

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – UNISO

***TRABALHO COMPLETO CONTENDO ARTIGOS CIENTÍFICOS. AGUARDANDO A PUBLICAÇÃO DOS RESULTADOS**

Introdução: A doxiciclina tornou-se uma promessa ao redirecionamento do fármaco para doenças neurodegenerativas crônicas, em virtude de sua elevada lipossolubilidade e efeito protetor. Dentre essas doenças, inclui-se a doença de Parkinson (DP), que resulta de complexas interações patológicas e não patológicas afetando a qualidade de vida. Objetivos: Frente ao envolvimento neuromotor na clínica da DP e tendo em vista a proposta de redirecionamento, os objetivos deste projeto foram avaliar os efeitos farmacológicos da doxiciclina em preparações neuromusculares, avaliar a segurança através do ensaio de mutagenicidade (*Salmonella*/microssoma) e realizar um estudo em ratos saudáveis para avaliar o impacto do uso crônico. Métodos: Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA/Uniso 114/2017). A avaliação do mecanismo neuromotor da doxiciclina foi realizada em preparação nervo frênico-diafragma de camundongos através de técnica miográfica convencional e utilizando-se polietilenoglicol 400 (PEG 400) (20 µL/mL), d-tubocurarina (d-TC) (4 µg/mL), atropina (2 µg/mL), neostigmina (1 µg/mL), fração FM 55-6 da *Casearia sylvestris* (0,2 mg/mL) e cálcio (1 mg/mL). O ensaio da mutagenicidade pelo teste de Ames foi realizado utilizando-se cepas TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium* na concentração inicial de 3,125 µg da doxiciclina. Conhecida a toxicidade preliminar da doxiciclina foram realizados os ensaios com e sem ativação metabólica (S9), em triplicata e comparados com mutágenos validados (controles positivos) e água (controle negativo). Atribuiu-se mutagenicidade a valores com índice $\geq 2,0$. No estudo crônico, ratos machos saudáveis receberam doxiciclina (10 mg/kg/dia), via gavagem, durante três meses. Findo o período, as amostras coletadas destinaram-se às dosagens de marcadores do estresse oxidativo (sangue e cérebro); dosagem da dopamina e metabólitos (cérebro) e avaliação neuromotora (preparação nervo frênico-diafragma de ratos). Resultados: A concentração de 2 mg/mL de doxiciclina foi selecionada para os ensaios na junção neuromuscular com os mencionados compostos. Nesta concentração, a doxiciclina apresentou efeito bloqueador que se reverteu após a lavagem da preparação. Tal bloqueio neuromuscular foi impedido pelo excesso de cálcio e pela fração FM 55-6, além de agir inversamente ao PEG 400. A doxiciclina não apresentou mutagenicidade mostrando não ter ação direta nem indireta para promover mutação reversa às linhagens estudadas. Resultante do

estudo crônico, não houve diferença significativa na *performance* neuromotora nem sobre o neurotransmissor dopamina e seus metabólitos quando comparados entre os grupos controle (salina 0,9%) e experimental. Nos parâmetros do estresse oxidativo houve uma diminuição significativa no grupo exposto à doxiciclina em comparação ao grupo controle nos seguintes biomarcadores GPx (sangue), GSH (cérebro) e TBARS (cérebro), reforçando o papel da doxiciclina no aumento da atividade antioxidante e na diminuição da peroxidação de lipídios. Conclusão: A doxiciclina *in situ* age sobre os canais de sódio neuronais e membrana do sarcolema; não é mutagênica; não compromete a *performance* neuromotora quando utilizada cronicamente preservando os níveis de dopamina e seus metabólitos, e o efeito antioxidante demonstrado reforça sua ação neuro protetora. Os resultados aqui obtidos não contraindicam o seu redirecionamento principalmente à DP.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. Doxiciclina. Estudo crônico. Estresse oxidativo. HPLC. Junção neuromuscular. Teste de Ames.

ABSTRACT

Background: Doxycycline has become a promise for repurposing the drug to chronic neurodegenerative diseases, due to its high liposolubility and protective effect. Among these diseases, Parkinson's disease (PD) is included, which results from complex pathological and non-pathological interactions affecting the quality of life. **Objectives:** Given the neuromotor involvement in the PD clinic and because of the redirection proposal, the objectives of this project were to evaluate the pharmacological effects of doxycycline in neuromuscular preparations, to evaluate safety through the mutagenicity test (*Salmonella*/microsome) and to carry out a study in healthy rats to assess the impact of chronic use. **Methods:** This study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA/Uniso 114/2017). The assessment of the doxycycline neuromotor mechanism was performed in the preparation of the phrenic nerve-diaphragm of mice using a conventional myographic technique and using polyethylene glycol 400 (PEG 400, 20 μ L/mL), d-tubocurarine (d-TC, 4 μ g/mL), atropine (2 μ g/mL), neostigmine (1 μ g/mL), fraction FM 55-6 of *Casearia sylvestris* (0.2 mg/mL) and calcium (1 mg/mL). The Ames test mutagenicity test was performed using strains TA97a, TA98, TA100 and TA102 of *Salmonella typhimurium* at the initial concentration of 3,125 μ g of doxycycline. Knowing the preliminary toxicity of doxycycline, the tests were performed with and without metabolic activation (S9), in triplicate and compared with validated mutagens (positive controls) and water (negative control). Mutagenicity is attributed to values with an index \geq 2.0. In the chronic study, healthy male rats received doxycycline (10 mg/kg/day), via gavage, for three months. At the end of the period, as collected, they were used to measure oxidative stress markers (blood and brain); dosage of dopamine and metabolites (brain) and neuromotor evaluation (phrenic nerve-diaphragm preparation of rats). **Results:** The concentration of 2 mg/mL of doxycycline was defined for the tests at the neuromuscular junction with the compounds. In this concentration, doxycycline showing a blocking effect that was reversed after washing the preparation. Such neuromuscular block was prevented by excess calcium and by the FM 55-6 fraction, in addition to acting inversely to PEG 400. Doxycycline did not present mutagenicity, showing no direct or indirect action to promote reverse mutation in the studied strains. As a result of the chronic study, there was no significant difference in neuromotor

performance or in the neurotransmitter dopamine and its metabolites when compared between the control (0.9% saline) and experimental groups. In the parameters of oxidative stress, there was a reduction in the group exposed to doxycycline compared to the control group in the following biomarkers GPx (blood), GSH and TBARS (brain tissue), reinforcing the role of doxycycline in increasing the antioxidant activity and decreasing the peroxidation of lipids. Conclusion: Doxycycline in situ acts on the neuronal sodium channels and the sarcolemma membrane; it is not mutagenic; it does not compromise neuromotor performance when used chronically, preserving the levels of dopamine and its metabolites, and the antioxidant effect reinforces its neuroprotective action. The results obtained here are not a contraindication to their repurposing, mainly to PD.

Keywords: Parkinson's disease. Doxycycline. Chronic study. Oxidative stress. HPLC. Neuromuscular junction. Ames test.