

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FISIOLOGIA

Rafaela Zimmermann

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE  
NANOCÁPSULAS CONTENDO NICOTINA, NORNICOTINA,  
ANATABINA E ANABASINA PARA O TRATAMENTO  
DE LESÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

Porto Alegre

2024

Rafaela Zimmermann

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE  
NANOCÁPSULAS CONTENDO NICOTINA, NORNICOTINA,  
ANATABINA E ANABASINA PARA O TRATAMENTO  
DE LESÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pranke  
Coorientadora: Profa. Dra. Laura Elena Sperling  
Coorientadora: Profa. Dra. Daikelly Braghirolli

Porto Alegre

2024

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 17.07.2024, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Elizandra Braganhol

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA

Profa. Dra. Renata Vidor Contri

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Prof. Dr. Luciano Stürmer de Fraga

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

#### CIP - Catalogação na Publicação

Zimmermann, Rafaela  
Desenvolvimento, caracterização e avaliação de nanocápsulas contendo nicotina, nornicotina, anatabina e anabasina para o tratamento de lesões do sistema nervoso central / Rafaela Zimmermann. -- 2024.

129 f.

Orientador: Patricia Pranke.

Coorientadores: Laura Elena Sperling, Daikelly Braghirolli.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. nanocápsulas. 2. nicotina. 3. nornicotina. 4. anatabina. 5. anabasina. I. Pranke, Patricia, orient. II. Sperling, Laura Elena, coorient. III. Braghirolli, Daikelly, coorient. IV. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, primeiramente, por todo o Seu amor e amparo nos momentos difíceis e por sempre iluminar o meu caminho.

À minha mãe, Madalena, por todo o esforço, amor e carinho dedicados a mim e aos meus irmãos. Pelo incentivo constante e por fazer o possível para que tivéssemos uma boa educação.

Ao meu amor, Tiago, pelo incentivo, companheirismo e paciência. Obrigada por me apoiar sempre!

À minha filha Isabella por tornar minha vida mais feliz. Por me permitir sentir o maior amor do mundo. Por iluminar meus dias e ressignificar minha existência. Te amo imensamente!

À Professora Dra. Patricia Pranke pela orientação, confiança, apoio, dedicação, amizade e carinho. Pelo exemplo pessoal e profissional de ética e profissionalismo. Muito obrigada!

À Professora Dra. Daikelly Braghirolli pela coorientação, dedicação, conhecimentos compartilhados, amizade e carinho. Pelo apoio e colaboração. Muito obrigada!

À Professora Dra. Laura Sperling pela coorientação, dedicação, ensinamentos, amizade e carinho. Pelo suporte e colaboração. Muito obrigada!

À Raíssa Padilha pela incansável dedicação na realização desse trabalho, o qual não teria sido possível sem seu suporte e apoio. Obrigada pela companhia, amizade e carinho.

À Luiza Wailer pela dedicação e apoio na realização desse trabalho, o qual teria sido bem mais difícil sem sua ajuda. Obrigada pela companhia, amizade e carinho.

À Juliana Girón, pelos ensinamentos, pela companhia nas horas de bancada, pela linda amizade, carinho e apoio nos momentos difíceis.

Ao Luiz por me ajudar com a edição das imagens, pelo carinho, amizade e excelente companhia.

À Malu pela ajuda com a edição final da tese, pelo carinho, amizade e doce companhia.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Células-tronco, por toda a ajuda e pela amizade cotidiana, que resulta em momentos de aprendizado, crescimento e alegria.

À Mariana e Cristiéli da Inventiva, pelo carinho e amizade. Obrigada pela contribuição técnica e intelectual na realização dos ensaios de liberação.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Biológicas: Fisiologia, pela excelência em ensino.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a bolsa de Doutorado.

Às agências de fomento e amparo à pesquisa, pelos financiamentos concedidos.

Ao Instituto de Pesquisa com Células-tronco pelo apoio financeiro, contribuindo com a aprendizagem e formação de profissionais mais capacitados.

À banca avaliadora desta tese, pelo interesse e tempo disponibilizado.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho,

**Muito obrigada!**

## SUMÁRIO

RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	9
LISTA DE FIGURAS .....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Nanotecnologia.....	12
1.2 Nanopartículas poliméricas .....	14
1.3 Poli(ácido láctico-co-glicólico).....	17
1.4 Caracterização de Nanopartículas Poliméricas .....	19
1.4.1 Morfologia .....	19
1.4.2 Distribuição de Tamanho de Partícula.....	19
1.4.3 Potencial Zeta .....	20
1.4.4 Determinação do pH.....	21
1.4.5 Determinação da Eficiência de Encapsulação .....	21
1.4.6 Cinética de liberação in vitro do fármaco.....	22
1.4.7 Estabilidade das Suspensões.....	22
1.4.8 Avaliação da Toxicidade das Nanopartículas.....	23
1.5 Alcalóides.....	24
1.6 Nicotina.....	24
1.7 Nornicotina, anatabina e anabasina.....	29
1.8 Células PC12.....	31
1.9 Doenças do sistema nervoso central.....	31
1.10 Lesão medular .....	32
1.10.1 Fisiopatologia da lesão medular.....	35
1.10.2 Abordagem terapêutica na lesão medular.....	38
2. HIPÓTESE .....	42
3. OBJETIVOS.....	42
3.1 Objetivo geral.....	42
3.2 Objetivos específicos.....	42
4. RESULTADOS .....	43
4.1 Capítulo I.....	44
4.2 Capítulo II .....	58
4.3 Capítulo III.....	69

5. DISCUSSÃO .....	100
6. CONCLUSÕES .....	106
7. PERSPECTIVAS .....	106
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	107
9. ANEXO I: formulações testadas .....	122

## RESUMO

A nanotecnologia é uma área de pesquisa inovadora que se desenvolveu ao longo das últimas duas décadas, explorando escalas nanométricas para o desenvolvimento de materiais, produtos e processos novos para diversas áreas, como medicina, cosméticos, indústria de alimentos e nanomaterias. Recentemente, muitas técnicas baseadas em nanotecnologia foram propostas para aprimorar a regeneração de tecidos. Sobretudo, nanopartículas, por apresentarem propriedades interessantes no campo da medicina regenerativa, como excelente biocompatibilidade e a capacidade de aumentar a biodisponibilidade do ativo. Lesões no sistema nervoso central (SNC) apresentam graves consequências, incluindo disfunções neurológicas, incapacidade e até morte. Traumas nessa região podem desencadear inflamação sistêmica, demandas metabólicas elevadas e déficits físicos, cognitivos e emocionais, resultando em perda de independência funcional e redução na qualidade de vida. Lesões cerebrais e na medula espinal são especialmente impactantes, prejudicando atividades diárias, movimento, raciocínio, com efeitos impactantes na qualidade de vida. Devido à versatilidade da nanotecnologia, que possibilita atuação em diferentes patologias, como lesão na medula espinal, a qual não há tratamento com o potencial para reabilitação, primeiramente foi realizada uma revisão bibliográfica para investigar os recentes avanços em nanotecnologia para o tratamento da lesão medular e reparação tecidual. Foi visto que, embora a nanotecnologia seja promissora para o tratamento da lesão medular, os testes em humanos ainda estão em fase teórica. No segundo momento, foi realizada uma revisão bibliográfica abordando métodos convencionais e novas tecnologias de nanoencapsulação, visando determinar o método mais eficaz para encapsular moléculas, especialmente as hidrofílicas, as quais apresentam um desafio significativo. Foi possível concluir que, os métodos mais utilizados para nanoencapsulação são baseados em processos de emulsificação. Diversos estudos forneceram evidências claras de que a nicotina, um alcaloide que constitui o princípio ativo do tabaco, apresenta poderosos efeitos fisiopatológicos no organismo, através de propriedades anti-inflamatórias e neuroprotetoras. Neste contexto, a nornicotina, anatabina e anabasina, análogos da nicotina, também demonstraram essas atividades em estudos recentes. Avaliando as interessantes propriedades da nicotina e seus análogos, um sistema nanoestruturado provavelmente iria potencializar seus efeitos benéficos bem como reduzir seus efeitos adversos. Na parte experimental desse trabalho, foram produzidas nanocápsulas inovadoras de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) contendo 3mg/mL de nicotina, nornicotina, anatabina ou anabasina, pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado (nanoprecipitação), as quais foram avaliadas quanto ao

tamanho de partícula, índice de polidispersidade (PDI), potencial zeta, pH, porcentagem de eficiência de encapsulamento, morfologia, estabilidade e perfil de liberação. Testes *in vitro* com a linhagem celular PC12 foram realizados, como ensaios MTT, Live/Dead e ELISA, para verificar a citotoxicidade e atividade anti-inflamatória dos nicotínicos. Nesse estudo, foi possível produzir nanocápsulas de PLGA contendo nicotina, nornicotina, anatabina e anabasina, homogêneas e sem a presença de precipitados, com potencial zeta negativo, tamanho submicrométrico e baixo PDI, significando que há homogeneidade na distribuição dos tamanhos das partículas. A eficiência de encapsulação foi de 50,7%, 43,6%, 48,9% e 52,9%, respectivamente, para nicotina, nornicotina, anatabina e anabasina, demonstrando que aproximadamente a metade dos ativos se encontra associada às nanocápsulas. Na avaliação por microscopia eletrônica de transmissão (MET), as nanocápsulas mostraram morfologia esférica, regular e nanométrica, corroborando com os resultados encontrados na análise de tamanho de partícula e PDI. Todas as suspensões se mantiveram estáveis quando estocadas na geladeira, pelo período de 30 dias. Na análise do perfil de liberação, todas as nanocápsulas exibiram liberação inicial rápida, o que é atribuído principalmente ao fármaco ligado ou adsorvido à superfície das nanocápsulas e após, se manteve uma liberação sustentada. Os testes *in vitro* mostraram que o tratamento com nanocápsulas contendo nicotínicos não reduziu a viabilidade celular, o que indica que tanto as nanocápsulas quanto os nicotínicos não foram tóxicos para as células, nas concentrações avaliadas. No ensaio de ELISA, não foi observada variação na expressão de citocinas em células PC12 tratadas com nicotínicos, possivelmente devido às baixas concentrações utilizadas. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que as nanocápsulas contendo nicotina, nornicotina, anatabina e anabasina foram satisfatoriamente desenvolvidas e caracterizadas. Ainda, não apresentaram citotoxicidade nas concentrações testadas. Portanto, podem ser ferramentas terapêuticas promissoras para o tratamento de lesões do sistema nervoso central.

Palavras-chave: nanocápsulas; nicotina; nornicotina; anatabina; anabasina.

## ABSTRACT

Nanotechnology is an innovative area of research that has developed over the last two decades, exploiting nanometric scales to develop new materials, products and processes for various areas, such as medicine, cosmetics, the food industry and nanomaterials. Recently, many nanotechnology-based techniques have been proposed to improve tissue regeneration. Nanoparticles in particular have interesting properties in regenerative medicine, such as excellent biocompatibility and the ability to increase drug bioavailability. Injuries to the central nervous system (CNS) have serious consequences, including neurological dysfunction, disability and even death. Trauma to this region can trigger systemic inflammation, high metabolic demands and physical, cognitive and emotional deficits, resulting in loss of functional independence and reduced quality of life. The impact of brain and spinal cord injuries is especially significant, impairing daily activities, movement and reasoning and adversely affecting the quality of life. Due to the versatility of nanotechnology, which makes it possible to act on different pathologies, such as spinal cord injury, for which there is no treatment with the potential for rehabilitation, a bibliographical review was first carried out to investigate recent advances in nanotechnology for the treatment of spinal cord injury and tissue repair. It was found that although nanotechnology is promising for the treatment of spinal cord injury, tests on humans are still in the theoretical phase. The second stage involved a literature review of conventional methods and new nanoencapsulation technologies, with the aim of determining the most effective method for encapsulating molecules, especially hydrophilic ones, which present a significant challenge. It has been concluded that the most widely used methods for nanoencapsulation are based on emulsification processes. Several studies have provided clear evidence that nicotine, an alkaloid that is the active ingredient in tobacco, has powerful pathophysiological effects on the body, through anti-inflammatory and neuroprotective properties. Within this context, nornicotine, anatabine, and anabasine, nicotine analogs, have also demonstrated these activities in recent studies. Given the interesting properties of nicotine and its analogs, a nanostructured system would probably enhance their beneficial effects and reduce their adverse effects. In the experimental part of this work, innovative poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanocapsules containing 3mg/mL of nicotine, nornicotine, anatabine, or anabasine were produced using the interfacial deposition method of a pre-formed polymer (nanoprecipitation), and were evaluated for particle size, polydispersity index (PdI), zeta potential, pH, encapsulation efficiency percentage, morphology, stability, and release profile. In vitro tests with the PC12 cell line were carried out, such as MTT, Live/Dead, and ELISA

assays, to verify the cytotoxicity and anti-inflammatory activity of nicotinoids. In this study, it was possible to produce PLGA nanocapsules containing nicotine, nornicotine, anatabine and anabasine, which were homogeneous and without the presence of precipitates, with negative zeta potential, submicrometric size and low PDI, meaning that there is homogeneity in the particle size distribution. The encapsulation efficiency was 50.7%, 43.6%, 48.9% and 52.9% for nicotine, nornicotine, anatabine and anabasine, respectively, demonstrating that approximately half of the active ingredients are associated with the nanocapsules. In the TEM evaluation, the nanocapsules showed spherical, regular and nanometric morphology, corroborating the results found in the particle size and PDI analysis. All the suspensions remained stable when stored in the refrigerator for a period of 30 days. In the analysis of the release profile, all the nanocapsules exhibited rapid initial release, which is mainly attributed to the drug bound or adsorbed to the surface of the nanocapsules; following this, a sustained release was maintained. The in vitro tests showed that treatment with nanocapsules containing nicotinoids did not reduce cell viability, indicating that both the nanocapsules and the nicotinoids were not toxic to the cells at the concentrations assessed. In the ELISA assay, no variation in cytokine expression was observed in the PC12 cells treated with nicotinoids, possibly due to the low concentrations used. The results obtained in this study show that the nanocapsules containing nicotine, nornicotine, anatabine and anabasine were satisfactorily developed and characterized. They also showed no cytotoxicity at the concentrations tested. These nanocapsules could, therefore, be promising therapeutic tools for the treatment of spinal cord injury.

Keywords: nanocapsules; nicotine; nornicotine; anatabine; anabasine.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Aplicações biomédicas de nanopartícula.....	13
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.....	15
<b>Figura 3.</b> Métodos usuais, empregados na preparação de nanopartículas poliméricas.....	16
<b>Figura 4.</b> Hidrólise de nanopartículas de PLGA.....	18
<b>Figura 5.</b> Representação da estrutura química da nicotina.....	25
<b>Figura 6.</b> Esquema simplificado do mecanismo molecular da via anti-inflamatória colinérgica.....	28
<b>Figura 7.</b> Representação da estrutura química da nornicotina, anatabina e anabasina.....	30
<b>Figura 8.</b> Disfunções associadas à lesão medular.....	34
<b>Figura 9.</b> Fisiopatologia da LME.....	36
<b>Figura 10.</b> Representação esquemática de várias estratégias terapêuticas avançadas para reparar a LM.....	39

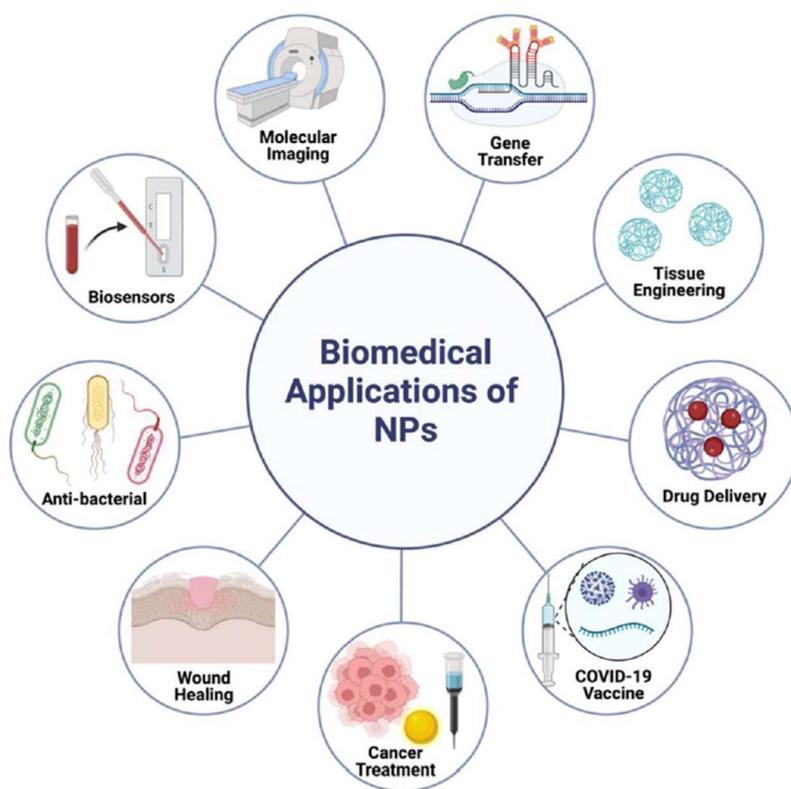
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma área de investigação ativa com ciência inovadora e aplicações em escala nanométrica ( $10^{-9}$  m) que se estabeleceu gradualmente nas últimas duas décadas. A nanotecnologia abrange a produção e utilização de sistemas físicos, químicos e biológicos em escalas que variam desde átomos ou moléculas individuais até dimensões submicrométricas, bem como a integração das nanoestruturas resultantes em sistemas maiores. A nanotecnologia é essencialmente a compreensão fundamental de como os materiais se comportam ou funcionam em uma escala nano, ou seja, em nível atômico, molecular ou subatômico. Isso implica na criação e utilização de estruturas, dispositivos e sistemas que possuem propriedades e funções completamente novas (GUNJAN et al., 2017).

A nanotecnologia permeia vários aspectos da nossa vida cotidiana, incluindo criônica, medicina (diagnóstico, administração de medicamentos, engenharia de tecidos), ambiente (filtração), energia (redução do consumo e aumento da eficiência na produção de energia), informação e comunicação (armazenamento de memória, novos dispositivos semicondutores, novos dispositivos optoeletrônicos, monitores, computadores quânticos). Além disso, ela contribui para a indústria pesada (aeroespacial, catálise, construção, fabricantes de veículos), bens de consumo (nanoalimentos, uso doméstico, óptica, têxteis, cosméticos, agricultura, esportes) (GUNJAN et al., 2017).

Na área da saúde, a nanomedicina e os sistemas de entrega direcionados fazem uso da nanotecnologia para terapia e o diagnóstico de diversas doenças, utilizando nanopartículas, biossensores nanoeletrônicos e nanotecnologia molecular. Algumas nanopartículas têm aplicações potenciais em novos instrumentos de diagnóstico, imagens e metodologias, medicamentos direcionados, produtos farmacêuticos, implantes biomédicos e engenharia de tecidos, como demonstrado na Figura 1. Ela fornece a capacidade de avaliar o corpo, a medicação e os dispositivos médicos em nível nano, prometendo uma medicina muito mais precisa no futuro. Os rápidos avanços na nanotecnologia estão gerando novos diagnósticos e terapias com melhores taxas de sucesso. Atualmente, a nanomedicina é empregada para o desenvolvimento de medicamentos inteligentes que permitem que tratamentos de alta toxicidade possam ser administrados com maior segurança usando nanotecnologia, como medicamentos quimioterápicos contra o câncer (TANEJA et al., 2021; ABBASI et al., 2023; HALEEM et al., 2023).



**Figura 1.** Aplicações biomédicas de nanopartículas: imagem molecular e terapia celular, engenharia de tecidos, biosensor, administração direcionada de fármacos, tratamento de câncer de tratamento de câncer com hipertermia magnética baseada em nanopartículas, cicatrização de feridas, terapia genética, tratamentos antibacterianos e tratamentos do COVID-19. Fonte: ABBASI et al., 2023.

Recentemente, muitas técnicas baseadas em nanotecnologia foram propostas para aprimorar a regeneração de tecidos. Sobretudo, nanopartículas, por apresentarem propriedades interessantes no campo da medicina regenerativa, como a capacidade de aumentar a biodisponibilidade do fármaco. Devido ao seu tamanho e química de superfície, atuam como um depósito de liberação gradual do ativo, com entrega direcionada ao local da lesão. Ainda, potencializam a penetração da droga, apresentam excelente biocompatibilidade e estrutura microscópica reproduzível (NEJATI- KOSHKI et al., 2017; NICOLA et al., 2017; FIROUZI-AMANDI et al., 2018; REIS et al., 2018; NICOLA et al., 2019).

Dessa forma, a nanotecnologia possibilita o desenvolvimento de nanopartículas e também nanofibras de liberação controlada com potencial aplicação em abordagens de engenharia de tecidos neurais, porque os biomateriais podem ser projetados em escala nanométrica, viabilizando mimetizar a estrutura do tecido neural. Além disso, a nanotecnologia desempenha um papel crucial na engenharia de tecidos ao permitir o encapsulamento e o

controle da liberação de drogas. Esses nanodispositivos, por sua vez, permitem direcionar o comportamento das células neurais, promovendo maior sobrevivência celular e reduzindo a inflamação (ZIMMERMANN et al., 2021).

As nanopartículas possuem uma relação significativa entre área de superfície e volume devido ao seu tamanho em nanoescala, o que permite carrear grandes quantidades de fármacos e se mover rapidamente pela corrente sanguínea. Sua área superficial expandida permite estabelecer habilidades distintas, ampliando suas qualidades mecânicas, magnéticas, ópticas e catalíticas. Dessa forma, as nanopartículas podem ser utilizadas para uma ampla variedade de aplicações farmacêuticas. As nanopartículas são classificadas em três categorias com base em sua composição química: orgânicas, inorgânicas e baseadas em carbono (KUMARI et al., 2010; HALEEM et al., 2023).

As nanopartículas orgânicas apresentam dimensões específicas, como um raio inferior a 100 nm, e são compostas por proteínas, carboidratos, lipídios e outras moléculas orgânicas. As nanopartículas inorgânicas são atóxicas, hidrofílicas, biocompatíveis e altamente estáveis em comparação com materiais orgânicos e englobam metais elementares, óxidos metálicos, sais metálicos, entre outras composições. Os nanomateriais à base de carbono, como fulerenos, nanotubos de carbono, grafeno e seus derivados, se destacam por suas dimensões estruturais incomuns e por possuírem propriedades mecânicas, elétricas, térmicas, ópticas e químicas excepcionais, o que têm despertado interesse em diversos campos, incluindo aplicações biomédicas (KUMARI e SOBHA, 2013; HALEEM, 2023).

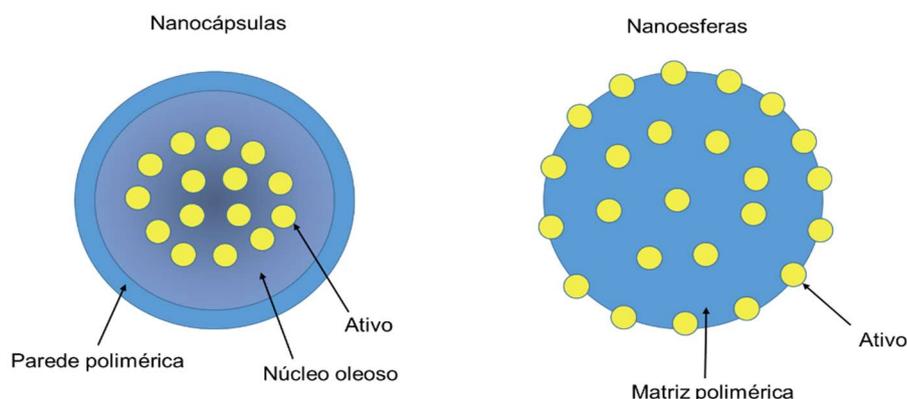
## **1.2 Nanopartículas poliméricas**

Um desafio constante na tecnologia científica é o desenvolvimento de fármacos que alcancem seu sítio de ação de forma específica e seletiva, buscando potencializar seus efeitos terapêuticos e reduzir seus efeitos colaterais (KINGSLEY et al., 2006; BAMRUNGSAP et al., 2012). Nesse contexto, os principais tipos de nanossistemas utilizados para transportar substâncias ativas incluem lipossomas, dendrímeros, nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas, nanopartículas metálicas e nanotubos de carbono (LETCHFORD e BURT, 2007; ZHANG et al., 2019; TANEJA et al., 2021). No entanto, as nanotecnologias baseadas em polímeros são amplamente empregadas em pesquisas devido às suas propriedades adequadas para garantir a distribuição e direcionamento precisos do fármaco. Além disso, há uma grande variedade de polímeros disponíveis, os processos de produção são relativamente

simples e é possível utilizar matrizes biocompatíveis e biodegradáveis (GALINDO-RODRÍGUEZ, et al., 2005; RAO e GECKELER, 2011; ZIMMERMANN et al., 2023).

Em relação ao desafio de encapsular moléculas hidrofílicas, as nanotecnologias poliméricas são notáveis por suas propriedades biocompatíveis e biodegradáveis. Embora as moléculas hidrofóbicas tenham alta eficiência de encapsulação, moléculas hidrofílicas ou anfílicas geram dificuldades no encapsulamento devido à partição do fármaco da fase polimérica para a fase externa antes das partículas solidificarem. Devido à sua solubilidade em água, eles tendem a se difundir na fase aquosa contínua durante o processo de emulsificação. Nesse contexto, a nanotecnologia baseada em polímeros tem auxiliado a superar essas dificuldades (IQBAL et al., 2015; ZIMMERMANN, 2023).

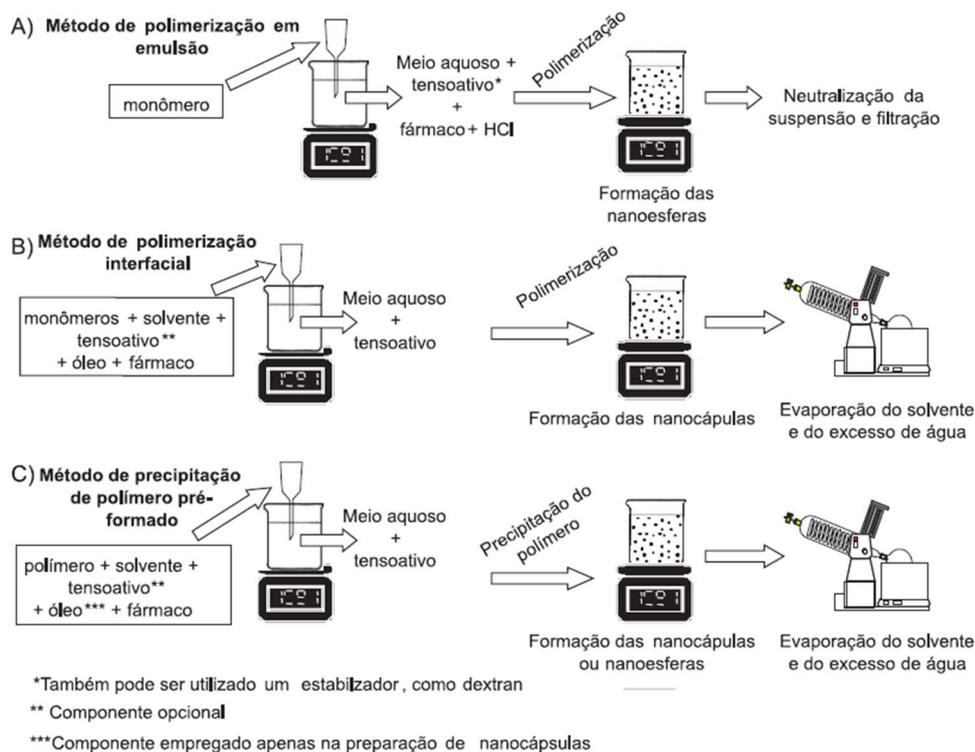
As nanopartículas poliméricas são transportadores coloidais sólidos que variam em tamanho de 10 a 1000 nm. Elas consistem em sistemas nanoestruturados nos quais o agente ativo (fármaco ou biomaterial) é dissolvido, aprisionado e/ou encapsulado na superfície da qual o agente ativo é adsorvido ou acoplado. Estruturalmente, dois tipos de nanopartículas podem ser identificados: nanocápsulas e nanoesferas, como mostrado na Figura 2. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico envolvendo um núcleo interno oleoso, podendo o princípio ativo estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, consistem em uma matriz polimérica compacta e homogênea, onde o princípio ativo é disperso e aprisionado nas redes poliméricas ou aderido à superfície. (GALINDO-RODRÍGUEZ, et al., 2005; KUMARI et al., 2010; VRIGNAUD et al., 2011).



**Figura 2.** Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: as nanocápsulas possuem uma parede polimérica com um núcleo interno fluido onde o ativo é disperso, atuando como reservatório; as nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica compacta e uniforme, onde o princípio ativo é disperso e retido dentro das redes poliméricas ou aderido à superfície. Fonte: a própria autora.

As nanocápsulas apresentam certas vantagens em comparação às nanoesferas, como a alta eficiência de encapsulação, o uso de menor quantidade de polímero na produção e, visto que o fármaco fica protegido no interior do núcleo, a liberação elevada nos momentos iniciais e irritações durante a administração podem ser reduzidas (ANTON et al., 2008; ZIMMERMANN et al., 2023).

Existem diferentes métodos relatados na literatura para a preparação de nanopartículas poliméricas. Esses métodos podem ser classificados, geralmente, em métodos baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos ou na precipitação de polímeros pré-formados. Independentemente do método de preparação os produtos são obtidos como suspensões coloidais aquosas (SCHAFFAZICK et al., 2003; GALINDO-RODRÍGUEZ, et al., 2005; MORA-HUERTAS et al., 2010; RAO e GECKELER, 2011). A Figura 3 ilustra as principais etapas dos diferentes métodos de preparação de nanopartículas.



**Figura 3.** Métodos usuais, empregados na preparação de nanopartículas poliméricas, baseados na utilização de monômeros dispersos (A; B) ou na precipitação de polímeros pré-formados (C). Fonte: SCHAFFAZICK et al., 2003.

Os métodos de polimerização de monômeros, tais como polimerização interfacial e polimerização por meio de emulsões (aquosas ou orgânicas), empregam moléculas iniciadoras para começar a reação de polimerização, usando uma nano ou microemulsão como molde. Contudo, esses métodos requerem processos adicionais de purificação para remover moléculas residuais do meio de polimerização, que podem ser eventualmente tóxicas, tais como monômeros, oligômeros ou surfactantes (REIS et al., 2006; GOTO et al., 2013; ZIMMERMANN et al., 2023).

Os métodos que envolvem reações de polímeros pré-formados têm como base a dispersão de um polímero, natural ou sintético, usando um solvente orgânico. No entanto, exigem uma etapa adicional para remover o solvente orgânico, para possibilitar seu uso em seres vivos. Além disso, por questões de segurança, esses métodos requerem condições especiais de processamento (REIS et al., 2006; VRIGNAUD et al., 2011; ZIELIŃSKA et al., 2020).

Entretanto, os procedimentos mais utilizados são os que fazem uso dos polímeros pré-formados, os quais abrangem várias técnicas, com destaque para aquelas que empregam polímeros sintéticos, como emulsificação-*evaporação* do solvente, emulsificação-*difusão* do solvente, *salting-out* e *nanoprecipitação*. (REIS et al., 2006; RAO e GECKELER, 2011).

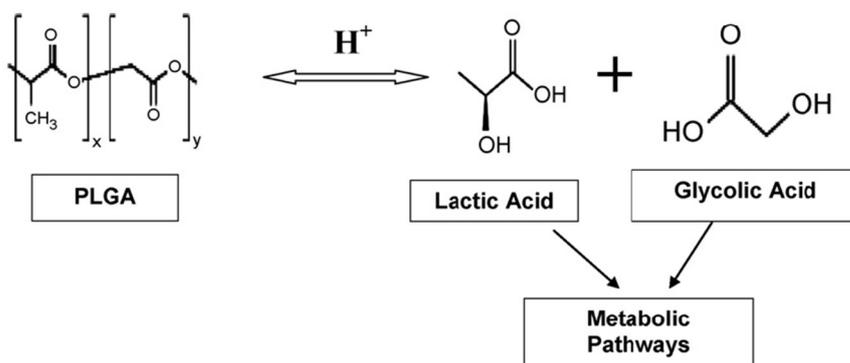
A escolha do método depende de uma série de fatores, como o tipo de droga a ser carregada, tamanho de partícula, área de aplicação, etc. Portanto, é necessária uma avaliação detalhada dos parâmetros cruciais envolvidos para possibilitar a obtenção das propriedades desejadas (RAO e GECKELER, 2011).

### **1.3 Poli(ácido láctico-co-glicólico)**

As nanopartículas poliméricas podem ser sintetizadas usando diferentes polímeros, de acordo com a aplicação e tipo de composto ser encapsulado, visando aprimorar os benefícios terapêuticos e minimizar os efeitos colaterais. A escolha do polímero depende de diversos fatores, como o tamanho desejado das nanopartículas, solubilidade em meio aquoso, permeabilidade superficial e perfil de liberação desejada do medicamento. Dessa forma, as nanopartículas podem ser elaboradas a partir de uma variedade de compostos, como proteínas, polissacarídeos e polímeros sintéticos e a combinação desses pode influenciar significativamente as características físico-químicas das nanopartículas resultantes, moldando assim suas propriedades e comportamento em aplicações terapêuticas (REIS et al., 2006; DOS SANTOS et al., 2016).

As nanopartículas biodegradáveis têm sido utilizadas frequentemente como veículos de distribuição de medicamentos devido à sua grande biodisponibilidade, melhor encapsulamento, liberação controlada e propriedades menos tóxicas. Elas podem ser sintetizadas usando polímeros sintéticos biodegradáveis, como PLGA poli(ácido láctico-co-glicólico), PLA (ácido polilático), PCL (poli-caprolactona) e Poli-alquil-cianoacrilatos ou polímeros naturais, tais como albumina, gelatina, alginato, colágeno e quitosana (KUMARI et al., 2010; BAMRUNGSAP et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2016).

O PLGA é um dos polímeros biodegradáveis mais amplamente utilizado para o desenvolvimento de nanomedicamentos, porque sofre hidrólise no organismo, que resulta na produção dos monômeros metabólicos biodegradáveis ácido láctico e ácido glicólico (Figura 4). Uma vez que o organismo consegue lidar eficazmente com estes dois monômeros, a utilização do PLGA para a administração de medicamentos ou aplicações de biomateriais está associada a uma toxicidade sistêmica mínima (KUMARI et al., 2010; BISWAS et al., 2024).



**Figura 4.** Hidrólise de nanopartículas de PLGA: nanopartículas de PLGA são biologicamente hidrolisadas em meio ácido em ácido láctico e glicólico. Fonte: KUMARI et al., 2010.

O PLGA é aprovado pela *Food and Drugs Administration* (FDA) dos EUA para uso terapêutico em humanos. Essas nanopartículas carregadas protegem cargas pouco solúveis e instáveis do meio biológico e são pequenas o suficiente para possibilitar a penetração capilar e a internalização celular (KUMARI et al., 2010). Ainda, esse polímero apresenta vantagens proeminentes, como a facilidade de ajustar as taxas de degradação, boas propriedades mecânicas e excelente processabilidade. No entanto, o PLGA é um polímero hidrofóbico e não possui sítios naturais de reconhecimento de células. Para superar essas limitações, diferentes estratégias têm sido propostas, incluindo os tratamentos de superfícies ou a combinação do PLGA com polímeros naturais e/ou moléculas bioativas, visando aprimorar seu desempenho biológico (ZHAO et al., 2016).

## **1.4 Caracterização de Nanopartículas Poliméricas**

As nanopartículas poliméricas podem apresentar diferenças nas propriedades físicas, como composição, concentração, tamanho, forma, propriedades de superfície, cristalinidade ou estado de dispersão. Essas características podem ser avaliadas por diversos métodos, visando a caracterização completa das nanopartículas. Microscopia eletrônica, espalhamento de luz dinâmico (DLS) ou espectroscopia de correlação de fótons (PCS), espectroscopia no infravermelho, eletroforese e cromatografia são alguns dos mais comumente usados. A caracterização das nanopartículas poliméricas é muito importante, em termos da sua aplicabilidade, bem como para controlar os processos de fabricação (ZIELÍNSKA et al., 2020).

### ***1.4.1 Morfologia***

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) têm sido amplamente utilizadas para obter informações sobre a forma e tamanho das nanopartículas poliméricas. Geralmente são combinadas com técnicas de criofratura para realizar a análise morfológica das nanopartículas. A MET pode permitir também a diferenciação entre nanocápsulas e nanoesferas, além de conseguir determinar a espessura da parede da nanocápsula (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Outra técnica que tem sido utilizada para caracterizar a morfologia superficial das nanopartículas poliméricas é a microscopia de força atômica (MFA), a qual fornece informações com alta resolução em três dimensões e em escala nanométrica, permitindo também a resolução de detalhes de superfície em nível atômico. A aplicação dessa técnica pode mostrar uma topografia complexa na superfície das nanopartículas, enquanto a análise seccional das amostras pode indicar a presença de pequenas cavidades e poros (SCHAFFAZICK et al., 2003; SUR et al., 2019).

### ***1.4.2 Distribuição de Tamanho de Partícula***

As nanopartículas poliméricas são partículas na faixa de tamanho de 1 a 1000 nm. Geralmente, as nanopartículas, mesmo preparadas através de diferentes métodos, apresentam diâmetros médios entre 100 e 300 nm, no entanto, podem ser obtidas partículas com diâmetros superiores ou mesmo inferiores.

A polidispersidade deve ser a mais baixa possível, idealmente, próxima de zero, e distribuição de tamanho unimodal. O tamanho das nanopartículas pode ser medido usando diferentes

técnicas, sendo as mais comuns o espalhamento de luz dinâmico (DLS) e estático (SLS), além de MET, MEV e MFA. Cada método de medição pode fornecer resultados distintos, por exemplo, a microscopia eletrônica transmite uma imagem das partículas isoladas do meio, enquanto o DLS permite determinar o raio hidrodinâmico das partículas em suspensão. O DLS complementa o MET ao possibilitar a medição de tamanhos maiores, fornecendo informações sobre o estado de agregação das nanopartículas em solução e mudanças na distribuição de tamanho (SCHAFFAZICK et al., 2003; HICKEY et al., 2015; ZIELIŃSKA et al., 2020).

Diversos fatores podem influenciar o tamanho das nanopartículas poliméricas, como a composição quali-quantitativa. Por exemplo, no caso das nanocápsulas, a natureza do óleo utilizado como núcleo durante a produção pode afetar o diâmetro das partículas devido a diferenças de viscosidade, hidrofobicidade ou tensão interfacial entre as fases líquidas. Além disso, a quantidade de medicamento presente pode contribuir para o aumento do diâmetro médio das nanopartículas e para uma distribuição de tamanho mais ampla (BRAR e VERMA, 2011; CARVALHO et al., 2018).

### ***1.4.3 Potencial Zeta***

O potencial zeta ( $\zeta$ ) é uma medida do potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado por alterações na interface com o meio dispersante, devido à dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (SCHAFFAZICK et al., 2003). Para determinar esse parâmetro, são empregadas técnicas de eletroforese (OSTOLSKA e WIŚNIEWSKA, 2014; ZIELIŃSKA et al., 2020).

Os principais componentes presentes em formulações capazes de influenciar o potencial zeta são os fosfolipídeos (lecitinas), os poloxamers (copolímeros de óxido de etileno e óxido de propileno) e os polímeros constituintes das nanopartículas. Especialmente os poliésteres, como o PLA, e as lecitinas fornecem um potencial negativo à interface, enquanto os poloxamers (tensoativos não-iônicos) tendem a reduzir o valor absoluto deste parâmetro. Especificamente, um alto valor de potencial zeta é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, já que forças repulsivas significativas impedem a agregação decorrente de colisões entre nanopartículas adjacentes. A determinação do potencial zeta é útil para elucidar o mecanismo de associação de fármacos com as nanopartículas (SCHAFFAZICK et al., 2003; HONARY e ZAHIR, 2013; ZIELIŃSKA et al., 2020).

#### ***1.4.4 Determinação do pH***

O monitoramento do pH ao longo do tempo de armazenamento é fundamental e pode fornecer informações relevantes sobre a estabilidade das suspensões nanoparticuladas. A alteração do pH pode indicar degradação do polímero, pois afeta a protonação nas superfícies das partículas. No entanto, a diminuição dos valores de pH das suspensões, em um curto período de tempo, pode ser atribuída à ionização de grupos carboxílicos presentes no polímero, liberando prótons para o meio circundante, dependendo da hidrofobicidade do polímero. Além disso, o pH do meio pode influenciar o potencial zeta e a estabilidade eletrostática da formulação, tornando a monitorização do pH uma prática de grande relevância (SCHAFFAZICK et al., 2003; ZIELIŃSKA et al., 2020).

#### ***1.4.5 Determinação da Eficiência de Encapsulação***

O teor total de fármaco encapsulado nas nanopartículas é um parâmetro fundamental para a avaliação das nanopartículas e pode ser determinado a partir da completa dissolução das mesmas em solvente adequado, seguido de um método analítico. Dependendo da estrutura química do fármaco, sua eficiência de encapsulação pode ser determinada quantitativamente por espectrofotometria UV e técnicas de cromatografia líquida, como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (SCHAFFAZICK et al., 2003; ALSHAWWA et al., 2022).

A determinação da quantidade de fármaco associado às nanopartículas é particularmente desafiadora devido ao seu tamanho reduzido, o que dificulta a separação entre a fração livre do fármaco e a fração associada (DE JONG e BORM, 2008). A técnica de separação de fármacos livres e associados a nanopartículas mais empregada é a ultracentrifugação, na qual o fármaco livre presente na suspensão é determinado no sobrenadante após a centrifugação. Portanto, a concentração do fármaco associado às nanopartículas é calculada pela diferença entre as concentrações total e livre do fármaco. Outro método utilizado é a ultrafiltração-centrifugação, onde uma membrana é empregada para separar parte da fase aquosa dispersante da suspensão coloidal. A concentração do fármaco livre é determinada no ultrafiltrado, e a fração do fármaco associada às nanoestruturas também é calculada subtraindo as concentrações total e livre (WALLACE et al., 2012).

Vários fatores podem influenciar a quantidade de fármaco associado aos sistemas nanoestruturados, incluindo as características físico-químicas do fármaco, o pH do meio, as características da superfície das nanopartículas ou a natureza do polímero, além da quantidade

de fármaco adicionado à formulação, a ordem de adição do fármaco à formulação (antes ou depois da formação das nanoestruturas), o tipo de óleo utilizado (no caso das nanocápsulas), bem como o tipo de surfactante adsorvido na superfície polimérica (PATRA et al., 2018; KHAN et al., 2019).

#### ***1.4.6 Cinética de liberação in vitro do fármaco***

A liberação de fármacos a partir de nanopartículas poliméricas é influenciada por diversos fatores, como a dessorção do fármaco da superfície das partículas e/ou a erosão da matriz polimérica, a difusão do fármaco através da matriz de nanosferas ou através da parede polimérica das nanocápsulas, ou a combinação de processos de difusão e erosão (SOPPIMATH et al., 2001). Diferentes métodos têm sido empregados para investigar a liberação de medicamentos a partir de nanopartículas poliméricas, como difusão a partir de bolsas de diálise e técnicas de separação baseadas em ultracentrifugação, filtração de baixa pressão ou ultrafiltração-centrifugação (SHEN e BURGESS, 2013).

De acordo com estudos prévios, a cinética de liberação do fármaco a partir de nanosferas geralmente segue uma forma exponencial (primeira ordem), possivelmente devido à difusão do fármaco da matriz polimérica para o meio ambiente e/ou erosão da matriz polimérica, resultando na liberação do fármaco. No caso das nanocápsulas, o fármaco teoricamente dissolvido no núcleo oleoso seria liberado desta estrutura vesicular por difusão através da parede polimérica, apresentando cinética de ordem zero (FU e KAO, 2010; LEE e YEO, 2015).

#### ***1.4.7 Estabilidade das Suspensões***

As suspensões coloidais geralmente não tendem à separação de fases até alguns meses após a preparação, devido ao processo de sedimentação ser lento para partículas submicrométricas e ainda mais minimizado pelo movimento browniano. No entanto, ao longo do tempo, podem ocorrer processos de aglomeração e sedimentação de partículas. Vários fatores podem afetar a estabilidade das suspensões coloidais, incluindo a adsorção de moléculas ativas na superfície das nanopartículas e a presença de surfactantes adsorvidos. Dessa forma, alguns parâmetros físico-químicos podem ser utilizados para monitorar a estabilidade das suspensões coloidais poliméricas, como tamanho de partícula, potencial zeta, distribuição de

massa molar do polímero, conteúdo de droga e pH (SCHAFFAZICK et al., 2003; ZIELIŃSKA et al., 2020).

A aplicação industrial de nanopartículas poliméricas dispersas em meio aquoso pode ser limitada devido a problemas de baixa estabilidade físico-química durante períodos prolongados de armazenamento. As principais limitações são a agregação de partículas, a estabilidade química do polímero, o medicamento ou outras matérias-primas utilizadas durante a produção das nanopartículas, além da possibilidade de liberação prematura da substância ativa. Além disso, é importante destacar que as formas farmacêuticas líquidas estão sujeitas à proliferação microbiana com necessidade de adição de conservantes. Para retardar ou evitar esses problemas físico-químicos e microbiológicos, geralmente recomenda-se a secagem como a liofilização (criodessecação) ou a secagem por pulverização (SCHAFFAZICK et al., 2003; ZIELIŃSKA et al., 2020).

#### ***1.4.8 Avaliação da Toxicidade das Nanopartículas***

O crescente interesse no uso de nanopartículas poliméricas em engenharia biomédica aumentou as preocupações sobre a biocompatibilidade e a citotoxicidade desses nanossistemas. Vários fatores, como tamanho, área superficial, agregação, química do material, funcionalização da superfície, forma e porosidade podem impactar sua toxicidade. Geralmente, a maior reatividade química das nanopartículas poliméricas é devido à sua maior relação entre área superficial e volume, o que aumenta a sua interação superficial com o sistema biológico (ABBASI et al., 2023).

Os métodos analíticos desempenham um papel fundamental na obtenção de informações sobre os potenciais riscos das nanopartículas poliméricas, permitindo a implementação de ações eficazes para garantir sua segurança (BUNDSCHUH et al., 2018). Os riscos associados ao uso de nanopartículas estão relacionados principalmente à sua possível toxicidade e interação com células vivas (SILVA et al., 2019). Além disso, é importante considerar as potenciais alterações (químicas, físicas) que o meio pode induzir às nanopartículas, bem como a degradação, que afeta sua biodisponibilidade e comportamento *in vivo* (BUNDSCHUH et al., 2018; GUPTA e XIE, 2018).

Para assegurar a qualidade dos resultados obtidos na avaliação da toxicidade, os métodos utilizados para monitorar a toxicidade das nanopartículas precisam ser capazes de detectar concentrações muito baixas de biomarcadores toxicológicos e devem evitar a possível interferência de outros compostos na amostra (ZIELIŃSKA et al., 2020). O perfil citotóxico de

nanopartículas é frequentemente investigado *in vitro* através de ensaios colorimétricos, como o *Alamar blue* e brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), para avaliar a viabilidade celular em linhagens celulares específicas. Geralmente, a viabilidade celular acima de 70% é considerada como evidência de baixa citotoxicidade da formulação de nanopartículas testada (ZIELIŃSKA et al., 2020; BOMMAKANTI et al., 2022).

## 1.5 Alcalóides

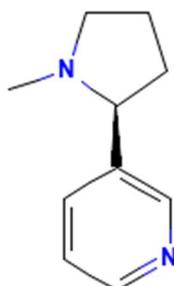
Desde a antiguidade, uma variedade de plantas contendo metabólitos bioativos com alto potencial terapêutico, têm sido empregadas no tratamento de diversas complicações de saúde, como doenças inflamatórias, distúrbios neurodegenerativos e outras complicações correlacionadas. Os alcalóides, uma categoria de metabólitos secundários que desempenham um papel na defesa química das plantas, se destacam nesse contexto. Eles são compostos nitrogenados que apresentam uma notável diversidade estrutural e química, que demonstram fortes efeitos farmacológicos, e aproximadamente 60% dos medicamentos derivados de plantas são representados por essa classe de compostos (SIBI G. et al., 2014; ARYAL et al., 2022).

Na medicina moderna, os alcalóides derivados de plantas ganham considerável atenção devido ao seu papel crucial no fornecimento constante de medicamentos destinados ao tratamento de doenças crônicas como câncer, diabetes e distúrbios neurológicos. Além de protegerem as plantas dos herbívoros, esses compostos também limitam infestações fúngicas e bacterianas, o que amplia seu uso na medicina e outras áreas. Os alcalóides demonstram uma ampla gama de propriedades farmacológicas, desempenhando papéis importantes em diversas áreas terapêuticas, como exemplos, analgésico ( morfina), antiasmático (efedrina), anticâncer (vincristina), anti-hipertensivo (reserpina), antipirético (quinina), e efeitos anti-hiperglicêmicos (piperina) (ADAMSKI et al., 2020; ARYAL et al., 2022).

## 1.6 Nicotina

Diversas pesquisas forneceram evidências claras de que a nicotina (Figura 5), um alcalóide que constitui o princípio ativo do tabaco, apresenta poderosos efeitos fisiopatológicos no organismo, através de propriedades anti-inflamatórias. Estudos sugerem que a nicotina propicia a melhora da cicatrização tecidual, aumentando a vascularização por meio do estímulo da angiogênese, diminuindo a inflamação em torno do local da lesão e acelerando a fibrogênese

(HOU et al., 2008; KENNETH et al., 2011; PONS e MARIN-CASTANO, 2011; KIM et al., 2017; HUANG et al., 2022).



**Figura 5.** Representação da estrutura química da nicotina. Fonte: PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/89594>

O impacto primário na LM resulta na estimulação de processos secundários que potencializam o trauma inicial, levando a respostas inflamatórias excessivas que resultam em aumento da lesão e destruição tecidual. Estudos realizados por Lee e colaboradores mostraram que a nicotina exerce potentes efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e neuroprotetores na lesão medular. O tratamento com nicotina resultou em uma diminuição dependente da dose no estresse oxidativo tecidual, na ativação de fatores de transcrição regulados por redox e na atenuação da expressão gênica inflamatória em modelo de compressivo de LM em ratos (LEE et al., 2009). Outro estudo avaliou a administração de nicotina na preservação do tecido da medula espinal em modelo de LM por contusão. Os resultados mostraram uma recuperação das funções locomotoras dos membros posteriores em animais tratados com nicotina, indicando que a administração de nicotina pode diminuir a neurodegeneração mecanismos de reparo no tecido lesionado da medula espinal (RAVIKUMAR et al., 2005).

A nicotina mostrou-se eficaz também como agente farmacológico benéfico para limitar a morte celular e a disfunção relacionada, em um modelo *in vitro* de lesão medular. Quando a nicotina foi aplicada, ocorreu uma proteção significativa dos neurônios, incluindo motoneurônios, sugerindo que a nicotina foi eficaz para limitar o dano excitotóxico histológico e funcional em modelo de LM (KAUR et al., 2018).

A nicotina também apresentou interessantes propriedades neuroprotetoras, como demonstrado num estudo recente onde a nicotina restaurou a função cognitiva e aliviou os

sintomas relacionados à idade em ratos machos idosos. Além disso, a nicotina reduziu a inflamação sistêmica crônica, que está associada ao hipermetabolismo da glicose, estimulou a neurogênese e inibiu a neuroinflamação, protegendo os órgãos do estresse oxidativo e do encurtamento dos telômeros (YANG et al.; 2023).

Ruan e colegas investigaram os efeitos neuroprotetores da nicotina na doença de Parkinson e foi possível verificar que o pré-tratamento com nicotina melhorou os déficits locomotores e o comportamento semelhante à ansiedade. A nicotina também aliviou a neuroapoptose, protegeu contra o dano neuronal dopaminérgico e inibiu a ativação da microglia, bem como a expressão de fatores pró-inflamatórios na substância nigra e no corpo estriado do modelo de camundongos com doença de Parkinson (RUAN et al., 2023).

Dados recentes sugerem a importância dos mecanismos colinérgicos para regulação da função imunológica. Células T, células B e macrófagos têm a capacidade de produzir acetilcolina (ACh) e enzimas envolvidas na produção de ACh. Esses tipos de células também expressam vários tipos de receptores colinérgicos em sua superfície. Dos receptores colinérgicos conhecidos, receptores nicotínicos como o subtipo  $\alpha 7$  ( $\alpha 7$ nAChR) são considerados mais importantes para efeitos sobre regulação imunológica. Assim, a estimulação específica de  $\alpha 7$ nAChR em monócitos leva à supressão eficiente de produção de citocinas pró-inflamatórias e, este receptor é essencial na regulação eficiente das citocinas neuroimunes e esse mecanismo é conhecido como via anti-inflamatória colinérgica (WESTMAN et al., 2009; RAKHECHA et al., 2022).

O receptor nicotínico  $\alpha 7$  é um tipo de receptor de acetilcolina presente em diversas células do sistema imunológico, como macrófagos, células dendríticas, monócitos, linfócitos B e T e fibroblastos presentes em tecido inflamado (WESTMAN et al., 2009; HAN e LAU, 2014). O mecanismo molecular do efeito anti-inflamatório mediado pela via colinérgica anti-inflamatória através do  $\alpha 7$ nAChR, é ilustrado na Figura 6.

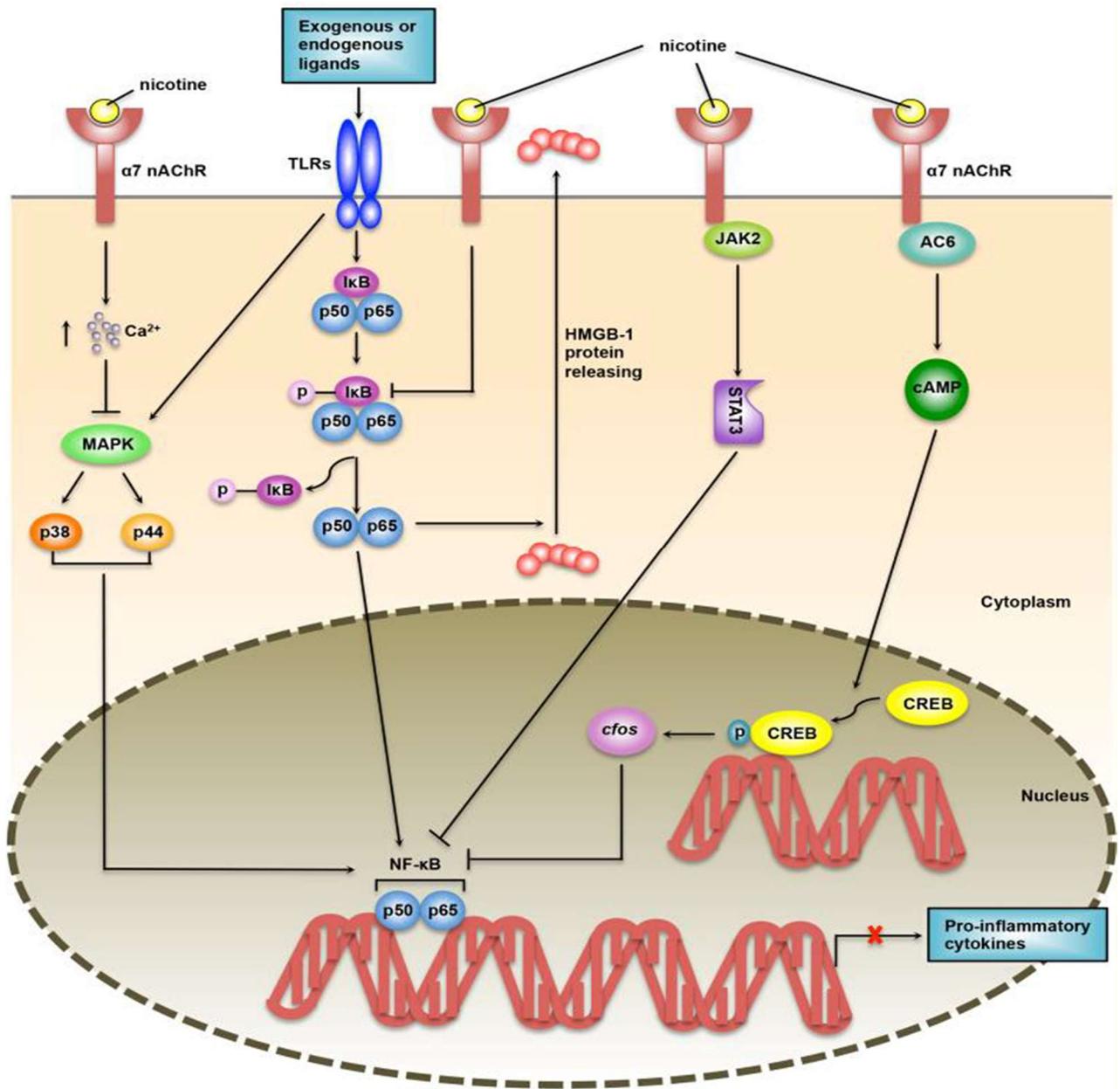
Diante de diversos estímulos, como ligantes tanto exógenos quanto endógenos dos receptores Toll-like (TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 e TLR9), o  $\alpha 7$  nAChR e seus agonistas têm a capacidade de desencadear um efeito anti-inflamatório, suprimindo a produção de citocinas em macrófagos e monócitos (HAN e LAU, 2014).

Em monócitos ou macrófagos, a interação fisiológica entre o  $\alpha 7$  nAChR e seus agonistas, como a nicotina, pode suprimir a fosforilação do I $\kappa$ B, um inibidor do NF- $\kappa$ B ou estimular a interação física entre o  $\alpha 7$  nAChR e a adenilato ciclase 6 (AC6), resultando no aumento do cAMP intracelular, o que poderia ativar a fosforilação do CREB, aumentando a

produção de cfos, um membro da família de genes de fatores de transcrição, que pode, por sua vez, regular negativamente a via de sinalização do NF- $\kappa$ B (HAN e LAU, 2014).

Adicionalmente, pode promover o recrutamento da janus quinase 2 (JAK2) para formar um complexo heterodimérico, ativando então o fator de transcrição STAT3, o qual também regula negativamente a via de sinalização do NF- $\kappa$ B. Juntas, todas essas cascatas de sinalização resultam na supressão da regulação positiva das citocinas pró-inflamatórias pelo NF- $\kappa$ B (HAN e LAU, 2014).

A proteína cromossômica 1 do grupo de alta mobilidade (HMGB1), que desempenha um papel de fator de transcrição e crescimento, também pode atuar como uma citocina pró-inflamatória, estimulando a produção de IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF, e mediando a inflamação em diversas doenças, incluindo a sepse. A liberação de HMGB1 foi controlada pelo NF- $\kappa$ B e foi observado que a ativação de  $\alpha$ 7 nAChR pela nicotina inibe a produção de HMGB1 ao suprimir a atividade do NF- $\kappa$ B. Nas células microgliais, a ativação de  $\alpha$ 7 nAChR pode regular positivamente os níveis de cálcio intracelular e, conseqüentemente, reduzir a fosforilação das MAPKs p38 e p44. Mecanismos semelhantes também foram observados em células T. Esses processos poderiam levar à redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias (HAN e LAU, 2014).



**Figura 6.** Esquema simplificado do mecanismo molecular da via anti-inflamatória colinérgica mediada pelo efeito anti-inflamatório via  $\alpha 7$  nAChR. Na via anti-inflamatória colinérgica, a nicotina se liga ao  $\alpha 7$  nAChR, resultando na redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias. TLR, receptor tipo toll like;  $\alpha 7$  nAChR, receptor  $\alpha 7$  nicotínico de acetilcolina; MAPK, proteína quinase ativada por mitógeno; NF- $\kappa$ B, fator nuclear kappa B; I $\kappa$ B, inibidor de kappa B; HMGB1, proteína cromossômica 1 do grupo de alta mobilidade; JAK2, janus quinase 2; STAT3, transdutor de sinal e ativador de transcrição 3; AC6, adenilato ciclase. Fonte: HAN e LAU, 2014.

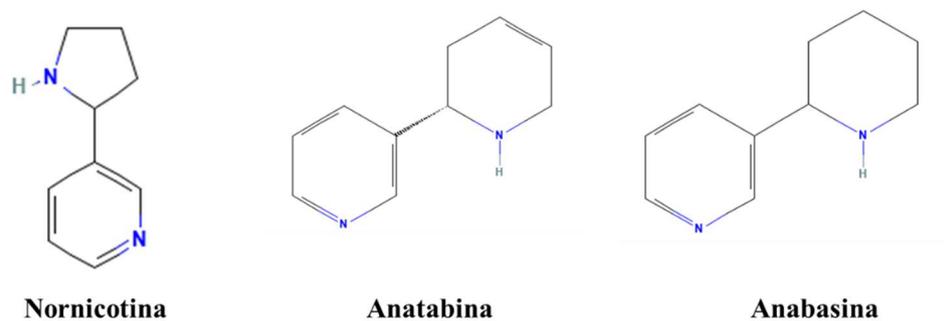
## 1.7 Nornicotina, anatabina e anabasina

Os alcalóides piridínicos predominantes no tabaco (*Nicotiana tabacum L.*) têm sido alvo de intensa investigação. Uma planta de tabaco comum produz alcalóides em proporções que variam de 2% a 4% do seu peso seco total. Aproximadamente 90% do conteúdo total de alcalóides é nicotina, com os alcalóides estruturalmente relacionados, nornicotina, anabasina e anatabina representando quase todos os 10% restantes. Embora os análogos da nicotina tenham mostrado um certo grau de toxicidade em estudos clínicos, eles demonstraram potencial para tratar distúrbios cognitivos, depressão, ansiedade, câncer, dor nociceptiva e doenças inflamatórias crônicas (ALIJEVIC et al., 2020).

Assim como o neurotransmissor endógeno acetilcolina (ACh), a nicotina ativa receptores colinérgicos ionotrópicos para induzir a despolarização das membranas neuronais com diversas propriedades cinéticas, eletrofisiológicas e farmacológicas. Os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) humanos são codificados por dezesseis genes, dos quais nove são expressos principalmente no cérebro ( $\alpha 2$ – $\alpha 7$  e  $\beta 2$ – $\beta 4$ ). Os outros sete, incluindo aqueles que formam o subtipo muscular nAChR ( $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$ ) e  $\alpha 9$  e  $\alpha 10$ , são expressos principalmente em tecidos periféricos. As subunidades proteicas codificadas se agrupam em uma estrutura pentamérica em torno de um poro iônico central (GRAHAM et al., 2002).

Os subtipos  $\alpha 4\beta 2$  heteromérico e  $\alpha 7$  homomérico são os receptores nicotínicos mais abundantes no cérebro humano. Em estudo recente, 71 alcalóides do tabaco foram categorizados em quatro grupos com base em elementos farmacofóricos nAChR e caracterizados por ensaios eletrofisiológicos automatizados. Os resultados demonstraram que os alcalóides nicotina, nornicotina, anabasina e anatabina, ativaram potentemente os nAChRs  $\alpha 4\beta 2$  e ativaram fracamente os nAChRs  $\alpha 7$ . Embora a nicotina fosse o agonista  $\alpha 4\beta 2$  mais potente, a anabasina produziu a maior ativação de  $\alpha 7$  (ALIJEVIC et al., 2020).

As estruturas químicas dos análogos da nicotina podem ser observadas na Figura 7.



**Figura 7.** Representação da estrutura química da nornicotina, anatabina e anabasina. Fonte: PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/89594>

Experimentos mostraram que a ativação de  $\alpha 7nAChR$  com anabasina reduziu significativamente a mortalidade de camundongos em modelo experimental de sepse, devido à diminuição da concentração sanguínea das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (ZABRODSKII et al., 2015).

Um tratamento agudo com anatabina por quatro dias reduziu significativamente os níveis de proteínas beta-amiloides no cérebro de camundongos transgênicos de modelo da doença de Alzheimer (PARIS et al., 2011). Em estudo semelhante, utilizando o mesmo modelo, a injeção aguda de anatabina reduziu os níveis plasmáticos de proteína C reativa, através da inibição das vias de sinalização NF- $\kappa$ B e STAT3. Além disso, a administração crônica de anatabina regula negativamente a expressão de NF- $\kappa$ B, ciclooxigenase-2 e óxido nítrico sintase induzível no tecido cerebral, indicando os efeitos da anatabina na regulação da neuroinflamação (XIA et al., 2021). A anatabina também melhora a inflamação intestinal e reduz a produção de fatores pró-inflamatórios em um modelo de colite em camundongos. Ainda, a administração oral de anatabina, aumentou a abundância de IL-10, uma citocina anti-inflamatória (CASTRO et al., 2020).

Um estudo realizado por Morin e colaboradores mostrou que um tratamento tardio de 3 meses com anatabina mitigou a astrogliose em modelo de lesão cerebral traumática leve e repetitiva (r-mTBI), realizada em camundongos hTau. A anatabina também diminuiu a fosforilação da proteína tau e do NF $\kappa$ B, que se apresentam aumentados após a r-mTBI (MORIN et al., 2021). Além disso, a anatabina é candidata promissora para o tratamento da asma pulmonar. Em estudo recente, animais asmáticos tratados com anatabina mostraram diminuição de células inflamatórias e níveis de citocinas no lavado broncoalveolar, reduziram a inflamação

nas vias aéreas através da diminuição da infiltração de mastócitos nos tecidos pulmonares e também apresentaram um aumento das enzimas antioxidantes e nos níveis de expressão de fatores que protegem contra os danos em processos inflamatórios, oxidantes, apoptose e outros (ABDO et al., 2022).

Devido a necessidade de novos tratamentos, com menos efeitos colaterais para a obesidade, um estudo mostrou que a administração diária, de curto prazo, de nornicotina, anabasina e anatabina apresenta efeitos positivos na perda de peso, através de reduções na gordura corporal e na ingestão de alimentos e aumento na atividade física, sugerindo que os análogos da nicotina são dignos de futuras investigações como farmacoterapias anti-obesidade (GREBENSTEIN et al., 2022).

Esses exemplos evidenciam como a ação farmacológica da nicotina e seus derivados permanece promissora em diversas áreas da medicina, abrangendo desde o tratamento de doenças inflamatórias até a gestão da dor crônica. Além disso, suas atividades neuroprotetoras e antioxidantes ampliam seu potencial terapêutico em uma variedade de patologias.

## **1.8 Células PC12**

As células PC12, derivadas do feocromocitoma adrenal de ratos, são amplamente empregadas em diversos campos de pesquisa devido à sua capacidade em replicar propriedades e processos neuronais. Elas desempenham um papel crucial no estudo de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, sendo utilizadas como um modelo celular para investigar os mecanismos patológicos e o potencial desenvolvimento de medicamentos (XIE et al., 2023). Especificamente, as células PC12 são de grande valor em estudos neurobiológicos, pois sua diferenciação induzida pelo fator de crescimento nervoso (NGF) aumenta sua sensibilidade a agentes nocivos, tornando-as ideais para pesquisas sobre neurotoxicidade, neuroproteção e neuroinflamação (BALON e WIATRAK, 2021). Além disso, as células PC12 desempenham um papel fundamental na investigação do impacto dos sinais nanotopográficos na diferenciação neuronal, fornecendo esclarecimentos valiosos para potenciais aplicações em estudos de regeneração nervosa (SEVEN et al., 2020).

## **1.9 Doenças do sistema nervoso central**

As doenças do sistema nervoso central (SNC) abrangem uma ampla gama de distúrbios neurológicos que afetam o cérebro e a medula espinal, levando a prejuízos funcionais. Essas

doenças incluem condições inflamatórias como esclerose múltipla e neuromielite óptica, distúrbios neurodegenerativos como Parkinson, Alzheimer, Huntington e doenças do neurônio motor, bem como doenças infecciosas como meningite viral e bacteriana, neurosífilis e síndrome da imunodeficiência neuroadquirida (SCHELD et al., 2014; VERKHRATSKY e BUTT, 2023; GHOLAMREZANEZHAD et al., 2023). Compreender estas doenças é crucial para o desenvolvimento de tratamentos eficazes e ferramentas de diagnóstico para gerir o complexo conjunto de distúrbios do SNC que têm um impacto significativo na saúde e no bem-estar do indivíduo (GHOSH et al., 2019).

Lesões no SNC têm um impacto profundo no organismo, levando a disfunções neurológicas graves, incapacidade e até morte (GEMMA e CALVI, 2015). Trauma no SNC pode resultar em inflamação em todo o sistema, demandas metabólicas excessivas, deficiências físicas, cognitivas e emocionais, perda de independência funcional e baixa qualidade de vida (GENG et al., 2023). Os efeitos das lesões traumáticas cerebrais e da medula espinal são particularmente significativos, afetando as atividades diárias, o movimento, o raciocínio e causando alterações de personalidade, com consequências duradouras na qualidade de vida (KRUCOFF et al., 2019).

A lesão da medula espinal é uma condição séria que impacta o sistema nervoso central, podendo levar à perda dos movimentos. Até o momento, não há tratamento disponível para restaurar o movimento perdido. O nosso grupo de pesquisa vem trabalhando há anos com estratégias inovadoras, através da combinação de drogas anti-inflamatórias, terapias com células-tronco e biomateriais, em busca de um recurso terapêutico que possa amenizar essa situação. O primeiro artigo do grupo nessa linha de pesquisa tem o título: Transplantation of mononuclear cells from human umbilical cord blood promotes functional recovery after traumatic spinal cord injury in Wistar rats (RODRIGUES et al., 2012).

### **1.10 Lesão medular**

A lesão medular (LM) é uma condição grave que leva à perda repentina da função motora, autonômica e sensorial sob o nível da lesão. A lesão tecidual associada à LM é determinada por uma cascata de eventos fisiopatológicos que causam morte celular, perda axonal, degradação da mielina, infiltração e ativação de células imunes, ruptura da barreira hematomedular e formação da cicatriz glial. Também ocorrem alterações vasculares e subsequente edema, isquemia e hipóxia, produção de citocinas, radicais livres e peroxidação lipídica, ruptura do equilíbrio iônico e excitotoxicidade. Esses eventos prejudicam a

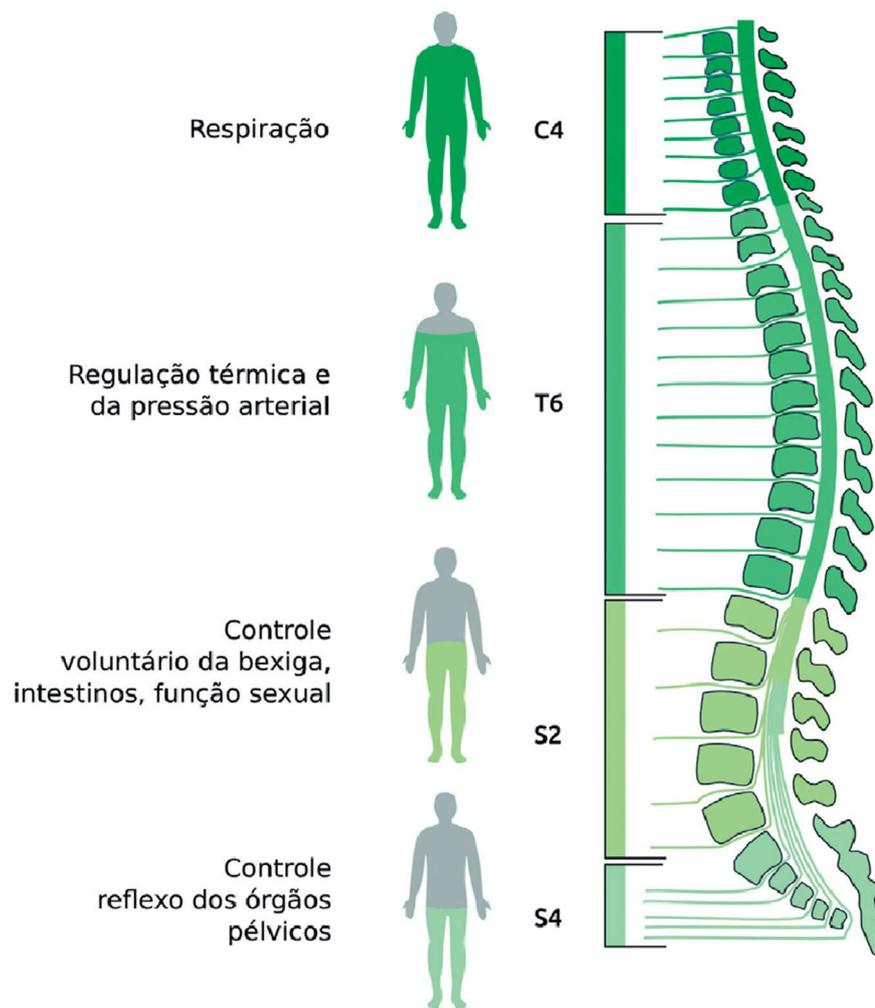
regeneração neural e restauração da função motora. Portanto, a LM é considerada uma doença multifatorial que apresenta tratamento limitado e que não restaura o movimento perdido (ANWAR et al., 2016; PRÜSS et al., 2017; KRONER e ALMANZA, 2019).

De acordo com estatísticas publicadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), entre 250.000 e 500.000 indivíduos são acometidos por LM a cada ano no mundo (WHO, 2013). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, a incidência de LM é de 6.000 a 8.000 casos novos por ano, sendo que destes 80% das vítimas são homens e 60% se encontram entre os 10 e 30 anos de idade (BRASIL, 2013).

A LM é uma patologia de grande impacto socioeconômico porque afeta não só a condição física e psicológica dos pacientes, mas também dos seus familiares, além de impor um elevado custo para a sociedade. Estudos que investigam a incidência de LM no Brasil mostram que a maioria dos casos é de origem traumática, sendo os acidentes automobilísticos, seguidos por ferimentos por projéteis de arma de fogo. Outras causas menos frequentes são as quedas e acidentes em práticas esportivas (BRASIL, 2013).

Existem as causas não traumáticas, que representam aproximadamente 20% dos casos de LM e abrangem uma ampla gama de condições, incluindo tumores intra e extra-medulares, fraturas patológicas (como metástases vertebrais, tuberculose, osteomielite e osteoporose), estenose do canal medular, deformidades graves da coluna, hérnia de disco, isquemia (especialmente associada a aneurismas de aorta), doenças infecciosas (como mielite transversa, paraparesia espástica tropical) e condições autoimunes (como esclerose múltipla) (BRASIL, 2013).

A gravidade da lesão pode ser determinada por meio de categorias neurológicas. Para esse fim, a Associação Americana de Lesão Medular (*American Spinal Injury Association - ASIA*) desenvolveu um formulário de classificação com base em 28 pontos sensoriais chave que são testados com um alfinete de segurança. Isso permite classificar a lesão em cinco níveis. O comprometimento do controle das funções e sistemas do corpo é dependente do nível em que a lesão medular ocorre, como ilustrado na Figura 8 (SCHOELLER et al., 2016).



**Figura 8.** Disfunções associadas à lesão medular. Fonte: SCHOELLER et al., 2016.

Quando a lesão ocorre acima da vértebra cervical C4, os pacientes apresentam a perda de controle de todas as funções abaixo do pescoço, incluindo a respiração, o que torna este tipo de lesão de alta morbidade. Quando a lesão ocorre entre a vértebra cervical 4 e a vértebra torácica 6, os pacientes mantêm o controle das funções respiratórias, porém não têm regulação da temperatura e pressão arterial, nem controle voluntário de órgãos. Lesões abaixo da vértebra torácica 6 apresentam disfunções semelhantes, como a perda do controle voluntário da bexiga, intestinos e funções sexuais, além da ausência do controle reflexo dos órgãos pélvicos (SCHOELLER et al., 2016).

As consequências decorrentes das lesões medulares não resultam apenas da lesão em si, mas também da falta de acesso a um atendimento adequado e a um tratamento de reabilitação multiprofissional voltado para a reintegração e autonomia do indivíduo afetado pela LM. A reabilitação é um processo abrangente e dinâmico, focado na promoção da saúde, destinado a

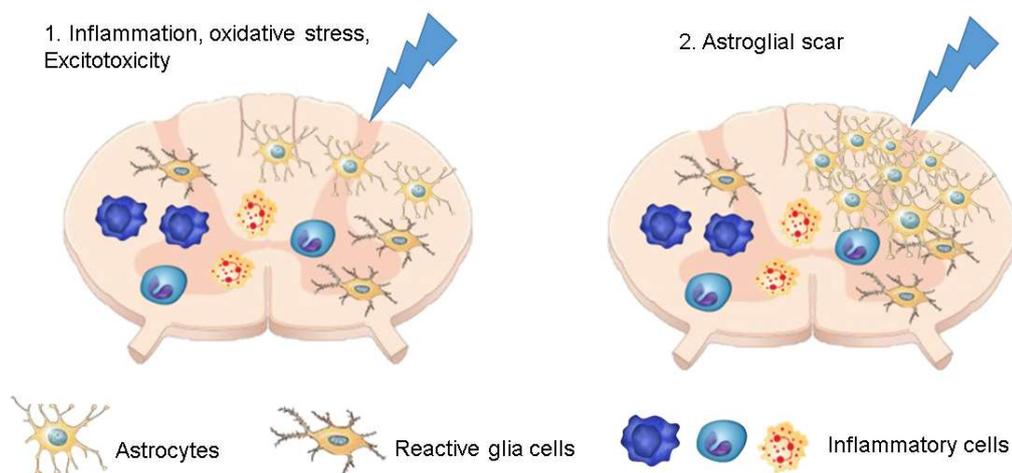
auxiliar pessoas com deficiência a se reintegrarem socialmente, restaurando seu funcionamento físico, mental, social e econômico (SCHOELLER et al., 2016).

A correta abordagem da equipe multidisciplinar oferece a melhor chance de um resultado bem sucedido após a LM. Terapia médica e reabilitação devem ocorrer juntos. Historicamente, a LM resultou em paralisia, imobilidade, isolamento e mortalidade. Continua a resultar em paralisia, mas a mobilidade, a integração com a sociedade e a prevenção de complicações secundárias têm atenuado sua natureza paralisante. A reabilitação deve começar assim que possível após lesão a qual, aliada a novas técnicas cirúrgicas, medicamentos e novas abordagens terapêuticas, podem levar a uma melhora na qualidade de vida do indivíduo com LM (BORAIAH e KUMAR, 2022).

### ***1.10.1 Fisiopatologia da lesão medular***

A LM resulta em uma série de mudanças patológicas que progressivamente reduzem o fluxo sanguíneo para a medula espinal, ocasionando hipóxia isquêmica e danos teciduais acelerados. Após o trauma inicial, ocorre uma grande liberação de células inflamatórias no local da lesão, causando danos secundários à medula espinal. Entre 24 e 72 horas após o evento, ocorre uma hipertrofia dos astrócitos residentes em resposta à lesão e dentro de 7 a 14 dias, os astrócitos ativados liberam proteoglicanos de sulfato de condroitina, que formam uma cicatriz no local. A cicatriz glial evita que ocorram maiores perdas neurais, bem como impedem que os axônios se regenerem e alcancem seus alvos mais distantes (LIDDELOW et al., 2016; NAGOSHI et al., 2018).

Desde o início da lesão, há um aumento no número de macrófagos migrando para o centro da lesão em resposta a sinais microambientais, e o material celular remanescente resultante da desmielinização contínua promove a produção de agentes inflamatórios, aumentando a neurotoxicidade, como demonstrado na Figura 9 (ZIMMERMANN et al., 2021).



**Figura 9.** Fisiopatologia da LME. O diagrama mostra os principais eventos fisiopatológicos que ocorrem após a lesão primária e levam à degeneração progressiva do tecido. (1) A ruptura vascular ocorre após a lesão primária e inicia a ativação glial, a neuroinflamação e o estresse oxidativo. A ativação de astrócitos e micrógliia e a infiltração de células imunológicas levam a uma resposta neuroinflamatória. (2) Essas alterações agudas resultam em morte celular, lesão axonal, remodelamento da matriz e formação de cicatriz glial na fase crônica da lesão. Fonte: ZIMMERMANN et al., 2021.

O trauma medular está associado ainda com a liberação excessiva de glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC). Esse fenômeno é especialmente exacerbado no ambiente hipóxico da medula lesionada, que leva ao estímulo excessivo dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos, resultando na morte celular por excitotoxicidade. As células da glia também são afetadas, sendo os oligodendrócitos os mais prejudicados devido à sua maior permeabilidade ao cálcio e sensibilização por ciclooxygenase-2, o que resulta em morte excitotóxica (CARLSON et al., 2010; ANJUM et al., 2020).

Nos primeiros dias após o trauma, a isquemia/reperfusão tecidual amplia a área lesionada. Durante a fase isquêmica, ocorre a proteólise limitada das enzimas presentes nas células endoteliais, levando à transferência de elétrons para as moléculas de oxigênio. Assim, quando as células endoteliais são novamente expostas ao oxigênio, ocorre a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que em conjunto com aquelas produzidas pelos neutrófilos e células necróticas, contribuem significativamente para a morte celular. Além disso, o início das respostas inflamatórias após o trauma parece estar associado à ativação das proteínas quinases ativadas por mitógeno, que desempenham um papel crucial na determinação da morte ou sobrevivência neuronal em determinadas situações, bem como na expressão gênica de proteínas pró-inflamatórias (SCHOELLER et al., 2016).

Durante a lesão endógena secundária, também ocorre ativação das vias inata e adaptativa da resposta imune. Inicialmente, há uma presença abundante de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). A IL-1 $\beta$  é liberada imediatamente após a lesão pela micróglia, e em conjunto com IL-6 e TNF- $\alpha$ , pode estimular a expressão uma das outras, resultando em um rápido aumento nos níveis das três citocinas. Quando estimulam seus receptores, o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  ativam a via de sinalização do fator nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B). Esta via é crucial para estimular a produção de mediadores inflamatórios como citocinas, prostaglandinas e óxido nítrico sintase induzível (iNOS), entre outros (SCHOELLER et al., 2016).

Na fase aguda da LM ocorre uma manifestação clínica importante, a degeneração axonal aguda (DAA). Este processo induz outros efetores, como cisteína protease calpaína e degeneração Walleriana, que estimulam ainda mais a degeneração axonal. A DAA é iniciada pelo alto influxo de Ca<sup>2+</sup> nos axônios. Esse fato ocorre em duas fases, a fase anterior ocorre dentro de 15 minutos após a lesão e a fase posterior, chamada degeneração Walleriana, ocorre após algumas horas (24-48 h) após a lesão. A degeneração Walleriana se manifesta pela formação de bulbos de retração, uma rede de microtúbulos que inibe a regeneração (ANJUM et al., 2020).

Na fase crônica da LM ocorre a formação de cicatriz glial (gliose), que é um mecanismo celular reativo facilitado pelos astrócitos. Esse processo, chamado astrogliose, é a resposta natural do organismo para proteger e iniciar o processo de cicatrização após o trauma medular. Os astrócitos são sensíveis a mudanças como alterações na expressão gênica, hipertrofia e excitações. Os outros constituintes principais do tecido cicatricial são os pericitos e os tecidos conjuntivos. Os pericitos desempenham um papel importante, pois secretam marcadores específicos que estimulam os fibroblastos a expressar a matriz extracelular, como a fibronectina, que é um dos principais componentes dos tecidos conjuntivos cicatriciais (ANJUM et al., 2020).

A morte celular após a LM pode ocorrer por diferentes mecanismos, como necroptose, apoptose e ferroptose. A necroptose é uma morte celular necrótica programada, que desempenha um papel vital na morte celular neuronal, apresentando dilatação celular, com perda de energia e ruptura da homeostase interna. A apoptose pode ser induzida pela desmielinização que ocorre quando a mielina, a camada protetora das células nervosas, é danificada. Este processo retarda as mensagens enviadas ao longo dos axônios pois deteriora o axônio e os oligodendrócitos (WANG et al., 2012). A morte celular também é induzida pelo alto nível de glutamato que aumenta o influxo de Ca<sup>2+</sup>, pela produção de EROs e espécies

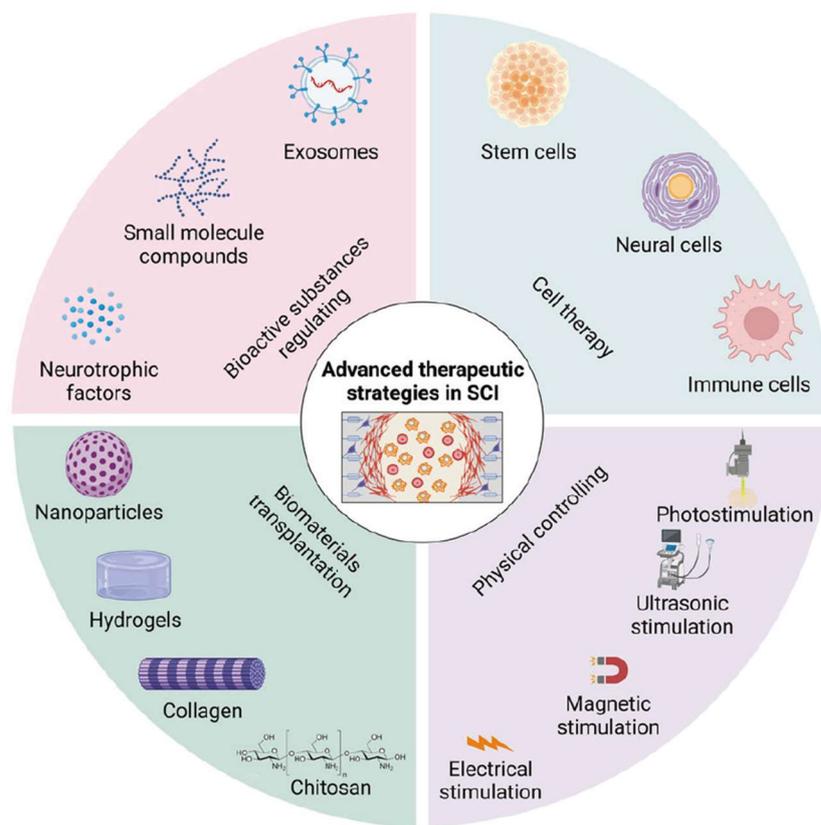
reativas de nitrogênio (ERNs), redução de glutathiona, aumento na carga de ferro e hiperativação do peroxissomo. A produção de EROs por neutrófilos e microglia desencadeia a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-2, interferon (IFN) e proteases, o que facilita a apoptose de oligodendrócitos (DOMINGUES et al., 2016). A desmielinização de oligodendrócitos também induz a expressão de receptores Fas que liberam caspases 3 e 8 que mediam a apoptose (SOBRIDO-CAMEÁN e BARREIRO-IGLESIAS, 2018).

A ferroptose é um novo tipo de morte celular dependente de ferro e tem uma forte correlação com a lesão secundária após LM. A inibição da ferroptose pode promover a recuperação da função neurológica, aumentando a sobrevivência neuronal e pode ser uma nova direção para pesquisas futuras sobre lesões agudas do SNC (HU et al., 2023).

### ***1.10.2 Abordagem terapêutica na lesão medular***

Estudos lineares sobre o mecanismo patológico da LM forneceram alvos de intervenção para o tratamento sequencial. Em geral, durante o estágio agudo da LM, o foco reside na neuroproteção e regulação neuroinflamatória, envolvendo o uso de drogas neuroprotetoras para reduzir a infiltração de células inflamatórias e diminuir o estresse oxidativo. Na fase subaguda, o objetivo principal é regular a formação de cicatrizes, promover a angiogênese e facilitar a regeneração neural, que pode ser alcançado através de diversos métodos, como o uso de materiais específicos, transplante de células e aplicação de pequenos compostos moleculares. Na fase crônica, a recuperação da função neural compensatória pode ser promovida através de regulação física, o circuito neural também pode ser reconstruído através da remoção da cicatriz glial, ou a utilização combinada de biomateriais e/ou células-tronco. Além disso, há a possibilidade de transdiferenciação dos astrócitos em neurônios por meio de transcrição reversa (HU et al., 2023).

Pequenas moléculas biológicas têm o potencial de fornecer fatores nutricionais para a regeneração neural ou regular o metabolismo celular (DOLCI et al., 2022). As células-tronco podem se diferenciar de maneira eficaz para substituir células neurais apoptóticas. Além disso, materiais bioativos e abordagens de regulação física podem influenciar o destino celular no local da LM. Tais abordagens têm o potencial de promover a geração de novos neurônios e a formação de uma rede neural intermediária, o que é propício para o quadro de LM (KIM et al., 2022). Essas abordagens estão ilustradas na Figura 10.



**Figura 10.** Representação esquemática de várias estratégias terapêuticas avançadas para reparar a LM, com base nos estudos. Estratégias incluindo regulação de substâncias bioativas, terapia celular, transplante de biomateriais e controle físico são aplicadas para reparar LM sob diferentes perspectivas. Entretanto, o uso combinado destas estratégias também tem recebido atenção crescente por parte dos investigadores. Fonte: HU et al., 2023.

Atualmente, substâncias bioativas, como fatores neurotróficos, compostos de moléculas pequenas e exossomos, são bastante utilizadas na pesquisa da LM, e todas apresentam a capacidade de promover a recuperação funcional após LM através da regeneração de axônios e melhoria do microambiente (ANDERSON et al., 2018).

O transplante de células emergiu como a abordagem terapêutica mais promissora para a LM. Uma vez que os neurônios maduros são difíceis de regenerar após danos, é de grande importância encontrar um método de reparo ideal, que seja simples, seguro, eficaz e viável para promover a regeneração axonal, a remielinização e a recuperação funcional. As células transplantadas no local da lesão têm o potencial de se diferenciar, secretar uma variedade de citocinas e fatores de crescimento, regular a resposta inflamatória, fornecer suporte nutricional e promover a regeneração axonal e o reparo neural. As interações, diretas ou indiretas, entre as células transplantadas e hospedeiras, respondem ao microambiente no local da lesão medular, sendo também capazes de influenciar o microambiente local e alterar as interações (HU et al., 2023).

A optogenética pode exercer um papel essencial na reconstrução de circuitos neuronais perdidos. Ahmad e colaboradores foram os primeiros a relatar que ChR2 pode ser expresso em neurônios motores ou células-tronco, estimulando assim a ativação e regeneração neuronal em resposta à irradiação de luz azul (AHMAD et al., 2015). Outro método não invasivo, chamado fotobiomodulação, também pode desempenhar um papel significativo na promoção da recuperação funcional, reduzindo a neuroinflamação e estimulando a regeneração do axônio neuronal após LM (ZHENG et al., 2021).

A estimulação ultrassonográfica pode regular a proliferação e diferenciação de células-tronco, enquanto a estimulação magnética pode induzir campos elétricos e promover o crescimento de axônios ao longo da direção da corrente elétrica. Já as características de polaridade da estimulação elétrica têm efeitos reguladores na migração e diferenciação de células-tronco em neurônios (HU et al., 2023).

A metilprednisolona (MP) é o único medicamento aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento da LM. Seu mecanismo de ação envolve principalmente a redução da resposta inflamatória secundária, a restauração da barreira hematomedular, a melhoria do suprimento sanguíneo da medula espinal, a eliminação de radicais livres e o aumento da secreção do fator neurotrófico (LIU et al., 2019). Entretanto, estudos recentes não recomendam o uso de MP para o tratamento da LM aguda devido a evidências clínicas significativas de efeitos colaterais deletérios da MP nesse contexto (HU et al., 2023).

A tecnologia de neuromodulação, como a estimulação elétrica funcional (NCT03439319), surgiu como nova modalidade de reabilitação e pode ser usada para melhorar a função dos membros (ANDERSON et al., 2020). O campo integrado da medicina e da indústria tem evoluído e constantemente, apresentando abordagens mais avançadas e convenientes para a reabilitação de indivíduos com LM, como exoesqueletos robóticos e interfaces cérebro-computador (BCIs). BCI é um conceito inovador de reabilitação que contorna a estação retransmissora da medula espinal e permite que sinais eletroencefalográficos controlem diretamente o movimento dos membros (CAPOGROSSO et al., 2016; GANZER, et al., 2020; DAVIS et al., 2022).

Em um modelo de LM de primata, uma interface cérebro-coluna restaurou a sustentação do peso da perna paralisada em locomoção na esteira e no solo (CAPOGROSSO et al., 2016). Os resultados de um ensaio clínico com BCI mostraram que indivíduos com LM obtiveram recuperação clínica completa da função motora da mão e do tato (NCT01997125), (GANZER et al., 2020). Outro ensaio clínico mostrou que as atividades neurais do córtex motor podem ser

decodificadas em ações por meio do BCI, melhorando significativamente a velocidade e a precisão da escrita de mãos paralisadas em indivíduos com LM (NCT00912041), (WILLETT et al., 2021).

## 2. HIPÓTESE

Tendo em vista o impacto da nanotecnologia no tratamento da lesão medular, seria relevante revisar a literatura sobre as diferentes abordagens existentes nessa linha de pesquisa.

Existem diferentes técnicas de produção de nanopartículas, sendo importante investigar a mais adequada para encapsular as moléculas de interesse desse trabalho.

A nicotina apresenta alto potencial para promover a regulação neuroinflamatória e seus derivados também apresentam tais propriedades.

Tendo como motivação, os trabalhos do grupo referentes à busca de novas estratégias farmacológicas para neuroproteção, no presente trabalho, a hipótese é que a utilização de nanocápsulas contendo nicotina, nornicotina, anatabina ou anabasina poderá reduzir a neuroinflamação, o que pode ser uma futura abordagem promissora no tratamento de lesões do sistema nervoso central.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo geral

Revisar a literatura sobre atuais abordagens da nanotecnologia para o tratamento da lesão medular e investigar qual a técnica mais adequada para nanoencapsular as moléculas de nicotina e seus derivados. Desenvolver nanocápsulas contendo nicotina, nornicotina, anatabina e anabasina para uso como abordagem terapêutica na lesão da medula espinal em futuras pesquisas.

### 3.2 Objetivos específicos

- ✓ Realizar revisão da literatura sobre o uso da nanotecnologia no tratamento da lesão medular e também sobre os principais métodos e novas tecnologias de preparo das nanocápsulas;
- ✓ Desenvolver nanocápsulas contendo nicotina, nornicotina, anatabina e anabasina;
- ✓ Caracterizar as nanocápsulas desenvolvidas bem como avaliar a sua estabilidade;
- ✓ Avaliar *in vitro* a toxicidade das nanocápsulas a partir da sua interação com cultura de células PC12;
- ✓ Avaliar *in vitro* o efeito das nanocápsulas desenvolvidas sobre a modulação da inflamação.

#### 4. RESULTADOS

Os resultados dessa tese foram organizados em capítulos.

O capítulo I apresenta o artigo de revisão intitulado *Nanotechnology for the Treatment of Spinal Cord Injury*, publicado no periódico *Tissue Engineering – Part B – Reviews*.

O capítulo II apresenta o artigo de revisão intitulado *Production of nanostructured systems: Main and innovative techniques*, publicado no periódico *Drug Discovery Today*.

O capítulo III apresenta o artigo original da parte experimental desse trabalho, intitulado *Development of nanocapsules containing nicotine, nornicotine, anatabine and anabasine for the treatment of central nervous system injuries*, submetido ao periódico *International Journal of Pharmaceutics*.

## 4.1 Capítulo I

### **Nanotechnology for the Treatment of Spinal Cord Injury**

Rafaela Zimmermann, Yuri Vieira Alves, Laura E. Sperling, Patricia Pranke

Artigo publicado no periódico Tissue Engineering – Part B – Reviews

## 4.2 Capítulo II

### **Production of nanostructured systems: Main and innovative techniques**

Rafaela Zimmermann, Bruna Borstmann Jardim Leal, Daikelly Iglesias Braghirolli, Patricia  
Pranke

Artigo publicado no periódico Drug Discovery Today

### 4.3 Capítulo III

#### **Development of nanocapsules containing nicotine, nornicotine, anatabine and anabasine for the treatment of central nervous system injuries**

Rafaela Zimmermann, Raíssa Padilha Silveira, Luiza Rodrigues Wailer, Renata Platcheck  
Raffin, Tiago Franco de Oliveira, Laura E. Sperling, Patricia Pranke

Artigo submetido ao periódico International Journal of Pharmaceutics

## 5. DISCUSSÃO

A primeira revisão publicada destacou os avanços recentes na aplicação da nanotecnologia para o tratamento de lesões do tecido neural, com foco específico em lesão medular. A nanotecnologia oferece promissoras nanoformulações para melhorar a entrega e a liberação de medicamentos neuroprotetores e anti-inflamatórios, essenciais para potencializar a recuperação neuronal após a lesão medular. Foi visto que, embora tenha havido progresso significativo na melhoria dos materiais e na otimização da cinética de liberação, ainda são necessários ensaios clínicos robustos para validar a segurança e eficácia dessas formulações. Questões como metabolismo de polímeros e farmacocinética precisam ser resolvidas para permitir a transição bem-sucedida dessas nanoformulações do estágio pré-clínico para o uso clínico.

A segunda revisão publicada abordou a busca constante pelo desenvolvimento de medicamentos mais específicos e seletivos, principalmente com relação ao desafio de encapsular moléculas hidrofílicas, em que as nanotecnologias poliméricas são notáveis por suas propriedades biocompatíveis e biodegradáveis e os métodos mais utilizados consistem em procedimentos de emulsificação, onde gotículas emulsionadas de um determinado polímero e medicamento solidificam em nanopartículas após extração do solvente da fase polimérica. Esta revisão apresentou métodos convencionais de emulsificação, mas também destacou novas tecnologias de emulsificação. Assim, nanoemulsões representam uma das soluções coloidais mais promissoras sistemas para o transporte e entrega de moléculas, amplamente utilizados nas áreas farmacêutica, cosmética, alimentícia e agrícola.

Face aos resultados descritos na literatura sobre a relevância do uso da nicotina e seus análogos nornicotina, anatabina e anabasina frente a doenças inflamatórias e neurodegenerativas, verificou-se a importância de realizar estudos com novos sistemas de administração, como as nanocápsulas, visando melhorar a estabilidade e a solubilidade e aumentar a biodisponibilidade do ativo, bem como reduzir seus efeitos deletérios.

Para o desenvolvimento das nanocápsulas, no presente estudo, foram testados os métodos de dupla emulsão baseadas no protocolo de Roy (2010) e nanoprecipitação, seguindo o protocolo de Fontana (2010) adaptado, que são técnicas que apresentam simplicidade e rapidez no seu preparo, com baixo custo e baixo conteúdo de polímero utilizado. No anexo I estão descritas as formulações testadas.

Primeiramente, a solubilidade da nicotina, nornicotina, anatabina e anabasina foram avaliadas em diferentes óleos. Pois, embora sejam compostos químicos semelhantes, possuem

características bem distintas. A nicotina e anabasina são solúveis em água, enquanto que a nornicotina e a anatabina são solúveis em etanol. Dessa forma, a seleção do óleo foi fundamental para a encapsulação destas substâncias.

Quanto ao polímero, foi escolhido o PLGA por ser biodegradável e biocompatível. Várias outras modificações na formulação foram testadas, visando homogeneidade no tamanho das partículas e a melhor taxa de encapsulamento, como diferentes solventes, tensoativos e tipos de óleo.

As características físico-químicas das nanopartículas dependem de vários parâmetros como a natureza do polímero, características do solvente orgânico, a concentração e o tipo de tensoativo (IQBAL et al., 2015; RAMAZANI et al., 2016). Após o desenvolvimento e caracterização das nanocápsulas, quanto ao diâmetro médio, PDI, potencial zeta e eficiência de encapsulação (EE), foi possível eleger uma formulação para incorporar os análogos da nicotina e proceder os ensaios seguintes.

Dessa forma, foram obtidas suspensões coloidais macroscopicamente homogêneas, fluidas e sem a presença de precipitados. O diâmetro das partículas mostrou-se submicrométricos com distribuição unimodal e baixo PDI, concluindo que há homogeneidade na distribuição dos tamanhos das partículas. As análises de potencial zeta indicaram a obtenção de partículas com carga negativa e não foi verificada a existência de algum efeito dos nicotinoides sobre a carga das partículas (SCHAFFAZICK, et al., 2003; MORAES et al., 2010).

A concentração dos ativos nas nanocápsulas produzidas foi de 3mg/mL e a eficiência de encapsulação foi de 50,7%, 43,6%, 48,9% e 52,9% para nicotina, nornicotina, anatabina e anabasina, respectivamente, demonstrando que aproximadamente a metade dos ativos se encontra associada às nanocápsulas. Nossos resultados estão de acordo com os dados relatados na literatura por Campus e colaboradores, os quais obtiveram uma EE de 48% para nanopartículas de PLGA carregadas com dexametasona, preparadas pela técnica de nanoprecipitação (CAMPOS et al., 2014). Em outro estudo, foram preparadas nanopartículas de PLGA contendo ibuprofeno, usando a mesma técnica, tendo sido alcançada uma EE de 41,9% (SAHIN et al., 2017).

Com avaliação morfológica, por MET, as nanocápsulas desenvolvidas pelo presente estudo mostraram-se esféricas, regulares e nanométricas, corroborando com os resultados encontrados na análise de tamanho de partícula e PDI.

A estabilidade físico-química das suspensões coloidais é um fator importante, pois por se tratarem de formas líquidas podem apresentar sedimentação, agregação de partículas ou ainda degradação química de seus componentes (SCHAFFAZICK et al., 2003; ZIELIŃSKA et

al., 2020). Todas as suspensões mantiveram-se estáveis quando estocadas na geladeira, com aspecto fluido, sem o surgimento de precipitação, separação de fases ou floculação.

O monitoramento do tamanho de partícula das suspensões de nanocápsulas analisadas estatisticamente por Análise de variância (ANOVA) e Tukey, demonstraram que não houve variação durante avaliação por 30 dias.

Como pode ser visto na análise do perfil de liberação, todas as nanocápsulas exibiram liberação inicial rápida, o que é atribuído principalmente ao fármaco ligado ou adsorvido à superfície das nanocápsulas (SOPPIMATH et al., 2001; SINGH e LILLARD, 2009) e após, o perfil de liberação foi estabilizado. O padrão de liberação é semelhante, mas apenas a nicotina apresentou alta taxa de liberação, em torno de 70%, enquanto a nornicotina, anatabina e anabasina apresentaram valores mais baixos.

Os diferentes perfis de liberação dos nicotínicos podem ser explicados em termos da ionização da molécula. A nicotina possui dois grupos básicos de nitrogênio em sua estrutura química ( $pK_{a1} = 3,12$ ;  $pK_{a2} = 8,02$ ) e pode, portanto, ser encontrada em três formas, base livre (Nic), sal monoprotonado (NicH<sup>+</sup>) ou sal diprotonado (NicH<sub>2</sub><sup>+</sup>) dependendo do pH da matriz. Essa característica intrínseca é bastante importante, pois afeta a sua biodisponibilidade (EL-HELLANI et al., 2015). Em pH 7,4, a nicotina pode ser considerada predominantemente diprotonada, o que a torna solúvel no meio, facilitando a liberação.

Um estudo realizado com nanopartículas de PLGA revestidas com quitosana mostrou um perfil de liberação bem diferente. A quitosana possui um grupo amina primário em sua unidade monomérica de glucosamina com baixo valor de  $pK_a$  (6,3), que é protonado e carregado positivamente em pH baixo, tornando a quitosana solúvel em solução aquosa. Em pH alcalino, esse grupo amina torna-se desprotonado e descarregado, tornando-o insolúvel. Assim, em pH 5,5, há quase 90% de liberação do fármaco, mas a mesma amostra mostra uma liberação de apenas 43% em pH 7,4 durante 7 dias. Esse resultado indica a natureza dependente do pH da amostra revestida com quitosana, devido à maior solubilidade da quitosana em pH ácido (KHANAL et al., 2016). Portanto, as diferenças na liberação podem ser impulsionadas principalmente pela protonação-desprotonação das moléculas. Assim, nos testes de liberação em pH 7,4, a nornicotina ( $pK_a = 9,09$ ), anatabina ( $pK_a = 8,84$ ) e anabasina ( $pK_a = 8,98$ ) parecem estar predominantemente protonadas, o que as torna mais insolúveis, diminuindo a taxa de liberação (ÁVILA et al., 2020).

Ao avaliar a influência dos nicotínicos livres na viabilidade da cultura de células PC12, não foram observadas diferenças significativas em comparação com o controle. Quando as células foram tratadas com os nicotínicos encapsulados, foi possível observar que o tratamento

com maiores concentrações de nicotina e seus derivados diminui a viabilidade celular em comparação ao controle. Portanto, a maior concentração de nanocápsulas que não reduziu a viabilidade foi utilizada para as análises posteriores.

Um resultado semelhante foi obtido em um estudo para determinar se a nicotina tem atividade anti-inflamatória em sinovócitos semelhantes a fibroblastos (FLS) da artrite reumatóide. Verificou-se que a nicotina em concentrações de 0,1 a 100  $\mu\text{M}$  não afetou a viabilidade do FLS na liberação de lactato desidrogenase ou ensaio MTT (ZHOU et al., 2012).

Zhang e colaboradores (2016) avaliaram a influência da nornicotina na expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e do fator derivado do epitélio pigmentar (PEDF) em células do epitélio pigmentar da retina (ARPE-19) e células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs). Os resultados do ensaio MTT mostraram que a nornicotina em concentrações de 0,1 a 10  $\mu\text{M}$  não alterou significativamente a viabilidade das células e também promoveu a proliferação de células endoteliais, migração e formação de tubos de HUVECs *in vitro*.

Outro estudo recente avaliou a viabilidade celular da anatabina em concentrações de 100 a 400  $\mu\text{M}$ , usando quatro sistemas celulares diferentes: células renais embrionárias humanas (HEK-293), linhagem celular de neuroblastoma de medula óssea humana (SY5Y), linhagem celular humana de leucemia monocítica (THP- 1) e cultivo primários de queratinócitos epidérmicos humanos. A avaliação foi realizada pelo CellTiterGlo, que mediu o nível de ATP em cada amostra tratada após 24 horas de exposição e mostrou viabilidade celular de aproximadamente 80% (MESSINIS et al., 2022). Por outro lado, segundo os dados da literatura, a composição da nanocápsula, incluindo o PLGA, pode afetar significativamente a viabilidade celular ao induzir a apoptose ou inibindo o crescimento celular em comparação com o tratamento com o ativo livre, o que pode ter ocorrido em nosso estudo (WANG et al., 2018; PARTIKEL et al., 2019; CHAICHIAN et al., 2022).

O teste Live/Dead foi realizado com células PC12 tratadas com nicotina 5  $\mu\text{M}$ ; nornicotina 10  $\mu\text{M}$ ; anatabina 1  $\mu\text{M}$ ; anabasina 10  $\mu\text{M}$ , onde os resultados reforçam os observados no teste de MTT, confirmando que as nanocápsulas contendo nicotinóides não foram tóxicas para as células nas concentrações testadas.

Neste estudo, foram investigados os efeitos da nicotina e seus análogos na expressão de citocinas pró-inflamatórias. Nenhuma mudança significativa foi observada. Algumas citocinas têm funções pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e TNF, enquanto outras geralmente têm funções anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10, IL- 11 e TGF- $\beta$  (ALMASRI et al., 2007).

Cui e colaboradores (2022) demonstraram redução significativa na viabilidade de células PC12 tratadas com glicose alta (HG), variando de acordo com a dose e tempo de exposição e co-tratadas com curcumina, resultando em aumento significativo na viabilidade celular. Além disso, a curcumina inibiu a expressão de mediadores inflamatórios, como fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL-6), ao mesmo tempo que induziu a expressão do mediador anti-inflamatório interleucina-10 (IL-10).

Outro estudo investigou a capacidade da nicotina nas concentrações de 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M e 10  $\mu$ M de promover células mononucleares do sangue periférico (PBMC) para produzir citocinas e avaliar sua capacidade de modificar a conversa cruzada entre células cancerígenas imunológicas e HT-29 ou RKO células cancerígenas do cólon. Foi demonstrado que a nicotina causa uma inibição de TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , bem como promove a secreção de IL-1ra por PBMC não estimuladas. Também reduziu a produção de IL-6 e IFN $\gamma$  em células estimuladas por mitógenos. O impacto da nicotina na função imunitária das PBMC tornou-se evidente quando estas células foram desafiadas com células de carcinoma do cólon HT-29 para produção de citocinas. Foi observada inibição na secreção das citocinas pró-inflamatórias TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2 e IFN $\gamma$ , enquanto a produção de IL-6 permaneceu inalterada. Por outro lado, a produção de citocinas pelas PBMCs induzida por células RKO não foi afetada pela nicotina em nenhuma das concentrações testadas, sugerindo uma resposta imune específica da célula (DJALDETTI e BESSLER, 2017).

Em outro estudo, culturas de astrócitos fetais humanos foram expostos a IL-1 $\beta$  humana recombinante e tratados simultaneamente com diferentes concentrações de nicotina (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 100  $\mu$ M). Os sobrenadantes celulares foram coletados para analisar os perfis de citocinas e colinesterase. Foi demonstrado que o tratamento com nicotina limita de forma dependente a produção de citocinas pró-inflamatórias críticas por astrócitos humanos ativados. Foi observada uma redução significativa na produção de IL-6 (60,5  $\pm$  3,3% de inibição), IL-1 $\beta$  (42,4  $\pm$  1,7% de inibição) e TNF- $\alpha$  (68,9  $\pm$  7,7% de inibição). Além disso, também houve inibição na produção da quimiocina IL-8 (31,4  $\pm$  8,5% de inibição), IL-13 (34,243  $\pm$  4,9% de inibição), quando a concentração de nicotina era de 100  $\mu$ M (REVATHIKUMAR et al., 2016).

Anteriormente, em nosso grupo de pesquisa foram produzidas nanocápsulas de Eudragit contendo nicotina. Os testes *in vitro* mostraram que o tratamento com nanocápsulas reduziu a viabilidade celular, sugerindo que o Eudragit pode ser prejudicial para elas, pois as células foram capazes de sobreviver quando tratados com nicotina livre. O ensaio de ELISA mostrou um aumento na expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-1, reforçando a hipótese de que as nanocápsulas eram tóxicas para as células PC12. No entanto, o grupo de células tratadas

com menor concentração de nanocápsulas contendo nicotina (100  $\mu$ M) apresentou redução da expressão de TNF- $\alpha$ , sugerindo que as mesmas atenuaram a inflamação induzida (ALBRECHT et al., 2021).

No presente estudo, foram avaliados os níveis de expressão de IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em células PC12 tratadas com nicotínóides. Ainda assim, não foi observada variação na expressão de citocinas, possivelmente devido às baixas concentrações utilizadas. Esses resultados contribuem para o conhecimento sobre os mecanismos de ação dos nicotínóides, enfatizando a sensibilidade das respostas celulares às diferentes concentrações e condições experimentais. Além disso, é relevante considerar que a análise foi conduzida em células PC12, e é possível que esses resultados possam variar em outros tipos de células ou em um contexto *in vivo* mais complexo. Portanto, consideramos as limitações da análise centrada em apenas um tipo de célula e a necessidade de realizar estudos adicionais envolvendo uma variedade de linhagens celulares para obter uma compreensão mais abrangente dos efeitos dos nicotínóides na expressão de citocinas. Ainda, é essencial expandir as análises para modelos mais fisiológicos, como estudos em modelos animais, para compreender melhor os efeitos dos nicotínóides na regulação da resposta inflamatória em interações celulares e sistêmicas.

## 6. CONCLUSÕES

A primeira revisão enfatizou a capacidade da nanotecnologia de melhorar a entrega de medicamentos neuroprotetores e anti-inflamatórios, essenciais para a recuperação após a lesão medular, enquanto identificou a necessidade contínua de ensaios clínicos robustos para validar sua eficácia clínica. Por outro lado, a segunda revisão destacou o papel das nanotecnologias poliméricas na superação do desafio de encapsular moléculas hidrofílicas, ressaltando tanto métodos convencionais quanto novas tecnologias de emulsificação para produzir nanoemulsões que são promissoras para aplicações em várias áreas.

Na parte experimental, foram formuladas com sucesso nanocápsulas poliméricas de PLGA inovadoras contendo nicotina, nornicotina, anatabina e anabasina, usando o método de nanoprecipitação. As nanocápsulas exibiram tamanho nanométrico, boa eficiência de encapsulação e perfil de liberação sustentada. Além disso, as nanocápsulas apresentaram boa estabilidade durante o armazenamento pelo período de 30 dias. No tratamento *in vitro* de células PC12 com as nanocápsulas foi possível demonstrar que tanto as nanocápsulas contendo os nicotínóides quanto o PLGA não foram tóxicos para as células. Porém, não foi possível observar atividade anti-inflamatória nessas células. Portanto, mais estudos são necessários para mostrar as propriedades promissoras dos nicotinoídes para o tratamento de doenças do SNC.

## 7. PERSPECTIVAS

- ✓ Realizar o estudo da atividade anti-inflamatória das nanocápsulas contendo nicotina, nornicotina, anatabina e anabasina em diferentes linhagens celulares;
- ✓ Avaliar a eficácia das nanocápsulas desenvolvidas na regulação neuroinflamatória em modelo animal de lesão de medula espinal.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, R.; SHINEH, G.; MOBARAKI, M. et al. Structural parameters of nanoparticles affecting their toxicity for biomedical applications: a review. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 25, n. 3, p. 43, 2023.

ABDO, W.; HAZIRI, I.; DMERDASH, M. et al. Anatabine attenuates ovalbumin-induced asthma via oxidative stress and inflammation mitigation and Nrf2/HO-1 signaling upregulation in rats. **Life Sciences**, v. 308, p. 120954, 2022.

ADAMSKI, Z.; BLYTHE, L. L.; MILELLA, L.; BUFO, S. A. Biological activities of alkaloids: from toxicology to pharmacology. **Toxins**, v. 12, n. 4, p. 210, 2020.

AHMAD, A.; ASHRAF, S.; KOMAI, S. Optogenetics applications for treating spinal cord injury. **Asian Spine Journal**, v. 9, n. 2, p. 299-305, 2015.

ALBRECHT, C. L.; SPERLING, L. E.; BRAGHIROLI, D. I.; PRANKE, P. Characterization, cytotoxicity and anti-inflammatory effect evaluation of nanocapsules containing nicotine. **Bioengineering**, v. 8, n. 11, p. 172, 2021.

ALIJEVIC, O.; McHUGH, D.; RUFENER, L. et al. An electrophysiological characterization of naturally occurring tobacco alkaloids and their action on human  $\alpha 4\beta 2$  and  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors. **Phytochemistry**, v. 170, p. 112187, 2020.

ALMASRI, A.; WISITHPHROM, K.; WINDSOR, L. J.; OLSON, B. Nicotine and lipopolysaccharide affect cytokine expression from gingival fibroblasts. **Journal of Periodontology**, v. 78, n. 3, p. 533-541, 2007.

ALSHAWWA, S. Z.; KASSEM, A. A.; FARID, R. M. et al. Nanocarrier drug delivery systems: characterization, limitations, future perspectives and implementation of artificial intelligence. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 4, p. 883, 2022.

ANDERSON, M. A.; O'SHEA, T. M.; BURDA, J. E. et al. Required growth facilitators propel axon regeneration across complete spinal cord injury. **Nature**, v. 561, n. 7723, p. 396-400, 2018.

ANDERSON, K. D.; WILSON, J. R.; KORUPOLU, R. et al. Multicentre, single-blind randomized controlled trial comparing MyndMove neuromodulation therapy with conventional therapy in traumatic spinal cord injury: a protocol study. **BMJ Open**, v. 10, n. 9, p. e039650, 2020.

ANJUM, A.; YAZID, M. D.; DAUD, M. F. et al. Spinal cord injury: pathophysiology, multimolecular interactions, and underlying recovery mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 20, p. 7533, 2020.

ANTON, N.; BENOIT, J.P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates - A review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, n. 3, p. 185-199, 2008.

ANWAR, M. A.; AL SHEHABI, T. S.; EID, A. H. Inflammogenesis of secondary spinal cord injury. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 10, p. 98, 2016.

ARYAL, B.; RAUT, B. K.; BHATTARAI, S. et al. Potential therapeutic applications of plant-derived alkaloids against inflammatory and neurodegenerative diseases. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–18, 2022.

ÁVILA, M. I.; ALONSO-MORALES, N.; BAEZA, J. A. et al. High load drug release systems based on carbon porous nanocapsule carriers. Ibuprofen case study. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 8, n. 24, p. 5293-5304, 2020.

BALON, K.; WIATRAK, B. PC12 and THP-1 cell lines as neuronal and microglia model in neurobiological research. **Applied Sciences**, v. 11, n. 9, p. 3729, 2021.

BAMRUNGSAP, S.; ZHAO, Z.; CHEN, T. et al. Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. **Nanomedicine**, v. 7, n. 8, p. 1253-1271, 2012.

BISWAS, A.; KUMAR, S.; CHOUDHURY, A. D. et al. Polymers and their engineered analogs for ocular drug delivery: Enhancing therapeutic precision. **Biopolymers**, p. e23578, 2024.

BOMMAKANTI, V.; BANERJEE, M.; SHAH, D. et al. An overview of synthesis, characterization, applications and associated adverse effects of bioactive nanoparticles. **Environmental Research**, v. 214, p. 113919, 2022.

BORAIAH, V.; KUMAR, S. A. S. Spinal cord injury. **International Journal of Orthopaedics Sciences**, v. 8, n. 1, p. 469-471, 2022.

BRAR, S. K.; VERMA, M. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 4-17, 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de atenção à saúde. Departamento de ações programáticas estratégicas e departamento de atenção especializada. Diretrizes de Atenção à Pessoa com Lesão Medular. 2013.

BUNDSCHUH, M.; FILSER, J.; LÜDERWALD, S. et al. Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to?. **Environmental Sciences Europe**, v. 30, p. 1-17, 2018.

CAMPOS, I. M. F.; SANTOS, T. M.; CUNHA, G. M. F. et al. Preparation and release characteristics of dexamethasone acetate loaded organochlorine-free poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 23, 2014.

CAPOGROSSO, M.; MILEKOVIC, T.; BORTON, D. et al. A brain–spine interface alleviating gait deficits after spinal cord injury in primates. **Nature**, v. 539, n. 7628, p. 284-288, 2016.

CARLSON, N.G.; ROJAS, M.A.; REDD, J.W. et al. Cyclooxygenase-2 expression in oligodendrocytes increases sensitivity to excitotoxic death. **Journal of Neuroinflammation**, v. 7, n. 25, 2010.

CARVALHO, P. M.; FELÍCIO, M. R.; SANTOS, N. C. et al. Application of light scattering techniques to nanoparticle characterization and development. **Frontiers in chemistry**, v. 6, p. 237, 2018.

CASTRO, P. A. R.; KOGEL, U.; SASSO, G. L.; PHILLIPS, B. W. et al. Anatabine ameliorates intestinal inflammation and reduces the production of pro-inflammatory factors in a dextran sulfate sodium mouse model of colitis. **Journal of Inflammation**, v. 17, n. 29, 2020.

CHAICHIAN, S.; KASHI, A. M.; TEHERMANESH, K. et al. Effect of PLGA Nanoparticle-Mediated Delivery of miRNA 503 on The Apoptosis of Ovarian Endometriosis Cells. **Cell Journal (Yakhteh)**, v. 24, n. 11, p. 697, 2022.

CUI, Y.; SONG, H. T.; ZHANG, P. et al. Curcumin protects PC12 cells from a high glucose-induced inflammatory response by regulating the miR-218-5p/TLR4 axis. **Medicine**, v. 101, n. 40, p. e30967, 2022.

DAVIS, K. C.; MESCHEDE-KRASA, B.; CAJIGAS, I. et al. Design-development of an at-home modular brain-computer interface (BCI) platform in a case study of cervical spinal cord injury. **Journal of Neuroengineering and Rehabilitation**, v. 19, n. 1, p. 53, 2022.

DE JONG, W. H.; BORM, P. J. A. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. **International Journal of Nanomedicine**, v. 3, n. 2, p. 133-149, 2008.

DJALDETTI, M.; BESSLER, H. Nicotine modifies cytokine production by human mononuclears stimulated by colon cancer cells. **Colorectal Cancer**, v. 3, n. 2, p. 10.21767, 2017.

DOLCI, S.; MANNINO, L.; BOTTANI, E. et al. Therapeutic induction of energy metabolism reduces neural tissue damage and increases microglia activation in severe spinal cord injury. **Pharmacological Research**, v. 178, p. 106149, 2022.

DOMINGUES, H. S.; PORTUGAL, C. C.; SOCODATO, R.; RELVAS, J. B. Oligodendrocyte, astrocyte, and microglia crosstalk in myelin development, damage, and repair. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 4, p. 71, 2016.

DOS SANTOS, P. P.; FLÔRES, S. H.; DE OLIVEIRA RIOS, A.; CHISTÉ, R. C. Biodegradable polymers as wall materials to the synthesis of bioactive compound nanocapsules. **Trends in Food Science & Technology**, v. 53, p. 23-33, 2016.

EL-HELLANI, A.; EL-HAGE, R.; BAALBAKI, R. et al. Free-base and protonated nicotine in electronic cigarette liquids and aerosols. **Chemical Research in Toxicology**, v. 28, n. 8, p. 1532-1537, 2015.

FIROUZI-AMANDI, A.; DADASHPOUR, M.; NOURI, M. et al. Chrysin-nanoencapsulated PLGA-PEG for macrophage repolarization: Possible application in tissue regeneration. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 105, p. 773-780, 2018.

FONTANA, M. C.; CORADINI, K.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Nanocapsules prepared from amorphous polyesters: effect on the physicochemical characteristics, drug release, and photostability. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, n. 5, p. 3091-3099, 2010.

FU, Y.; KAO, W. J. Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 4, p. 429-444, 2010.

GALINDO-RODRIGUEZ, S. A.; ALLEMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Polymeric nanoparticles for oral delivery of drugs and vaccines: a critical evaluation of in vivo studies. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 22, n. 5, p. 419-463, 2005.

GANZER, P. D.; COLACHIS, S. C.; SCHWEMMER, M. A. et al. Restoring the sense of touch using a sensorimotor demultiplexing neural interface. **Cell**, v. 181, n. 4, p. 763-773, 2020.

GEMMA, M.; CALVI, M. R. Trauma of the Central Nervous System. **Prognosis of Neurological Diseases**, p. 37-52, 2015.

GENG, Y.; LI, Z.; ZHU, J. et al. Advances in Optogenetics applications for central nervous system injuries. **Journal of Neurotrauma**, v. 40, n. 13-14, p. 1297-1316, 2023.

GHOLAMREZANEZHAD, A.; ASSADI, M.; JADVAR, H. (Ed.). **Radiology-nuclear Medicine Diagnostic Imaging: A Correlative Approach**. John Wiley & Sons, 2023.

GHOSH, D.; SAMANTA, S.; CHAKRABORTY, S. **Multifractals and Chronic Diseases of the Central Nervous System**. Springer Singapore, 2019.

GOTO, P. L.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; SANTOS, O. D. H. D. Preparation and characterization of polymeric nanocapsules produced by in situ polymerization from nanoemulsions produced by direct emulsification. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 34, n. 2, p. 228-233, 2013.

GRAHAM, A.; COURT, J. A.; MARTIN-RUIZ, C. M. et al. Immunohistochemical localization of nicotinic acetylcholine receptor subunits in human cerebellum. **Neuroscience**, v. 113, n. 3, p. 493-507, 2002.

GREBENSTEIN, P. E.; ERICKSON, P.; GRACE, M.; KOTZ, C. M. Anatabine, Nornicotine, and Anabasine Reduce Weight Gain and Body Fat through Decreases in Food Intake and Increases in Physical Activity. **Journal of Clinical Medicine**, v. 11, p. 481, 2022.

GUNJAN, M.; ROHAYAH, B. M.; TURANI, T. Nanotechnology a Boon or a Curse: A Review. **Open Access Journal of Toxicology**, v. 1, n. 3, p. 555563, 2017.

GUPTA, R.; XIE, H. Nanoparticles in daily life: applications, toxicity and regulations. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 37, n. 3, 2018.

HALEEM, A.; JAVAID, M.; SINGH, R. P. et al. Applications of nanotechnology in medical field: a brief review. **Global Health Journal**, v. 7, n. 2, p. 70-77, 2023.

HAN, Y.; LAU, Y. L. Nicotine, an anti-inflammation molecule. **Inflammation & Cell Signaling**, v. 1, n. e155, p. 1-8, 2014.

HICKEY, J. W.; SANTOS, J. L.; WILLIFORD, J. M.; MAO, H. Q. Control of polymeric nanoparticle size to improve therapeutic delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 219, p. 536-547, 2015.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 1). **Tropical journal of pharmaceutical research**, v. 12, n. 2, p. 255-264, 2013.

HOU, H. Y.; WANG, Y. S.; XU, J.F.; WANG, B. R. Nicotine promotes contribution of bone marrow-derived cells to experimental choroidal neovascularization in mice. **Experimental Eye Research**, v. 86, n. 6, p. 983-990, 2008.

HU, X.; XU, W.; REN, Y. et al. Spinal cord injury: molecular mechanisms and therapeutic interventions. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, p. 245, 2023.

HUANG, Q.; YE, A.; LI, P.; BAO, J. et al. Nicotine ameliorates inflammatory mediators in RU486 induced preterm labor model through activating cholinergic anti-inflammatory pathway. **Cytokine**, v.160, p. 156054, 2022.

IQBAL, M.; ZAFAR, N.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 496, n. 2, p. 173-190, 2015.

KAUR, J.; RAUTI, R.; NISTRU, A. Nicotine-mediated neuroprotection of rat spinal networks against excitotoxicity. **European Journal of Neuroscience**, v. 47, n. 11, p. 1353-1374, 2018.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 908-931, 2019.

KHANAL, S.; ADHIKARI, U.; RIJAL, N. P. et al. pH-responsive PLGA nanoparticle for controlled payload delivery of diclofenac sodium. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 7, n. 3, p. 21, 2016.

KENNETH, K. N. G.; NEVEN, A.; MICHAEL, A. B.; ALISON, C. H.; HEATHER, S. Local delivery of nicotine does not mitigate fibrosis but may lead to angiogenesis. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 26, n. 3, p. 349-358, 2011.

KIM, D. H.; CHO, H. J.; PARK, C. Y. et al. Transplantation of PSA-NCAM-positive neural precursors from human embryonic stem cells promotes functional recovery in an animal model of spinal cord injury. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 19, n. 6, p. 1349-1358, 2022.

KIM, J. W.; LIM, C. W.; KIM, B. Effects of nicotine on corneal wound healing following acute alkali burn. **PLoS One**, v. 12, n. 6, p. e0179982, 2017.

KRONER, A.; ALMANZA, J. R. Role of microglia in spinal cord injury. **Neuroscience Letters**, v. 709, p. 134370, 2019.

KRUCOFF, M. O.; MILLER, J. P.; SAXENA, T. et al. Toward functional restoration of the central nervous system: A review of translational neuroscience principles. **Neurosurgery**, v. 84, n. 1, p. 30-40, 2019.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

KUMARI, A.R.; SOBHA, K. Nanobiotechnology as a prospective approach for safe environmental remediation – a review. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, n. 4, p. 69-95, 2013.

LEE, J. H.; YEO, Y. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. **Chemical Engineering Science**, v. 125, p. 75-84, 2015.

LEE, M. Y.; CHEN, L.; TOBOREK, M. Nicotine attenuates iNOS expression and contributes to neuroprotection in a compressive model of spinal cord injury. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, n. 4, p. 937-947, 2009.

LETCHFORD, K.; BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, n. 3, p. 259-269, 2007.

LIDDELOW, S. A.; BARRES, B. A. Regeneration: not everything is scary about a glial scar. **Nature**, v. 532, p. 182, 2016.

LIU, Z.; YANG, Y.; HE, L. et al. High-dose methylprednisolone for acute traumatic spinal cord injury: a meta-analysis. **Neurology**, v. 93, n. 9, p. e841-e850, 2019.

MESSINIS, D. E.; POUSSIN, C.; LATINO, D. A. et al. Systems biology reveals anatabine to be an NRF2 activator. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 1011184, 2022.

MORAES, C. M.; DE PAULA, E.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Physicochemical Stability of Poly(lactide-co-glycolide) Nanocapsules Containing the Local Anesthetic Bupivacaine. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 6, p. 995-1000, 2010.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1-2, p. 113-142, 2010.

MORIN, A.; MOUZON, B.; FERGUSON, S. et al. A 3-month-delayed treatment with anatabine improves chronic outcomes in two different models of repetitive mild traumatic brain injury in hTau mice. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 7900, 2021.

NAGOSHI, N.; KHAZAEI, M.; AHLFORS, J. E. et al. Human spinal oligodendrogenic neural progenitor cells promote functional recovery after spinal cord injury by axonal remyelination and tissue sparing. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 7, p. 806, 2018.

NEJATI-KOSHKI, K.; MORTAZAVI, Y.; PILEHVAR-SOLTANAHMADI, Y.; SHEORAN, S.; ZARGHAMI, N. An update on application of nanotechnology and stem cells in spinal cord injury regeneration. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 90, p. 85-92, 2017.

NICOLA, F. C.; MARQUES, M. R.; ODORCYK, F. et al. Neuroprotector effect of stem cells from human exfoliated deciduous teeth transplanted after traumatic spinal cord injury involves inhibition of early neuronal apoptosis. **Brain Research**, v. 1663, p. 95-105, 2017.

NICOLA, F. C.; MARQUES, M. R.; ODORCYK, F. et al. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth modulate early astrocyte response after spinal cord contusion. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 1, p. 748-760, 2019.

OSTOLSKA, I.; WIŚNIEWSKA, M. Application of the zeta potential measurements to explanation of colloidal Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> stability mechanism in the presence of the ionic polyamino acids. **Colloid and Polymer Science**, v. 292, p. 2453-2464, 2014.

PARIS, D.; BEAULIEU-ABDELAHAD, D.; BACHMEIER, C. et al. Anatabine lowers Alzheimer's A $\beta$  production in vitro and in vivo. **European Journal of Pharmacology**, v. 670, n. 2-3, p. 384-391, 2011.

PARTIKEL, K.; KORTE, R.; MULAC, D. et al. Serum type and concentration both affect the protein-corona composition of PLGA nanoparticles. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 10, n. 1, p. 1002-1015, 2019.

PATRA, J. K.; DAS, G.; FRACETO, L. F. et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 16, p. 1-33, 2018.

PONS, M.; MARIN-CASTANO, M. E. Nicotine increases the VEGF/PEDF ratio in retinal pigment epithelium: a possible mechanism for CNV in passive smokers with AMD. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 52, n. 6, p. 3842-3853, 2011.

PRÜSS, H.; TEDESCHI, A.; THIRIOT, A.; LYNCH, L.; LOUGHHEAD, S. M. et al. Spinal cord injury-induced immunodeficiency is mediated by a sympathetic-neuroendocrine adrenal reflex. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 11, p. 1549-1559, 2017.

PubChem substance and compound databases. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, acesso em 22 de abril de 2024.

RAKHECHA, B.; AGNIHOTRI, P.; DAKAL, T. C. et al. Anti-inflammatory activity of nicotine isolated from Brassica oleracea in rheumatoid arthritis. **Bioscience Reports**, v. 42, n.4, p. BSR20211392, 2022.

RAMAZANI, F.; CHEN, W.; VAN NOSTRUN, C. F. et al. Strategies for encapsulation of small hydrophilic and amphiphilic drugs in PLGA microspheres: state-of-the-art and challenges. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 499, n. 1-2, p. 358-367, 2016.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 7, p. 887-913, 2011.

RAVIKUMAR, R.; FUGACCIA, I.; SCHEFF, S. W. et al. Nicotine attenuates morphological deficits in a contusion model of spinal cord injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 22, n. 2, p. 240-251, 2005.

REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 8-21, 2006.

REIS, K. P.; SPERLING, L. E.; TEIXEIRA, C. et al. Application of PLGA/FGF-2 coaxial microfibers in spinal cord tissue engineering: an in vitro and in vivo investigation. **Regenerative Medicine**, v. 13, n. 7, p. 785-801, 2018.

REVATHIKUMAR, P.; BERGQVIST, F.; GOPALAKRISHNAN, S. et al. Immunomodulatory effects of nicotine on interleukin 1 $\beta$  activated human astrocytes and the role of cyclooxygenase 2 in the underlying mechanism. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, p. 1-13, 2016.

RODRIGUES, L. P.; IGLESIAS, D.; NICOLA, F. C. et al. Transplantation of mononuclear cells from human umbilical cord blood promotes functional recovery after traumatic spinal cord injury in Wistar rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, p. 49-57, 2012.

ROY, A.; SINGH, M. S.; UPADHYAY, P.; BHASKAR, S. Combined chemo-immunotherapy as a prospective strategy to combat cancer: a nanoparticle based approach. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 5, p. 1778-1788, 2010.

RUAN, S.; XIE, J.; WANG, L. et al. Nicotine alleviates MPTP-induced nigrostriatal damage through modulation of JNK and ERK signaling pathways in the mice model of Parkinson's disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, p. 1088957, 2023.

SAHIN, A.; SPIROUX, F.; GUEDON, I. et al. Using PVA and TPGS as combined emulsifier in nanoprecipitation method improves characteristics and anticancer activity of ibuprofen loaded PLGA nanoparticles. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 72, n. 9, p. 525-528, 2017.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.; FREITAS, L.D.L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726–737, 2003.

SCHELD, M. W.; WHITLEY, R. J.; MARRA, C. M. (Ed.). **Infections of the central nervous system**. Lippincott Williams & Wilkins, 2014.

SCHOELLER, S. et al. Abordagem multiprofissional em lesão medular: saúde, direito e tecnologia. **Florianópolis: Publicação do IFSC**, v. 200, 2016.

SEVEN, F.; GÖLCEZ, T.; YARALI, Z. B. et al. Guiding neural extensions of PC12 cells on carbon nanotube tracks dielectrophoretically formed in poly (ethylene glycol) dimethacrylate. **RSC Advances**, v. 10, n. 44, p. 26120-26125, 2020.

SHEN, J.; BURGESS, D. J. In vitro dissolution testing strategies for nanoparticulate drug delivery systems: recent developments and challenges. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 3, p. 409-415, 2013.

SIBI, G.; VENKATEGOWDA, A.; GOWDA, L. Isolation and characterization of antimicrobial alkaloids from Plumeria alba flowers against food borne pathogens. **American Journal of Life Sciences**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2014.

SILVA, A. M.; ALVARADO, H. L.; ABREGO, G. et al. In vitro cytotoxicity of oleanolic/ursolic acids-loaded in PLGA nanoparticles in different cell lines. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 8, p. 362, 2019.

SINGH, R.; LILLARD JR, J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 86, n. 3, p. 215-223, 2009.

SOBRIDO-CAMEÁN, D.; BARREIRO-IGLESIAS, A. Role of caspase-8 and Fas in cell death after spinal cord injury. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, p. 101, 2018.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1-2, p. 1-20, 2001.

SUR, S.; RATHORE, A.; DAVE, V. et al. Recent developments in functionalized polymer nanoparticles for efficient drug delivery system. **Nano-Structures & Nano-Objects**, v. 20, p. 100397, 2019.

TANEJA, P.; SHARMA, S.; SINHA, V. B.; YADAV, A. K. Advancement of nanoscience in development of conjugated drugs for enhanced disease prevention. **Life sciences**, v. 268, p. 118859, 2021.

VERKHRATSKY, A.; BUTT, A. **Neuroglia: function and pathology**. Elsevier, 2023.

VRIGNAUD, S.; BENOIT, J.P.; SAULNIER, P. Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 33, p. 8593-8604, 2011

WALLACE, S. J.; LI, J.; NATION, R. L.; BOYD, B. J. Drug release from nanomedicines: selection of appropriate encapsulation and release methodology. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 2, p. 284-292, 2012.

WANG, J. T.; MEDRESS, Z. A.; BARRES, B. A. Axon degeneration: Molecular mechanisms of a self-destruction pathway. **Journal of Cell Biology**, v. 196, p. 7-18, 2012.

WANG, Z.; DING, J.; MA, X.; LUO, S. Selective ultrasound contrast enhancement in the tumor by nanocapsules with perfluorooctylbromide: effect of PLGA-PEG proportion. **RSC Advances**, v. 8, n. 32, p. 17958-17966, 2018.

WESTMAN, M.; ENGSTRÖM, M.; CATRINA, A. I.; LAMPA, J. Cell specific synovial expression of nicotinic alpha 7 acetylcholine receptor in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 70, n. 2, p. 136-140, 2009.

WILLETT, F. R.; AVANSINO, D. T.; HOCHBERG, L. R. et al. High-performance brain-to-text communication via handwriting. **Nature**, v. 593, n. 7858, p. 249-254, 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International perspectives on spinal cord injury**. Geneva: WHO, 2013.

XIA, W.; KOLLI, A. R.; KOSHIBU, K. et al. In Vivo Profiling of a Natural Alkaloid, Anatabine, in Rodents: Pharmacokinetics and Anti-Inflammatory Efficacy. **Journal of Natural Products**, v. 84, p. 1012-1021, 2021.

XIE, D.; DENG, T.; ZHAI, Z. et al. The cellular model for Alzheimer's disease research: PC12 cells. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 15, p. 1016559, 2023.

YANG, L.; SHEN, J.; LIU, C. et al. Nicotine rebalances NAD<sup>+</sup> homeostasis and improves aging-related symptoms in male mice by enhancing NAMPT activity. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 900, 2023.

ZABRODSKII, P. F.; GROMOV, M. S.; MASLYAKOV, V. V. Effect of  $\alpha 7n$ -acetylcholine receptor activation and antibodies to TNF- $\alpha$  on mortality of mice and concentration of proinflammatory cytokines during early stage of sepsis. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 159, n. 6, p. 740-742, 2015.

ZHANG, Y.; MA, A.; WANG, L.; ZHAO, B. Nornicotine and nicotine induced neovascularization via increased VEGF/PEDF. **Ophthalmic Research**, v. 55, n. 3, p. 163-163, 2016.

ZHAO, W.; LI, J.; JIN, K. et al. Fabrication of functional PLGA-based electrospun scaffolds and their applications in biomedical engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 59, p. 1181-1194, 2016.

ZHENG, Q.; ZHANG, J.; ZUO, X. et al. Photobiomodulation promotes neuronal axon regeneration after oxidative stress and induces a change in polarization from M1 to M2 in macrophages via stimulation of CCL2 in neurons: relevance to spinal cord injury. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 71, p. 1290-1300, 2021.

ZHOU, Y.; ZUO, X.; LI, Y et al. Nicotine inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$  induced IL-6 and IL-8 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatology International**, v. 32, p. 97-104, 2012.

ZIELIŃSKA, A; CARREIRÓ, F.; OLIVEIRA, A. M. et al. Polymeric nanoparticles: production, characterization, toxicology and ecotoxicology. **Molecules**, v. 25, n. 16, p. 3731, 2020.

ZIMMERMANN, R.; ALVES, Y. V.; SPERLING, L. E.; PRANKE, P. Nanotechnology for the treatment of spinal cord injury. **Tissue Engineering: Part B**, v. 27, n. 4, p. 353-365, 2021.

ZIMMERMANN, R., LEAL, B. B. J., BRAGHIROLI, D. I.; PRANKE, P. Production of nanostructured systems: Main and innovative techniques. **Drug Discovery Today**, v. 28, n. 2, p. 103454, 2023.