

**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

## 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 tetraciclinas 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.

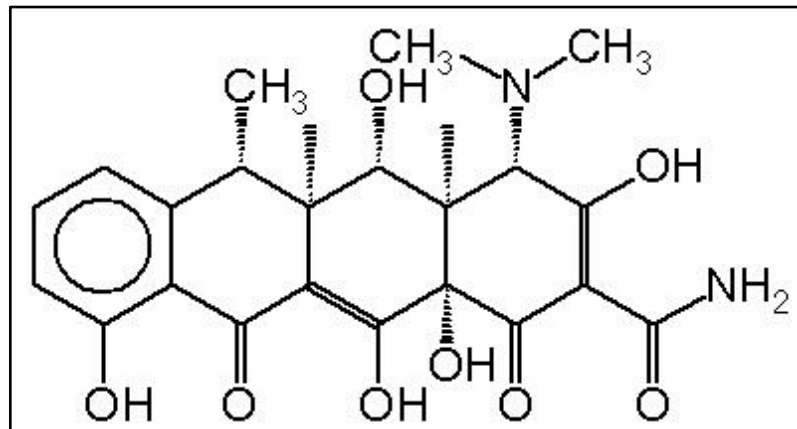
## 1. INTRODUÇÃO

### 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 sobrevida 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 doxíciclina – 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 doxíciclina 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 doxíciclina 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.

## 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.