células PC12 foram incubadas em placas de 24 poços ( $2 \times 10^5$  células/poço) revestidas com colágeno tipo IV (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) e incubadas por 24 horas para adesão. Após este período, o meio foi aspirado e

substituído por meio de diferenciação, F-12K Nutrient Mixture Kaighn's Modification (GIBCO®, Life Technologies Corporation, USA) suplementado com 1% soro equino e 1% solução antibiótica. As células foram tratadas com doxiciclina 5 $\mu$ M sendo novamente incubadas (37°C) por 72 horas. Foi feito um controle negativo (células não tratadas) e um controle positivo (células + NGF 100 ng/mL).

A análise morfológica foi realizada por microscopia invertida, com contraste de fase (400x), obtendo-se imagens aleatórias de 4 campos por poço após 24, 48 e 72 horas. A porcentagem de células com neuritos foi determinada utilizando-se o software Image J open source software (RASBAND, 1997-2014). Apenas células com pelo menos um neurito de comprimento igual ou maior que o diâmetro do corpo celular foram consideradas diferenciadas. Os resultados foram expressos em porcentagem de células com neuritos em relação ao número total de células contadas.

### **3.6 Tratamento com inibidores das vias de sinalização neurotrófica**

A diferenciação celular induzida pela doxiciclina foi avaliada também na presença de inibidores específicos dos receptores trkA (antagonista K252a) e das cascatas de sinalização PI3K/Akt (inibidor LY294002) e MAPK/ERK (inibidor U0126), que são ativadas subsequentemente à ativação dos receptores trk pelas neurotrofinas. Os inibidores LY294002 e U0126 foram diluídos em DMSO e o K252a em PBS, conforme indicação do fabricante. As soluções foram armazenadas a – 20°C sob abrigo da luz e diluídas em meio de cultura imediatamente antes do uso. As células PC12 foram tratadas com K252a 100nM, LY294002 30 $\mu$ M ou U0126 10 $\mu$ M e incubadas por 1 hora antes da adição da doxiciclina 5 $\mu$ M ou NGF 100 ng/mL, seguindo-se o ensaio de diferenciação celular (PHAN et al., 2014; SEOW et al., 2013).

### **3.7 Western blot (fosfo-TrkA, sinapsina I, sinaptofisina, GAP-43, $\beta$ III-tubulina, F-actina, SIRT1 e AMPK $\alpha$ e fosfo-AMPK $\alpha$ )**

#### **3.7.1 Preparo do lisado celular**

As células PC12 ( $2 \times 10^5$  células/poço) foram incubadas em placas de 24 poços por 24 horas para adesão e então tratadas conforme descrito no item 3.5. Após 72 horas de incubação (ou 24 horas, no caso da análise da proteína fosfo-TrkA), o meio de cultura foi desprezado e foram adicionados 40 $\mu$ L de tampão de lise (CellLytic™, suplementado com coquetel inibidor de protease 1:200 e 1% de inibidor de fosfatase). Todo o procedimento de lise celular foi realizado em banho de gelo para reduzir a atividade das proteases. Após 10 minutos, as células foram transferidas com auxílio de *scraper* para microtubos de centrifuga. Após centrifugação (12000 rpm, por 10 minutos a 4°C), os precipitados foram desprezados e os lisados celulares (sobrenadantes) foram preservados em freezer (- 80°C) até a realização dos ensaios. Alíquotas (10 $\mu$ L) de cada grupo foram utilizadas para determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford descrito a seguir.

### 3.7.2 Dosagem de proteínas do lisado celular

Foi utilizado o reagente de cor *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad®), de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante. Os lisados celulares e o reagente de cor foram diluídos em água (1:5) e foi utilizada uma curva de calibração (40 - 400  $\mu$ g/mL) de soro-albumina bovina (BSA). A reação de cor foi realizada em placa de 96 poços, adicionando-se 10 $\mu$ L da amostra diluída (ou padrão) e o reagente diluído (volume total de 200 $\mu$ L). A absorbância (595 nm) foi determinada em leitor de microplacas após 5 minutos de agitação (300 rpm). Para eliminar a interferência do tampão de lise na reação de Bradford (BRADFORD, 1976), controles contendo 10 $\mu$ L de tampão de lise diluído foram analisados e a média das absorbâncias foi subtraída dos valores das absorbâncias das amostras. As concentrações de proteína nas amostras foram calculadas com base na curva de calibração, multiplicando-se o valor pelo fator de diluição (x5).

### 3.7.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As amostras foram diluídas em tampão Laemli 4x (com 10% de  $\beta$ -mercaptoetanol) e aquecidas por 5 minutos a 95°C. Em seguida, alíquotas contendo 10 $\mu$ g de proteínas (20 $\mu$ g para a investigação de fosfo-TrkA) foram aplicadas em gel

de poliacrilamida 10% e separadas (1 hora, 160 V) em cuba de eletroforese contendo 1L de tampão TRIS/glicina/SDS 1x (Bio-Rad®).

#### 3.7.4 Transferência gel-membrana

As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (1 hora, 0,37 A) em cuba de eletroforese (Bio-Rad®) contendo 1 litro de tampão TRIS/Glicina (Bio-Rad®).

#### 3.7.5 Reação imune

As membranas foram incubadas (1 hora, temperatura ambiente, 300 rpm) com tampão de bloqueio contendo 5% de leite desnatado em pó (Bio-Rad®) em TTBS (tampão TBS com Tween 20). Posteriormente, foram incubadas (300 rpm a 4°C, overnight) com anticorpos primários rabbit anti-fosfo-TrkA (1:250), rabbit anti-sinapsina I (1:1664), mouse anti-sinaptofisina (1:400), mouse anti-GAP-43 (1:5000), rabbit anti-SIRT1 (1:500), rabbit anti-AMPK  $\alpha$  (1:500) ou rabbit anti-fosfo-AMPK  $\alpha$  (1:500), todos obtidos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, Mo, USA), ou mouse anti-F-actina (1:100) e rabbit anti- $\beta$ III-tubulina (1:1000), obtidos da Abcam®.

Ao término dessa fase, as membranas foram lavadas com TTBS e incubadas (1 hora, temperatura ambiente, 300 rpm) com anticorpo secundário conjugado com horseradish peroxidase (anti-mouse ou anti-rabbit IgG – HRP, 1:8000 ou anti-mouse IgM, 1:8000 para F-actina).

Após lavagem com TTBS e TBS, as membranas foram tratadas com reativo ECL (Clarity, Bio-Rad®) e foi realizada a digitalização das bandas em sistema de detecção de quimioluminescência ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories®, Inc., Hercules, CA, USA). A quantificação foi feita por densitometria ótica (DO) usando-se o software Image Lab (versão 5.2.1, Bio-Rad®).

Os procedimentos foram repetidos para quantificação da  $\beta$ -actina, usada como controle de carregamento. Para tal, as membranas foram tratadas com tampão *mild stripping* (1,5% glicina, 0,1% SDS e 1% de Tween 20, pH 2,2) e submetidas à imunorreação com anticorpo primário monoclonal anti- $\beta$ -actina (1:3300) e com o anticorpo secundário (anti-mouse IgG-HRP, 1:8000), seguindo-se os mesmos procedimentos descritos para os demais anticorpos. Os valores de DO das demais

proteínas foram divididos pelos valores de DO da  $\beta$ -actina para normalização dos resultados (L'EPISCOPO et al., 2011).

### **3.8 Diferenciação celular no modelo de neurotoxicidade/neuroproteção**

Após os tratamentos (MPP<sup>+</sup> 100 $\mu$ M, NGF 100 ng/mL e/ou doxiciclina 5 $\mu$ M), as células foram submetidas ao ensaio de diferenciação celular descrito no item 3.5. Foi avaliado o efeito protetor da doxiciclina contra os efeitos do MPP<sup>+</sup>.

### **3.9 Western blot no modelo de neurotoxicidade/neuroproteção (sinapsina I, sinaptofisina, GAP-43, $\beta$ III-tubulina e F-actina)**

Após os tratamentos (MPP<sup>+</sup> 100 $\mu$ M, NGF 100 ng/mL e doxiciclina 5 $\mu$ M), foi feita a análise da expressão de proteínas pela técnica de Western Blot descrito no item 3.7, para avaliar o efeito protetor da doxiciclina contra os efeitos do MPP<sup>+</sup>.

### **3.10 Determinação de neurofilamento NF-200 por imunofluorescência**

A coloração por imunofluorescência do neurofilamento-200 foi realizada de acordo com um procedimento anteriormente descrito (SCHIMMELPFENG; WEIBEZAHN; DERTINGER, 2004) com algumas modificações. As células PC12 foram semeadas ( $2 \times 10^5$  células/poço) em placas de 12 poços contendo 1 lamínula esterilizada revestida com colágeno IV/poço (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA). Após 24 horas de incubação para adesão, as células foram tratadas com MPP<sup>+</sup> 100 $\mu$ M, NGF 100 ng/mL e/ou doxiciclina 5 $\mu$ M e incubadas novamente (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Após 72 horas, o meio de cada poço foi removido e as células fixadas nas lamínulas com paraformaldeído 4% (10 minutos à temperatura ambiente). As lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS e as células foram permeabilizadas com 0,2% de Triton X-100 em PBS (10 minutos à temperatura ambiente). As proteínas foram bloqueadas durante 1 hora (temperatura ambiente) com uma solução de PBS contendo 3% de BSA e 0,1% de Tween 20. Em seguida, as células foram incubadas (4°C, overnight) com o anticorpo primário rabbit anti-neurofilamento-200 (Abcam®, diluição 1:500 em PBS contendo 1% de BSA). No dia seguinte, as células foram cuidadosamente lavadas duas vezes com PBS seguindo-

se incubação (temperatura ambiente, 1 hora, protegido da luz) com o anticorpo secundário conjugado com fluoróforo, anti-rabbit igG Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) produzido em ovinos (Abcam®, diluição 1:500 em PBS contendo BSA a 1%). O procedimento de lavagem foi repetido e os núcleos foram corados com 20  $\mu\text{M}$  Hoeschst 33342 (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) durante 2 minutos. Então, as lamínulas foram montadas sobre lâminas e observadas sob microscopia de fluorescência (Olympus BX51, 400x) utilizando filtros específicos para FITC e Hoeschst. As imagens foram capturadas com o software Standard Cell Sense. A fluorescência celular total corrigida (FCTC) foi calculada utilizando o software Image J (RASBAND, 1997-2014) e a fórmula  $\text{FCTC} = \text{densidade integrada} - (\text{área da célula selecionada} \times \text{fluorescência média das leituras de background})$ .

### 3.11 Captação de glicose

As células foram semeadas em placas de 6 poços ( $1 \times 10^6$  células/poço) e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas. Após o tratamento (MPP<sup>+</sup> 100 $\mu\text{M}$ , NGF 100 ng/mL e doxíciclina 5 $\mu\text{M}$ ) e incubação por 72 horas, o meio de cultura foi removido e foram realizadas 2 lavagens com PBS 1x. Em seguida, foi adicionado meio DMEM sem glicose e no grupo controle positivo foi adicionada citocalasina B 10 $\mu\text{M}$  (inibidor da captação de glicose) por 1 hora. Então, foram adicionadas a solução de glicose não marcada (50 $\mu\text{M}$ ) e glicose marcada com radionuclídeo trício (deoxi-D-glicose, 2-[1,2-<sup>3</sup>H(N)]; 1,0  $\mu\text{Ci}$ ) e incubou-se por 30 minutos. Após esse período, foram realizadas 3 lavagens com PBS 1x para retirar o excesso de glicose marcada e adicionou-se a solução de lise celular (SOLVABLE™) e o líquido de cintilação (Ultima Gold™), ambos da PerkinElmer (Waltham, MA, USA). O conteúdo dos poços foi transferido para microtubos e a radioatividade foi medida em contador de cintilação Microbeta 1450 LSC Luminescence Counter (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Os resultados foram expressos em contagens por minuto (CPM) (ABDUL MUNEER et al., 2011).

### 3.12 Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas empregando-se análise de variância para múltiplas comparações, one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (GraphPad

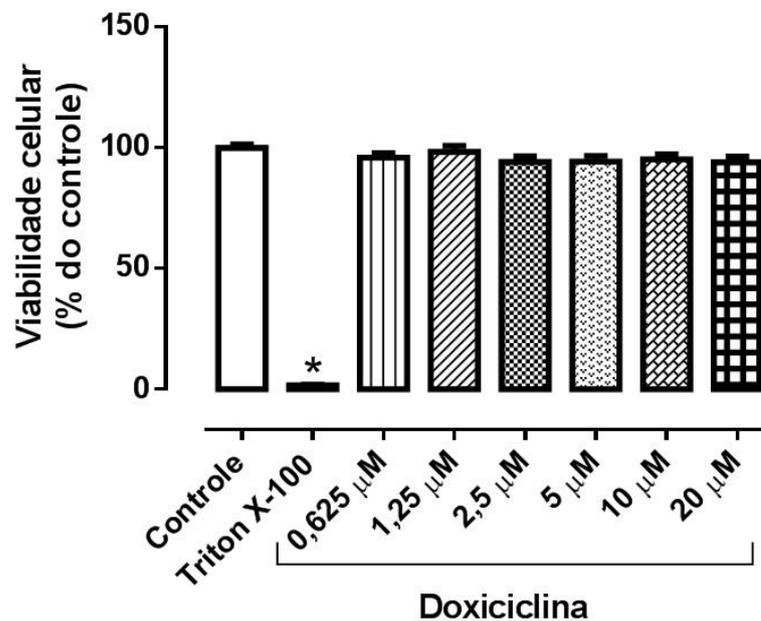
Software, version 6, San Diego, California, USA). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Viabilidade celular

Para determinar se a doxíciclina altera a viabilidade celular, diversas concentrações (0,625 $\mu$ M; 1,25 $\mu$ M; 2,5 $\mu$ M; 5 $\mu$ M; 10 $\mu$ M; e 20 $\mu$ M) foram avaliadas pelo ensaio de MTT. Não foram observadas diferenças significativas entre o grupo controle (100  $\pm$  1,27%) e os grupos tratados com doxíciclina (0,625 $\mu$ M: 95,89  $\pm$  1,88%; 1,25 $\mu$ M: 98,32  $\pm$  2,41%; 2,5 $\mu$ M: 94,06  $\pm$  2,40%; 5 $\mu$ M: 94,21  $\pm$  2,36%; 10 $\mu$ M: 95,27  $\pm$  2,04%; e 20 $\mu$ M: 93,94  $\pm$  2,36%); apenas o controle positivo (Triton X-100) reduziu a porcentagem de células viáveis (1,57  $\pm$  0,32%) (Figura 2). Os valores de absorbância dos grupos tratados foram normalizados com base na absorbância média do grupo controle, a qual foi considerada como 100% de viabilidade.

**Figura 2** – Efeito da doxíciclina na viabilidade de células PC12.



Representação gráfica da porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle após 72 horas do tratamento. O gráfico representa média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de três ensaios realizados em sextuplicata. \* Significativo para  $p < 0,05$  em relação ao controle.

## 4.2 Efeito da doxiciclina na neuritogênese de células PC12

Foram avaliados os efeitos de diferentes concentrações da doxiciclina (0,3125 $\mu$ M; 0,625 $\mu$ M; 1,25 $\mu$ M; 2,5 $\mu$ M; 5 $\mu$ M; 10 $\mu$ M e 20 $\mu$ M) na neuritogênese de células PC12 não estimuladas com NGF, após 72 horas de incubação. O grupo tratado com NGF foi usado como controle positivo e aumentou significativamente a porcentagem de células com neuritos (5,73  $\pm$  0,46%) com relação ao controle não tratado (0,64  $\pm$  0,17%). Apenas as concentrações de 1,25 $\mu$ M (4,43  $\pm$  0,34%); 2,5 $\mu$ M (4,56  $\pm$  0,49%) e 5 $\mu$ M (4,85  $\pm$  0,56%) induziram significativamente a neuritogênese em relação ao controle, não havendo contudo diferenças significativas entre os três grupos. Concentrações menores (0,3125 $\mu$ M e 0,625 $\mu$ M) e maiores (10 $\mu$ M e 20 $\mu$ M) não tiveram efeito sobre a neuritogênese (Figura 3A). A curva concentração-resposta correlacionando o log das concentrações à porcentagem de células com neuritos apresentou um perfil em sino (*bell-shaped*) com concentração efetiva para 50% de efeito máximo, EC<sub>50</sub> = 1,13 $\mu$ M (Figura 3B).

**Figura 3** – Efeito da doxiciclina na neuritogênese de células PC12 não estimuladas com NGF.

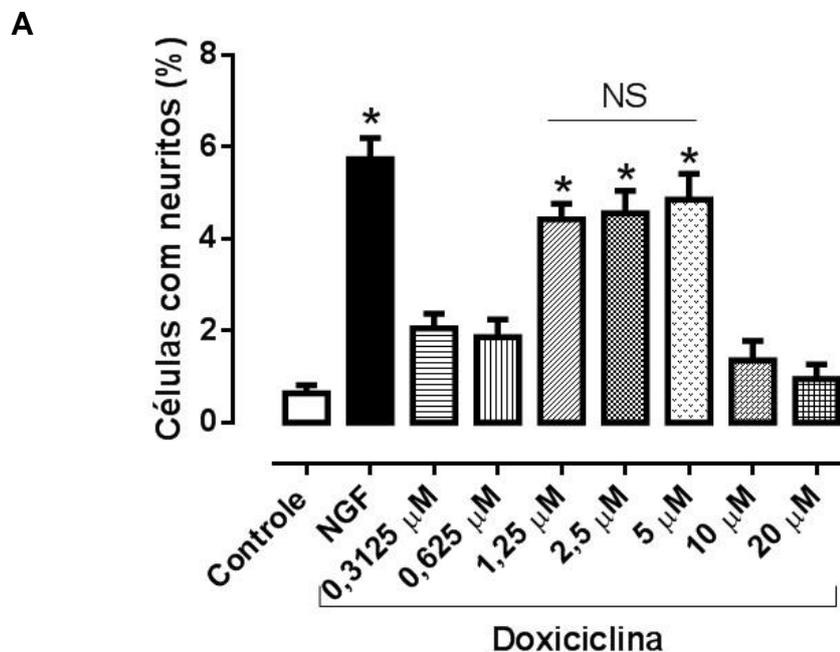
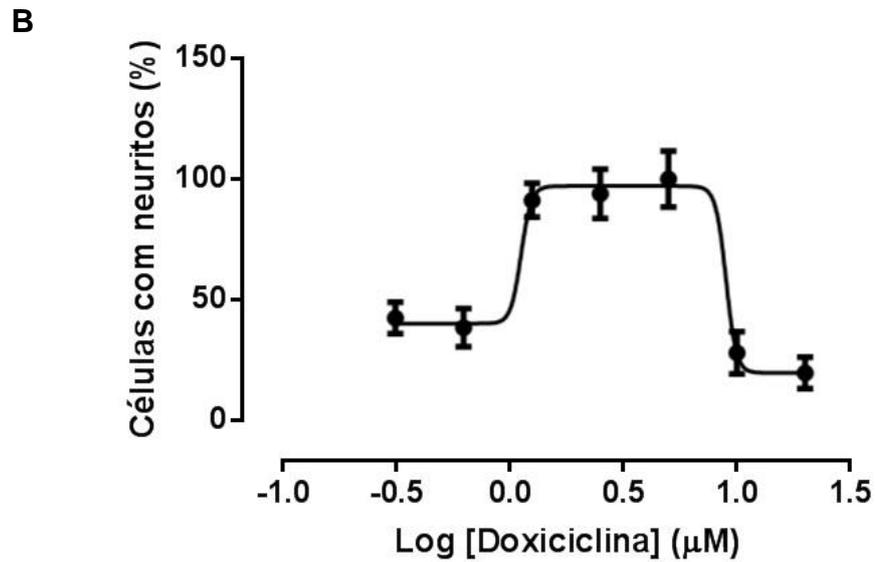


Figura 3 – Continuação.



(A) Representação gráfica da porcentagem de células com neuritos após 72 horas de incubação com diferentes concentrações de doxiciclina ou NGF 100 ng/mL (controle positivo). Os gráficos representam média  $\pm$  EPM de três ensaios realizados em triplicata. \* Significativo para  $p < 0,05$  em relação ao controle. (B) Curva concentração-resposta. Curva de regressão não linear correlacionando o log das concentrações e a porcentagem de células com neuritos, normalizando-se o maior valor médio para 100% ( $EC_{50} = 1,13\mu\text{M}$ ).

### 4.3 Tratamento com inibidores das vias de sinalização neurotrófica

Foi realizado o ensaio de diferenciação celular na ausência e na presença de K252a, antagonista do receptor neurotrófico trkA, seletivo para NGF. O grupo tratado com NGF (controle positivo) apresentou porcentagem de células com neuritos significativamente maior ( $4,84 \pm 0,48\%$ ) do que o controle de células não tratadas ( $0,96 \pm 0,44\%$ ). Da mesma forma, o grupo tratado com doxiciclina apresentou porcentagem significativamente maior ( $7,61 \pm 1,01\%$ ) de células com neuritos do que o grupo controle ( $0,96 \pm 0,44\%$ ).

Os grupos tratados com o antagonista (NGF + K252a e doxiciclina + K252a) foram comparados aos respectivos grupos sem o antagonista. O tratamento com K252a reduziu a neuritogênese induzida pelo NGF ( $1,38 \pm 0,38\%$ ) em relação ao NGF sozinho ( $4,84 \pm 0,48\%$ ). De maneira similar, o K252a também reduziu a neuritogênese induzida pela doxiciclina ( $2,88 \pm 0,49\%$ ) em relação ao grupo tratado com apenas o antibiótico ( $7,61 \pm 1,01\%$ ). Esses dados são apresentados na Figura 4A. Fotomicrografias dos referidos grupos após 72 horas de incubação são apresentadas na Figura 4B.

**Figura 4** – Efeito do antagonista do receptor trkA (K252a) na neuritogênese induzida pela doxiciclina em células PC12.

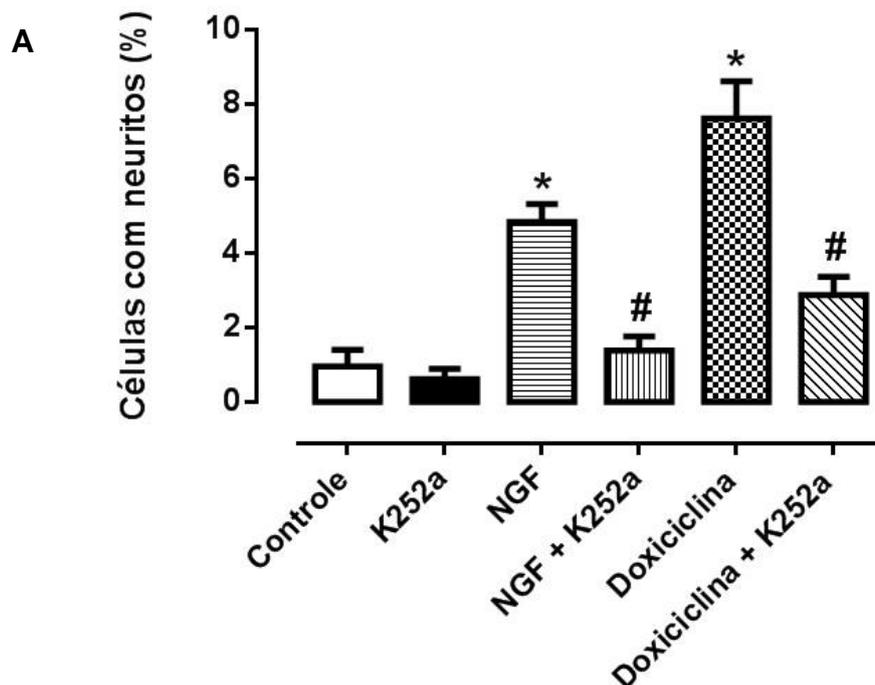
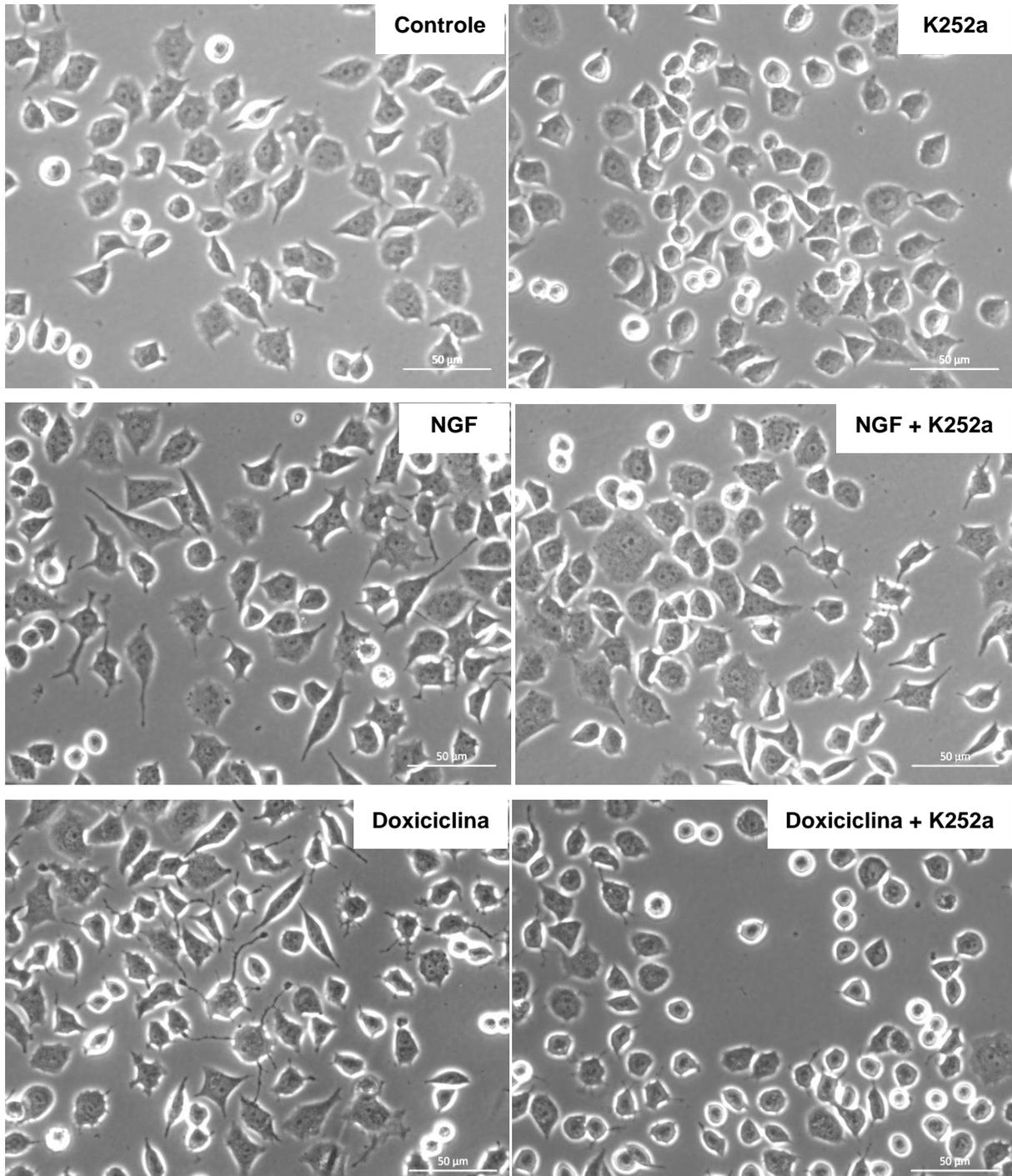


Figura 4 – Continuação.

**B**

**(A)** Representação gráfica da porcentagem de células diferenciadas após 72 horas do tratamento. As barras representam média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de três experimentos realizados em triplicata. \* Significativo para  $p < 0,05$  em relação ao controle negativo. # Significativo para  $p < 0,05$  em relação ao respectivo tratamento sem o antagonista K252a. **(B)** Fotomicrografias obtidas em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 400x, escala de 50µm), após 72 horas de incubação. Tratamentos: K252a 100nM (pré-tratamento de 1 hora); NGF 100 ng/ml e doxíciclina 5µM.

A indução de neuritogênese também foi avaliada na presença do inibidor da via PI3K/Akt (LY294002). NGF e doxíciclina induziram significativamente ( $11,13 \pm 1,60\%$  e  $16,06 \pm 1,22\%$ , respectivamente) a formação de neuritos em relação ao controle de células não tratadas ( $1,92 \pm 0,49\%$ ). O inibidor LY294002 reduziu significativamente o efeito do NGF ( $1,06 \pm 0,37\%$ ) em relação ao NGF sozinho ( $11,13 \pm 1,60\%$ ). O grupo doxíciclina + LY294002 apresentou uma porcentagem de células diferenciadas significativamente menor ( $1,27 \pm 0,46\%$ ) do que o grupo tratado apenas com doxíciclina ( $16,06 \pm 1,22\%$ ), como apresentado na Figura 5AB.

**Figura 5** – Efeito do LY294002 (inibidor da via PI3K/Akt) na neuritogênese induzida pela doxíciclina em células PC12.

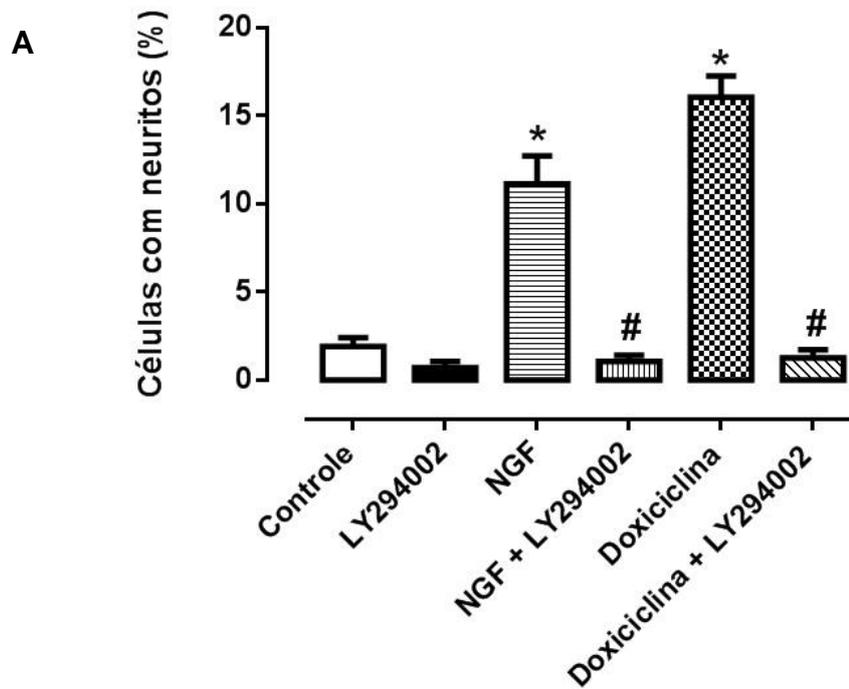
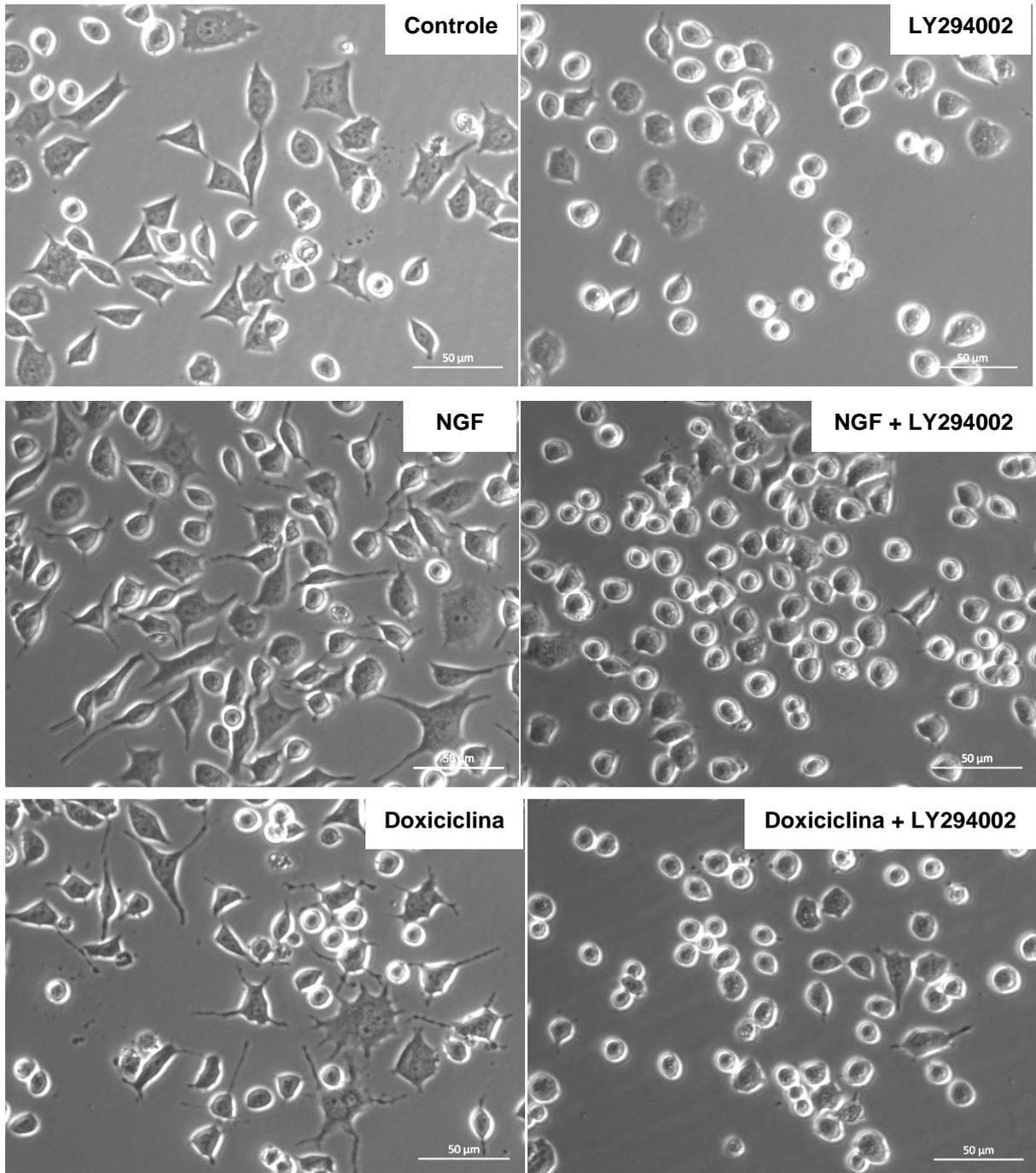


Figura 5 – Continuação.

**B**

**(A)** Representação gráfica da porcentagem de células diferenciadas após 72 horas do tratamento. As barras representam média  $\pm$  EPM de três ensaios realizados em triplicata. \* Significativo para  $p < 0,05$  em relação ao controle. # Significativo para  $p < 0,05$  em relação ao respectivo tratamento sem o inibidor LY294002. **(B)** Fotomicrografias obtidas em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 400x, escala de 50µm), após 72 horas de incubação. Tratamentos: LY294002 30µM (pré-tratamento de 1 hora); NGF 100 ng/ml e doxiciclina 5µM.

Investigou-se ainda a participação da via MAPK/ERK na neuritogênese induzida pela doxíciclina com o emprego do inibidor U0126. Após 72 horas de incubação, o NGF aumentou significativamente a porcentagem de células com neuritos ( $5,88 \pm 0,50\%$ ) em relação ao grupo controle ( $0,61 \pm 0,23\%$ ), sendo que o inibidor U0126 reduziu significativamente ( $0,23 \pm 0,12\%$ ) a diferenciação estimulada pelo NGF. O grupo doxíciclina apresentou porcentagem de células diferenciadas ( $5,00 \pm 0,49\%$ ) significativamente maior se comparado ao grupo controle ( $0,61 \pm 0,23\%$ ), enquanto o grupo doxíciclina + U0126 apresentou redução significativa de células com neuritos ( $0,28 \pm 0,15\%$ ) em relação ao grupo tratado apenas com doxíciclina (Figura 6A e B).

**Figura 6** – Efeito do U0126 (inibidor da via MAPK/ERK) na neuritogênese induzida pela doxíciclina em células PC12.

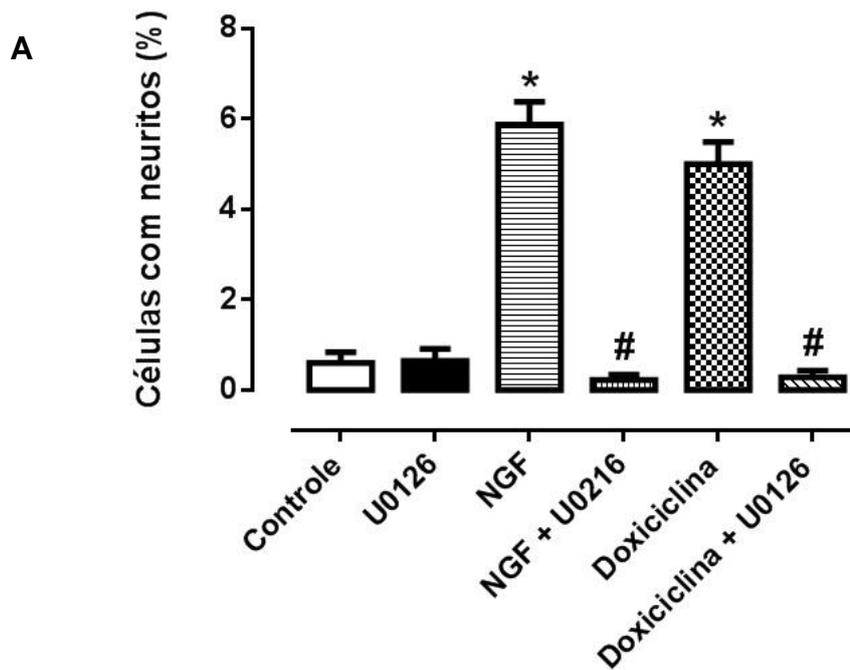
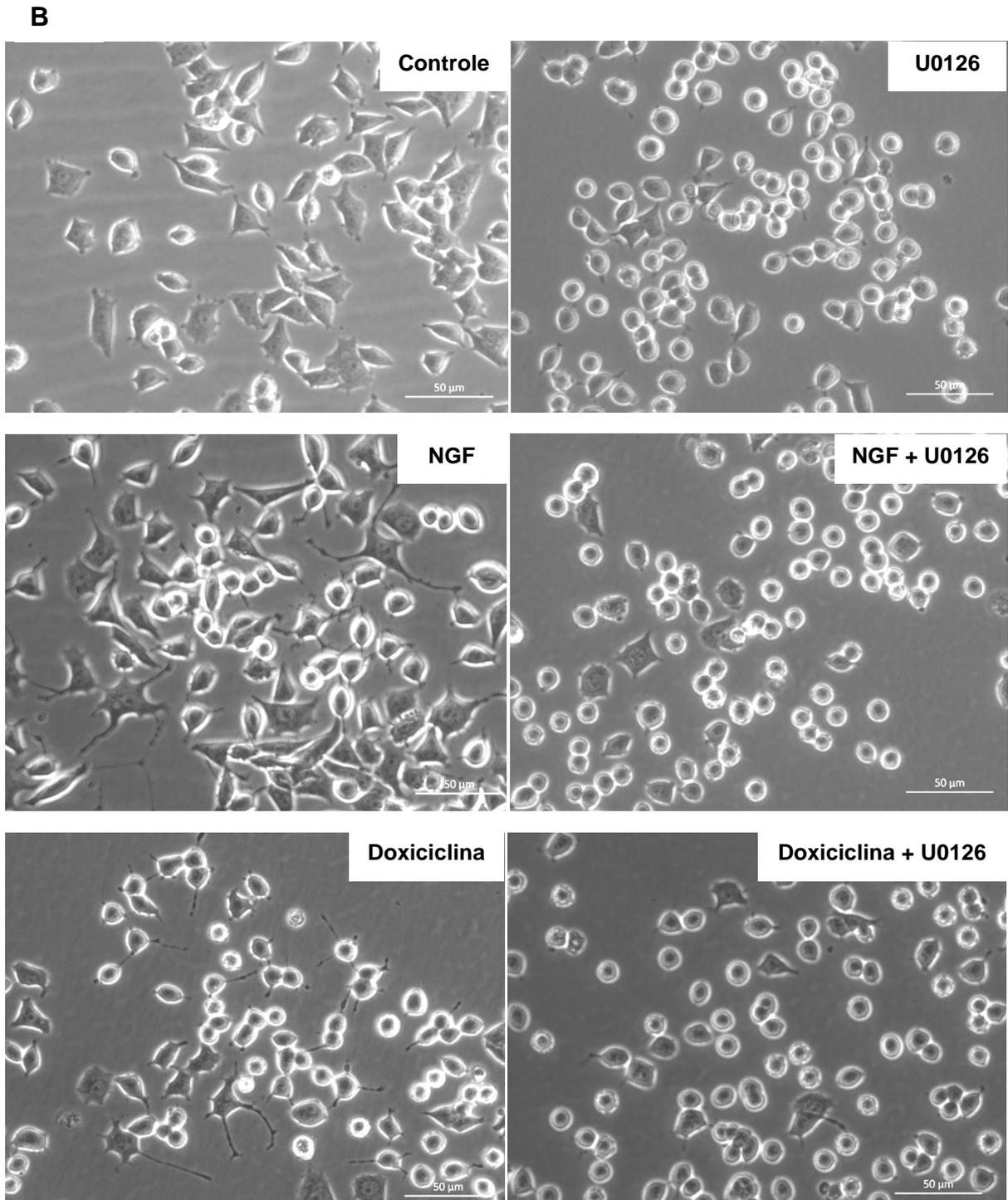


Figura 6 – Continuação.



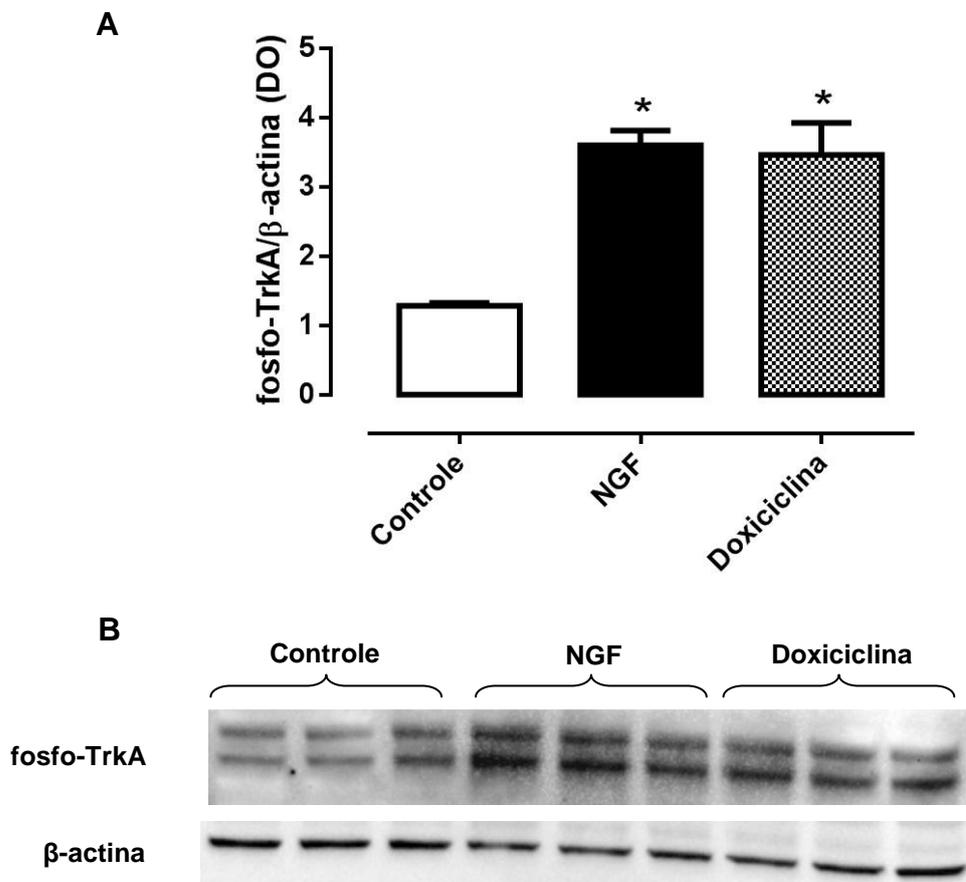
**(A)** Representação gráfica da porcentagem de células com neuritos após 72 horas do tratamento. As barras representam média  $\pm$  EPM de três ensaios realizados em triplicata. \* Significativo para  $p < 0,05$  em relação ao controle. # Significativo para  $p < 0,05$  em relação ao respectivo tratamento sem o inibidor U0126. **(B)** Fotomicrografias obtidas em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 400x, escala de 50µm), após 72 horas de incubação. Tratamentos: U0126 10µM (pré-tratamento 1 hora); NGF 100 ng/ml e doxiciclina 5µM.

#### 4.4 Efeito da doxíciclina na expressão de fosfo-TrkA, sinapsina I, sinaptofisina, GAP-43, $\beta$ III-tubulina e F-actina em células PC12 não estimuladas com NGF

Para delinear o mecanismo de ação neurotrófica da doxíciclina foi avaliada a expressão de proteínas relacionadas à manutenção do sistema nervoso, à comunicação sináptica e ao crescimento axonal, as quais são alvo do efeito neurotrófico do NGF (DAS; FREUDENRICH; MUNDY, 2004). Também foi avaliada a expressão de proteínas do citoesqueleto, fundamentais no processo de formação das extensões (filopodia) que originarão os neuritos (SAINATH; GALLO, 2015).

Assim como o NGF ( $3,60 \pm 0,21$ ), a doxíciclina aumentou a expressão de fosfo-TrkA ( $3,46 \pm 0,46$ ) em relação ao controle ( $1,28 \pm 0,04$ ), como mostrado na Figura 7A e B.

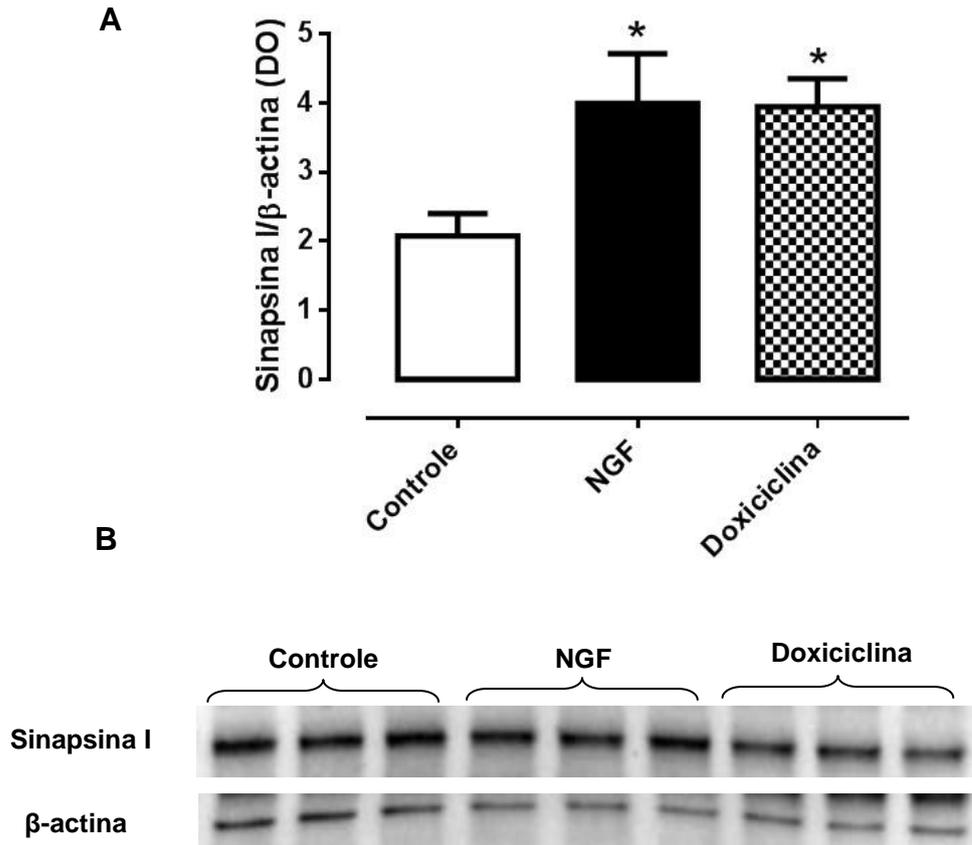
**Figura 7** – Efeito da doxíciclina na expressão de fosfo-TrkA em células PC12 não estimuladas com NGF.



**(A)** Representação gráfica da expressão de fosfo-TrkA normalizada pela  $\beta$ -actina. As barras representam média  $\pm$  EPM de três ensaios realizados em triplicata. \* Significativo para  $p < 0,05$  em relação ao controle. **(B)** Bandas da proteína na membrana de Western Blot. Tratamentos: NGF 100 ng/ml; doxíciclina  $5\mu\text{M}$ .

A doxíciclina ( $3,95 \pm 0,41$ ) e o NGF ( $4,00 \pm 0,72$ ) aumentaram a expressão de sinapsina I se comparados ao controle de células não tratadas ( $2,08 \pm 0,32$ ) (Figura 8A e B).

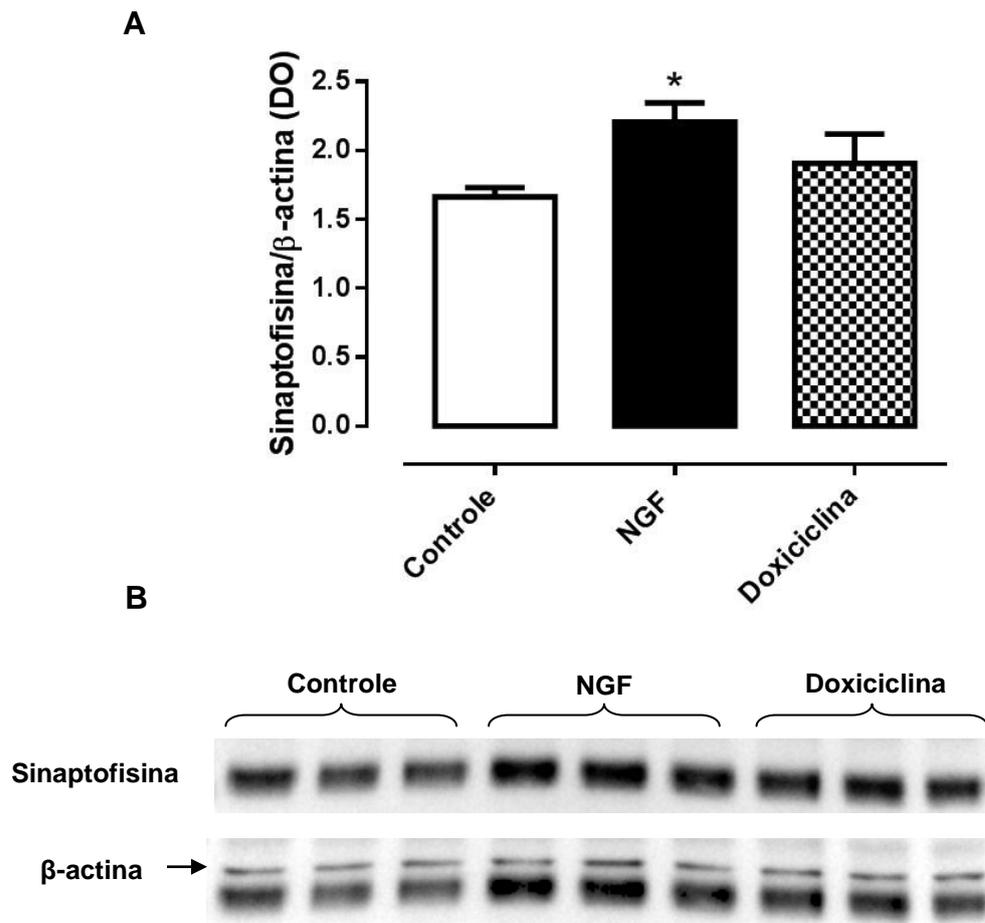
**Figura 8** – Efeito da doxíciclina na expressão de sinapsina I em células PC12 não estimuladas com NGF.



**(A)** Representação gráfica da expressão de sinapsina I normalizada pela  $\beta$ -actina. As barras representam média  $\pm$  EPM de três ensaios realizados em triplicata. \* Significativo para  $p < 0,05$  em relação ao controle. **(B)** Bandas da proteína na membrana de Western Blot. Tratamentos: NGF 100 ng/ml; doxíciclina 5 $\mu$ M.

A expressão de sinaptofisina teve um aumento significativo apenas no grupo tratado com NGF ( $2,21 \pm 0,14$ ) comparado ao grupo controle ( $1,66 \pm 0,07$ ). A doxíciclina não induziu significativamente a expressão de sinaptofisina ( $1,91 \pm 0,21$ ) em relação ao grupo controle (Figura 9AB).

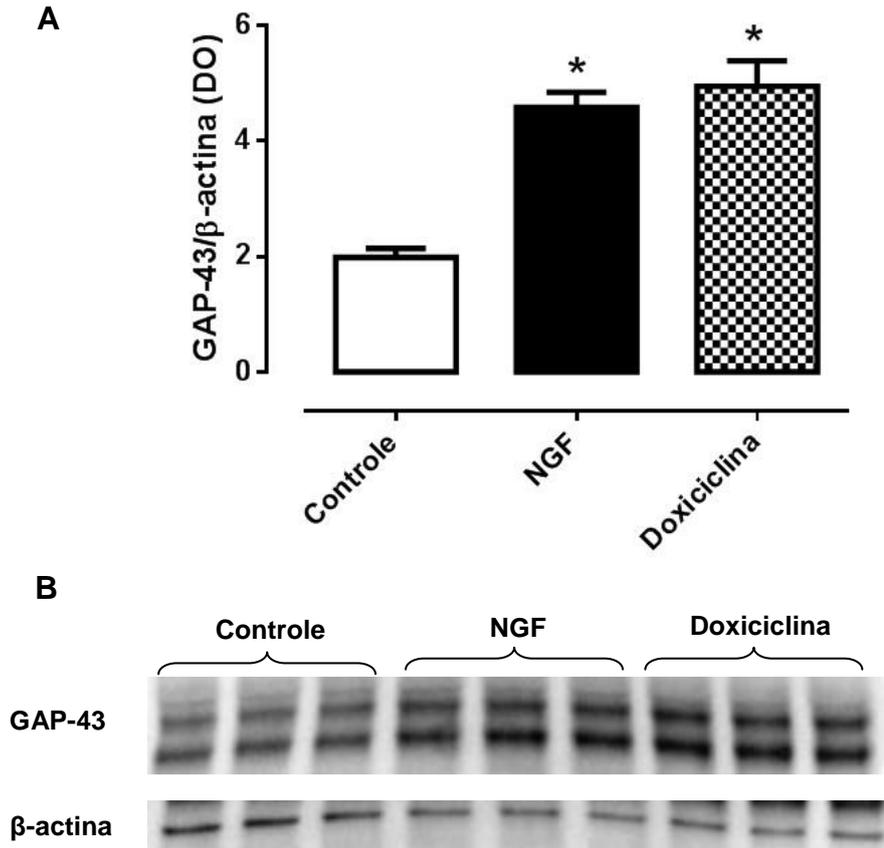
**Figura 9** – Efeito da doxíciclina na expressão de sinaptofisina em células PC12 não estimuladas com NGF.



**(A)** Representação gráfica da expressão de sinaptofisina normalizada pela  $\beta$ -actina. As barras representam média  $\pm$  EPM de três ensaios realizados em triplicata. \* Significativo para  $p < 0,05$  em relação ao controle. **(B)** Bandas da proteína na membrana de Western Blot. Tratamentos: NGF 100 ng/ml; doxíciclina 5 $\mu$ M.

O NGF e a doxiciclina induziram a expressão de GAP-43 ( $4,59 \pm 0,26$  e  $4,95 \pm 0,44$ , respectivamente) em relação ao controle não tratado ( $1,98 \pm 0,16$ ) (Figura 10A e B).

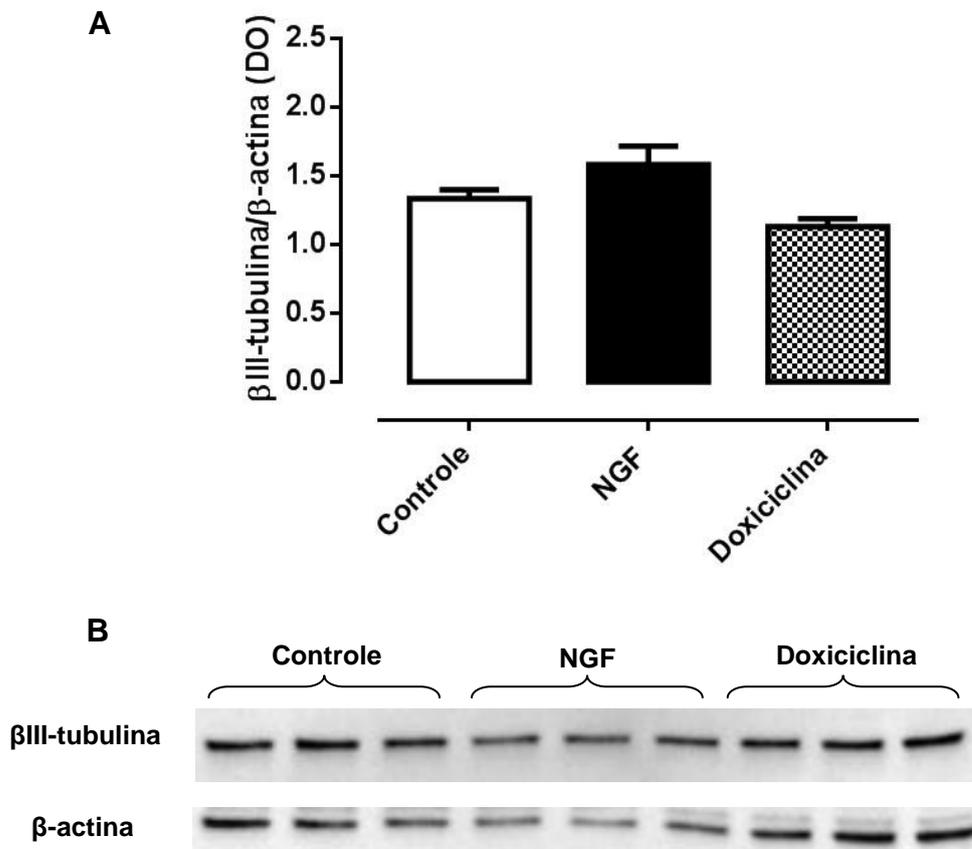
**Figura 10** – Efeito da doxiciclina na expressão de GAP-43 em células PC12 não estimuladas com NGF.



**(A)** Representação gráfica da expressão de GAP-43 normalizada pela  $\beta$ -actina. As barras representam média  $\pm$  EPM de três ensaios realizados em triplicata. \* Significativo para  $p < 0,05$  em relação ao controle. **(B)** Bandas da proteína na membrana de Western Blot. Tratamentos: NGF 100 ng/ml; doxiciclina  $5\mu\text{M}$ .

Além das proteínas relacionadas à neuroplasticidade axonal, também foram avaliadas duas proteínas do citoesqueleto,  $\beta$ III-tubulina e F-actina. Não foi observado efeito da doxiciclina ( $1,13 \pm 0,06$ ) ou do NGF ( $1,58 \pm 0,13$ ) na expressão de  $\beta$ III-tubulina em relação ao controle ( $1,33 \pm 0,07$ ), como apresentado na Figura 11A e B.

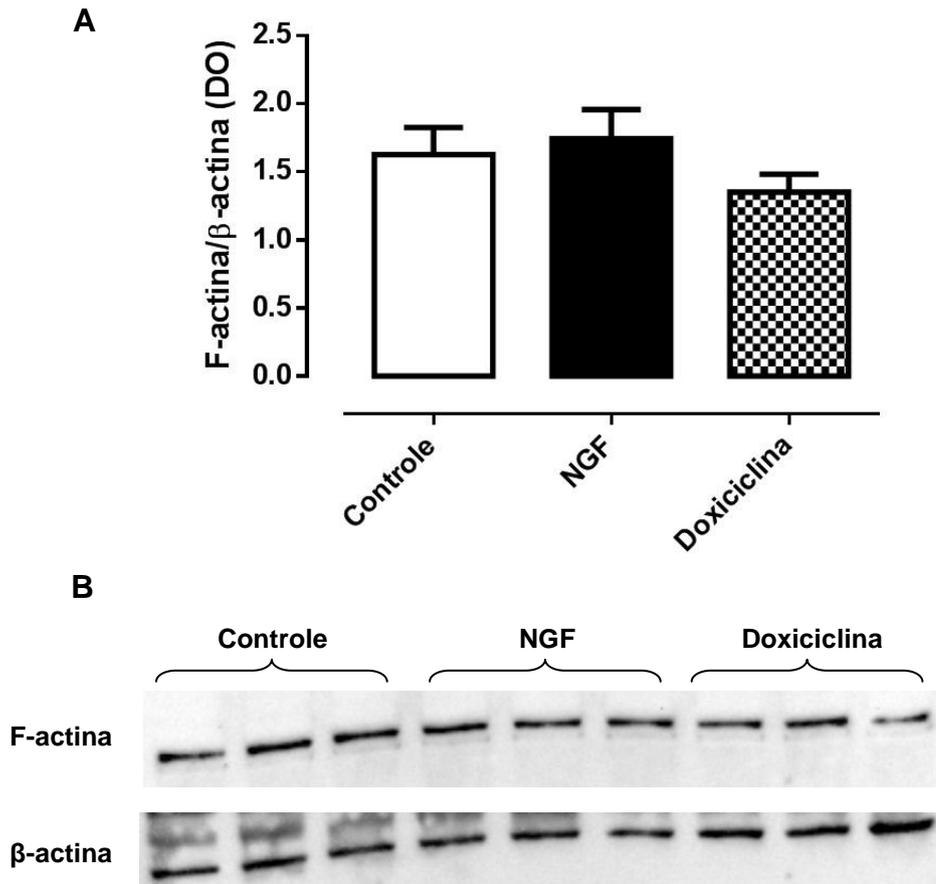
**Figura 11** – Efeito da doxiciclina na expressão de  $\beta$ III-tubulina em células PC12 não estimuladas com NGF.



**(A)** Representação gráfica da expressão de  $\beta$ III-tubulina normalizada pela  $\beta$ -actina. As barras representam média  $\pm$  EPM de três ensaios realizados em triplicata. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. **(B)** Bandas da proteína na membrana de Western Blot. Tratamentos: NGF 100 ng/ml; doxiciclina 5 $\mu$ M.

Também não foram observadas diferenças significativas na expressão da F-actina entre os grupos analisados (controle:  $1,63 \pm 0,20$ ; NGF:  $1,75 \pm 0,21$ ; doxiciclina:  $1,35 \pm 0,13$ ), como apresentado na Figura 12A e B.

**Figura 12** – Efeito da doxiciclina na expressão de F-actina em células PC12 não estimuladas com NGF.

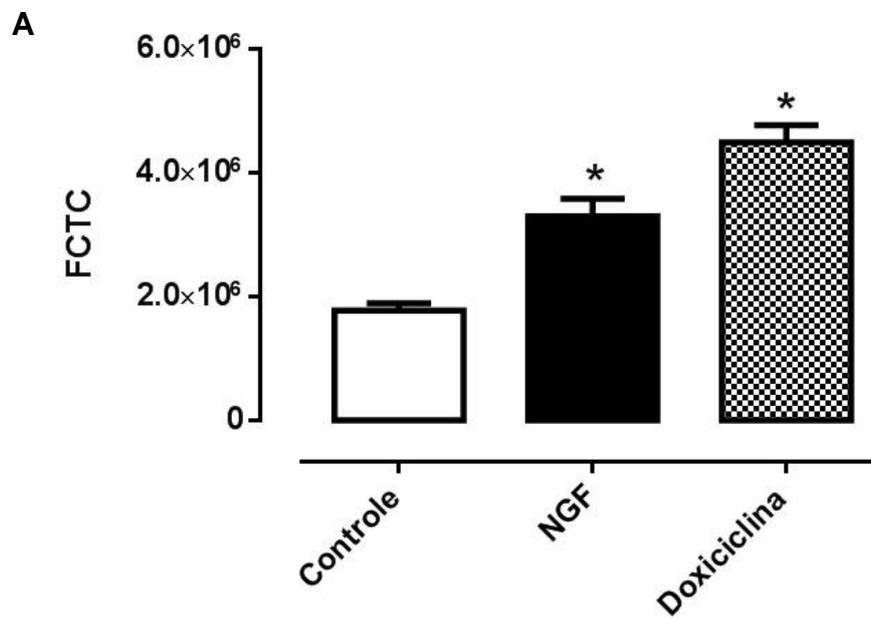


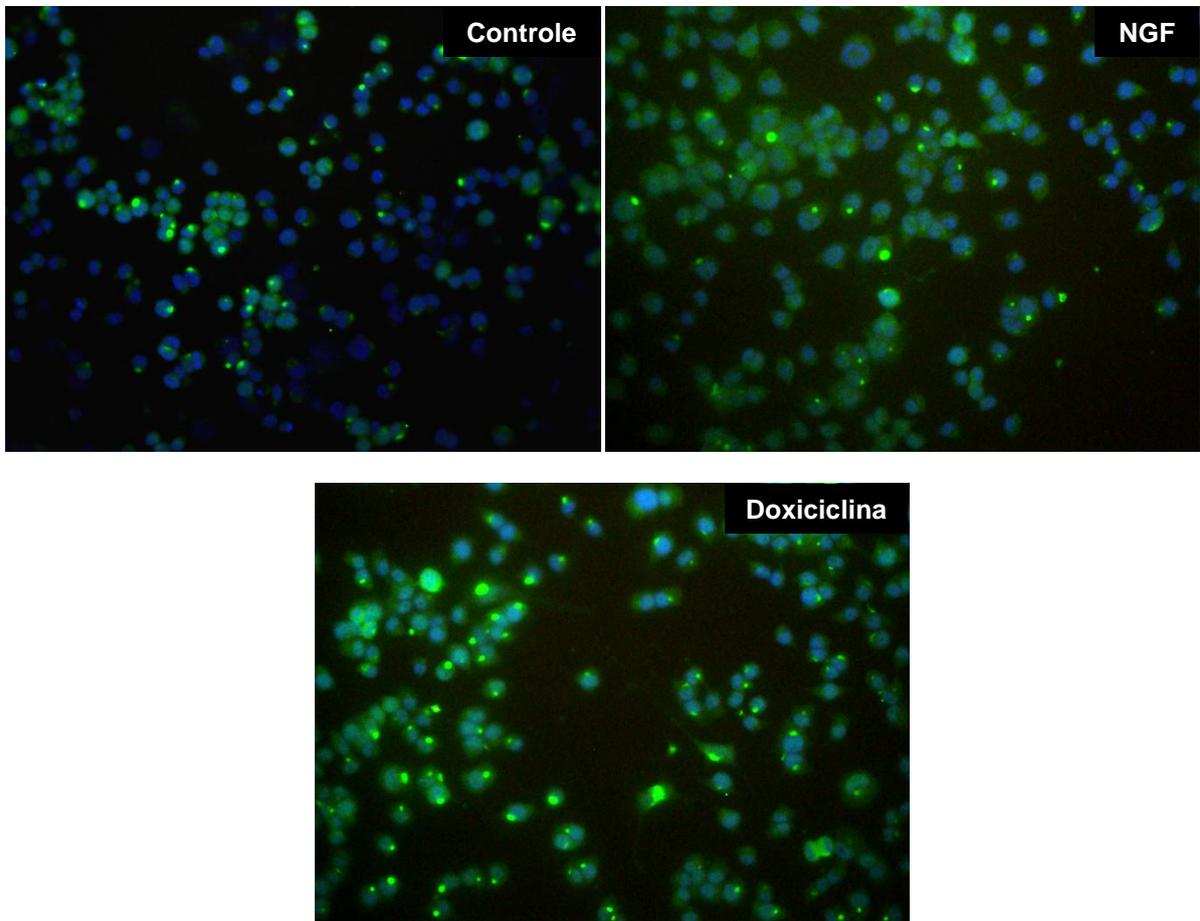
**(A)** Representação gráfica da expressão de F-actina normalizada pela  $\beta$ -actina. As barras representam média  $\pm$  EPM de três ensaios realizados em triplicata. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. **(B)** Bandas da proteína na membrana de Western Blot. Tratamentos: NGF 100 ng/ml; doxiciclina 5 $\mu$ M.

#### 4.5 Efeito da doxiciclina na expressão de NF-200 em células PC12

O grupo tratado com doxiciclina ( $4,49 \times 10^6 \pm 276510$ ) e o grupo tratado com NGF ( $3,30 \times 10^6 \pm 281989$ ) apresentaram intensidade de fluorescência (representando a formação de neurofilamento-200) significativamente maior que o grupo controle ( $1,77 \times 10^6 \pm 117199$ ), como apresentado na Figura 13A e B.

**Figura 13** – Efeito da doxiciclina na expressão do NF-200 em células PC12 não estimuladas com NGF.



**Figura 13 – Continuação.****B**

**(A)** Representação gráfica da intensidade total de fluorescência celular corrigida (FCTC). O gráfico representa média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de três ensaios em triplicata. \* Significativo para  $p < 0,05$  em relação ao controle. **(B)** Fotomicrografias obtidas por sobreposição das imagens mostrando neurofilamentos (verde) marcados com anticorpo anti-NF-200kDa conjugado com FITC e núcleos (azul) corados com Hoescht 33342 (microscopia de fluorescência, aumento 400x). Tratamentos: NGF 100 ng/mL; doxiciclina 5 $\mu$ M.

#### 4.6 Efeito da doxiciclina na neuritogênese em modelo de neurotoxicidade induzida por MPP<sup>+</sup>

Além do potencial neurotrófico da doxiciclina *per se*, também foi avaliado o potencial neuroprotetor da doxiciclina em células PC12 estimuladas com NGF e tratadas com a neurotoxina dopaminérgica MPP<sup>+</sup>. Como apresentado na Figura 14A, o MPP<sup>+</sup> reduziu significativamente ( $1,34 \pm 0,16\%$ ) a neuritogênese induzida pelo NGF ( $3,64 \pm 0,33\%$ ), utilizado como controle. Esse efeito foi minimizado pela adição de doxiciclina, que aumentou significativamente a porcentagem de células com neuritos ( $4,03 \pm 0,44\%$ ) em relação ao grupo tratado com a neurotoxina ( $1,34 \pm 0,16\%$ ). Fotomicrografias dos referidos grupos são apresentados na Figura 14B.

**Figura 14** - Efeito da doxiciclina na neuritogênese em modelo de neurotoxicidade induzida pelo MPP<sup>+</sup>.

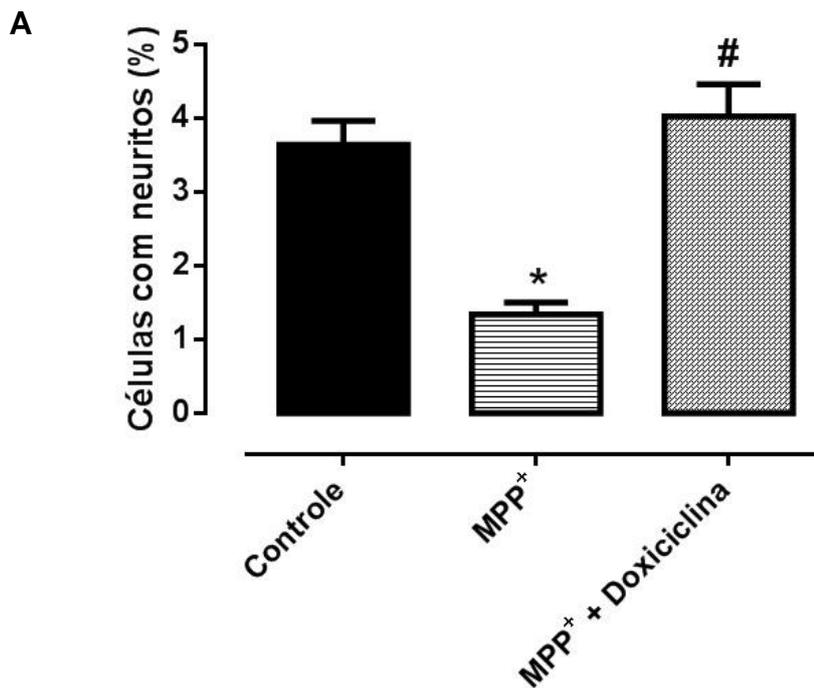
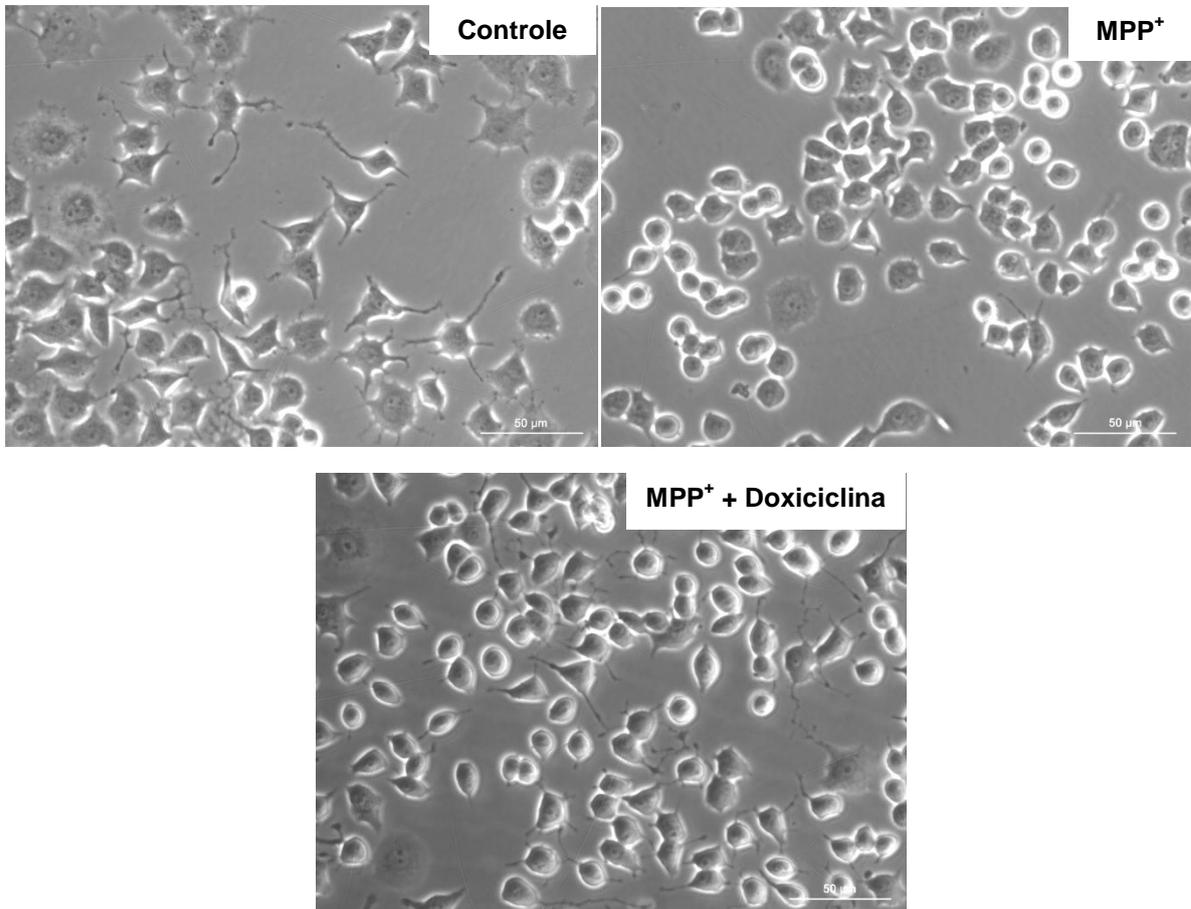


Figura 14 – Continuação.

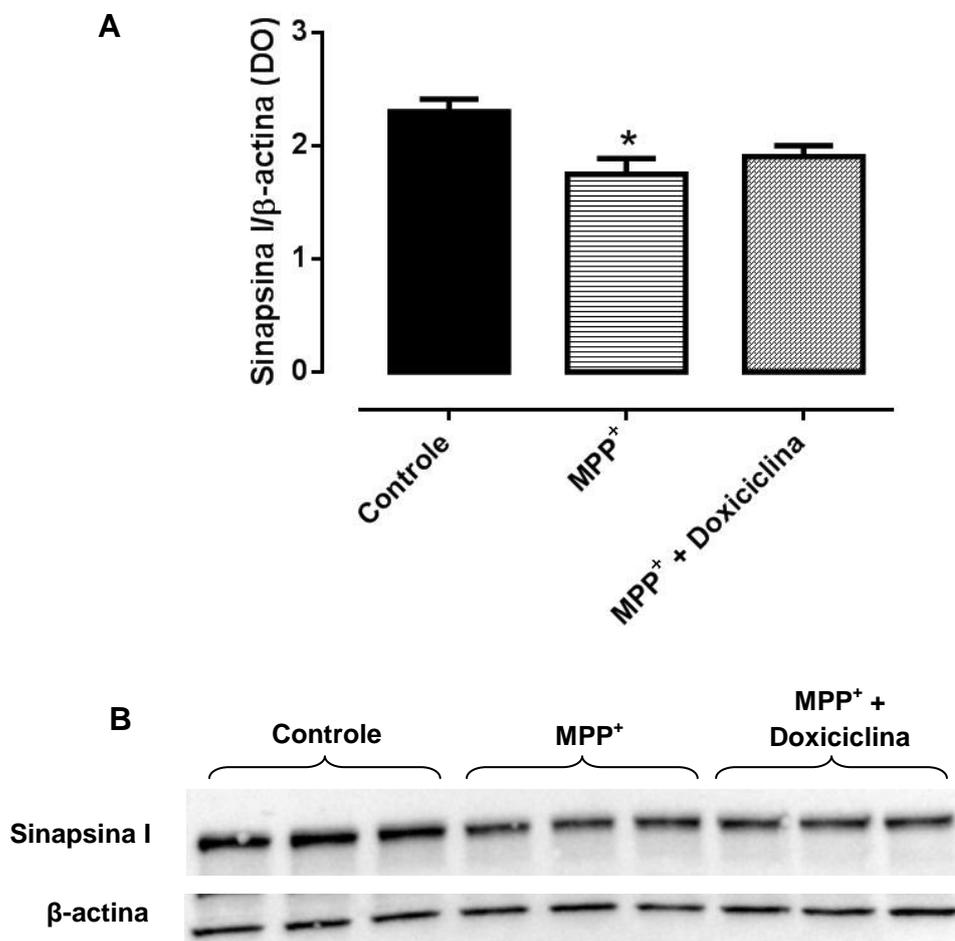
**B**

**(A)** Representação gráfica da porcentagem de células com neuritos após 72 horas de incubação. As barras representam média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de três ensaios em triplicata. \* Significativo para  $p < 0,05$  em relação ao controle. # Significativo para  $p < 0,05$  em relação ao MPP<sup>+</sup>. **(B)** Fotomicrografias obtidas em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 400x, escala de 50µm). Tratamentos: NGF 100 ng/mL; MPP<sup>+</sup> 100µM; doxíciclina 5µM.

#### 4.7 Efeito da doxiciclina na expressão de sinapsina I, sinaptofisina, GAP-43, $\beta$ III-tubulina e F-actina no modelo de neurotoxicidade induzida por MPP<sup>+</sup>

O MPP<sup>+</sup> reduziu a expressão de sinapsina I ( $1,75 \pm 0,14$ ) em relação ao grupo controle tratado somente com NGF ( $2,30 \pm 0,11$ ), porém a adição do antibiótico não alterou ( $1,90 \pm 0,10$ ) o efeito do MPP<sup>+</sup> (Figura 15A e B).

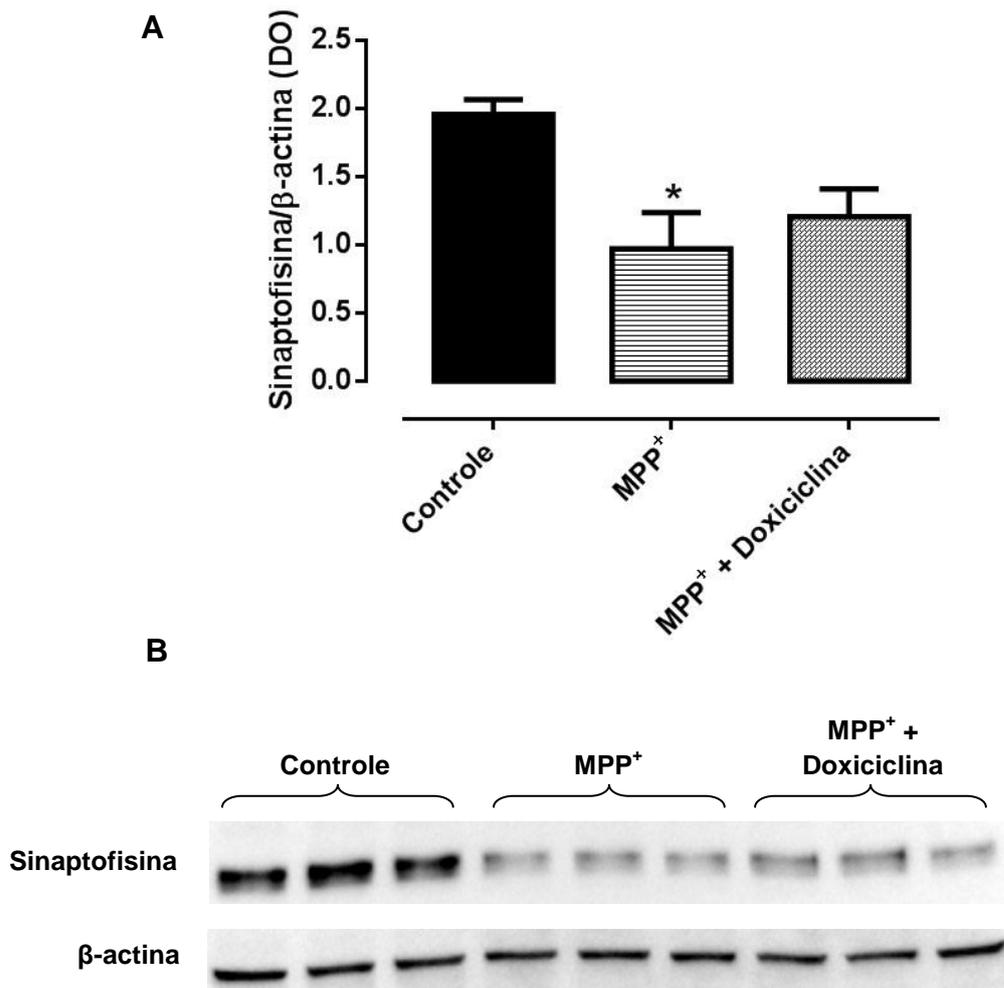
**Figura 15** – Efeito da doxiciclina na expressão de sinapsina I em modelo de neurotoxicidade induzida pelo MPP<sup>+</sup>.



**(A)** Representação gráfica da expressão de sinapsina I normalizada pela  $\beta$ -actina. As barras representam média  $\pm$  EPM de três ensaios realizados em triplicata. \* Significativo para  $p < 0,05$  em relação ao controle. **(B)** Bandas da proteína na membrana de Western Blot. Tratamentos: NGF 100 ng/ml; MPP<sup>+</sup> 100 $\mu$ M; doxiciclina 5 $\mu$ M.

O grupo MPP<sup>+</sup> ( $0,97 \pm 0,27$ ) apresentou expressão reduzida de sinaptofisina em relação ao controle ( $1,96 \pm 0,11$ ); a adição da doxiciclina ( $1,21 \pm 0,20$ ) não aumentou significativamente a expressão da proteína em relação ao grupo tratado com a neurotoxina (Figura 16A e B).

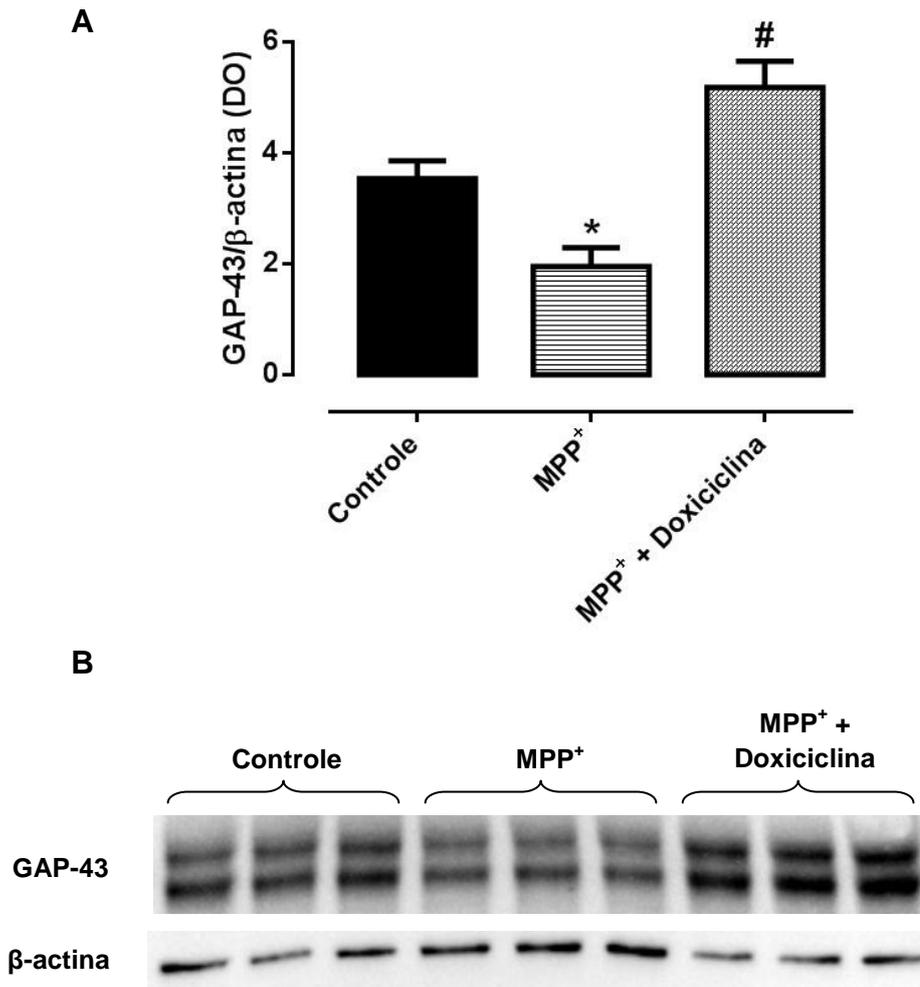
**Figura 16** – Efeito da doxiciclina na expressão de sinaptofisina em modelo de neurotoxicidade induzida pelo MPP<sup>+</sup>.



**(A)** Representação gráfica da expressão de sinaptofisina normalizada pela  $\beta$ -actina. As barras representam média  $\pm$  EPM de três ensaios realizados em triplicata. \* Significativo para  $p < 0,05$  em relação ao controle. **(B)** Bandas da proteína na membrana de Western Blot. Tratamentos: NGF 100 ng/ml; MPP<sup>+</sup> 100 $\mu$ M e doxiciclina 5 $\mu$ M.

O tratamento com a neurotoxina MPP<sup>+</sup> também reduziu significativamente ( $1,95 \pm 0,34$ ) a expressão de GAP-43 em relação ao controle ( $3,54 \pm 0,32$ ); a doxíciclina aumentou significativamente ( $5,18 \pm 0,47$ ) a expressão de GAP-43 em relação ao grupo do MPP<sup>+</sup> (Figura 17A e B).

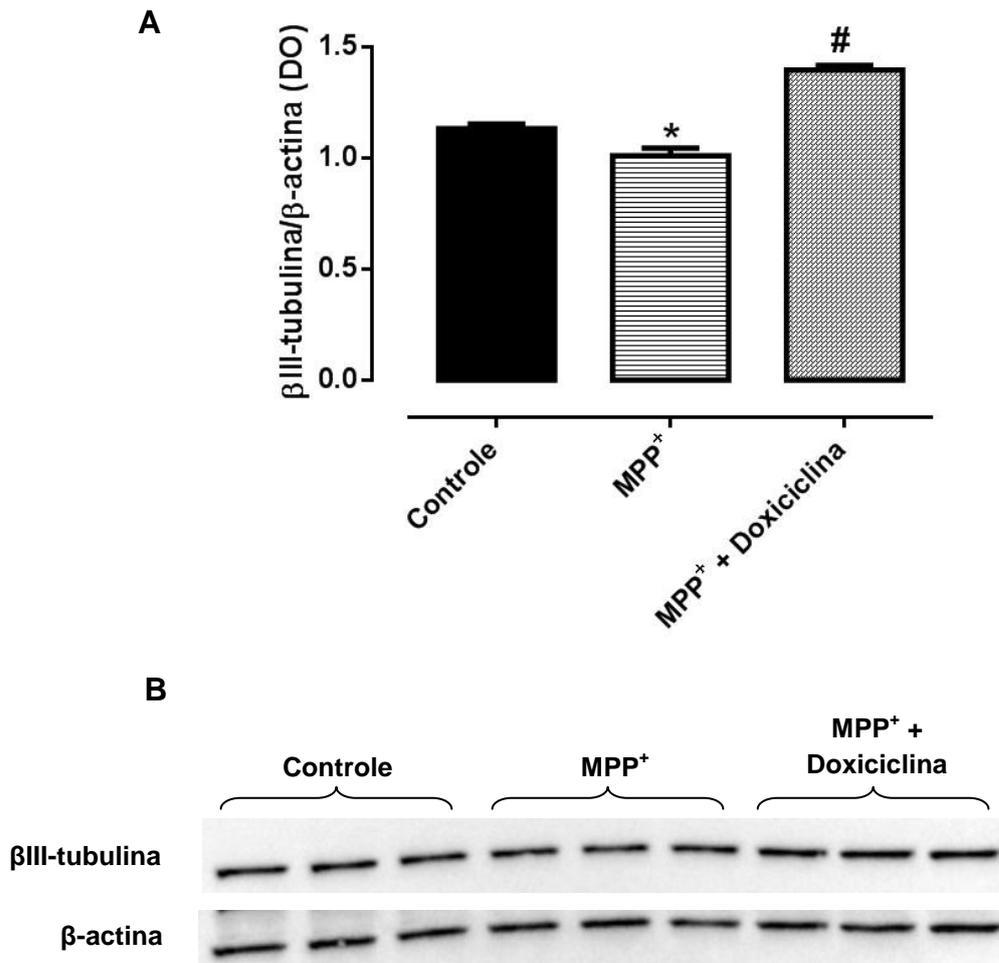
**Figura 17** – Efeito da doxíciclina na expressão de GAP-43 em modelo de neurotoxicidade induzida pelo MPP<sup>+</sup>.



**(A)** Representação gráfica da expressão de GAP-43 normalizada pela  $\beta$ -actina. As barras representam média  $\pm$  EPM de três ensaios realizados em triplicata. \* Significativo para  $p < 0,05$  em relação ao controle. # Significativo para  $p < 0,05$  em relação ao MPP<sup>+</sup>. **(B)** Bandas da proteína na membrana de Western Blot. Tratamentos: NGF 100 ng/ml; MPP<sup>+</sup> 100 $\mu$ M e doxíciclina 5 $\mu$ M.

O MPP<sup>+</sup> reduziu a expressão ( $1,01 \pm 0,03$ ) de  $\beta$ III-tubulina em relação ao grupo controle ( $1,13 \pm 0,02$ ), e a adição da doxiciclina aumentou significativamente a expressão desta proteína ( $1,40 \pm 0,02$ ) em comparação ao grupo MPP<sup>+</sup> (Figura 18A e B).

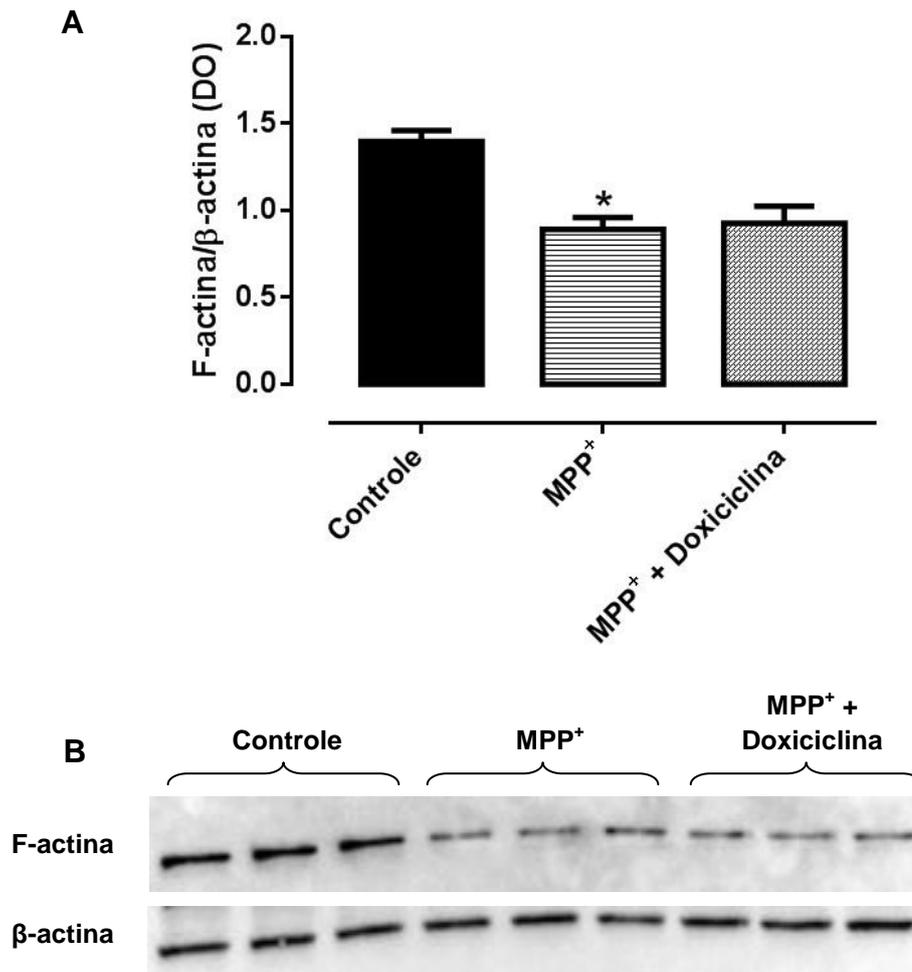
**Figura 18** – Efeito da doxiciclina na expressão de  $\beta$ III-tubulina em modelo de neurotoxicidade induzida pelo MPP<sup>+</sup>.



**(A)** Representação gráfica da expressão de  $\beta$ III-tubulina normalizada pela  $\beta$ -actina. As barras representam média  $\pm$  EPM de três ensaios realizados em triplicata. \* Significativo para  $p < 0,05$  em relação ao controle. # Significativo para  $p < 0,05$  em relação ao MPP<sup>+</sup>. **(B)** Bandas da proteína na membrana de Western Blot. Tratamentos: NGF 100 ng/ml; MPP<sup>+</sup> 100 $\mu$ M e doxiciclina 5 $\mu$ M.

A expressão de F-actina também foi reduzida pela neurotoxina MPP<sup>+</sup> ( $0,89 \pm 0,07$ ) quando comparada ao controle ( $1,40 \pm 0,06$ ). A adição de doxiciclina não alterou significativamente a expressão de F-actina ( $0,93 \pm 0,10$ ) quando comparada ao MPP<sup>+</sup>, como demonstrado na Figura 19A e B.

**Figura 19** – Efeito da doxiciclina na expressão de F-actina em modelo de neurotoxicidade induzida pelo MPP<sup>+</sup>.

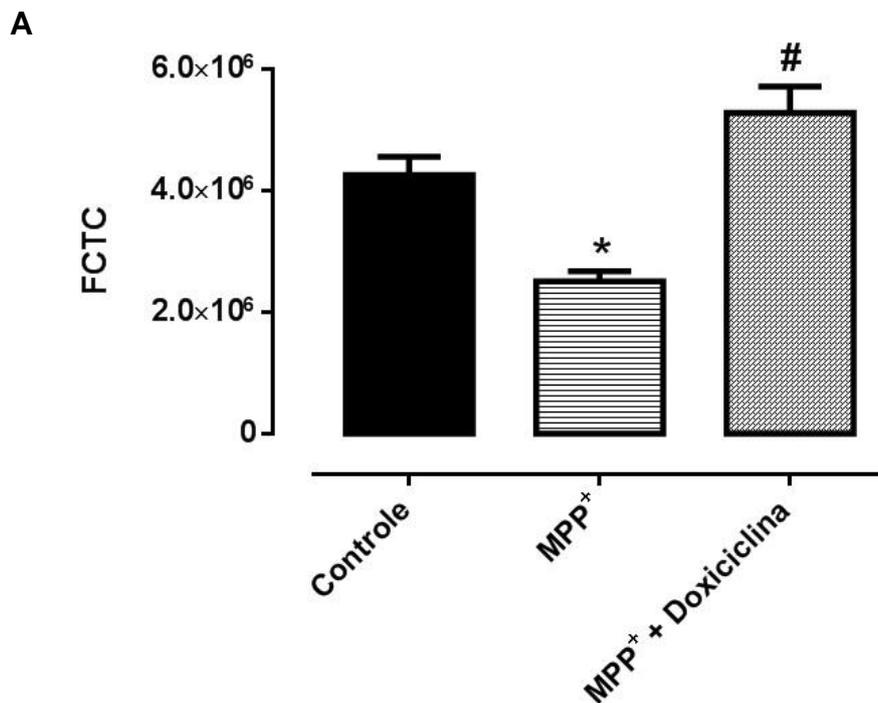


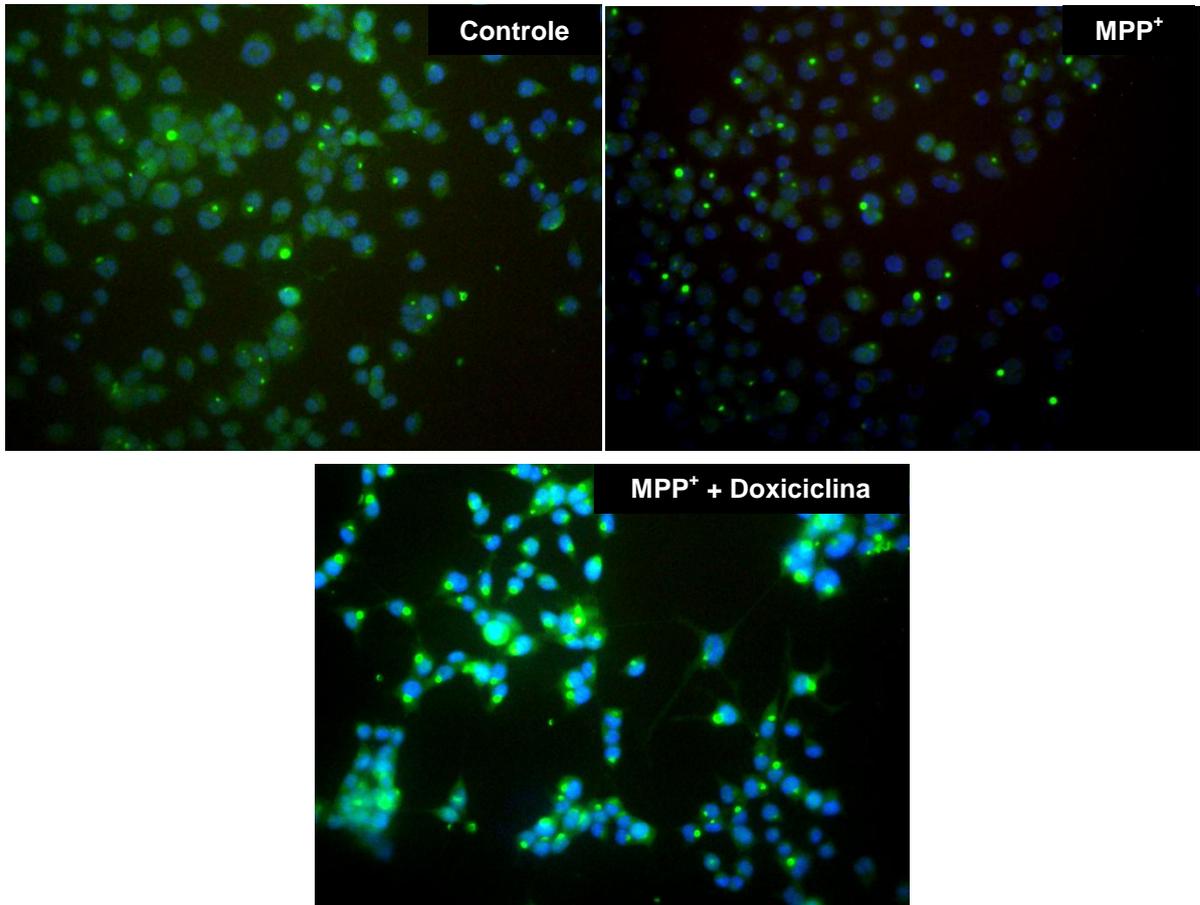
**(A)** Representação gráfica da expressão de F-actina normalizada pela  $\beta$ -actina. As barras representam média  $\pm$  EPM de três ensaios realizados em triplicata. \* Significativo para  $p < 0,05$  em relação ao controle. **(B)** Bandas da proteína na membrana de Western Blot. Tratamentos: NGF 100 ng/ml; MPP<sup>+</sup> 100 $\mu$ M e doxiciclina 5 $\mu$ M.

#### 4.8 Efeito da doxiciclina no neurofilamento NF-200 em modelo de neurotoxicidade induzida pelo MPP<sup>+</sup>

Na avaliação do modelo tratado com MPP<sup>+</sup>, observou-se que o grupo tratado com MPP<sup>+</sup> teve intensidade de fluorescência reduzida ( $2,51 \times 10^6 \pm 169510$ ) de forma significativa em relação ao controle ( $4,26 \times 10^6 \pm 301436$ ). Já o tratamento MPP<sup>+</sup> + doxiciclina ( $5,28 \times 10^6 \pm 432237$ ) obteve a intensidade de fluorescência significativamente maior que o grupo MPP<sup>+</sup>. O gráfico da fluorescência celular total corrigida e as imagens são apresentados a seguir na Figura 20.

**Figura 20** - Efeito da doxiciclina no neurofilamento NF-200 em modelo de neurotoxicidade induzida pelo MPP<sup>+</sup>.



**Figura 20** – Continuação.**B**

**(A)** Representação gráfica da intensidade de fluorescência celular total corrigida (FCTC). O gráfico representa média  $\pm$  erro padrão da média de três ensaios em triplicata. \* Significativo para  $p < 0,05$  em relação ao controle. # Significativo para  $p < 0,05$  em relação ao MPP<sup>+</sup>. **(B)** Sobreposição das imagens representando neurofilamentos (verde) marcados com anticorpo anti-NF-200kDa conjugado com FITC e núcleos (azul) corados com Hoescht 33342 (microscopia de fluorescência, aumento 400x). Tratamentos: NGF 100 ng/mL; doxíciclina 5 $\mu$ M; MPP<sup>+</sup> 100 $\mu$ M.

#### 4.9 Captação de glicose

Como apresentado na Figura 21A, a citocalasina B (controle positivo, inibidor da captação de glicose) reduziu significativamente ( $1202 \pm 207$  CPM) a captação de glicose das células PC12 em relação ao controle sem tratamento ( $29446 \pm 1672$  CPM). Tanto o grupo tratado com NGF ( $27736 \pm 1541$ ) quanto aquele tratado com doxiciclina ( $29554 \pm 2164$  CPM) não apresentaram alteração significativa em relação ao grupo controle.

O tratamento com  $MPP^+$  reduziu significativamente a captação de glicose ( $13659 \pm 1519$  CPM) comparado ao grupo controle, porém a doxiciclina ( $9245 \pm 1406$  CPM) não apresentou efeito protetor contra essa redução induzida pela neurotoxina (Figura 21B).

**Figura 21** - Efeito da doxiciclina na captação da glicose em (A) células PC12 não estimuladas com NGF e em (B) modelo de neurotoxicidade induzida pelo  $MPP^+$ .

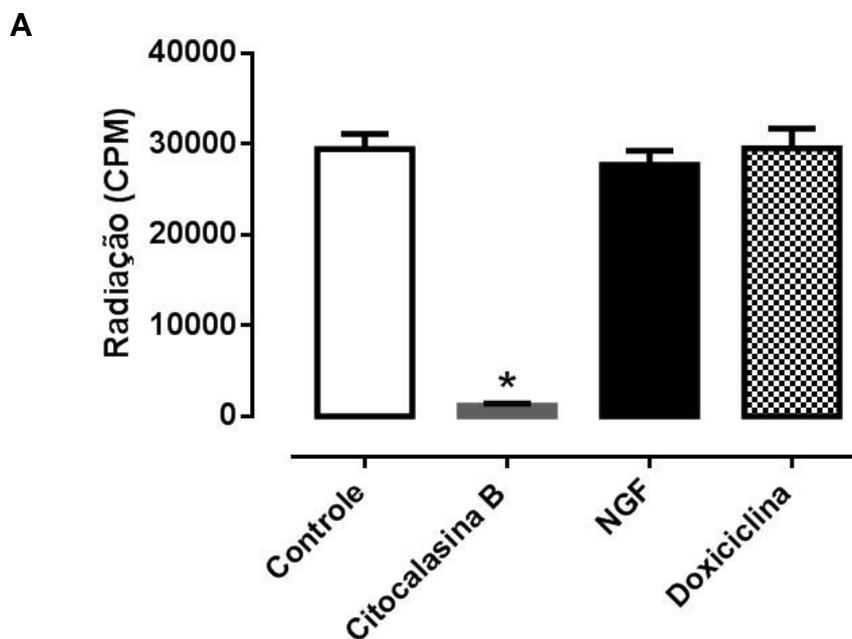
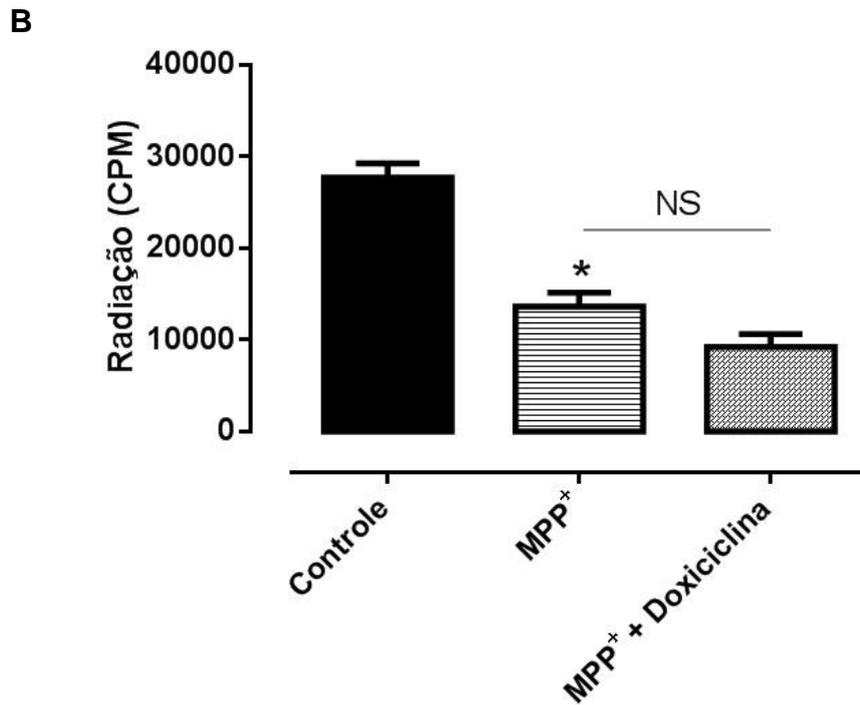


Figura 21 – Continuação.

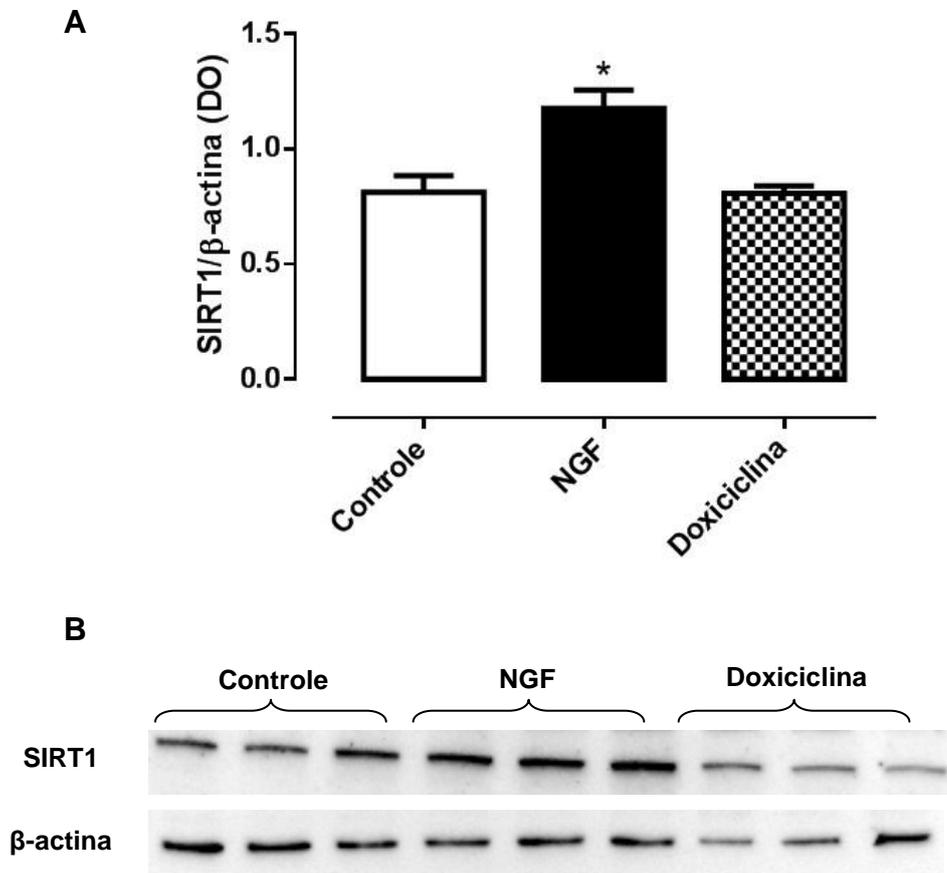


**(A)** O gráfico representa média  $\pm$  erro padrão da média de três ensaios em triplicata. \* Significativo para  $p < 0,05$  em relação ao controle. Tratamentos: NGF 100 ng/mL; doxíciclina 5 $\mu$ M; citocalasina B (inibidor da captação de glicose, 10  $\mu$ M, pré-tratamento 1 hora). **(B)** O gráfico representa média  $\pm$  erro padrão da média de três ensaios em triplicata. \* Significativo para  $p < 0,05$  em relação ao controle. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados com MPP<sup>+</sup> e MPP<sup>+</sup> + doxíciclina. Tratamentos: NGF 100 ng/mL; doxíciclina 5 $\mu$ M; MPP<sup>+</sup> 100 $\mu$ M.

#### 4.10 Efeito da doxiciclina sobre a expressão de SIRT1, AMPK $\alpha$ e fosfo-AMPK $\alpha$ em células PC12 não estimuladas com NGF

O grupo tratado com NGF apresentou um aumento significativo da expressão de SIRT1 ( $1,18 \pm 0,08$ ) em relação ao controle ( $0,81 \pm 0,07$ ). Já as células tratadas com doxiciclina ( $0,81 \pm 0,03$ ) não apresentaram diferença significativa em relação ao controle. Esses dados são mostrados na Figura 22A e B.

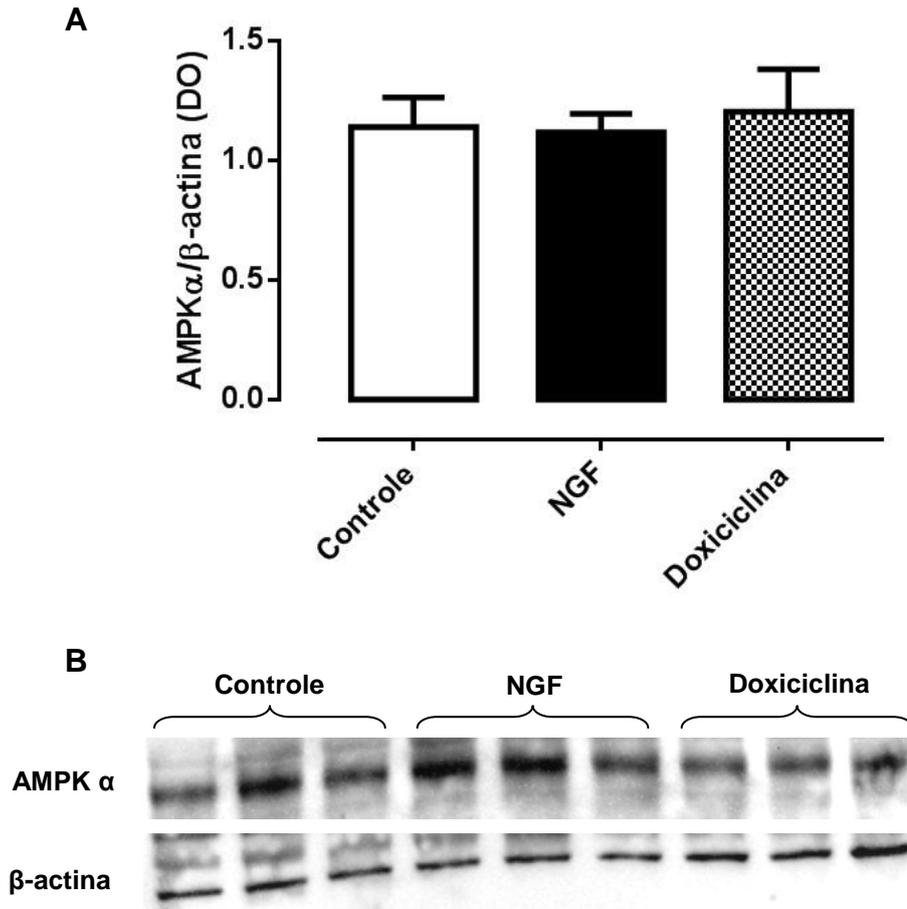
**Figura 22** – Efeito da doxiciclina na expressão de SIRT1 em células PC12 não estimuladas com NGF.



**(A)** Representação gráfica da expressão de SIRT1 normalizada pela  $\beta$ -actina. As barras representam média  $\pm$  EPM de três ensaios realizados em triplicata. \* Significativo para  $p < 0,05$  em relação ao controle. **(B)** Bandas da proteína na membrana de Western Blot. Tratamentos: NGF 100 ng/ml e doxiciclina  $5\mu\text{M}$ .

Com relação à expressão de AMPK  $\alpha$ , não foi observada diferença significativa entre os grupos controle ( $1,14 \pm 0,12$ ), NGF ( $1,12 \pm 0,08$ ) e o tratamento com doxiciclina ( $1,20 \pm 0,18$ ), como demonstrado na Figura 23A e B.

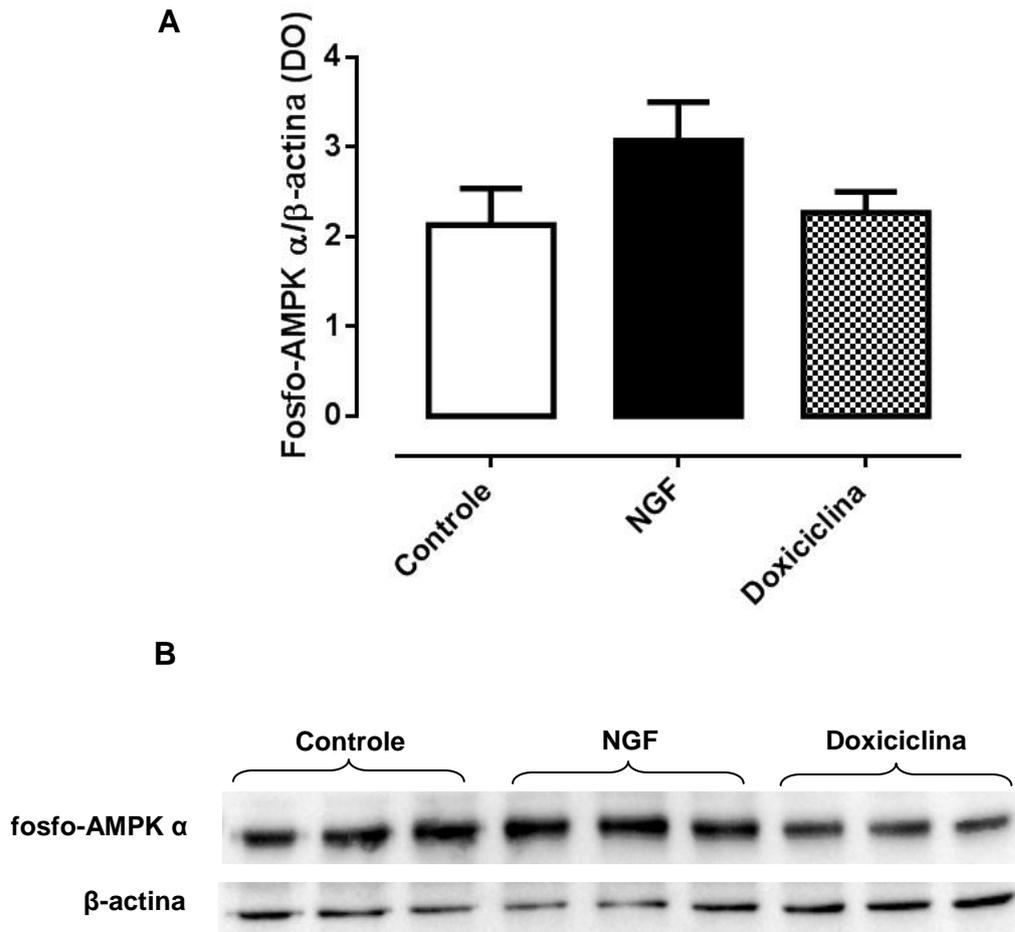
**Figura 23** – Efeito da doxiciclina na expressão de AMPK  $\alpha$  em células PC12 não estimuladas com NGF.



**(A)** Representação gráfica da expressão de AMPK  $\alpha$  normalizada pela  $\beta$ -actina. As barras representam média  $\pm$  EPM de três ensaios realizados em triplicata. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. **(B)** Bandas da proteína na membrana de Western Blot. Tratamentos: NGF 100 ng/ml e doxiciclina 5 $\mu$ M.

Também não houve diferença significativa da expressão de fosfo-AMPK  $\alpha$  entre o controle ( $2,13 \pm 0,41$ ), o grupo tratado com NGF ( $3,07 \pm 0,43$ ) ou o grupo da doxíciclina ( $2,27 \pm 0,23$ ), como apresentado na Figura 24A e B.

**Figura 24** – Efeito da doxíciclina na expressão de fosfo-AMPK  $\alpha$  em células PC12 não estimuladas com NGF.



**(A)** Representação gráfica da expressão de fosfo-AMPK  $\alpha$  normalizada pela  $\beta$ -actina. As barras representam média  $\pm$  EPM de três ensaios realizados em triplicata. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. **(B)** Bandas da proteína na membrana de Western Blot. Tratamentos: NGF 100 ng/ml e doxíciclina 5 $\mu$ M.

## 5. DISCUSSÃO

Este estudo avaliou o potencial neurotrófico da doxiciclina como possível mecanismo de neuroproteção em células PC12 tratadas com MPP<sup>+</sup>, metabólito ativo da neurotoxina MPTP que induz parkinsonismo *in vivo*. Primeiramente, demonstramos que a doxiciclina não interfere na viabilidade das células PC12. O ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) é um indicador de viabilidade celular, mais precisamente da função mitocondrial das células com base na redução enzimática do MTT a cristais de formazan pelas desidrogenases mitocondriais das células viáveis, produzindo uma coloração azul escuro/púrpura (HANSEN; NIELSEN; BERG, 1989). Nossos resultados demonstram que dentre as concentrações de doxiciclina avaliadas, não houve dano à função mitocondrial das células PC12. Tao et al. (2017) também demonstraram, através do ensaio de MTT, que diferentes concentrações de minociclina, outra tetraciclina de segunda geração, não alteraram a viabilidade de células PC12.

Assim, com base no ensaio de viabilidade, foi avaliado o potencial neuritogênico das concentrações não citotóxicas da doxiciclina, determinando-se a concentração efetiva que induz 50% de resposta (EC<sub>50</sub>). A curva concentração-resposta apresentou um perfil de sino (*bell-shaped*), no qual a intensidade de resposta (neuritogênese) atingiu um platô entre 1,25µM e 5µM (intensidade máxima), diminuindo nas concentrações mais altas. Semelhante ao efeito da doxiciclina, alguns estudos demonstraram uma curva concentração-resposta com o perfil *bell-shaped* para o efeito do NGF sobre a neuritogênese em neurônios sensoriais da raiz do gânglio dorsal (ROSOFF et al., 2004) e em células PC12 (RAVNI et al., 2006). Em linha com esses achados, outro estudo de nosso grupo demonstrou o mesmo perfil de sino para a curva concentração-resposta de indução de neuritogênese por outro agente neurotrófico, um peptídeo sintético baseado em um peptídeo isolado de veneno de serpente (BERNARDES et al., 2018). Dentre os agentes que induzem neuritogênese, o perfil *bell-shaped* em curvas dose-resposta é comum e consistente com uma resposta hormética, isto é, uma resposta bifásica, na qual ocorre um estímulo ou efeito benéfico em doses baixas e inibição com doses altas de neurotrofinas, tanto endógenas quanto exógenas (CALABRESE, 2008; MATTSON, 2008).

Para a investigação dos mecanismos moleculares foram avaliados os efeitos sobre vários moduladores das vias neurotróficas, e para tal foi selecionada a concentração de 5 $\mu$ M da doxiciclina, a maior concentração efetiva para indução de neuritogênese nas células PC12. Essa concentração também teve por base um estudo *in vitro* no qual a minociclina induziu o crescimento de neuritos em células PC12 após a privação de oxigênio-glicose seguida de reoxigenação (TAO et al., 2017) e estudos clínicos sobre a concentração atingida no fluido cérebro-espinhal após tratamento oral com doxiciclina (YIM; FLYNN; FITZGERALD, 1985; GONZALEZ-LIZARRAGA et al., 2017).

Nossos resultados mostraram que a doxiciclina induz a neuritogênese em células PC12 sem a necessidade de adição de NGF. Esta resposta foi reduzida na presença de inibidores das vias de sinalização neurotrófica, o que sugere que essas vias exercem um papel crucial na ação neurotrófica da doxiciclina. Assim, este estudo mostra que a doxiciclina estimula o crescimento de neuritos através da ativação do receptor trkA e das cascatas de sinalização PI3K/Akt e MAPK/ERK. Até o presente, não há dados na literatura que mostrem a relação da doxiciclina com as vias de diferenciação neuronal analisadas neste estudo. Lu et al. (2016) demonstraram o efeito protetor de outro antibiótico da mesma classe, a minociclina, contra o dano induzido pela ketamina em células tronco neurais por mecanismo envolvendo a via PI3K/Akt/Gsk-3 $\beta$  e correlacionaram o efeito à inibição da apoptose, uma vez que essa via é diretamente relacionada à inibição de proteínas apoptóticas e sobrevivência celular. Porém, a ativação de PI3K também está associada à iniciação e ao alongamento dos neuritos em células PC12 estimuladas com NGF, em neurônios simpáticos e em neurônios sensoriais (KOBAYASHI, 1997; KURUVILLA; YE; GINTY, 2000; KIM et al., 2014). Além disso, foi demonstrado que a fosforilação de Akt (ativação de PI3K/Akt) está relacionada à regeneração de axônios motores (NAMIKAWA et al., 2000). Assim, a via PI3K/Akt ativada por fatores neurotróficos regula a formação, maturação e ramificação de neuritos (BENNISON et al., 2020). O inibidor específico de Akt, LY294002, é amplamente utilizado para estudar a via PI3K/Akt (PHAN et al., 2014) e foi empregado em nosso estudo para caracterizar a ação da doxiciclina sobre essa via e correlacioná-la à indução de neuritos nas células PC12 não estimuladas com NGF. A cascata de sinalização MAPK/ERK – também envolvida na ação neurotrófica da doxiciclina – é ativada por uma diversidade de ligantes e receptores relacionados a diversos processos

biológicos, como proliferação, diferenciação e sobrevivência em diferentes tipos celulares, além de responderem em situações de estresse e inflamação (CARGNELLO; ROUX, 2011; PHAN et al., 2014; BENNISON et al., 2020). Também já foi descrita sua relação com a modulação da plasticidade sináptica pelas neurotrofinas (JOVANOVIC et al., 1996). A sinalização de MAPK/ERK é essencial em todos os aspectos da neuritogênese, como iniciação e rápido alongamento e ramificação de neuritos (XIAO; LIU, 2003; BENNISON et al., 2020). Portanto, a atuação da doxíciclina sobre essas vias está em linha com a nossa hipótese inicial de que a doxíciclina poderia agir sobre as mesmas vias de sinalização que o NGF.

O mecanismo molecular de ação da doxíciclina na neuritogênese foi avaliado através dos seus efeitos na expressão de proteínas alvo da ação neurotrófica do NGF, e que estão relacionadas à plasticidade sináptica e crescimento axonal. A sinalização mediada pelo receptor *trk* é importante para a manutenção do sistema nervoso central e periférico (FUKUDA et al., 2015). O NGF promove a autofosforilação do *trkA*, que leva à ativação das vias como PI3K e MAPK/ERK, e finalmente resulta na ativação da expressão gênica, sobrevivência neuronal e crescimento de neuritos (KAPLAN; STEPHENS, 1994; HUANG; REICHARDT, 2001). O aumento da expressão da forma ativada do receptor (fosforilada) causada pela doxíciclina reforça que a doxíciclina mimetiza o mecanismo de ação pelo qual o NGF age. A sinapsina I está presente no citoplasma de vesículas sinápticas dos terminais nervosos (VALTORTA et al., 1989). As neurotrofinas estimulam a expressão da sinapsina I através da cascata MAPK/ERK e regulam as interações entre sinapsina I e a actina do citoesqueleto, contribuindo para a comunicação sináptica através da liberação de neurotransmissores (JOVANOVIC et al., 1996). Dessa forma, a ativação da via MAPK/ERK e o aumento da expressão de sinapsina I induzidos pela doxíciclina sugerem que a doxíciclina simula os efeitos das neurotrofinas, modulando a plasticidade sináptica nas células PC12 não estimuladas pelo NGF. A proteína GAP-43, por sua vez, está associada com o processo de crescimento axonal, trata-se da proteína neurotípica mais abundante nos cones de crescimento, sendo usada como marcador de diferenciação neuronal (DAS; FREUDENRICH; MUNDY, 2004; ENCINAS et al., 1999). A correlação entre o aumento da síntese e do transporte axonal de GAP-43 com o crescimento de neuritos e diferenciação em células PC12 está bem estabelecida (DAS; FREUDENRICH; MUNDY, 2004). Nossos resultados sugerem que a regulação

positiva do GAP-43 está envolvida na formação e alongamento de neuritos induzidos pela doxiciclina. Dados da ação da doxiciclina sobre essas proteínas ainda são escassos na literatura, mas o aumento da expressão de GAP-43 relacionado à formação de neuritos já foi observado em células PC12 expostas a privação de glicose/oxigênio e reoxigenação tratadas com minociclina (TAO et al., 2017).

A doxiciclina também aumentou a expressão do neurofilamento NF-200, o principal componente do citoesqueleto dos axônios. Os neurofilamentos formam uma rede densa de filamentos que fornece estabilidade mecânica aos axônios, sendo responsáveis pelo diâmetro axonal e pela condução do sinal elétrico ao longo do axônio (PERROT et al., 2008; KOUNAKIS; TAVERNARAKIS, 2019). A sua regulação positiva indica o seu envolvimento na neuritogênese estimulada pela doxiciclina.

Além de induzir à formação de neuritos em células PC12 (sem a presença de NGF) através das vias e moduladores neurotróficos, a doxiciclina protegeu contra a inibição da neuritogênese causada pela neurotoxina dopaminérgica MPP<sup>+</sup>. Outros mecanismos de proteção da doxiciclina contra doenças neurodegenerativas já foram propostos, incluindo diminuição da ativação de microglia e conseqüentemente da neuroinflamação; inibição da formação de agregados de  $\alpha$ -sinucleína e de agregados de peptídeos  $\beta$ -amiloide, principais marcadores das doenças de Parkinson e Alzheimer, respectivamente (COSTA et al., 2011; GONZALEZ-LIZARRAGA et al., 2017; LAZZARINI et al., 2013). Cho et al. (2009) demonstraram *in vitro* e *in vivo* que a doxiciclina protege neurônios dopaminérgicos após o tratamento com MPTP (precursor do MPP<sup>+</sup>) por um mecanismo anti-apoptótico e anti-inflamatório. Em nosso estudo, demonstramos o efeito protetor da doxiciclina em modelo tratado com MPP<sup>+</sup> e associamos o mecanismo de neuroproteção à atividade neurotrófica da doxiciclina, o que, teoricamente sugere um potencial de regeneração axonal. Não há ainda dados a respeito desse mecanismo neuroprotetor da doxiciclina na literatura científica.

Nossos achados indicam que o efeito negativo do MPP<sup>+</sup> na neuritogênese está associado à diminuição da expressão das proteínas relacionadas à comunicação sináptica (sinapsina I e sinaptofisina), ao crescimento axonal (GAP-43), além das proteínas do citoesqueleto, que fornecem o suporte estrutural para a plasticidade axonal e sináptica. A doxiciclina protegeu contra a regulação negativa do GAP-43 pelo MPP<sup>+</sup>, mas não contra a regulação negativa da sinapsina I ou da

sinaptofisina. Holahan (2017) já destacou a importância da função de GAP-43 e da busca por reguladores positivos desta proteína como possíveis terapias para facilitar a regeneração do SNC após danos axonais, disfunções da memória ou doenças neurodegenerativas.

O processo de degeneração induzido pelo MPP<sup>+</sup> se inicia nas porções terminais do axônio e retrocede até atingir o corpo celular; esse padrão de degeneração axonal retrógrada (“*dying back*”) é caracterizado pela perda dos terminais sinápticos e axonopatia precedendo a degeneração somática e a morte celular (MORFINI et al., 2007). De fato, estudos em animais e humanos sugerem que a degeneração axonal dopaminérgica é um evento chave nos estágios iniciais da doença de Parkinson e envolve mecanismos distintos da degeneração do corpo celular neuronal (TAGLIAFERRO; BURKE, 2016; O’KEEFFE; SULLIVAN, 2018). Os mecanismos pelos quais o MPP<sup>+</sup> causa a perda significativa de sinapses e axônios antes de atingir o corpo celular ainda não foram completamente elucidados. Um dos mecanismos sugeridos é a disfunção do transporte axonal em geral e, particularmente, do transporte vesicular, que afeta a disponibilidade de neurotransmissores e função sináptica (SERULLE et al., 2007). A diminuição da expressão de sinapsina I pelo MPP<sup>+</sup>, observada em nosso estudo, está em linha com as anormalidades no transporte vesicular causadas pelo MPP<sup>+</sup>, pois essa proteína regula o tráfego de vesículas sinápticas e a transmissão sináptica (SONG; AUGUSTINE, 2015). Adicionalmente, o citoesqueleto axonal, formado por microtúbulos e filamentos de actina que continuamente crescem e encolhem, facilitando o remodelamento do citoesqueleto, desempenha um papel crucial no transporte axonal. A rede de microtúbulos formados por heterodímeros de  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina constitui a base para o transporte axonal ativo, enquanto os filamentos de actina, especialmente F-actina, determinam a direção do crescimento do axônio (KEVENAAR; HOOGENRAAD, 2015). Em nosso estudo, o MPP<sup>+</sup> afetou negativamente a expressão de  $\beta$ III-tubulina e F-actina. Essa observação está de acordo com Cappelletti, Surrey e Maci (2005), que mostraram que o MPP<sup>+</sup> afeta a dinâmica dos microtúbulos *in vitro*, com a redução do comprimento e número de microtúbulos. Além disso, a interferência na dinâmica dos microtúbulos axonais e actina pode comprometer a eficiência sináptica, pois a colaboração entre essas proteínas contribui para a regulação da sinalização sináptica através da organização e ancoragem de vesículas nos terminais sinápticos (KOUNAKIS; TAVERNARAKIS,

2019). A doxíciclina aumentou a expressão da  $\beta$ III-tubulina nas células tratadas com MPP<sup>+</sup>, mas não foi capaz de interferir na redução da expressão da F-actina induzida pelo MPP<sup>+</sup>.

Além de microtúbulos e actina, o citoesqueleto também é formado por neurofilamentos, que são particularmente abundantes nos axônios. A expressão de neurofilamentos está associada ao crescimento axonal e à manutenção da homeostase neuronal, sendo relevantes nos processos neurodegenerativos e na regeneração axonal (WANG et al., 2012). Cataldi, et al. (2016) demonstraram que o MPTP (precursor do MPP<sup>+</sup>) reduziu o comprimento e a espessura de neurofilamentos de alto peso molecular (200-220 kDa) no mesencéfalo de camundongos. O MPP<sup>+</sup> também inibiu o desenvolvimento do NF-200 em nosso estudo. Ainda, a doxíciclina, que por si só é capaz de aumentar a expressão dessa estrutura nas células PC12, também é capaz de contrapor a ação prejudicial do MPP<sup>+</sup>.

Os neurônios utilizam a glicose como principal fonte de energia para a sua grande demanda energética e a captação de glicose nestas células é feita por transportadores GLUT 3 (POWERS et al., 2017). Assim como os neurônios, as células PC12 possuem a maior fração do transportador GLUT 3 na membrana plasmática e outra parte é encontrada em vesículas intracelulares (THOUIDIS et al., 1999). Neste estudo verificamos que a doxíciclina não altera a captação de glicose em células PC12. O MPP<sup>+</sup> reduziu a captação de glicose pelas células PC12, o que pode interferir no metabolismo e prejudicar as atividades normais da célula, porém a doxíciclina não apresentou efeito protetor com relação a esse efeito.

No presente estudo, também foi investigado o efeito da doxíciclina na expressão de proteínas relacionadas à bioenergética celular, pois a diferenciação neuronal é um processo que depende de uma alta disponibilidade de energia. Em nossas análises, a doxíciclina não alterou a expressão de SIRT1, AMPK  $\alpha$  ou fosfo-AMPK  $\alpha$ , enquanto o NGF induziu apenas a SIRT1. Essa observação está em linha com outros achados de nosso estudo que indicam que a doxíciclina não influenciou na captação de glicose, particularmente o AMPK que estimula a captação celular de glicose ao induzir a translocação dos transportadores GLUT para a membrana plasmática, além de mobilizar a glicose armazenada sob a forma de glicogênio (CURRY et al., 2018). O estímulo causado pelo NGF através do receptor trkA na expressão de SIRT1 já foi demonstrado em hepatócitos (TSAI et al., 2018). Em

células PC12-615, que tem a expressão aumentada de trkA e consequente aceleração da diferenciação celular induzida pelo NGF, também não foi observada alteração na expressão de AMPK após o tratamento com NGF. No entanto, a diferenciação estimulada pela neurotrofina causou um aumento na expressão de fosfo-AMPK  $\alpha$  (MARTORANA et al., 2018). Em nosso estudo, não observamos indução de fosfo-AMPK  $\alpha$  pelo NGF. Talvez isso se deva ao fato de que esse aumento seja transitório e em nossa avaliação de 72 horas esse aumento já tivesse ocorrido e os valores normais tivessem sido restabelecidos. De fato, quando as células completam a diferenciação, os níveis de ATP são restaurados e as células retornam à sua homeostase energética, não sendo mais necessária a ativação (fosforilação) do AMPK (MARTORANA et al., 2018).

Alguns estudos sugerem que aumentar a atividade de AMPK seria uma estratégia viável para estimular o metabolismo energético celular ou reverter falhas em neurônios vulneráveis, como por exemplo, as populações neuronais da substância *nigra* acometidas pela degeneração na DP. Entretanto, há diversos estudos contraditórios sobre sua ação na formação de neuritos ou como mecanismo de neuroproteção. Ativadores farmacológicos de AMPK, como metformina e resveratrol, possuem efeitos neuroprotetores, mas estudos indicam que essas drogas também podem induzir efeitos neuroprotetores por outras vias, independentes da ativação da AMPK (KIM et al., 2016; CURRY et al., 2018). Variáveis como tipo celular, múltiplas isoformas das subunidades que compõem o AMPK, status bioenergético, estressores celulares ou intensidade de ativação são fatores relevantes e que provavelmente contribuem para as evidências conflitantes (CURRY et al., 2018; BENNISON et al., 2020). No caso da doxiciclina, não há relatos anteriores à respeito do seu efeito na expressão de AMPK  $\alpha$  ou SIRT1. Baseado no que foi discutido anteriormente, é possível que o antibiótico possa causar indução da AMPK anterior ao período de 72 horas avaliado ou, ainda, que a ação neurotrófica da doxiciclina seja independente da modulação dessas proteínas. Assim, este estudo sugere que o efeito neuroprotetor da doxiciclina independe da modulação da bioenergética celular.

Apesar de não ter protegido contra a regulação negativa de todas as proteínas avaliadas, a doxiciclina protegeu contra a diminuição da neuritogênese nas células tratadas com MPP<sup>+</sup>. Similarmente, a minociclina aumentou a plasticidade sináptica e sinaptogênese no hipocampo de camundongos idosos, revertendo a

redução da proteína pós-sináptica PSD-95, sem, contudo, causar alterações na expressão de sinaptofisina (JIANG et al., 2015). Em conjunto, essas observações indicam que nem todas as proteínas associadas à neuroplasticidade axonal precisam ter regulação positiva para a efetividade da neuroproteção.

## 6. CONCLUSÃO

A doxiciclina induz o processo de neuritogênese por mecanismo envolvendo a ativação do receptor *trkA* e das vias de sinalização neurotrófica PI3K/Akt e MAPK/ERK, acompanhada pela regulação positiva de proteínas relacionadas à plasticidade axonal e sináptica (sinapsina I, GAP-43 e NF-200). A atividade neurotrófica da doxiciclina protege as células PC12 expostas à neurotoxina MPP<sup>+</sup>, promovendo a modulação de proteínas axonais (GAP-43, NF-200) e do citoesqueleto ( $\beta$ III-tubulina).

Nossos achados demonstram o dano axonal induzido pelo MPP<sup>+</sup> e corroboram a importância da regeneração axonal como estratégia terapêutica para doenças neurodegenerativas. O efeito neurotrófico e neuroprotetor sugere que a doxiciclina é uma alternativa para retardar processos neurodegenerativos ou promover a regeneração axonal, mas estudos adicionais são necessários para comprovar esse potencial.

## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com a intenção de aperfeiçoar e complementar os resultados deste estudo, pesquisas futuras podem abordar:

- A ação da doxiciclina em proteínas relacionadas à sobrevivência e diferenciação neuronal, além das que foram investigadas neste estudo. O foco no papel de proteínas quinases, como PKC, mTor e Rho kinase, na neuritogênese induzida pela doxiciclina permitiria a compreensão mais detalhada da sua atividade e pode contribuir com a descoberta de novos alvos para promover a regeneração axonal.
- Análises moleculares através de métodos computacionais (por exemplo, *Molecular Docking*) para descrever a forma de interação entre receptores de membrana, como o trkA, e a doxiciclina.
- O potencial neurotrófico da doxiciclina como um dos mecanismos de proteção para diferentes modelos de doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer.

## 8. REFERÊNCIAS

ABDUL MUNEEER, P. M. et al. Ethanol impairs glucose uptake by human astrocytes and neurons: protective effects of acetyl-L-carnitine. **Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol**, v. 3, n. 1, p. 48-56, 2011.

ABOU-DONIA, M. B. The cytoskeleton as a target for organophosphorus ester-induced delayed neurotoxicity (OPIDN). **Chem Biol Interact**, v. 87, n. 1-3, p. 383-93, 1993.

ABOU-DONIA, M. B.; LAPADULA, D. M.; SUWITA, E. Cytoskeleton proteins as targets for organophosphorus compound and aliphatic hexacarbon-induced neurotoxicity. **Toxicology**, v. 49, n. 2-3, p. 469-77, 1988.

AGWUH, K. N.; MacGOWAN, A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines. **J Antimicrob Chemoter**, v. 58, n. 2, p. 256-265, 2006.

ALETTA, J. M. Phosphorylation of type III  $\beta$ -tubulin in PC12 cell neuritis during NGF-induced process outgrowth. **Developmental Neurobiology**, v. 31, n. 4, p. 461-75, 1996.

ARAKI, T.; SASAKI, Y.; MILBRANDT, J. Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. **Science**, v. 305, n. 5686, p. 1010-3, 2004.

ARIMURA, N.; KAIBUCHI, K. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, p. 194-205, 2007.

BENNISON, S. A. et al. Protein kinases: master regulators of neuritogenesis and therapeutic targets for axon regeneration. **Cell Mol Life Sci**, v. 77, n. 8, p. 1511-30, 2020.

BENOWITZ, L. I.; ROUTTENBERG, A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. **Trends Neurosci**, v. 20, n. 2, p. 84-91, 1997.

BERNARDES, C. P. et al. A synthetic snake-venom-based tripeptide (Glu-Val-Trp) protects PC12 cells from MPP<sup>+</sup> toxicity by activating the NGF-signaling pathway. **Peptides**, v. 104, p. 24-34, 2018.

BORTOLANZA, M. et al. Tetracycline repurposing in neurodegeneration: focus on Parkinson's disease. **J Neural Transm**, v. 125, p. 1403-15, 2018.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, 1976.

BURKE, R. E.; O'MALLEY, K. Axon degeneration in Parkinson's disease. **Exp Neurol**, v. 246, p. 72-83, 2013.

CALABRASE, E. J. Enhancing and regulating neurite outgrowth. **Crit Rev Toxicol**, v. 38, n.4, p. 391-418, 2008.

CAMINITI, S. P. et al. Axonal damage and loss of connectivity in nigrostriatal and mesolimbic dopamine pathways in early Parkinson's disease. **Neuroimage Clin**, v. 14, p. 734-40, 2017.

CAPPELLETTI, G.; SURREY, T.; MACI, R. The parkinsonism producing neurotoxin MPP<sup>+</sup> affects microtubule dynamics by acting as a destabilizing factor. **FEBS Letters**, v. 579, p. 4781-86, 2005.

CARGNELLO, M.; ROUX, P. P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 75, n. 1, p. 50-83, 2011.

CATALDI, S. et al. e-Cadherin in 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson Disease. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, article ID 3937057, 2016.

CETRULLO, S. et al. mTOR, AMPK, and SIRT1: key players in metabolic stress management. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, v. 25, n. 1, p. 59-75, 2015.

CHO, Y. et al. Doxycycline is neuroprotective against nigral dopaminergic degeneration by a dual mechanism involving MMP-3. **Neurotox Res**, v. 2016, p. 361-71, 2009.

COSTA, R. et al. Testing the therapeutic potential of doxycycline in a *Drosophila melanogaster* model of Alzheimer disease. **J Bio Chem**, v. 286, n. 48, p. 41647-55, 2011.

CUNHA, B. A.; COMER, J. B.; JONAS, M. The tetracyclines. **Med Clin North Am**, v. 66, n. 1, p. 293-302, 1982.

CUNHA, C. et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) overexpression in the forebrain results in learning and memory impairments. **Neurobiol Dis**, v. 33, n. 3, p. 358-368, 2009.

CURRY, D. W. et al. Targeting AMPK signaling as a neuroprotective strategy in Parkinson's disease. **J Parkinsons Dis**, v. 8, n. 2, p. 161-81, 2018.

DANI, J. W.; ARMSTRONG, D. M.; BENOWITZ, L. I. Mapping the development of the rat brain by GAP-43 immunocytochemistry. **Neuroscience**, v. 40, n. 1, p. 277-87, 1991.

DAS, K. P.; FREUDENRICH, T. M.; MUNDY, W. R. Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures. **Neurotoxicol Teratol**, v. 26, n. 3, p. 397-406, 2004.

DEL REY, N. L.-G. et al. Advances in Parkinson's disease: 200 years later. **Front Neuroanat**, v. 12, n. 113, 2018.

DEL ROSSO, J. Q. Oral doxycycline in the management of acne vulgaris: current perspectives on clinical use and recent findings with a new double-scored small tablet formulation. **J Cli Aesthet Dermatol**, v. 8, n. 5, p. 19-26, 2015.

DIENEL, G. A. Fueling and imaging brain activation. **ASN Neuro**, v. 4, n. 5, e00093, 2012.

DUGGAR, B. M. Aureomycin: a product of the continuing search for new antibiotics. **Ann N Y Acad Sci**, v. 51, p. 177-181, 1948.

ENCINAS, M. et al. Extracellular-regulated kinases and phosphatidylinositol 3-kinase are involved in brain-derived neurotrophic factor-mediated survival and neuritogenesis of the neuroblastoma cell line SH-SY5Y. **J Neurochem**, v. 73, p. 1409-21, 1999.

FERREIRA, R. S. et al. **Neuropatia sensorial periférica induzida pela cisplatina: estudo dos mecanismos de neurotoxicidade da cisplatina e do efeito protetor do éster fenetil do ácido cafeico (CAPE) em células PC12.** 2018. 134 p. Tese

(Doutorado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

FILBIN, M. T. Axon regeneration: Vaccinating against spinal cord injury. **Curr Biol**, v. 10, n. 3, p. R100-103, 2000.

FUKUDA, Y. et al. Neurotrophin promotes NGF signaling through interaction of GM1 ganglioside with Trk neurotrophin receptor in PC12 cells. **Brain Res**, v. 1596, p. 13-21, 2015.

GARCIA, D.; SHAW, R. J. AMPK: mechanisms of cellular energy sensing and restoration of metabolic balance. **Mol Cell**, v. 66, n. 6, p. 780-800, 2017.

GARRETT, E. A. Biology of Parkinson's disease: pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 6, n. 3, p. 259-80, 2004.

GIRGENRATH, M. et al. Pathology is alleviated by doxycycline in a laminin-alpha2-null model of congenital muscular dystrophy. **Ann Neurol**, v. 65, n. 1, p. 47-56, 2009.

GONZALEZ-LIZARRAGA, F. et al. Repurposing doxycycline for synucleinopathies: remodeling of alpha-synuclein oligomers towards non-toxic parallel beta-sheet structured species. **Sci Rep**, v. 7, p. 41755, 2017.

GRAU, C. M.; GREENE, L. A. Use of PC12 cells and rat superior cervical ganglion sympathetic neurons as models for neuroprotective assays relevant to Parkinson's disease. **Methods Mol Biol**, v. 846, p. 201-11, 2012.

GREENE, L. A.; TISCHLER, A. S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 73, n. 7, p. 2424-8, 1976.

GUO, W. et al. Sirt1 overexpression in neurons promotes neurite outgrowth and cell survival through inhibition of the mTOR signaling. **J Neurosci Res**, v. 89, n. 11, p. 1723-36, 2011.

HAGG, T. From neurotransmitters to neurotrophic factors to neurogenesis. **Neuroscientist**, v. 15, n. 1, 20-7, 2009.

HANSEN, M. B.; NIELSEN, S. E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **J Immunol Methods**, v. 119, n. 2, p. 203-10, 1989.

HOLAHAN, M. R. A shift from a pivotal to supporting role for the growth-associated Protein (GAP-43) in the coordination of axonal structural and functional plasticity. **Front Cell Neurosci**, v. 11, 2017.

HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 677-736, 2001.

\_\_\_\_\_. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. **Annu Rev Biochem**, v. 72, p. 609-42, 2003.

JIANG, Y. et al. Minocycline enhances hippocampal memory, neuroplasticity and synapse-associated proteins in aged C57 BL/6 mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 121, p. 20-9, 2015.

JOVANOVIC, J. N. et al. Neurotrophins stimulate phosphorylation of synapsin I by MAP kinase and regulate synapsin I-actin interactions. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 93, n. 8, p. 3679-83, 1996.

KANAAN, N. M. et al. Axonal degeneration in Alzheimer's disease: When signaling abnormalities meet the axonal transport system. **Exp Neurol**, v. 246, p. 44-53, 2013.

KAPLAN, D. R.; STEPHENS, R. M. Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor. **J. Neurobiol**, v. 25, n. 11, p. 1404-17, 1994.

KEVENAAR, J. T.; HOOGENRAAD, C. C. The axonal cytoskeleton: from organization to function. **Front Mol Neurosci**, v. 8, n. 44, 2015.

KIM, J. et al. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. **Exp Mol Med**, v. 48, n. 4, p. e224, 2016.

KIM, M. S. et al. Nerve Growth Factor (NGF) regulates activity of Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT) in neurons via the Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt-Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) pathway. **J Biol Chem**, v. 289, n. 45, p. 31349-60, 2014.

KIRYUSHKO, D.; BEREZIN, V.; BOCK, E. Regulators of neurite outgrowth: role of cell adhesion molecules. **Ann NY Acad Sci**, v. 1014, p. 140-54, 2004.

KOBAYASHI, M. et al. Expression of a constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase induces process formation in rat PC12 cells. Use of Cre/loxP recombination system. **J Biol Chem**, v. 272, n. 26, p.16089-92, 1997.

KOUNAKIS, K.; TAVERNARAKIS, N. The cytoskeleton as a modulator of aging and neurodegeneration. In: GUEST, P. C (ed.). **Reviews on biomarker studies in aging and anti-aging research**, Advances in experimental medicine and biology. Springer Nature, 2019. Chapter 12.

KUMMER, A.; TEIXEIRA, A. L. Neuropsychiatry of Parkinson's disease. **Neuro-Psiquiatr**, v. 67, n. 3b, 2009.

KURUVILLA, R.; YE, H.; GINTY, D. D. Spatially and functionally distinct roles of the PI3-K effector pathway during NGF- signaling in sympathetic neurons. **Neuron**, v. 27, n. 3, p. 499-512, 2000.

L'EPISCOPO, F. et al. A Wnt1 regulated Frizzled-1/beta-Catenin signaling pathway as a candidate regulatory circuit controlling mesencephalic dopaminergic neuron-astrocyte crosstalk: Therapeutical relevance for neuron survival and neuroprotection. **Mol Neurodegener**, v. 6, p. 49, 2011.

LANGSTON, J. W. The MPTP story. **J Parkinsons Dis**, v. 7, s11-s19, 2017.

LAZZARINI, M. et al. Doxycycline restrains glia and confers neuroprotection in a 6-OHDA Parkinson model. **Glia**, v. 61, n. 7, p. 1084-100, 2013.

LI, X. Sirt1 and energy metabolism. **Acta Biochim Biophys Sin**, v. 45, n.1, p. 51-60, 2013.

LIN, M. T.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 787-95, 2006.

LONGO, F. M.; MASSA, S. M. Small-molecule modulation of neurotrophin receptors: a strategy for the treatment of neurological disease. **Nat Rev Drug Discov**, v. 12, n. 7, p. 507-25, 2013.

LU, Y. et al. Protective effect of minocycline against ketamine-induced injury in Neural Stem Cell: Involvement of PI3K/Akt and Gsk-3 beta pathway. **Front Mol Neurosci**, v. 9, art. 135, 2016.

LUO, J.; MILLER, M. W. Growth factor-mediated neural proliferation: target of ethanol toxicity. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 27, n. 2, p. 157-67, 1998.

MARTORANA, F. et al. Differentiation by nerve growth factor (NGF) involves mechanisms of crosstalk between energy homeostasis and mitochondrial remodeling. **Cell Death Dis**, v. 9, n. 3, 2018.

MATTSON, M. P. Hormesis defined. **Ageing Res Rev**, v. 7, n. 1, 2008.

MCALLISTER, A. K. Neurotrophins and neuronal differentiation in the central nervous system. **Cell Mol Life Sci**, v. 58, n. 8, p. 1054-60, 2001.

MIRZA, F. J.; ZAHID, S. The role of synapsins in neurological disorders. **Neurosci Bull**, v. 34, n. 2, p. 349-358, 2018.

MITCHELL, P. J. et al. A quantitative method for analysis of *in vitro* neurite outgrowth. **J Neurosci Methods**, v. 164, n. 2, 350-62, 2007.

MORFINI, G. et al. 1-Methyl-4-phenylpyridinium affects fast axonal transport by activation of caspase and protein kinase C. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, n. 7, p. 2442-7, 2007.

MUECKLER, M. Facilitative glucose transporters. **Eur J Biochem**, v. 219, p. 713-725, 1994.

NAMIKAWA, K. et al. Akt/protein kinase B prevents injury-induced motoneuron death and accelerates axonal regeneration. **J Neurosci**, v. 20, n. 8, p. 2875-86, 2000.

NAU, R.; SÖRGEL, F.; EIFFERT, H. Penetration of drugs through the blood-cerebrospinal fluid/blood-brain barrier for treatment of central nervous system infections. **Clin Microbiol Rev**, v. 23, n. 4, p. 858-83, 2010.

NELSON, M. L. Chemical and biological dynamics of tetracyclines. **Adv Dent Res**, v. 12, p. 5-11, 1998.

O'KEEFFE, G. W.; SULLIVAN, A. M. Evidence for dopaminergic axonal degeneration as an early pathological process in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 56, p. 9-15, 2018.

OMS. Lista Modelo de Medicamentos Essenciais, ed. 20, 2017.

ORSUCCI, D. et al. Tetracyclines and neuromuscular disorders. **Curr Neuropharmacol**, v. 10, n. 2, p. 134-8, 2012.

PALDINO, E. Neuroprotective effects of doxycycline in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. **Mol Neurobiol**, v. 57, n. 4, p.1889-1903, 2020.

PAPAPETROPOULOS, A.; SZABO, C. Inventing new therapies without reinventing the wheel: the power of drug repurposing. **Br J Pharmacol**, v. 175, n. 2, p. 165-7, 2018.

PERROT, R. et al. Review of the multiple aspects of neurofilament functions, and their possible contribution to neurodegeneration. **Mol Neurobiol**, v. 38, n. 1, p. 27-65, 2008.

PHAN, C. W. et al. *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr) Pers. cultivated under tropical conditions: isolation of hericenones and demonstration of NGF-mediated neurite outgrowth in PC12 cells via MEK/ERK and PI3K-Akt signaling pathways. **Food Funct**, v. 5, n. 12, p. 3160-9, 2014.

PICCONI, B.; PICCOLI, G.; CALABRESI, P. Synaptic dysfunction in Parkinson's disease. **Adv Exp Med Biol**, v. 970, p. 553-71, 2012.

POWERS, R. et al. Metabolic investigation of the molecular mechanisms associated with Parkinson's disease. **Metabolites**, v. 7, n. 2, p. 22, 2017.

RASBAND, W. S. Image J, **U. S. National Institutes of Health**, Bethesda, Maryland, USA. 1997-2004. <http://imagej.nih.gov/ij/>.

RAVNI, A. et al. The neurotrophic effects of PACAP in PC12 cells: control by multiple transduction pathways. **J Neurochem**, v. 98, n. 2, p. 321-9, 2006.

REGLODI, D. et al. Novel tactics for neuroprotection in Parkinson's disease: role of antibiotics, polyphenols and neuropeptides. **Prog Neurobiol**, v. 155, p. 120-48, 2017.

ROSOFF, W. F. et al. A new chemotaxis assays shows the extreme sensitivity of axons to molecular gradients. **Nat Neurosci**, v. 7, n. 6, p. 678-82, 2004.

SAINATH, R.; GALLO, G. Cytoskeletal and signaling mechanisms of neurite formation. **Cell Tissue Res**, v. 359, n. 1, p. 267-78, 2015.

SALVADORES, N. et al. Axonal degeneration during aging and its functional role in neurodegenerative disorders. **Front Neurosci**, v. 11, p. 451, 2017.

SANTOS, N. A. G. et al. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects PC12 cells from MPP<sup>+</sup> toxicity by inducing the expression of neuron-typical proteins. **Neurotoxicology**, v. 45, p. 131-8, 2014.

SAPADIN, A. N.; FLEISCHMAJER, R. Tetracyclines: Nonantibiotic properties and their clinical implications. **J Am Acad Dermatol**, v. 54, p. 258-265, 2006.

SCHIMMELPFENG, J.; WEIBEZAHN, K. F.; DERTINGER, H. Quantification of NGF-dependent neuronal differentiation of PC12 cells by means of neurofilament-L mRNA expression and neuronal outgrowth. **J Neurosci Methods**, v. 139, n. 2, p. 299-306, 2004.

SEOW, L. S. et al. Potentiation of neuritogenic activity of medicinal mushrooms in rat pheochromocytoma cells. **BMC Complement Altern Med**, v. 13, p. 157, 2013.

SERULLE, Y. et al. 1-Methyl-4-phenylpyridinium induces synaptic dysfunction through a pathway involving caspase and PKC enzymatic activities. **PNAS**, v. 104, n. 7, p. 2437-41, 2007.

SHEA, T. B. et al. Phospholipid-mediated delivery of anti-GAP-43 antibodies into neuroblastoma cells prevents neuritogenesis. **J Neurosci**, v. 11, n. 6, p. 1685-90, 1991.

SINGH, P.; HANSON, P. S.; MORRIS, C. M. SIRT1 ameliorates oxidative stress induced neural cell death and is down-regulated in Parkinson's disease. **BMC Neurosci**, v. 18, n. 46, 2017.

SMITH, K.; LEYDEN, J. J. Safety of doxycycline and minocycline: a systematic review. **Clin Ther**, v. 27, n. 9, p. 1329-42, 2005.

SOFRONIEW, M. V.; HOWE, C. L.; MOBLEY, W. C. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 1217-81, 2001.

SON, J. H. et al. Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. **Exp Mol Med**, v. 44, n. 2, p. 89-98, 2012.

SONG, S. H.; AUGUSTINE, G. J. Synapsin isoforms and synaptic vesicle trafficking. **Molecules and Cells**, v. 38, p. 936-40, 2015.

SPASIĆ, M. R.; CALLAERTS, P.; NORGA, K. K. AMP-activated protein kinase (AMPK) molecular crossroad for metabolic control and survival of neurons. **Neuroscientist**, v. 15, n. 4, p. 309-16, 2009.

SPILLANTINI, M. G. et al. Alpha-synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. **Proc Natl Acad Sci**, v. 95, p. 6469-73, 1998.

STORCH, A.; LUDOLPH, A. C.; SCHWARZ, J. Dopamine transporter: involvement in selective dopaminergic neurotoxicity and degeneration. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 111, n. 10-11, p. 1267-86, 2004.

TAGLIAFERRO, P.; BURKE, R. E. Retrograde axonal degeneration in Parkinson Disease. **J Parkinson's Disease**, v. 6, p. 1-15, 2016.

TAO, T. et al. Minocycline promotes neurite outgrowth of PC12 cells exposed to oxygen-glucose deprivation and reoxygenation through regulation of MLCP/MLC signaling pathways. **Cell Mol Neurobiol**, v. 37, p. 417-26, 2017.

TENG, K. K. et al. Cultured for neuronal PC12 cells: a model function, differentiation and survival. In: CELIS, J. E. **Cell Biology**, a Laboratory Handbook. 3 ed. Academic Press, 2006. Chapter 21, p. 171-176.

TERRY, R. D. Cell death or synaptic loss in Alzheimer disease. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 59, n. 12, p. 1118-9, 2000.

THOUIDIS, G. et al. Glucose transporter Glut3 is targeted to secretory vesicles in neurons and PC12 cells. **J Biol Chem**, v. 274, n. 20, p. 14062-6, 1999.

TOHDA, C.; KUBOYAMA T.; KOMATSU, K. Search for natural products related to regeneration of the neuronal network. **Neurosignals**, v. 14, n. 1-2, p. 34-45, 2005.

TSAI, M. S. et al. Nerve growth factor upregulates sirtuin 1 expression in cholestasis: a potential therapeutic target. **Exp Mol Med**, v. 50, n.1, 2018.

VALTORTA, F. et al. Synaptophysin and synapsin I as tools for the study of the exo-endocytotic cycle. **Cell Biol Int Rep**, v. 13, p. 1023-38, 1989.

WANG, H. et al. Neurofilament proteins in axonal regeneration and neurodegenerative diseases. **Neural Regen Res**, v. 7, n. 8, p. 620-626, 2012.

WEIL, R. S. et al. Current concepts and controversies in the pathogenesis of Parkinson's disease dementia and Dementia with Lewy bodies. **F1000Res**, v. 6, 2017.

XIAO, J.; LIU, Y. Differential roles of ERK and JNK in early and late stages of neurogenesis: a study in a novel PC12 model system. **J Neurochem**, v. 86, p. 1516-23, 2003.

XU, S. L. et al. Isorhamnetin, a flavonol aglycone from *Ginkgo biloba L.*, induces neuronal differentiation of cultured PC12 cells: Potentiating the effect of Nerve Growth Factor. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, article ID 278273, 2012.

YAO, J. S. et al. Comparison of doxycycline and minocycline in the inhibition of VEGF-induced smooth muscle cell migration. **Neurochem Int**, v. 50, n. 3, p. 524-30, 2007.

YIM, C. W.; FLYNN, N. M.; FITZGERALD, F. T. Penetration of oral doxycycline into the cerebrospinal fluid of patients with latent or neurosyphilis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 28, n. 2, p. 347-8, 1985.

YU, R. et al. Doxycycline exerted neuroprotective activity by enhancing the activation of neuropeptide GPCR PAC1. **Neuropharmacology**, v. 103, p. 1-15, 2016.

ZHANG, G. B. et al. A study on the protective role of doxycycline upon dopaminergic neuron of LPS-PD rat model rat. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 19, n. 18, p. 3468-74, 2015.

ZHANG, W. et al. Effects of neural stem cells on synaptic proteins and memory in a mouse model of Alzheimer's disease. **J Neurosci Res**, v. 92, n. 2, p. 185-94, 2014.