

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA  
PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
FISILOGIA E FARMACOLOGIA

**O AGONISTA GABA<sub>A</sub> MUSCIMOL ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS:  
PADRONIZAÇÃO DE UMA METODOLOGIA PARA INTERVENÇÃO  
FARMACOLÓGICA A LONGO PRAZO EM NÚCLEOS DO SISTEMA  
NERVOSO CENTRAL**

LUIZ GONZAGA DA SILVA JUNIOR

BELO HORIZONTE  
2010

**Luiz Gonzaga da Silva Junior**

O AGONISTA GABA<sub>A</sub> MUSCIMOL ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS:  
PADRONIZAÇÃO DE UMA METODOLOGIA PARA INTERVENÇÃO  
FARMACOLÓGICA A LONGO PRAZO EM NÚCLEOS DO SISTEMA  
NERVOSO CENTRAL

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA  
DE PÓS GRADUAÇÃO EM FISIOLÓGIA E FARMACOLOGIA  
DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS PARA  
A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS

ORIENTADOR: PROF. Dr. MARCO ANTÔNIO PELIKY FONTES  
CO-ORIENTADOR: PROF. Dr. FREDERIC FREZARD

BELO HORIZONTE  
2010

## **AGRADECIMENTOS**

- A Deus, por me permitir chegar até aqui, me ensinando a superar todas as dificuldades.
- À minha querida Michelle, que me deu forças para sempre continuar e alcançar este objetivo. Obrigado por tudo.
- Aos meus pais, pelo seu exemplo e dedicação, por estar sempre ao meu lado e por ter me ensinado o caminho da dignidade e honestidade.
- Ao meu irmão, Charles, pelo apoio de sempre.
- Aos meus grandes amigos Iacomini, Gustavo Henrique, Falcão e Vaca. Sua presença foi fundamental para todas as superações.
- Aos velhos amigos do laboratório, Rodrigo, Dan, Fabrício, Ary e Tchê, Antonela.
- Aos novos amigos, Roberto Lautner, Ana Paula Bahia, Aline, Nathália, Gisele, Carlos, Erica.
- Ao Fiat Verde (Adriano, Lucas e Gabriel) pelos bons momentos passados.
- À professora Cíntia Demicheli pelo auxílio.
- Ao professor Cândido Celso Coimbra e ao Samuel Penna Wanner, pela colaboração no meu trabalho.

- Ao Zezé, sempre presente para ajudar a todos.
- Aos professores Ubiratan Barros de Melo e Raul de Barros Neto pelas oportunidades e confiança, pelos exemplos de competência e honestidade na docência em fisiologia.
- À professora Leonor da Mata Machado, grandemente responsável por tudo o que me tornei.
- Aos professores Andréa, Robson e Maria José, por sua colaboração na minha formação.
- À Celinha por sua competência e por estar sempre disposta a ajudar sempre que precisei.
- A todos os professores, amigos e colegas do Departamento. Obrigado pela amizade e apoio de todos vocês.
- Ao Departamento de Fisiologia e Biofísica, pelo apoio e confiança depositados em mim.
- Ao professor Frederic Frezard pela confiança, paciência, serenidade e compreensão, que me fortaleceram por todo o caminho.
- Ao professor Marco Antônio, pela oportunidade.
- Às agências de fomento à pesquisa: CNPq, CAPES, FAPEMIG.

## LISTA DE ABREVIATURAS

3V	Terceiro ventrículo
ANOVA	Análise de variância
BMI	Bicuculina methiodide
bpm	batimentos por minuto
DMC	Porção compacta do DMH
DMD	Porção difusa do DMH
DMH	Hipotálamo dorsomedial
DRV's	Vesículas de desidratação e reidratação
DSPC	Diestearoil fosfatidilcolina
DSPE	Diestearoil fosfatidiletanolamina
EPM	Erro padrão da média
f	Fórnix
FC	Frequência cardíaca
GABA	Ácido gama amino butírico
GAD	Glutamato descarboxilase
MLV's	Vesículas grandes multilamelares
mmHg	milímetros de mercúrio
MWCO	Limite de separação por peso molecular
NaCl	Cloreto de sódio
PAM	Pressão arterial média
PEG	Polietileno glicol

PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
SMF	Sistema mononuclear fagocitário
SNC	Sistema nervoso central
SUV's	Vesículas pequenas unilamelares
Tc	Temperatura de transição de fase

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1. Estrutura e Características dos Lipossomas .....</b>	<b>12</b>
<b>1.2. Uso de Lipossomas como Veículos de Princípios Ativos no SNC .....</b>	<b>17</b>
<b>1.3. Papel do GABA no Sistema Nervoso Central .....</b>	<b>18</b>
<b>1.4. O Hipotálamo e a Resposta Cardiovascular ao Estresse .....</b>	<b>20</b>
<b>1.5. O Hipotálamo Dorsomedial e a Resposta Cardiovascular ao Estresse Emocional.....</b>	<b>22</b>
<b>1.6. O GABA no SNC e o Controle do Sistema Cardiovascular .....</b>	<b>24</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
<b>2.1. Objetivo Geral .....</b>	<b>25</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos.....</b>	<b>25</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1. Preparação dos lipossomas .....</b>	<b>27</b>
<b>3.2. Caracterização dos Lipossomas .....</b>	<b>31</b>
3.2.1. Determinação do tamanho das partículas .....	31
3.2.2. Determinação da concentração do muscimol nos lipossomas .....	31
3.2.3. Determinação da taxa de liberação dos lipossomas <i>in vitro</i> .....	32
<b>3.3. Efeitos Cardiovasculares dos Lipossomas Contendo Muscimol Após Microinjeção Central.....</b>	<b>32</b>
3.3.1. Animais .....	32
3.3.3. Confeção de cânulas injetoras e procedimento de microinjeção.....	34
3.4. Lesões eletrolíticas bilaterais do hipotálamo dorsomedial.....	35
3.5. Canulação da artéria aorta abdominal .....	36
3.6. Medida dos parâmetros cardiovasculares .....	36
3.7. Estresse por jato de ar .....	37

<b>Histologia.....</b>	<b>38</b>
<b>3.8. Análise dos dados .....</b>	<b>39</b>
<b>3.9. Análise estatística.....</b>	<b>40</b>
<b>3.10. Procedimentos experimentais .....</b>	<b>40</b>
Protocolo 1 – Avaliação dos efeitos cardiovasculares produzidos pelo estresse por jato de ar após microinjeção de lipossomas contendo veículo no DMH de ratos .....	40
Protocolo 2 – Avaliação dos efeitos cardiovasculares produzidos pelo estresse por jato de ar após a microinjeção de lipossomas contendo muscimol no DMH de ratos até 420 minutos após a administração .....	41
Protocolo 3 – Avaliação dos efeitos cardiovasculares produzidos pelo estresse por jato de ar após microinjeção de lipossomas contendo muscimol no DMH de ratos 24 horas após a administração .....	42
Protocolo 4 – Avaliação dos efeitos cardiovasculares produzidos pelo estresse por jato de ar após lesão eletrolítica bilateral no DMH .....	43
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1. Características das Preparações de lipossomas .....</b>	<b>44</b>
Protocolo 1 – Avaliação dos efeitos cardiovasculares produzidos pelo estresse por jato de ar após microinjeção de lipossomas contendo veículo no DMH de ratos .....	46
Protocolo 2 – Avaliação dos efeitos cardiovasculares produzidos pelo estresse por jato de ar após a microinjeção de lipossomas contendo muscimol no DMH de ratos até 420 minutos após a administração.....	54
Protocolo 3 – Avaliação dos efeitos cardiovasculares produzidos pelo estresse por jato de ar após microinjeção de lipossomas contendo muscimol no DMH de ratos 24 horas após a administração .....	62

<b>Protocolo 4 – Avaliação dos efeitos cardiovasculares produzidos pelo estresse por jato de ar após lesão eletrolítica bilateral no DMH.....</b>	<b>65</b>
<b>4.2. Análise Histológica.....</b>	<b>68</b>
<b>6. RESUMO .....</b>	<b>84</b>
<b>7. ABSTRACT .....</b>	<b>86</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>88</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O estudo do sistema nervoso central (SNC), suas propriedades funcionais e neuroquímicas é fundamental para o desenvolvimento de alternativas para o tratamento de uma série de patologias relacionadas a esse sistema. Esta é, entretanto, uma tarefa complexa, particularmente quando o estudo visa compreender o papel funcional de populações específicas de neurônios.

Historicamente, o estudo do papel funcional do encéfalo exigiu que diversas metodologias fossem propostas e utilizadas. Entre essas, podem-se destacar os conceitos frenológicos de Franz Gall (1809), que relacionava traços de personalidade com a dimensão de regiões do encéfalo do indivíduo, e os primeiros estudos de ablação experimental, propostos por Charles Bell (1811), que mostrou o envolvimento do cérebro na sensibilidade e percepção (Widmaier, 2006).

Nas últimas décadas, os avanços na pesquisa em neurociência foram consideráveis e permitiram, com o aprimoramento de diferentes técnicas, a identificação de neurônios e caracterização de vários componentes funcionais de diversas populações de neurônios no SNC.

Os neurônios no SNC não são distribuídos aleatoriamente. Na realidade, estes são organizados funcional e anatomicamente em grupos celulares conhecidos como núcleos. Estes podem estar envolvidos nos diversos aspectos do controle sensorial, motor ou motivacional.

O desenvolvimento das técnicas de estudo do SNC proporcionou avaliações cada vez mais específicas. Técnicas de lesão química ou eletrolítica de grupamentos neuronais proporcionavam avaliações em longo prazo nas funções do SNC determinadas por aquelas regiões (Goren et al., 1997). Outras metodologias também são utilizadas com bons resultados, como a estimulação elétrica de regiões do SNC (Goodchild et al., 1982).

A técnica de intervenção em núcleos do SNC por estimulação ou inibição farmacológica vem sendo utilizada com algumas vantagens sobre as outras técnicas. Primeiramente, esta permite o conhecimento não só das características funcionais dos núcleos, mas das propriedades neuroquímicas dos neurônios em estudo. O conhecimento dos neurotransmissores e receptores envolvidos em uma função específica também permite o desenvolvimento de fármacos que possam intervir no funcionamento do sistema, com vistas à funções terapêuticas (Goodchild et al., 1982).

Todos os métodos anteriormente abordados possuem limitações. As técnicas de lesão de núcleos do SNC produzem alterações irreversíveis pela morte neuronal. Os estudos que utilizam estimulação elétrica produzem ativação não somente dos corpos celulares, mas também de axônios de passagem (Goodchild et al., 1982). Apesar da estimulação farmacológica ser vantajosa sobre a estimulação elétrica nesse aspecto, a curta janela temporal de uma resposta funcional produzida pela estimulação elétrica ou química dos neurônios inviabiliza estudos que objetivam avaliar o efeito crônico produzido por intervenções no SNC.

Algumas estratégias metodológicas são empregadas na tentativa de prolongar o tempo de ação de fármacos no SNC. Microinjeções múltiplas e utilização de bombas de infusão osmóticas podem fazer com que a ação de um agonista ou antagonista de neurotransmissores exerça sua ação cronicamente (Hipolito et al.; Pedersen et al., 2009). Em ambos os casos, entretanto, o grande volume de veículo administrado nos núcleos do SNC demandado para a aplicação dessas técnicas acaba produzindo lesão extensa do SNC, que implica que a alteração observada seja devida à presença da lesão, não do fármaco utilizado.

Uma possibilidade metodológica para tornar o efeito de uma intervenção crônica no SNC é a utilização de veículos que possam armazenar essas substâncias e liberá-las de maneira lenta e controlada.

### **1.1. Estrutura e Características dos Lipossomas**

Os lipossomas são nanossistemas carreadores constituídos por vesículas esféricas com uma ou várias camadas lipídicas concêntricas que isolam um ou mais compartimentos aquosos do meio externo (Gregoriadis, 2007). Têm por constituição substâncias não tóxicas, biodegradáveis e praticamente não imunogênicas. A principal característica dos lipossomas são sua capacidade de armazenar compostos solúveis em água em seu compartimento aquoso interno, ou compostos insolúveis em água, armazenando-os em sua membrana. Além disso, compostos encapsulados em lipossomas são protegidos da inativação decorrente da exposição do

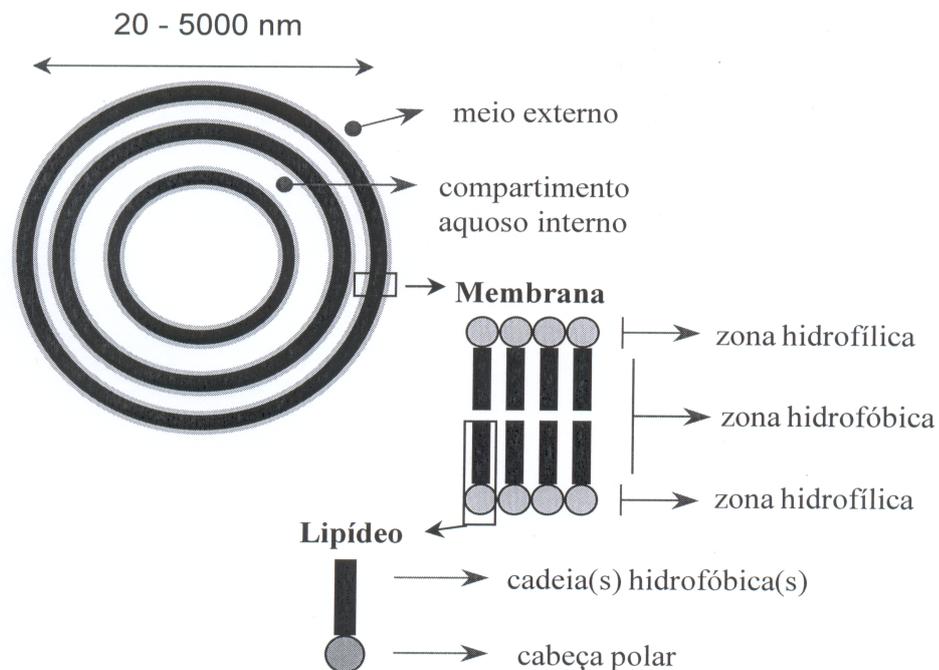
composto ao meio externo. A liberação do composto encapsulado dependerá da permeabilidade da membrana lipossomal ao composto, bem como da depuração dos lipossomas. Essas propriedades também podem ser controladas através da manipulação das características dos lipossomas, tais como: composição lipídica, tamanho das vesículas e das características da sua superfície. (Torchilin, 2005b).

Os primeiros relatos sobre lipossomas foram feitos em 1965, quando Banghan e colaboradores (1965) observaram que a exposição de fosfolipídeos em água fazia com que esses se agrupassem em estruturas lamelares capazes de guardar solutos em seu interior. Essas estruturas foram denominadas lipossomas, e foram inicialmente utilizadas como modelo para o estudo de membranas. Alguns anos mais tarde, a capacidade dos lipossomas em armazenar solutos foi utilizada para o armazenamento de drogas (Gregoriadis et al., 1971; Gregoriadis and Ryman, 1972). Seu potencial como carreador de fármacos e uso na biologia e medicina foi apresentado em 1976 (Gregoriadis, 1976b, a; Frezard et al., 2005b).

Desde então, os lipossomas têm sido amplamente utilizados como veículos de princípios ativos (Frezard et al., 2005). Uma de suas vantagens está no armazenamento de fármacos e liberação gradual em sítios específicos do organismo. Tal recurso permite a liberação controlada de solutos, o que o torna especialmente vantajoso para o uso no SNC, onde as técnicas de microinjeção utilizadas atualmente não permitem que fármacos possam atuar por um longo período de tempo nesse sistema.

Quanto às características dos lipossomas, pode-se classificá-los quanto ao número de camadas, diâmetro das vesículas, acoplamento a polímero de etileno glicol e fluidez da bicamada lipossomal (Frezard et al., 2005a).

O diâmetro médio dos lipossomas varia de 20 a 5000 nm. Os lipossomas podem apresentar ainda uma única camada bilipídica (ou vesículas unilamelares), ou várias camadas bilipídicas, organizadas concêntricamente (vesículas multilamelares). A escolha de uma vesícula uni ou multilamelar vai depender do composto a ser encapsulado. Vesículas unilamelares apresentam um interior com maior volume aquoso, capaz de armazenar uma maior quantidade de substâncias hidrofílicas. Vesículas multilamelares são úteis para a incorporação de substâncias lipofílicas, que serão incorporadas nas membranas lipossomais (Ulrich, 2002) (Figura 1).



**Figura 1:** Representação da estrutura e composição básica de um lipossoma multilamelar

Os lipossomas quando administrados sistemicamente serão depurados ou eliminados via sistema mononuclear fagocitário (SMF) (Ishida et al., 2002). Grande parte do clearance dos lipossomas pelo SMF deve-se à opsonização dos mesmos e reconhecimento pelas células de defesa (Harashima et al., 2002b; Ishida et al., 2002; Ulrich, 2002). A utilização de polímeros de etileno glicol incorporados á membrana lipossomal forma uma camada protetora sobre a superfície do lipossoma, reduzindo seu reconhecimento pelas opsoninas, e conseqüentemente seu clearance (Harashima et al., 2002b; Frezard et al., 2005b; Torchilin, 2005b; Immordino et al., 2006).

A fluidez da membrana dos lipossomas é um importante determinante da sua permeabilidade e conseqüente facilidade ou não da liberação dos compostos encapsulados. Os lipídeos de membrana apresentam duas fases: uma fase fluida ou de “cristal líquido”, onde as moléculas encontram-se com grande liberdade de movimento; e uma fase rígida, ou “gel”, onde as cadeias lipídicas apresentam um estado ordenado, com pouca liberdade de movimento. O fator determinante do estado da fluidez da camada lipossomal é a temperatura. A observância da temperatura de transição de fase ( $T_c$ ) do lipídeo que irá constituir o lipossoma é fundamental para a adequação ao objetivo desejado. Lipídeos com  $T_c$  maiores que a temperatura do meio a ser estudado encontrarão-se em fase “gel”, enquanto aqueles com  $T_c$  menores do que a temperatura do meio a ser estudado encontrarão-se em fase “cristal líquido”. Foi observado que lipossomas com lipídeos em fase “cristal líquido” são mais permeáveis do que aqueles com lipídeos em fase gel. Assim, a

liberação de um composto encapsulado ocorrerá mais lentamente em lipídeos que encontram-se em fase rígida, proporcionando uma ação mais prolongada, e conseqüentemente um efeito mais duradouro da substância administrada (Ulrich, 2002).

O colesterol é um importante componente dos lipossomas. Este, quando acrescentado aos lipídeos para a formação das vesículas tem a capacidade de aumentar a rigidez da membrana na fase “cristal líquido”, enquanto reduz a rigidez e os defeitos estruturais das membranas no estado “gel” (Frezard et al., 2005).

Uma característica fundamental dos lipossomas, que será um fator determinante na escolha dos lipídeos e do método de preparação é a sua capacidade em encapsular as substâncias de interesse, assim como liberar essa substância de maneira controlada. A taxa de encapsulamento da substância pode ser otimizada, e resulta num maior aproveitamento do composto a ser encapsulado. Considerando que o composto não encapsulado é perdido, a maximização da taxa de encapsulamento torna o método de preparação dos lipossomas economicamente mais interessante (Frezard et al., 2005). A liberação de substâncias incorporadas ao compartimento aquoso ocorrerá espontaneamente, sob a influência do gradiente de concentração. A membrana lipossomal age como barreira e limita a difusão da substância para o meio externo ao lipossoma (Frezard et al., 2005). A velocidade de liberação dependerá tanto da fluidez da membrana (observando-se se esta estará em fase cristal líquido ou gel no sistema orgânico), quanto das características físico-químicas do composto encapsulado. Como a permeabilidade da membrana lipossomal pode ser

manipulada pela escolha dos lipídeos, a liberação de uma substância pode ser lentificada ou aumenta de acordo com a necessidade. Em condições fisiológicas, outros fatores tais como a interação de proteínas com as membranas lipossomais e a captação desses lipossomas por células com capacidade endocítica contribuem para a liberação do composto encapsulado (Brown et al., 1981; Ishida et al., 2002; Ulrich, 2002).

## **1.2. Uso de Lipossomas como Veículos de Princípios Ativos no SNC**

A viabilidade da microinjeção de lipossomas no SNC já foi demonstrada com sucesso em estudos anteriores (Silva-Barcellos et al., 2001), com lipossomas que encapsulavam peptídeos angiotensinérgicos. Nesse estudo, diversas preparações de lipossomas foram avaliadas, e lipossomas contendo lipídeos de alta Tc, acoplados a polímeros de etileno glicol 2000 apresentaram tempo de liberação prolongado dos peptídeos, quando comparados aos lipossomas de baixa Tc ou sem a presença dos polímeros de etileno glicol 2000 (convencionais). Foi demonstrado que a Angiotensina-(1-7) encapsulada em lipossomas e microinjetada no bulbo rostral ventrolateral produziu efeitos na pressão arterial e frequência cardíaca, que duraram por até 5 dias (Silva-Barcellos et al., 2001).

Considerando a importância de estudos que envolvam a utilização de microinjeções do agonista GABA<sub>A</sub> muscimol e a possibilidade em prolongar o tempo de ação dessa substância no SNC, é possível que o encapsulamento

do muscimol em lipossomas possa constituir-se em uma ferramenta útil para o estudo em neurociência. Para determinação da viabilidade do estudo dos lipossomas contendo muscimol *in vivo*, nós optamos por fazer o estudo onde sua administração ocorreu em áreas hipotalâmicas reguladoras de respostas envolvendo alterações cardiovasculares ao estresse emocional.

### **1.3. Papel do GABA no Sistema Nervoso Central**

O ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do SNC de mamíferos, apresentando-se virtualmente em todas as áreas encefálicas. A presença dessa substância foi observada na década de 1950, quando aminoácidos livres foram identificados no cérebro de mamíferos, despertando interesse sobre sua função (Bowery and Smart, 2006). Um composto inibitório de natureza desconhecida foi chamado de Fator I (onde "I" representava a natureza inibitória dessa substância) (Florey and McLennan, 1955). Experimentos demonstraram que o fator I continha serina, GABA, ácido glutâmico e ácido aspártico (Florey and Mc, 1959). Experimentos anteriores já sugeriam que o GABA fosse uma substância de natureza inibitória (Hayashi, 1958). Apesar de diversas evidências, o reconhecimento do GABA como neurotransmissor inibitório no SNC de mamíferos somente ocorreu em 1967, quando estudos demonstraram sua natureza inibitória após aplicação via iontoforese em diversos tipos neuronais, em regiões cerebrais de gato (Krnjevic and Schwartz, 1966).

A síntese e metabolismo do GABA possui estreita relação à do glutamato. O GABA é produzido pela descarboxilação do glutamato, via glutamato descarboxilase (GAD). Após liberação na fenda sináptica, o GABA é rapidamente degradado através de uma transaminação catalisada pela GABA transaminase, produzindo novamente glutamato e alfa-cetoglutarato (Farrant, 2001).

O receptor ionotrópico GABA<sub>A</sub> é membro da superfamília de receptores que incluem o receptor nicotínico de acetilcolina, glicina e receptores 5HT<sub>3</sub>. Todos esses receptores são ionotrópicos e associados com eventos de rápida condutância (Bowery and Smart, 2006). O receptor GABA<sub>A</sub> pode ser estimulado por muscimol ou isoguavacina, e a combinação do GABA ou seus agonistas ao receptor GABA<sub>A</sub> produz aumento à condutância ao cloreto, com hiperpolarização subsequente da membrana pós-sináptica. Ao contrário, o receptor GABA<sub>A</sub> pode ser inibido competitivamente pela bicuculina, que estabelece inibição competitiva com o agonista (Goodchild, 1993; Farrant, 2001). Este receptor é encontrado em todo o encéfalo, com maior concentração nos gânglios da base, cerebelo, hipocampo e hipotálamo (Tappaz et al., 1977; Goodchild, 1993).

O agonista GABA<sub>A</sub> muscimol é comumente utilizado para inibição de neurônios do SNC em fatias cerebrais (Yang et al., 2003), animais anestesiados (Fontes et al., 2001) e animais acordados (DiMicco et al., 1986; da Silva et al., 2003; de Menezes et al., 2006). Seu uso na pesquisa tem proporcionado diversos esclarecimentos sobre inúmeras áreas de interesse sobre o SNC. Um ponto negativo sobre os estudos que utilizam o muscimol, assim como outras substâncias no SNC é que, geralmente, essas

substâncias sofrem rápida absorção e metabolismo por parte do organismo. Se o objetivo do estudo for reproduzir condições onde a estimulação ou inibição de um núcleo seja crônica, o estudo será falho, especialmente para compostos de vida curta.

#### **1.4. O Hipotálamo e a Resposta Cardiovascular ao Estresse**

As respostas orgânicas relacionadas ao estresse têm sido foco de estudo há mais de um século. Em 1878, Claude Bernard já postulava sobre a estabilidade do meio interno de um indivíduo, formado pelo líquido orgânico circulante que banhava todos os elementos teciduais (Bernard, 1878). Já no início do século XX, Cannon descreveu estresse como a tentativa do organismo em tentar regular a homeostase porventura acometida pela perda da sua estabilidade decorrente de estímulos aversivos ou ameaçadores ao organismo. Essa reação também foi denominada como reação de fuga ou de luta (Cannon, 1929).

A resposta orgânica adequada ao estresse é vantajosa para a seleção natural, pois provê ao indivíduo a capacidade de antecipar e reagir rapidamente a ameaças. Desta forma, essa resposta facilita a sobrevivência ou o bem estar do organismo, preservando a homeostase por ajustes em curto prazo nas atividades de diversos sistemas (Clark et al., 1997). Quando essa resposta não mantém a homeostase devido à ativação inadequada, inapropriada ou excessiva do sistema compensatório, ocorrem distúrbios

somáticos e psicológicos ao indivíduo (Clark et al., 1997). As dificuldades do organismo em se adaptar às situações de estresse estão ligadas a vários estados patológicos em humanos. Com relação ao sistema cardiovascular estes distúrbios podem incluir hipertensão, arritmias cardíacas, infarto do miocárdio e até mesmo morte súbita (Folkow, 1982; Leor et al., 1996; Davies et al., 1999; Parati et al., 2001; DiMicco et al., 2002; Critchley et al., 2005; Gerin et al., 2005).

O interesse pelo hipotálamo como mediador das respostas ao estresse iniciou-se com os experimentos de Bard (Bard, 1928), que demonstrou que a ativação de componentes responsáveis pelas respostas de fuga ou de luta dependia de um hipotálamo intacto. Desde então, diversos estudos mostraram a participação do hipotálamo na elaboração do comportamento agressivo, integrando os componentes somático, autonômico e neuroendócrino (Chi and Flynn, 1971; Bandler et al., 1972; Lisa et al., 1989; Soltis and DiMicco, 1991; Pacak and Palkovits, 2001).

Um importante componente efetor da resposta ao estresse é o sistema cardiovascular. A descarga em massa do sistema nervoso simpático decorrente da reação de estresse faz com que ocorra a liberação de norepinefrina e epinefrina na circulação (Callahan et al., 1989), implicando nos sinais cardiovasculares clássicos do comportamento de defesa. O resultado é uma resposta pressora (alteração do tônus vascular em leitos específicos) e taquicárdica.

Vários núcleos e subregiões hipotalâmicas têm sido apontados como mediadores da resposta cardiovascular ao estresse, entre eles a região

periventricular do hipotálamo posterior (Schmidt and DiMicco, 1984; DiMicco et al., 1986; Wible et al., 1988), região perifornical (Smith et al., 1990; Diamant et al., 1992) e núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (Callahan et al., 1989; Martin and Haywood, 1993). No entanto, na última década, estudos utilizando técnicas mais precisas de microinjeção de drogas no sistema nervoso central (SNC) sugerem que uma outra região, o hipotálamo dorsomedial (DMH), seja o núcleo envolvido na mediação da resposta cardiovascular ao estresse (para revisão, ver (DiMicco et al., 2002)).

### **1.5. O Hipotálamo Dorsomedial e a Resposta Cardiovascular ao Estresse Emocional**

O DMH foi considerado parte da “área de defesa hipotalâmica”, baseado nos estudos em que a estimulação elétrica nessa região produzia um padrão de ajustes comportamentais e autonômicos similares aos observados durante a reação de estresse defensivo (Hilton, 1979).

Stotz-Potter e colaboradores (Stotz-Potter et al., 1996a) mostraram em seu estudo que a inibição dos neurônios do DMH pelo agonista GABA<sub>A</sub> muscimol reduziu de maneira importante a taquicardia e o aumento de pressão arterial causados pela exposição do rato ao estresse por jato de ar. Esses resultados indicaram que o DMH tem um papel importante na mediação das respostas cardiovasculares ao estresse.

Shekhar (Shekhar, 1993) e Shekhar e colaboradores (Shekhar et al., 1993) observaram em ratos acordados que a ativação do DMH pelos

antagonistas GABAérgicos BMI e picrotoxina produz aumento de frequência cardíaca, pressão arterial e um padrão de comportamento similar ao observado em estados de ansiedade. Esses resultados indicaram que o DMH possui um papel importante na regulação das respostas cardiovasculares e comportamentais ao estresse emocional. Adicionalmente, existem evidências indicando que a disfunção crônica da função GABAérgica no DMH leva ao desenvolvimento de um comportamento similar ao pânico (Shekhar et al., 1996).

Vários estudos sugerem que situações repetidas ou prolongadas de estresse podem resultar em vários estados patológicos, como a hipertensão arterial, arritmias cardíacas, infarto do miocárdio e até mesmo a morte súbita (Amiragova, 1985; Leor et al., 1996; DiMicco et al., 2002). Existem evidências de que a ocorrência de patologias do sistema cardiovascular seja devido a um aumento sustentado de atividade simpática (Lohmeier, 2001), que pode ocorrer devido a um aumento sustentado da atividade neuronal de núcleos envolvidos no controle cardiovascular. Em particular, estudos em animais e humanos mostram que situações de estresse exacerbado produzem aumento sustentado da pressão arterial (Parati et al., 2001; Gerin et al., 2005). Além disso, outros distúrbios do estresse, como o transtorno do pânico apresentam uma correlação positiva com a ocorrência de hipertensão essencial (Davies et al., 1999). Uma metodologia que possibilite uma intervenção em longo prazo em núcleos do SNC envolvidos no controle cardiovascular pode trazer esclarecimentos sobre a gênese ou manutenção de patologias do sistema cardiovascular, inclusive a hipertensão essencial.

## 1.6. O GABA no SNC e o Controle do Sistema Cardiovascular

O GABA é um neurotransmissor inibitório essencial nos circuitos que controlam a função cardiovascular no sistema nervoso central (Gordon and Sved, 2002b). Como já citado anteriormente, a regulação hipotalâmica das respostas cardiovasculares ao estresse está relacionada à participação de receptores GABAérgicos. Horiuchi e colaboradores (Horiuchi et al., 2004) mostraram que os neurônios do DMH são ativados de maneira dose-dependente através da desinibição do DMH com o antagonista GABA<sub>A</sub> bicuculina. Adicionalmente, a enzima glutamato Descarboxilase (GAD) – capaz de catalizar a descarboxilação de glutamato a GABA – foi encontrada abundantemente em áreas hipotalâmicas (Tappaz et al., 1977), e sua presença em ratos espontaneamente hipertensos é reduzida (Kramer et al., 2000). Dessa forma, é possível especular que uma disfunção crônica de GABA nos núcleos hipotalâmicos envolvidos na resposta cardiovascular ao estresse possa ser causa de disfunções do sistema cardiovascular, como arritmias cardíacas e até mesmo hipertensão arterial.

O GABA já foi encapsulado em lipossomas em um estudo que tinha por objetivo a injeção endovenosa das vesículas lipossomais e sua utilização como um sistema transportador do composto encapsulado até o SNC (Loeb et al., 1986). Ainda não foram realizados estudos, entretanto, que objetivem o encapsulamento de GABA ou agonistas GABAérgicos em lipossomas para administração direta no SNC. Essa potencial ferramenta para estudos em neurociência possibilitaria uma abordagem que permitiria estudos mais esclarecedores em diversas áreas de pesquisa do sistema nervoso central.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar o papel potencial dos lipossomas como sistema de liberação controlada do agonista GABA<sub>A</sub> muscimol em sítios cerebrais específicos, de forma a intervir de maneira crônica na atividade neuronal desses sítios.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Produzir lipossomas encapsulando o agonista GABA<sub>A</sub> muscimol de maneira que sejam compatíveis com os procedimentos de microinjeção e retenção no SNC de ratos para liberação controlada do fármaco.
- Caracterizar os lipossomas quanto ao seu tamanho, integridade, taxa de encapsulamento e taxa de liberação do composto encapsulado *in vitro*.
- Avaliar *in vivo* a eficiência dos lipossomas como sistema de liberação controlada do agonista GABA<sub>A</sub> muscimol através da:
  - Certificação de que os lipídeos lipossomais não produzem alterações cardiovasculares quando administrados no DMH.

- Avaliação das alterações cardiovasculares produzidas pelo estresse experimental agudo em animais previamente submetidos à administração de lipossomas contendo muscimol no DMH.
- Avaliação da recuperação da resposta funcional após fim da liberação do composto por lipossomas
- Comparação da utilização dos lipossomas como método crônico de bloqueio de atividade neuronal com outro método classicamente utilizado – o método de lesão eletrolítica.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Preparação dos lipossomas

##### 3.1.1. Lipídeos utilizados:

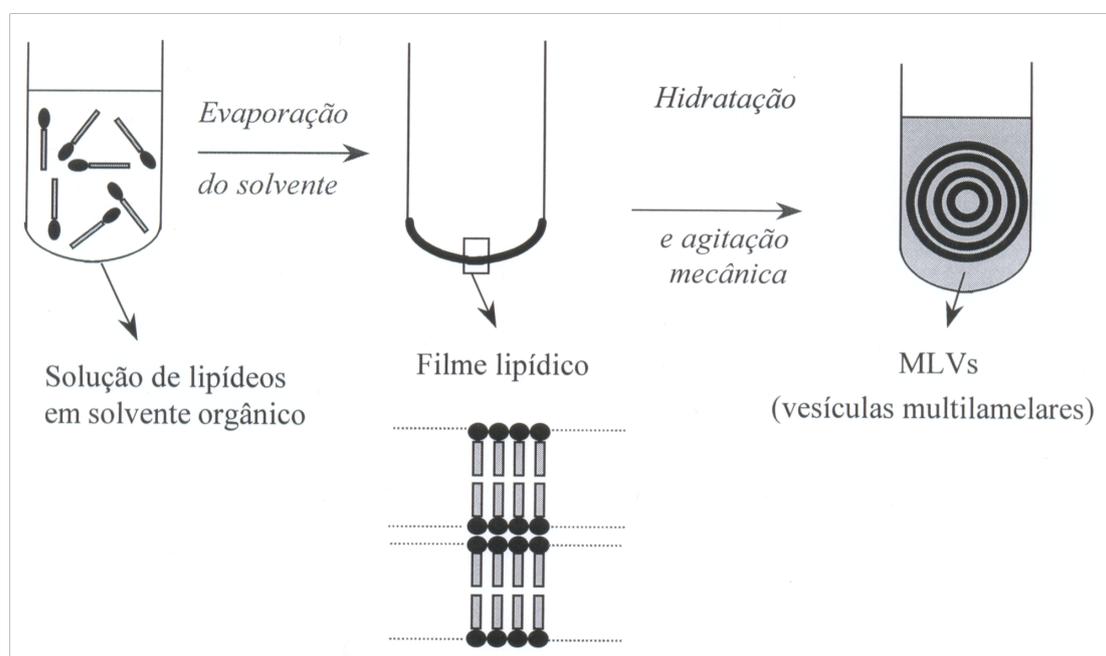
- Diestearoil-fosfatidilcolina (DSPC) (Avanti polar lipids, AL, USA)
- Colesterol (Sigma)
- Diestearoilfosfatidiletanolamina acoplado a um polímero de etileno-glicol 2000 (PEG 2000) (DSPE-PEG) (Avanti polar lipids, AL, USA)

##### 3.1.2. Drogas:

- Agonista GABA<sub>A</sub> muscimol (Sigma, PM = 114,10)
- Veículo (NaCl 0,9%)

Lipossomas contendo o agonista GABA<sub>A</sub> muscimol foram preparados a partir do método de desidratação-reidratação, proposto por Kirby e Gregoriadis (Kirby, 1984). Os lipídeos utilizados foram diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) (Temperatura de transição de fase de 55 graus celsius), colesterol e diestearoilfosfatidiletanolamina acoplada a um polímero de polietileno glicol 2000, (DSPE – PEG), na relação molar de 5:4:0,3.

Inicialmente, os lipídeos foram solubilizados em clorofórmio e submetidos a evaporação para formação de um filme lipídico, com o auxílio de um evaporador rotatório. Em seguida, o filme lipídico foi reidratado com água desionizada para a formação de vesículas multilamelares (MLV's) na concentração de lipídeos de 67,5 mM (Figura 2). Vesículas pequenas unilamelares (SUV's) foram então obtidas do composto inicial a partir de ultrassonicação por sonda (Misonix, USA).



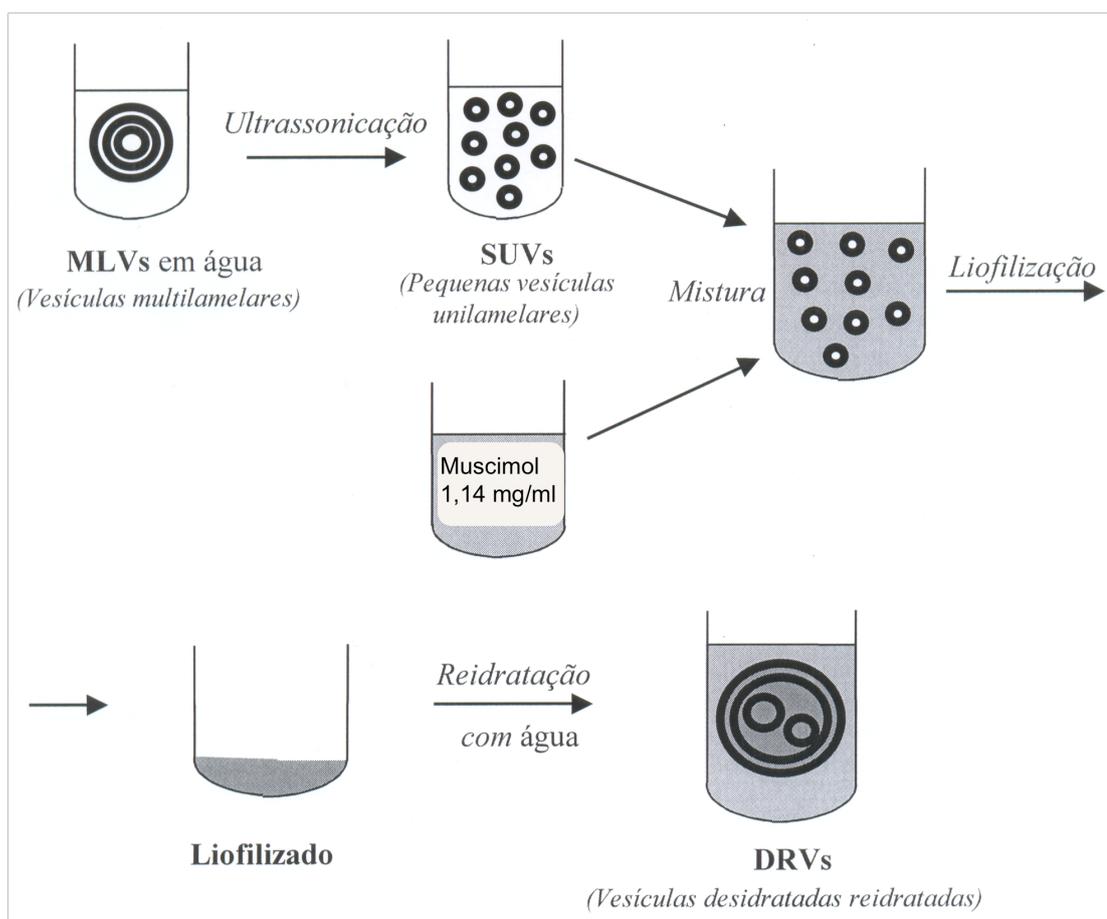
**Figura 2:** Representação esquemática da preparação das vesículas multilamelares – Passo inicial do método de desidratação e reidratação

À suspensão de SUV's foi adicionada uma solução de muscimol (1,14 mg/ml) em solução de cloreto de sódio (0,9%), na proporção de 3:1,5. A solução foi levada para liofilização por um período de 36 horas.

Após liofilização, as amostras foram reidratadas em temperatura maior que a da transição de fase do DSPC (60 graus celsius), para a formação das

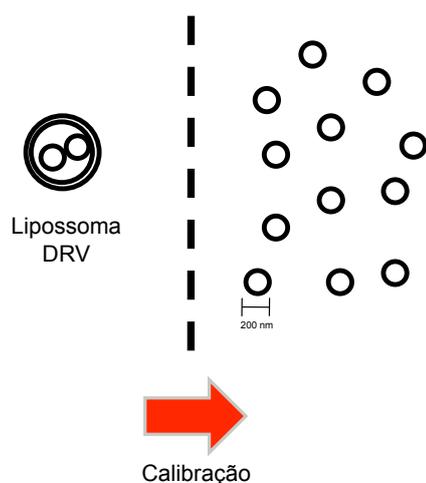
vesículas de desidratação e reidratação (figura 3). A amostra liofilizada foi reidratada de acordo com o seguinte protocolo:

- Adição de 0,45 ml de água, agitação em vórtex e banho maria a 60 graus por 30 minutos.
- Adição de 0,45 ml de solução salina (0,9%), agitação em vórtex e banho maria a 60 graus por 30 minutos.
- Adição de 0,9 ml de solução salina (0,9%), agitação em vórtex e banho maria a 60 graus por 30 minutos.



**Figura 3:** Representação esquemática da preparação das vesículas de desidratação e reidratação.

A suspensão final de lipossomas foi então submetida a calibração em membranas de policarbonato de poro de diâmetro 200 nm, segundo metodologia descrita em estudos anteriores (Olson et al., 1979; Nayar, 1989). A solução foi submetida a extrusão em temperatura de 60 graus celsius a partir de um extrusor, sob pressão de 500 psi de gás argônio. A figura 4 esquematiza o processo de extrusão.



**Figura 4:** Representação do processo de calibração das vesículas lipossomais em membranas de policarbonato.

Para separação do muscimol não encapsulado, a suspensão de lipossomas foi submetida a diálise em membranas de celulose (Spectrum Labs) de 15000 MWCO (limite de separação por peso molecular). A formulação foi colocada no saco de diálise e mergulhada em 500 ml de solução salina (0,9%) a temperatura de 5 graus celsius. A solução de diálise foi mantida sob agitação constante, e a solução salina foi trocada a cada 12 horas. O processo de diálise durou 36 horas.

## **3.2. Caracterização dos Lipossomas**

### **3.2.1. Determinação do tamanho das partículas**

O diâmetro hidrodinâmico médio dos lipossomas e o índice de polidispersidade foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons usando um zetasizer (Malvern, USA).

### **3.2.2. Determinação da concentração do muscimol nos lipossomas**

Para determinação da taxa de encapsulamento e da concentração final de muscimol nos lipossomas, uma amostra da solução foi solubilizada por metanol para ruptura dos lipossomas e liberação do composto encapsulado. Em seguida, a solução foi avaliada por espectrofotometria na região ultra violeta para o registro do espectro de absorção eletrônica do muscimol. O espectro obtido foi subtraído daquele obtido com lipossomas vazios, para que a determinação da concentração não apresentasse interferência da presença dos lipídeos. A curva espectrofotométrica foi então comparada com uma curva de solução de muscimol de concentração conhecida em metanol (Fig 6).

### **3.2.3. Determinação da taxa de liberação dos lipossomas *in vitro***

Para avaliar a capacidade dos lipossomas em reter o muscimol encapsulado e determinar a taxa de liberação do muscimol pelos lipossomas, a solução lipossomal foi colocada em incubação a 37 graus celsius. Em intervalos de tempo determinados (0, 6, 12, 24, 48 horas), alíquotas de 100 microlitros foram retiradas e submetidas a ultrafiltração em Microcon YM 50 (50000 MWCO, Milipore Corporation), visando a separação do meio extravascular dos lipossomas. As amostras de ultrafiltrado foram dosados por espectrofotometria ultra violeta para determinação da concentração de muscimol, em procedimento similar ao descrito anteriormente.

## **3.3. Efeitos Cardiovasculares dos Lipossomas Contendo Muscimol Após Microinjeção Central**

### **3.3.1. Animais**

Foram utilizados ratos Wistar, pesando entre 280 e 400 g, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Para todos os procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg i.p.) ou ketamina-xilazina-acepromazina (55,6, 5,5 e 1,1 mg/kg, respectivamente, i.p.). Todos os procedimentos com animais foram

aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG, sob o protocolo nº 105/2006.

### **3.3.2. Confeção e implante de cânulas-guia**

Para direcionamento das agulhas para injeção das drogas nos sítios de microinjeção, cânulas-guia foram confeccionadas a partir de agulhas 22 G cortadas no tamanho de 16 mm. A cânula-guia foi encaixada em um suporte preso ao porta eletrodos do aparelho estereotáxico (Stoelting, IL, USA).

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg i.p. suplementado quando necessário) e posicionados no aparelho estereotáxico com a barra incisiva fixada 3.3 mm abaixo da linha interaural.

Após injeção subcutânea de anestésico local (cloridrato de lidocaína 2% + epinefrina 1:200000), foi feita uma incisão mediana para exposição do crânio e localização do bregma. Dois parafusos foram fixados ao crânio para ancoragem das cânulas-guia. Em seguida, as cânulas-guia foram implantadas bilateralmente nas coordenadas estabelecidas de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (Paxinos and Watson, 1986) (-3,3 mm anterior, 0,6mm lateral e -8,0 mm dorso-ventral, tomando-se o bregma como ponto de referência), e fixadas com acrílico dental autopolimerizável. Um oclisor metálico de 16 mm (0,30 mm de diâmetro) foi introduzido nas cânulas-guia para evitar sua obstrução por resíduos de sangue ou sujeira.

Para evitar que o movimento do animal pudesse danificar as cânulas-guia, um anel de plástico de 1 cm de diâmetro por 1 cm de altura com uma fenda longitudinal de 5 mm foi fixado comacrílico dental ao redor das cânulas-guia.

Ao término dos procedimentos cirúrgicos, os animais receberam uma dose intramuscular de 0,2 ml de pentabiótico veterinário (1:200000 UI) e foram levados para recuperação.

### **3.3.3. Confeção de cânulas injetoras e procedimento de microinjeção**

Para a microinjeção dos lipossomas no sistema nervoso central, cânulas injetoras foram confeccionadas a partir de agulhas gengivais 30 G curtas. As agulhas foram cortadas no tamanho de 17 mm, conectadas a um tubo de polietileno (Norton, 0.010 I.D) e a uma seringa Hamilton de 5 µl preenchida com água destilada. O polietileno foi preenchido com lipossomas ou veículo, e entre a água destilada e a substância contida no polietileno havia uma pequena bolha de ar. As cânulas injetoras eram então introduzidas cuidadosamente na cânula-guia específica para cada microinjeção. O volume utilizado para todas as microinjeções foi de 100 nl. Durante a administração dos lipossomas, o movimento descendente da bolha de ar indicou o sucesso da injeção. Adicionalmente, para verificar se não havia obstrução na cânula injetora, estas eram testadas após sua remoção.

### **3.4. Lesões eletrolíticas bilaterais do hipotálamo dorsomedial**

Os ratos foram anestesiados com ketamina-xilazina-acepromazina e foi realizada a raspagem e limpeza da pele da cabeça acima dos ossos frontal e parietal. Na seqüência, os animais foram fixados a um estereotáxico (David Kopf, Tujunga, CA, EUA), sendo que a posição da barra dos dentes incisivos foi ajustada de forma que o bregma e o lambda permaneceram na mesma altura. Foi realizada uma incisão na pele ao longo da sutura sagital, a pele e os músculos subjacentes foram retraídos e, então, o periósteo foi separado do crânio e extirpado. Um eletrodo de aço inoxidável (250 mm de diâmetro, Frederic Haer, Bowdoinham, ME, EUA) foi inserido no cérebro. As coordenadas estereotáxicas utilizadas para as lesões eletrolíticas bilaterais do hipotálamo dorsomedial foram retiradas do atlas de Paxinos e Watson (Paxinos and Watson, 1986) 3,2 mm posterior ao bregma, 0,6 mm a partir da linha média, e 9,0 mm de profundidade a partir da superfície do crânio. Um segundo eletrodo (“clip tipo jacaré”) foi fixado à borda da ferida cirúrgica na cabeça. Para a lesão do tecido cerebral, um instrumento de precisão (Ugo Basile, Comerio, Itália) foi utilizado. Uma corrente anodal constante (1 mA) foi passada através dos eletrodos durante 20 s. Após a lesão da estrutura de interesse em um lado, o eletrodo foi removido e inserido nas mesmas coordenadas contralateralmente. Ratos submetidos a lesões sham foram preparados da mesma forma, entretanto a ponta do eletrodo foi posicionada 2 mm acima do DMH e nenhuma corrente foi passada.

### **3.5. Canulação da artéria aorta abdominal**

Para medida dos parâmetros cardiovasculares, os animais foram novamente anestesiados com tribromoetanol (250 mg/Kg i.p. suplementado se necessário) e a artéria aorta abdominal foi canulada através da introdução de um catéter de polietileno (Clay Adams, 0.011 ID) de aproximadamente 4 cm (soldado por aquecimento a um tubo PE-50 de 15 cm) na artéria femoral. Este cateter era previamente preenchido com solução salina (0,9%). Após a introdução do catéter na artéria, este foi passado pelo tecido subcutâneo do animal até sua exteriorização na região interescapular. Todas as incisões foram fechadas com pequenas suturas. Ao término dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram levados para recuperação.

### **3.6. Medida dos parâmetros cardiovasculares**

A cânula inserida na artéria femoral era conectada a um transdutor de pressão, ligado a um sistema de aquisição de dados (Biopac Systems model MP100 A-CE, CA, USA). Por toda a duração de cada experimento, a frequência cardíaca e pressão arterial foram continuamente registradas.

### **3.7. Estresse por jato de ar**

O procedimento de estresse por jato de ar foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Villela e colaboradores (Villela et al., 2009). Após estabilização dos parâmetros cardiovasculares, os animais eram cuidadosamente colocados em um tubo contensor de acrílico. Após 10 minutos de estabilização, foi acionado um jato de ar com fluxo de 10 litros por minuto, direcionado à face do animal (Figura 5). O jato de ar durava 10 minutos, quando então o aparelho era desligado e o animal era removido do contensor. A frequência cardíaca e pressão arterial era medida durante todo o procedimento, e no mínimo, 20 minutos após seu término. Neste estudo, considerou-se estresse por jato de ar todos os elementos presentes no procedimento, como a contensão, o ruído causado pelo aparelho gerador do jato de ar, e o próprio jato.



**Figura 5:** Fotografia do animal no contendor sendo submetido ao estresse por jato de ar (10 litros/minuto).

## Histologia

Ao final de cada experimento, os ratos foram sacrificados com uma overdose de anestesia, então foi feita a microinjeção de 2% de *alcian blue* (100 nl) nos sítios de microinjeção para subsequente confirmação histológica. Os encéfalos foram removidos e armazenados em formaldeído 4% por no mínimo 24 horas. Após este período, os encéfalos foram transferidos para uma solução de sacarose 20% por no mínimo 3 dias. Subsequentemente, estes foram cortados no sentido coronal com a espessura de 50  $\mu\text{m}$  na

região do hipotálamo em um micrótomo de congelamento. Os cortes foram colocados em lâminas de histologia previamente gelatinizadas, e então, corados com solução de vermelho neutro (1%) para confirmação histológica. No caso dos animais submetidos a lesão eletrolítica, a coloração das lâminas foi feita utilizando-se cresyl violeta. Os sítios de microinjeção foram confirmados utilizando como referência o Atlas de Paxinos e Watson (Paxinos and Watson, 1986).

### **3.8. Análise dos dados**

A análise do muscimol encapsulado em lipossomas foi realizada a partir da análise espectrofotométrica do composto após rompimento do lipossoma em metanol. A concentração da droga foi determinada por comparação com o muscimol livre em concentração conhecida adicionado a metanol.

Para análise dos experimentos *in vivo*, os valores basais de frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM) foram considerados como a média dessas variáveis no período de um minuto antes da microinjeção das drogas. Durante a aplicação do jato de ar, foi feita a medida das variáveis no período de 30 segundos, colhidos a cada 2 minutos, no intervalo de 2 minutos antes da aplicação do jato de ar até 6 minutos após o término do jato. Adicionalmente, as médias dos valores de pressão e frequência cardíaca foram analisadas durante os 10 minutos do jato de ar.

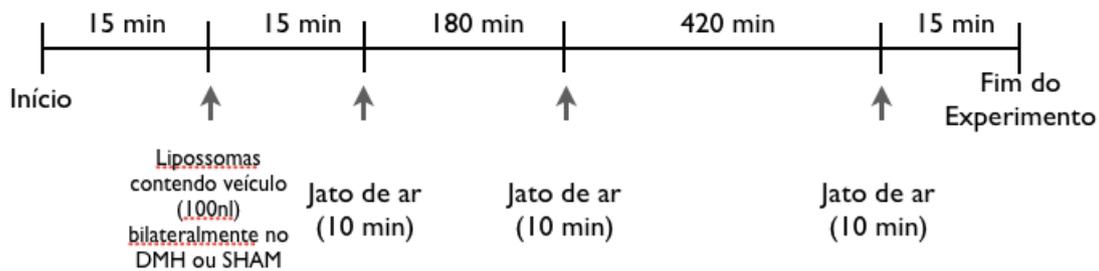
### **3.9. Análise estatística**

Comparações entre dois grupos foram analisadas pelo teste *t* de Student. Diferenças entre três ou mais grupos experimentais foram analisadas utilizando-se a análise de variância (ANOVA) seguida pela correção de Bonferroni. Para as análises das alterações de frequência cardíaca e pressão arterial em função do tempo, foi utilizada two way ANOVA com medidas repetidas. O nível de significância foi fixado em  $P < 0,05$ . Todos os valores foram expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

### **3.10. Procedimentos experimentais**

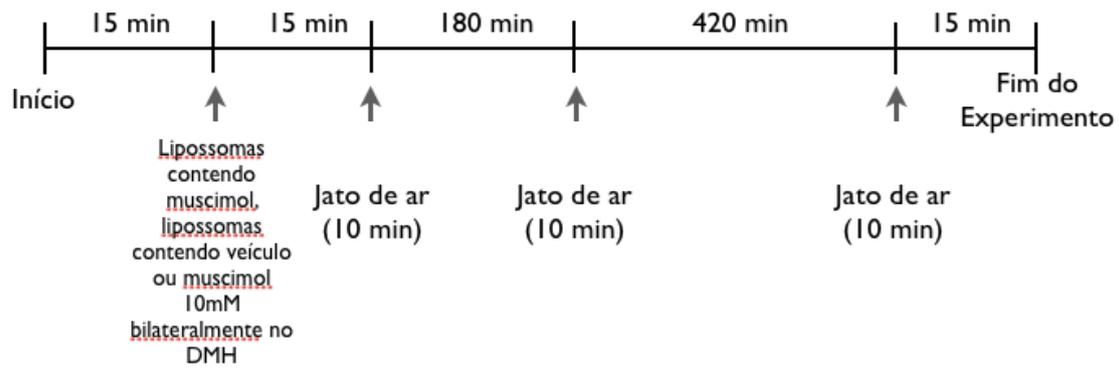
#### **Protocolo 1 – Avaliação dos efeitos cardiovasculares produzidos pelo estresse por jato de ar após microinjeção de lipossomas contendo veículo no DMH de ratos**

Para certificação de que os lipídeos lipossomais não poderiam produzir efeitos nos neurônios do DMH, lipossomas contendo veículo (cloreto de sódio 0,9%) foram administrados bilateralmente no DMH de ratos (100 nl para cada lado). Estes então foram posteriormente submetidos a estresse por jato de ar. Os efeitos cardiovasculares produzidos pelo estresse por jato de ar foram comparados com os efeitos produzidos pelo mesmo procedimento em um grupo de animais submetidos a cirurgia de canulação bilateral do DMH, porém sem a administração de qualquer microinjeção. O procedimento experimental foi realizado de acordo com o seguinte protocolo:



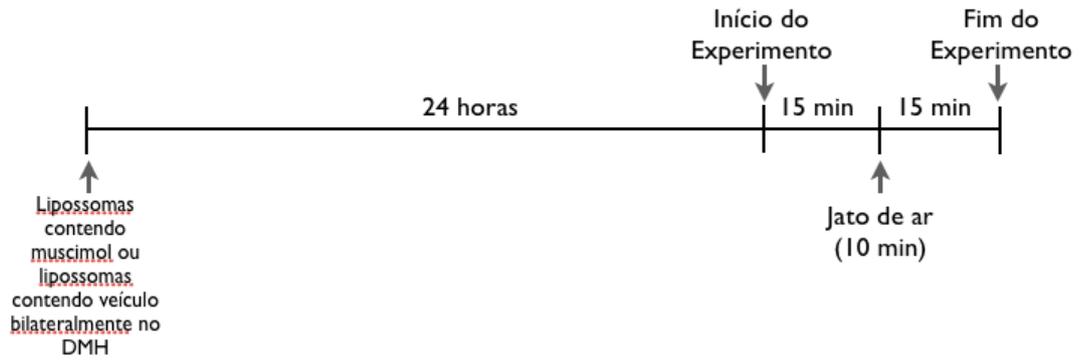
**Protocolo 2 – Avaliação dos efeitos cardiovasculares produzidos pelo estresse por jato de ar após a microinjeção de lipossomas contendo muscimol no DMH de ratos até 420 minutos após a administração**

Para avaliar se os lipossomas foram satisfatórios em reter o composto encapsulado e permitir sua liberação controlada, lipossomas contendo muscimol foram microinjetados bilateralmente no DMH de ratos, que foram então submetidos a estresse por jato de ar em intervalos tempo determinados (15, 180 e 420 minutos após a microinjeção). Os efeitos cardiovasculares produzidos pelo estresse por jato de ar após a microinjeção de lipossomas foram comparados com os efeitos cardiovasculares produzidos pelo mesmo procedimento em animais que receberam bilateralmente no DMH microinjeções de lipossoma contendo veículo (cloreto de sódio 0,9%) ou solução de muscimol (10mM). Todas as microinjeções foram feitas no volume de 100 nl em cada hemisfério. O experimento foi realizado de acordo com o seguinte protocolo:



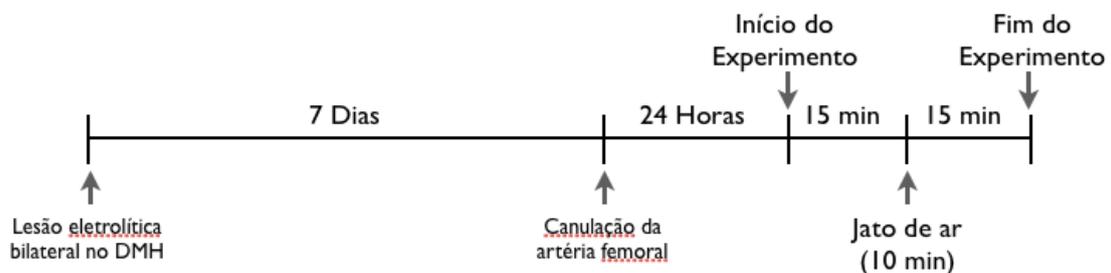
**Protocolo 3 – Avaliação dos efeitos cardiovasculares produzidos pelo estresse por jato de ar após microinjeção de lipossomas contendo muscimol no DMH de ratos 24 horas após a administração**

Para avaliar se os lipossomas tinham a capacidade de liberar o muscimol em uma concentração que pudesse produzir alterações fisiológicas no DMH de ratos 24 horas após a sua administração, estes foram microinjetados bilateralmente no DMH de ratos, que foram então submetidos a estresse por jato de ar 24 horas após a microinjeção. Os efeitos cardiovasculares produzidos pelo estresse por jato de ar após a microinjeção de lipossomas foram comparados com os efeitos cardiovasculares produzidos pelo mesmo procedimento em animais que receberam bilateralmente no DMH microinjeções de lipossoma contendo veículo (cloreto de sódio 0,9%). Todas as microinjeções foram feitas no volume de 100 nl em cada hemisfério. A microinjeção dos lipossomas ocorreu 24 horas após a cirurgia de canulação da artéria femoral. O experimento foi realizado de acordo com o seguinte protocolo:



#### **Protocolo 4 – Avaliação dos efeitos cardiovasculares produzidos pelo estresse por jato de ar após lesão eletrolítica bilateral no DMH**

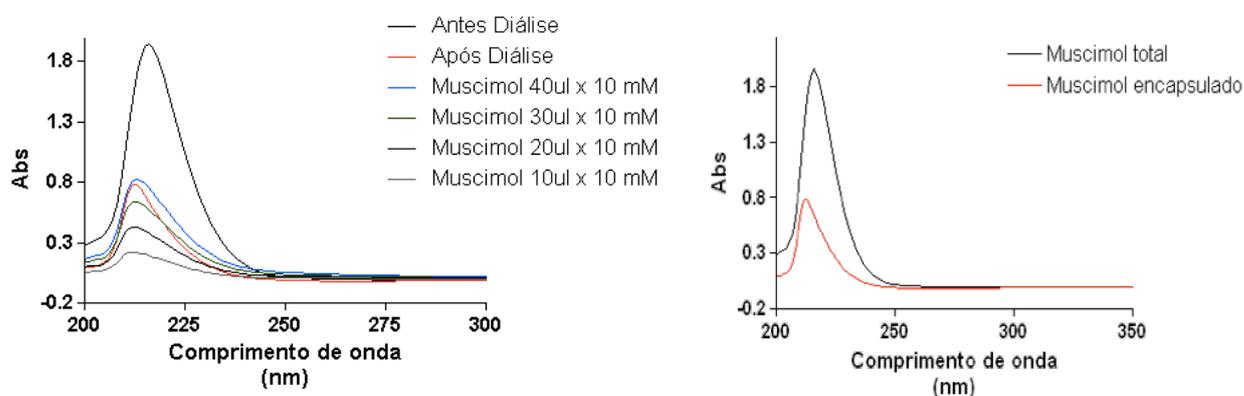
Com o intuito de avaliar a funcionalidade do muscimol encapsulado em lipossomas em inibir cronicamente áreas do SNC, seu efeito foi comparado com o método de lesão eletrolítica, um método crônico de bloqueio de atividade celular já tradicionalmente utilizado. Os animais receberam a lesão bilateral do DMH, e uma semana após os procedimentos de lesão, submeteram-se a canulação da artéria femoral. Passadas 24 horas após a cirurgia de canulação, os animais foram submetidos ao estresse por jato de ar para observação das alterações cardiovasculares. O experimento foi realizado de acordo com o seguinte protocolo:



## 4. RESULTADOS

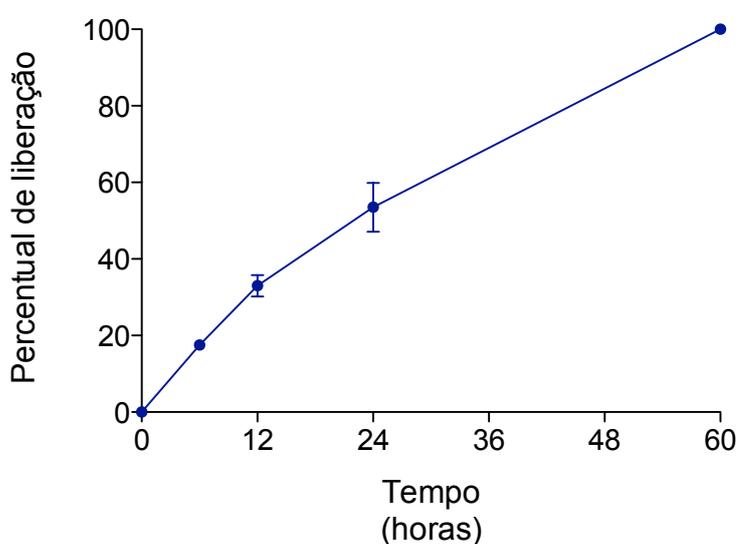
### 4.1. Características das Preparações de lipossomas

Análise espectrofotométrica indicou que o encapsulamento do muscimol ocorreu de forma eficiente nas preparações de lipossomas, com uma taxa de  $35 \pm 1,09 \%$ . A figura 6 mostra o registro espectrofotométrico da curva de calibração do muscimol para comparação com o muscimol adicionado aos lipossomas, e solução de lipossomas contendo muscimol antes e após a separação por diálise do composto encapsulado do não encapsulado. A razão entre as duas curvas mostra a taxa de encapsulamento. A concentração de muscimol nos lipossomas foi de  $9,89 \pm 0,29$  mM. O diâmetro hidrodinâmico médio dos lipossomas foi de  $191,9 \pm 8,6$  nm, com um índice de polidispersidade de  $0,052 \pm 0,019$ . A relação final de droga/lipídeo foi de  $0,0123 \pm 0$  p/p. Os valores apresentados correspondem a análise de 3 amostras de solução de lipossomas.



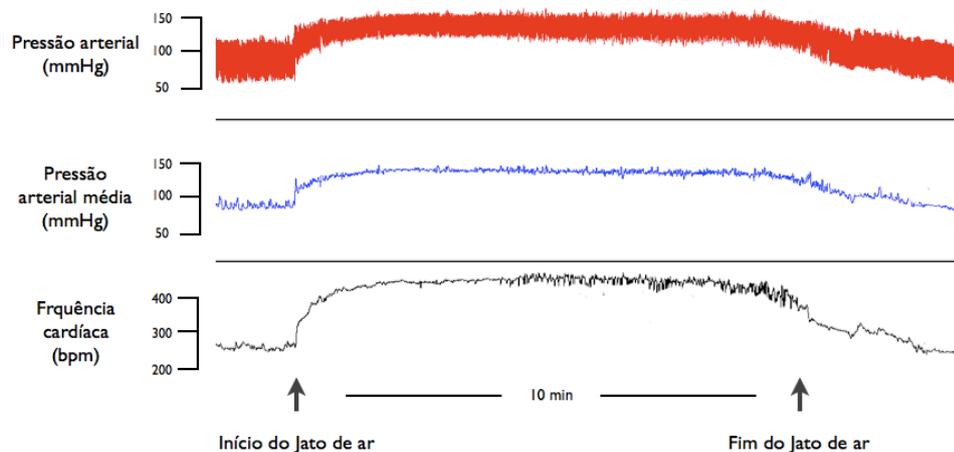
**Figura 6.** Esquerda: Registro ilustrando uma análise espectrofotométrica com medidas de muscimol livre de concentração conhecida, em comparação com o muscimol adicionado ao composto de lipossomas após rompimento dos mesmos em metanol. Direita: Registro ilustrando uma análise espectrofotométrica do muscimol total adicionado ao composto de lipossomas X muscimol efetivamente encapsulado pelos lipossomas. A formulação efetivamente encapsulada foi obtida após diálise da preparação de lipossomas.

A medida de retenção do composto *in vitro* foi avaliada pela liberação do composto encapsulado quando incubado à 37 graus. Os resultados mostraram que após 24 horas de incubação, aproximadamente 40% do composto ainda encontrava-se retido dentro dos lipossomas. Após 60 horas de incubação, 100% do composto já havia sido liberado dos lipossomas (Figura 7).



**Figura 7.** Cinética de liberação do muscimol pelos lipossomas a 37 graus C em solução salina (Análise de 2 amostras).

Em todos os procedimentos de caracterização *in vivo* dos lipossomas, foram avaliadas as respostas cardiovasculares ao estresse por jato de ar. A figura 8 mostra um registro representativo das alterações de pressão arterial, pressão arterial média e frequência cardíaca de um rato ocorridas durante os 10 minutos de duração do estresse. No presente estudo, o estresse por jato de ar produziu um aumento significativo na frequência cardíaca ( $120 \pm 21$  bpm) e pressão arterial ( $12 \pm 3$  mmHg) (Figura 8)



**Figura 8.** Registro original mostrando as alterações cardiovasculares produzidas durante o estresse por jato de ar (10 litros / minuto) em ratos. O Estresse por jato de ar durou 10 minutos, conforme mostrado na figura.

**Protocolo 1 – Avaliação dos efeitos cardiovasculares produzidos pelo estresse por jato de ar após microinjeção de lipossomas contendo veículo no DMH de ratos**

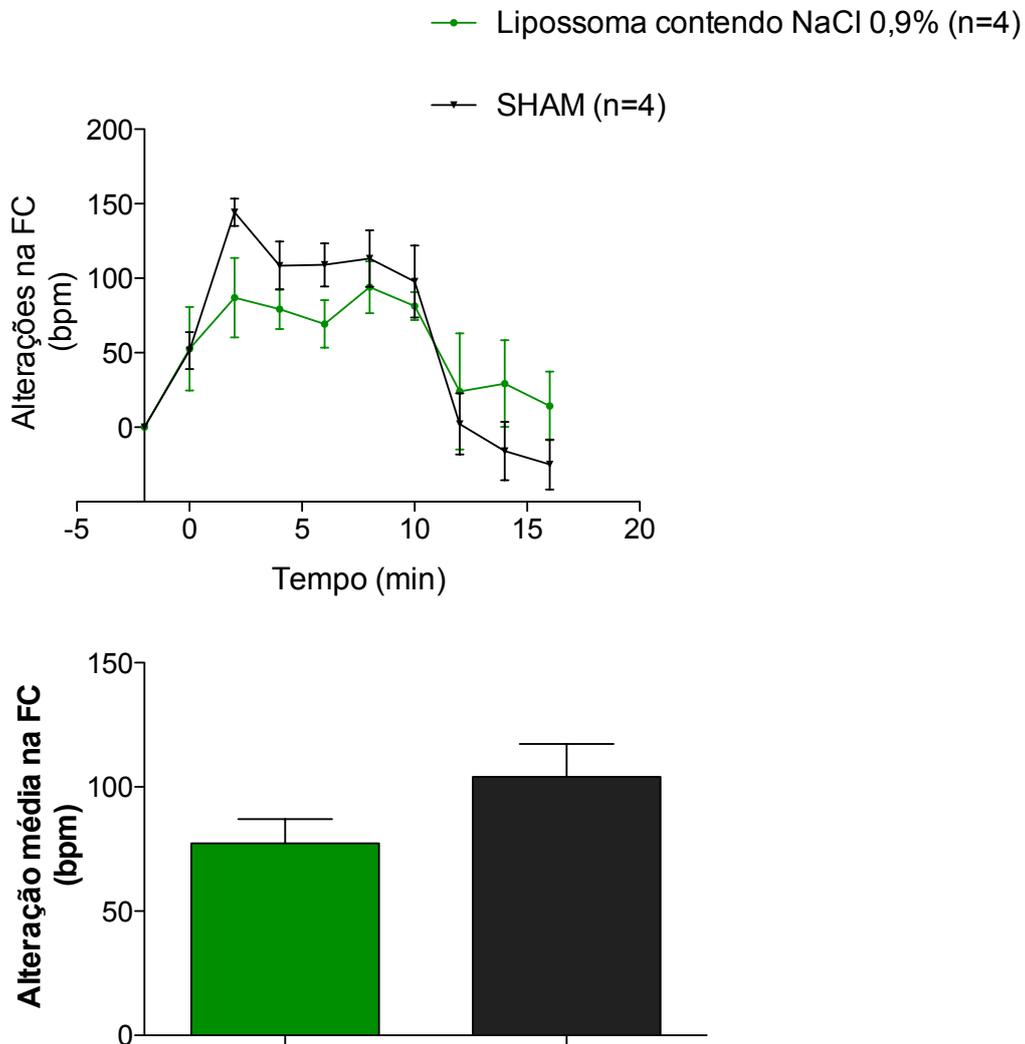
Os parâmetros cardiovasculares basais dos grupos que receberam a microinjeção bilateral de lipossomas vazios está mostrada na tabela 1. A microinjeção de 100 nl bilateralmente de lipossomas contendo muscimol não produziu alterações cardiovasculares significativas.

	Lipossoma Vazio (n=4)		SHAM (n=4)	
	FC	PAM	FC	PAM
Valores Basais	353 ± 19	109 ± 12	321 ± 16	105 ± 7
Microinjeção de lipossomas contendo veículo (NaCl 0,9%)	356 ± 13	110 ± 12		

**Tabela 1.** Valores basais e alterações na frequência cardíaca e pressão arterial média produzidas pela microinjeção de 100 nl do lipossoma contendo veículo (NaCl 0,9%) ou nos animais que não receberam qualquer microinjeção, no hipotálamo dorsomedial dos ratos.

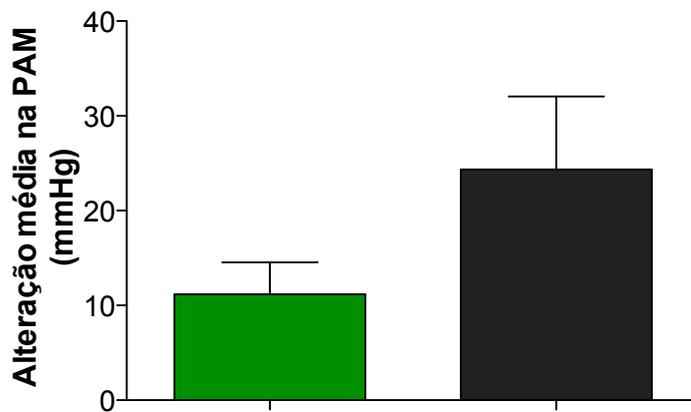
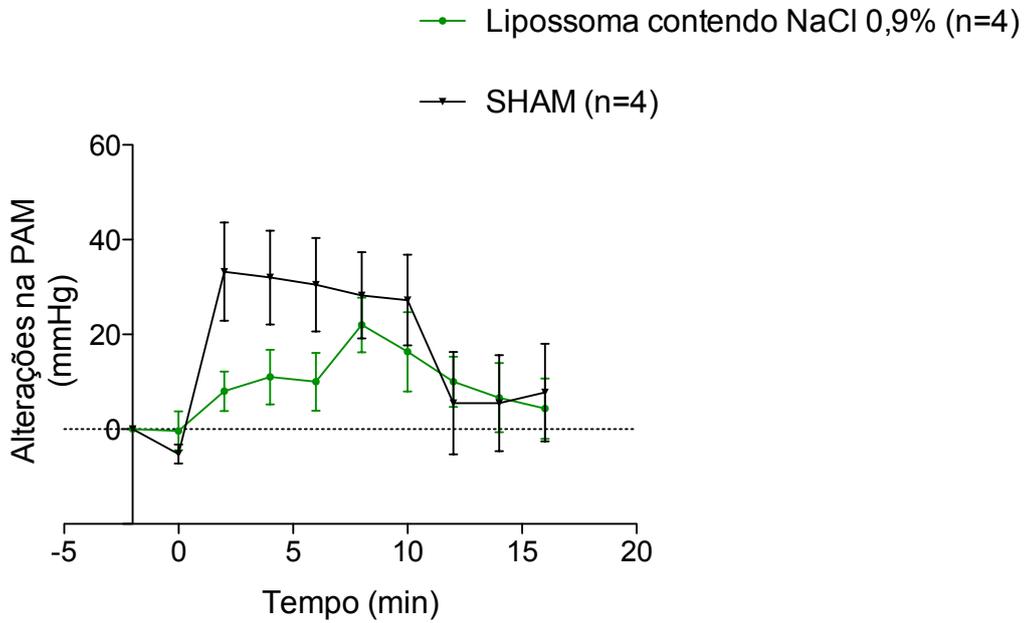
Após 15, 180 e 420 minutos da administração dos lipossomas vazios, ou após 15, 180 e 420 minutos de estabilização dos valores basais de frequência cardíaca e pressão arterial do grupo SHAM, os animais foram submetidos ao estresse por jato de ar. Os resultados são mostrados nas figuras 9 a 14. A taquicardia e o aumento na pressão arterial causados pelo jato de ar não foram alterados nos animais que receberam a microinjeção de lipossomas contendo veículo (NaCl 0,9%), quando comparados ao grupo SHAM, que não recebeu nenhuma microinjeção. Esses resultados indicam que a presença dos lipídeos lipossomais foi inerte no SNC, tornando-os hábeis para utilização nesse sistema.

**15 min**



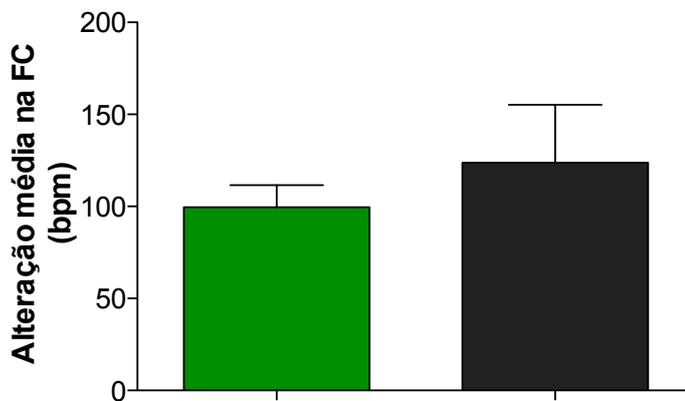
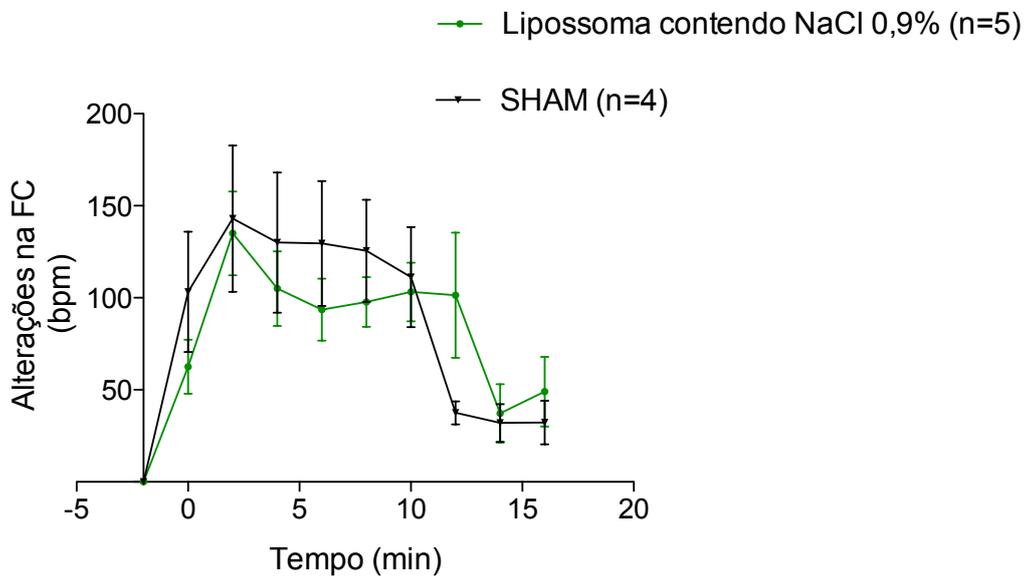
**Figura 9.** Painel superior: alterações na frequência cardíaca (FC) produzidas pelo estresse por jato de ar (0 – 10 minutos) em ratos, 15 minutos após a administração de lipossomas contendo veículo (NaCl 0,9%) ou alterações produzidas pelo estresse por jato de ar (0 – 10 minutos) no grupo SHAM 15 minutos após início do experimento. Painel inferior: valor médio das alterações de FC produzidas durante o estresse por jato de ar.

**15 min**



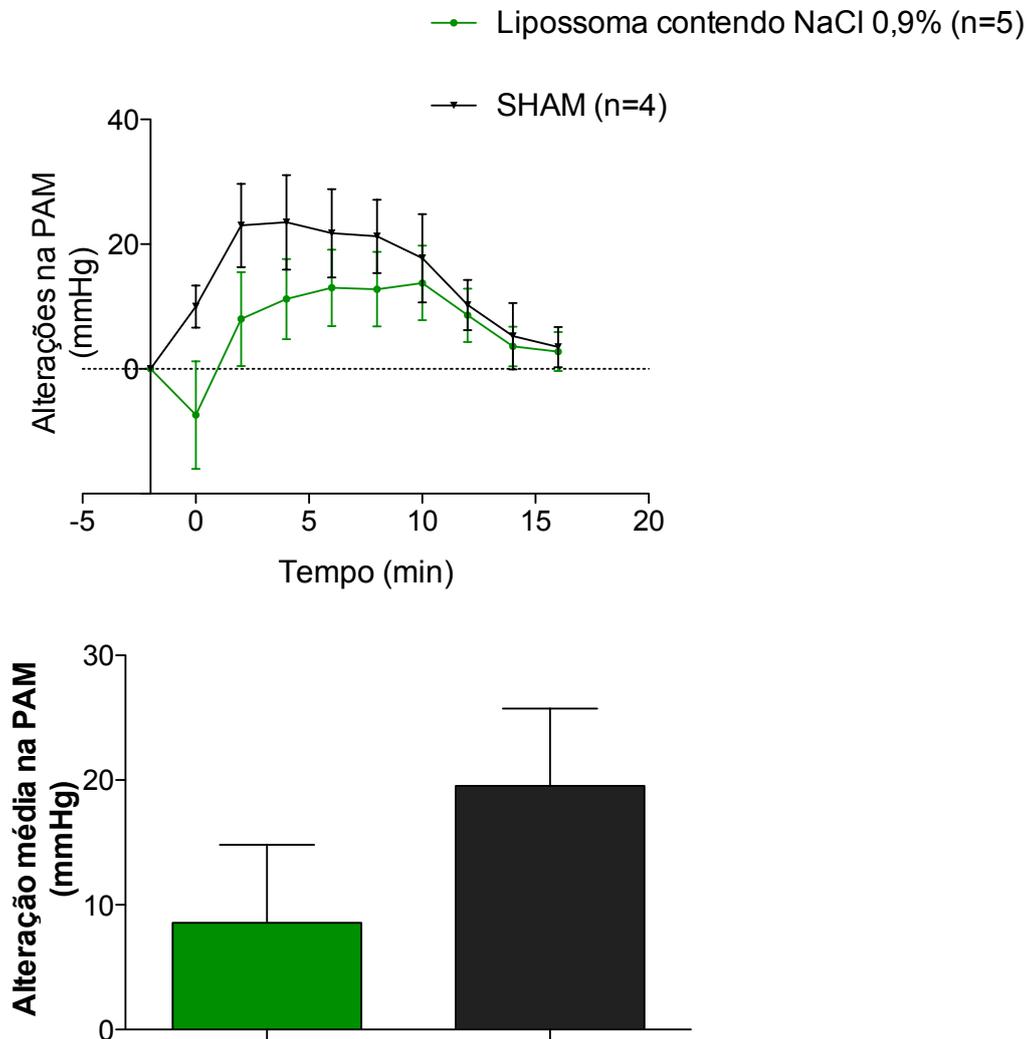
**Figura 10.** Painel superior: alterações na pressão arterial média (PAM) produzidas pelo estresse por jato de ar (0 – 10 minutos) em ratos, 15 minutos após a administração de lipossomas contendo veículo (NaCl 0,9%) ou alterações produzidas pelo estresse por jato de ar (0 – 10 minutos) no grupo SHAM 15 minutos após início do experimento. Painel inferior: valor médio das alterações de PAM produzidas durante o estresse por jato de ar.

**180 min**



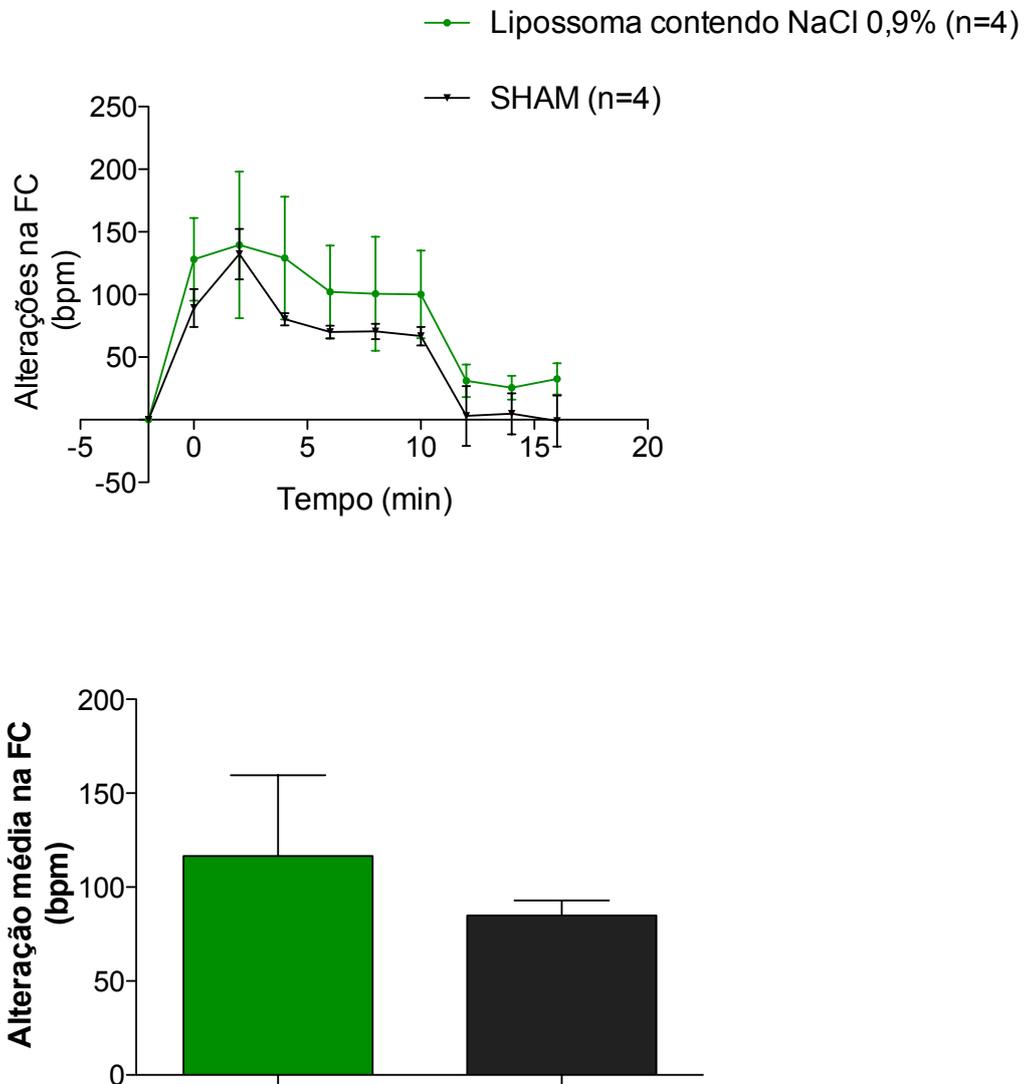
**Figura 11.** Painel superior: alterações na frequência cardíaca (FC) produzidas pelo estresse por jato de ar (0 – 10 minutos) em ratos, 180 minutos após a administração de lipossomas contendo veículo (NaCl 0,9%) ou alterações produzidas pelo estresse por jato de ar (0 – 10 minutos) no grupo SHAM 180 minutos após início do experimento. Painel inferior: valor médio das alterações de FC produzidas durante o estresse por jato de ar.

**180 min**



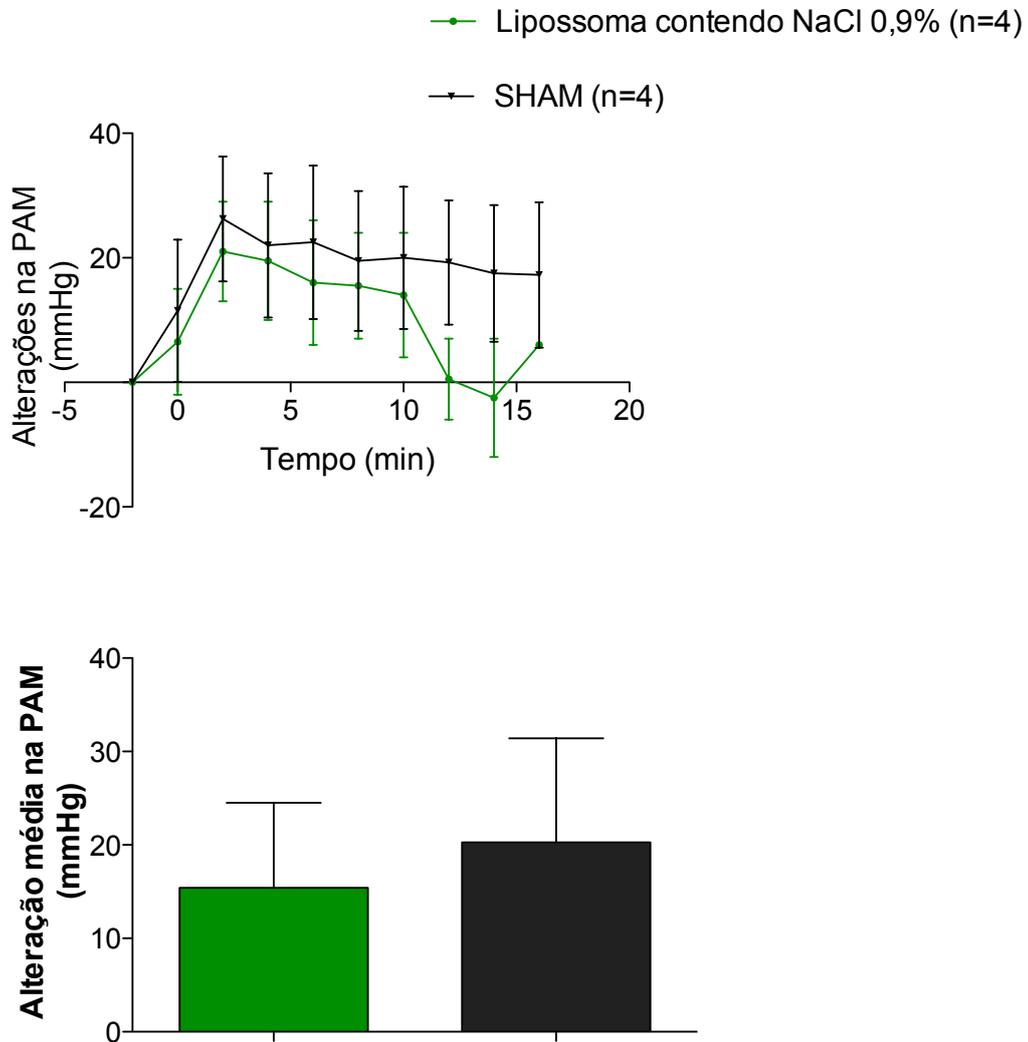
**Figura 12.** Painel superior: alterações na pressão arterial média (PAM) produzidas pelo estresse por jato de ar (0 – 10 minutos) em ratos, 180 minutos após a administração de lipossomas contendo veículo (NaCl 0,9%) ou alterações produzidas pelo estresse por jato de ar (0 – 10 minutos) no grupo SHAM 180 minutos após início do experimento. Painel inferior: valor médio das alterações de PAM produzidas durante o estresse por jato de ar.

**420 min**



**Figura 13.** Painel superior: alterações na frequência cardíaca (FC) produzidas pelo estresse por jato de ar (0 – 10 minutos) em ratos, 420 minutos após a administração de lipossomas contendo veículo (NaCl 0,9%) ou alterações produzidas pelo estresse por jato de ar (0 – 10 minutos) no grupo SHAM 420 minutos após início do experimento. Painel inferior: valor médio das alterações de FC produzidas durante o estresse por jato de ar.

**420 min**



**Figura 14.** Painel superior: alterações na pressão arterial média (PAM) produzidas pelo estresse por jato de ar (0 – 10 minutos) em ratos, 420 minutos após a administração de lipossomas contendo veículo (NaCl 0,9%) ou alterações produzidas pelo estresse por jato de ar (0 – 10 minutos) no grupo SHAM 420 minutos após início do experimento. Painel inferior: valor médio das alterações de PAM produzidas durante o estresse por jato de ar.

**Protocolo 2 – Avaliação dos efeitos cardiovasculares produzidos pelo estresse por jato de ar após a microinjeção de lipossomas contendo muscimol no DMH de ratos até 420 minutos após a administração**

Os valores basais de pressão arterial e frequência cardíaca dos animais utilizados são mostrados na tabela 2. A microinjeção de 100 nl de muscimol livre (10 mM), lipossomas contendo muscimol (9,9 mM) ou lipossomas contendo veículo (NaCl 0,9%) no DMH não produziu alterações cardiovasculares, conforme mostrado na tabela 2.

	Lipossoma Muscimol (n=4)		Lipossoma contendo veículo (NaCl 0,9%) (n=4)		Muscimol Livre (n=4)	
	FC	PAM	FC	PAM	FC	PAM
Antes da Microinjeção	339 ± 5	103 ± 10	353 ± 19	109 ± 12	330 ± 6	108 ± 8
Após Microinjeção	344 ± 5	106 ± 9	356 ± 13	110 ± 12	333 ± 9	101 ± 2

**Tabela 2.** Valores basais e alterações na frequência cardíaca e pressão arterial média produzidas pela microinjeção de 100 nl do lipossoma contendo veículo (NaCl 0,9%), lipossoma contendo muscimol ou muscimol livre (10mM) no hipotálamo dorsomedial dos ratos.

Após 15 minutos da administração de lipossomas contendo veículo, muscimol livre ou lipossomas contendo muscimol encapsulado no DMH de ratos, estes foram submetidos ao estresse por jato de ar. Como observado na figura 15, a taquicardia produzida pelo estresse por jato de ar foi reduzida após a microinjeção de muscimol livre ou lipossomas contendo muscimol. Lipossomas contendo veículo não reduziram as respostas cardiovasculares produzidas pelo estresse por jato de ar (Figura 15). A microinjeção dos

compostos descritos acima foi incapaz de produzir alterações significativas nos aumentos da pressão arterial produzidos pelo estresse por jato de ar (Fig. 16).

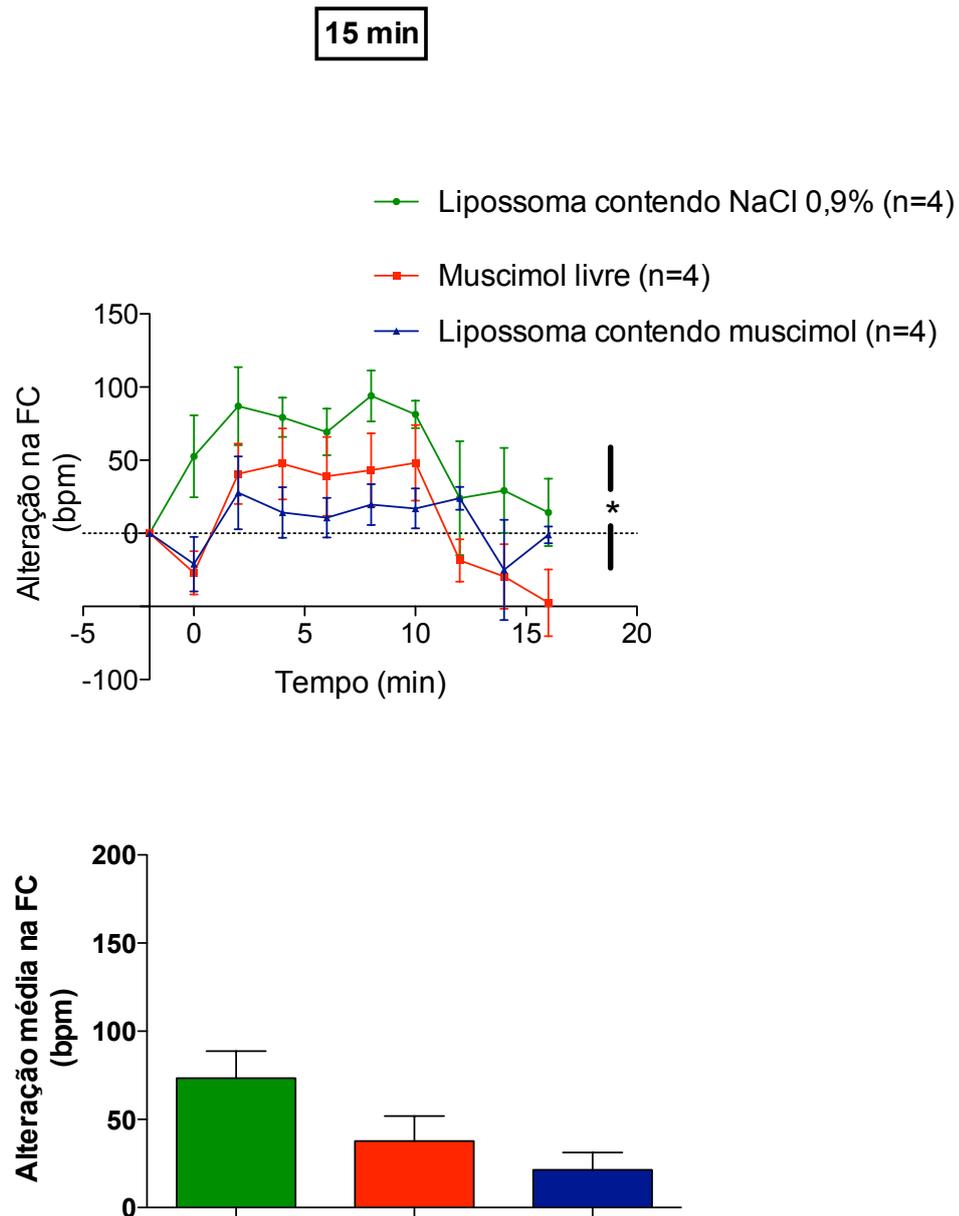


Figura 15: Alterações na FC produzidas pelo estresse por jato de ar (tempo 0 a 10 minutos) em ratos 15 minutos após a microinjeção bilateral de 100 nl de lipossomas contendo veículo (salina 0,9%), muscimol livre (10mM) ou muscimol encapsulado em lipossomas (9,9 mM). Paineil superior: alterações da FC em função do tempo. Paineil inferior: valor médio das alterações produzidas durante o estresse por jato de ar. \* $p < 0,05$  comparado com o grupo no qual foi feita a microinjeção de lipossomas contendo veículo (two way ANOVA, bonferroni post test).

15 min

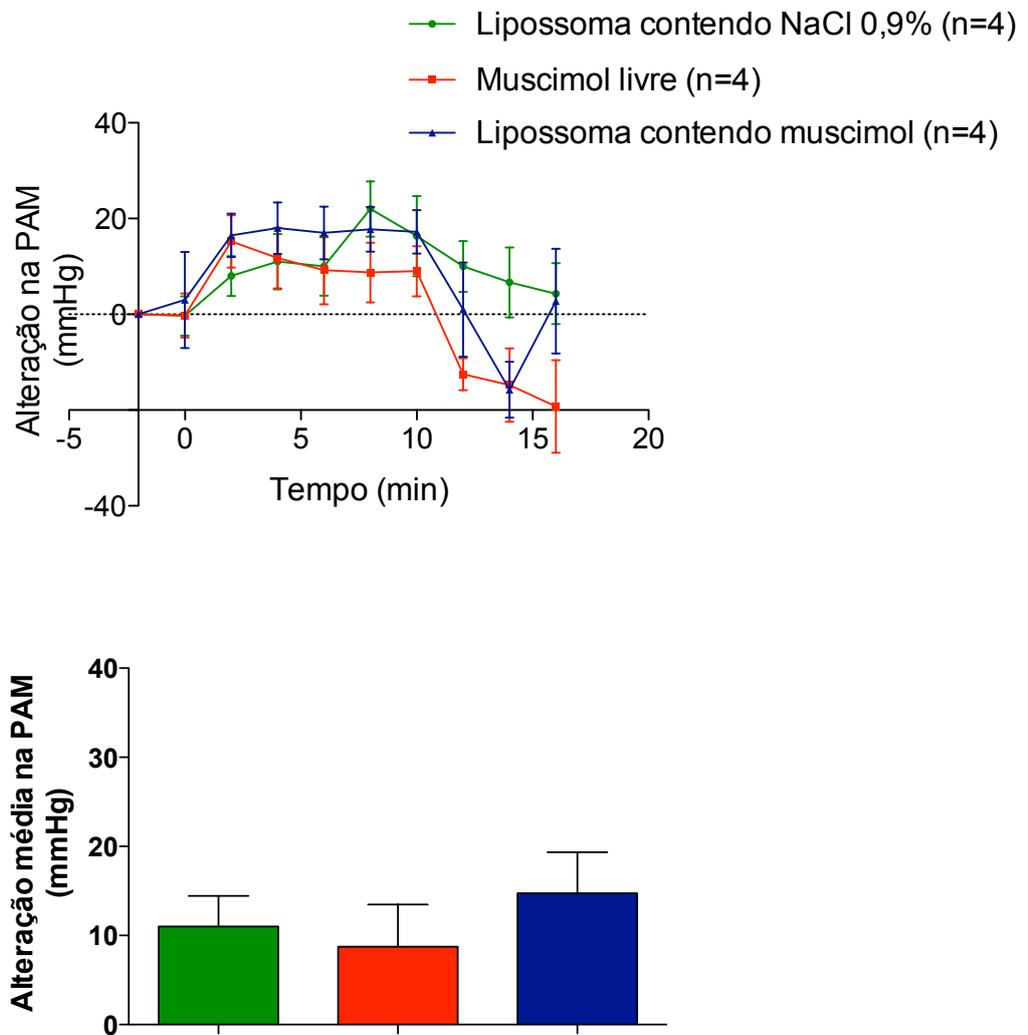


Figura 16: Alterações na PAM produzidas pelo estresse por jato de ar (tempo 0 a 10 minutos) em ratos 15 minutos após a microinjeção bilateral de 100 nl de lipossomas contendo veículo (salina 0,9%), muscimol livre (10mM) ou muscimol encapsulado em lipossomas (9,9 mM). Painel superior: alterações da PAM em função do tempo. Painel inferior: valor médio das alterações produzidas durante o estresse por jato de ar.

Os resultados obtidos 180 minutos após a microinjeção no DMH de lipossomas vazios, muscimol livre ou lipossomas contendo muscimol são apresentados nas figuras 17 e 18. O aumento da frequência cardíaca produzida pelo estresse por jato de ar foi significativamente reduzida (em 92%, em média) somente nos animais onde foi realizada a microinjeção de lipossomas contendo muscimol. A figura 17 mostra a média da resposta taquicárdica obtida durante o estresse por jato de ar. Esta indica que não houve somente perda da resposta inibitória produzida pela microinjeção de muscimol livre, mas também a potenciação da resposta (resposta potenciada em 220%). A figura 18 indica que não houveram alterações significativas na pressão arterial média dos animais que receberam a microinjeção de lipossomas contendo muscimol ou muscimol livre, quando os grupos são comparados com o controle.

180 min

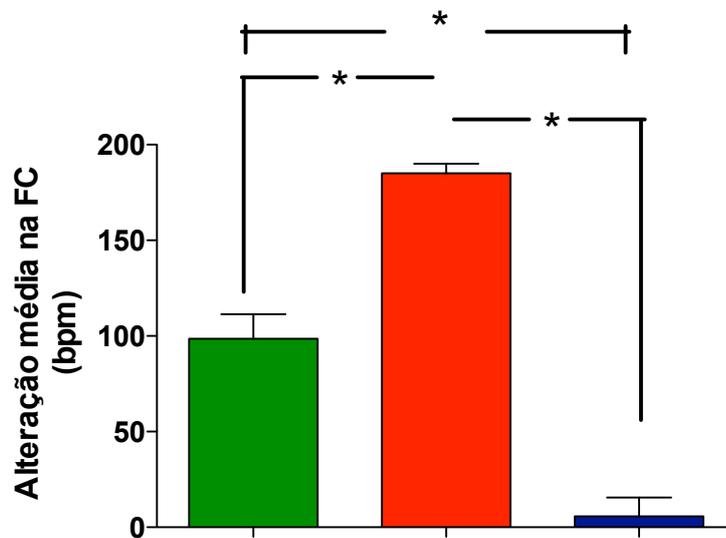
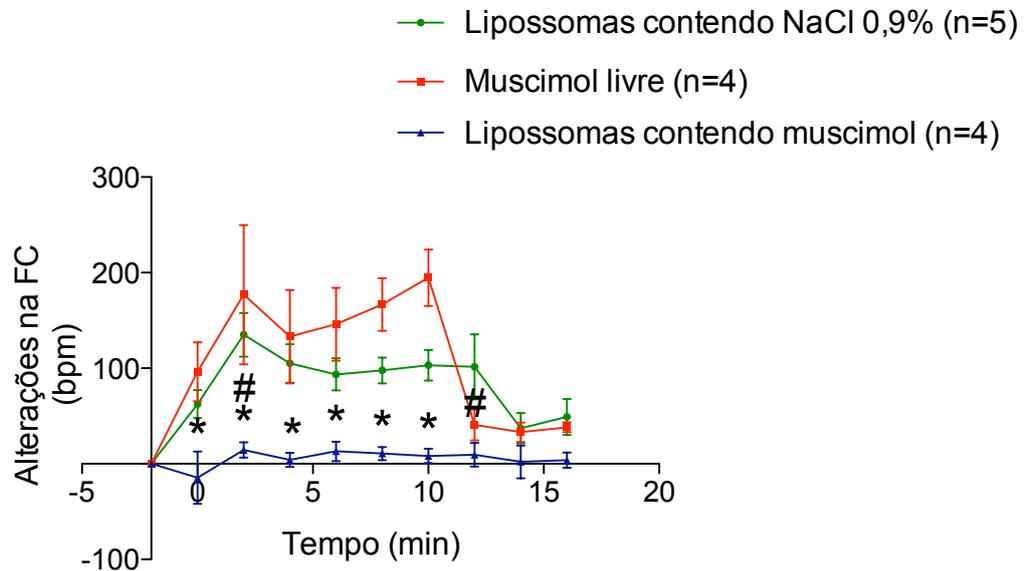


Figura 17: Alterações na FC produzidas pelo estresse por jato de ar (tempo 0 a 10 minutos) em ratos 180 minutos após a microinjeção bilateral de 100 nl lipossomas contendo veículo (salina 0,9%), muscimol livre (10mM) ou muscimol encapsulado em lipossomas (9,9 mM). Paineis superior e inferior: alteração da FC em função do tempo. \* $p < 0,05$  em comparação com o grupo onde foi feita a microinjeção de muscimol livre; e # $p < 0,05$  em comparação com o grupo no qual foi feita a microinjeção de lipossomas vazios (two way ANOVA, bonferroni post test). Paineis inferior: valor médio das alterações produzidas durante o estresse por jato de ar. \* $p < 0,05$  (one way ANOVA, bonferroni post test).

180 min

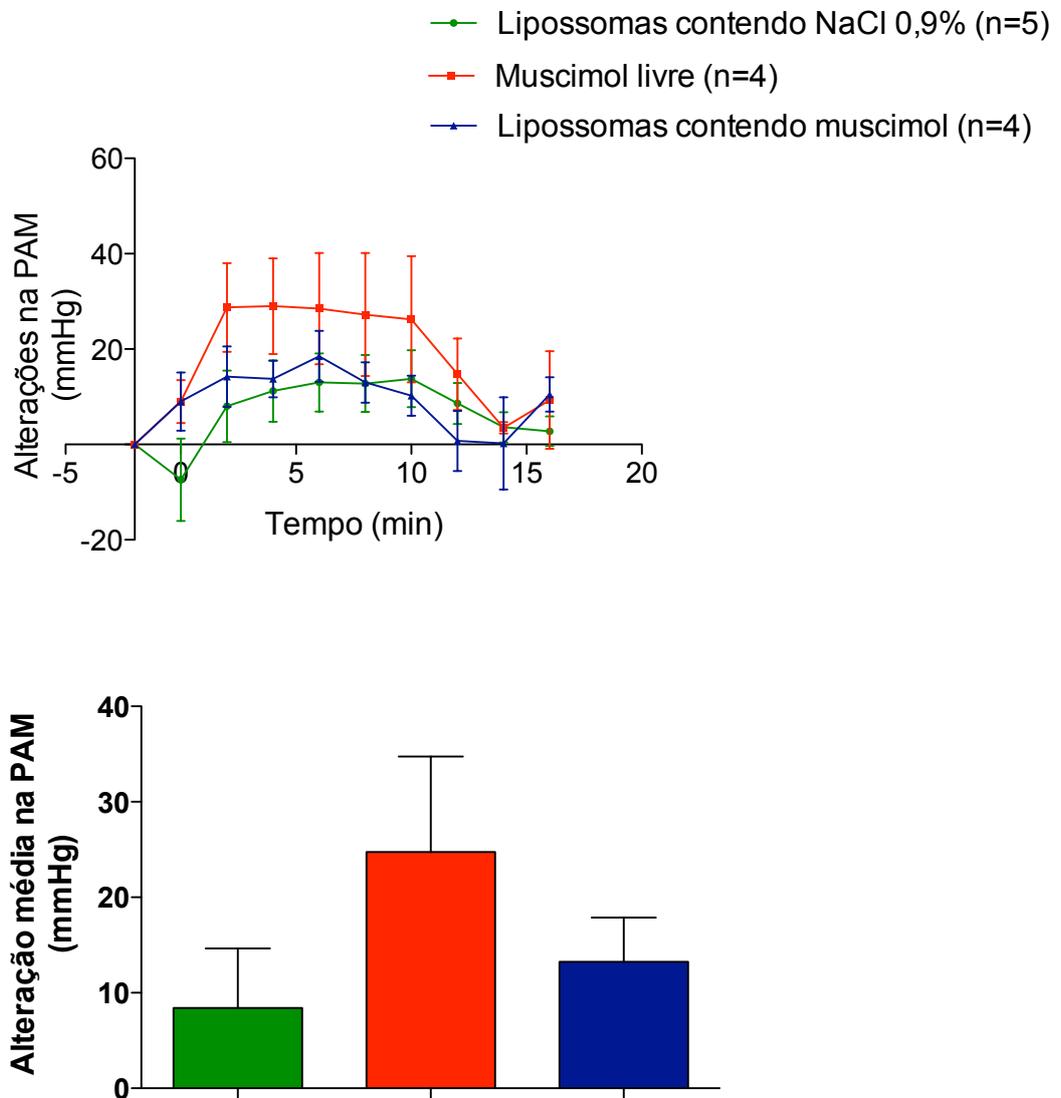


Figura 18: Alterações na PAM produzidas pelo estresse por jato de ar (tempo 0 a 10 minutos) em ratos 180 minutos após a microinjeção bilateral de 100 nl de lipossomas contendo veículo (salina 0,9%), muscimol livre (10mM) ou muscimol encapsulado em lipossomas (9,9 mM). Painel superior: alterações da FC e PAM em função do tempo. Painel inferior: valor médio das alterações produzidas durante o estresse por jato de ar.

As figuras 19 e 20 mostram os resultados de taquicardia e aumento da pressão arterial obtidos 420 minutos após a microinjeção de lipossomas

vazios ou lipossomas contendo muscimol no DMH de ratos. A resposta taquicárdica produzida pelo estresse por jato de ar foi reduzida em média, em 88% nos ratos que receberam a microinjeção de lipossomas contendo muscimol. Não houve alteração significativa nos valores de pressão arterial dos ratos que receberam a microinjeção de lipossomas contendo muscimol em comparação com o grupo controle.

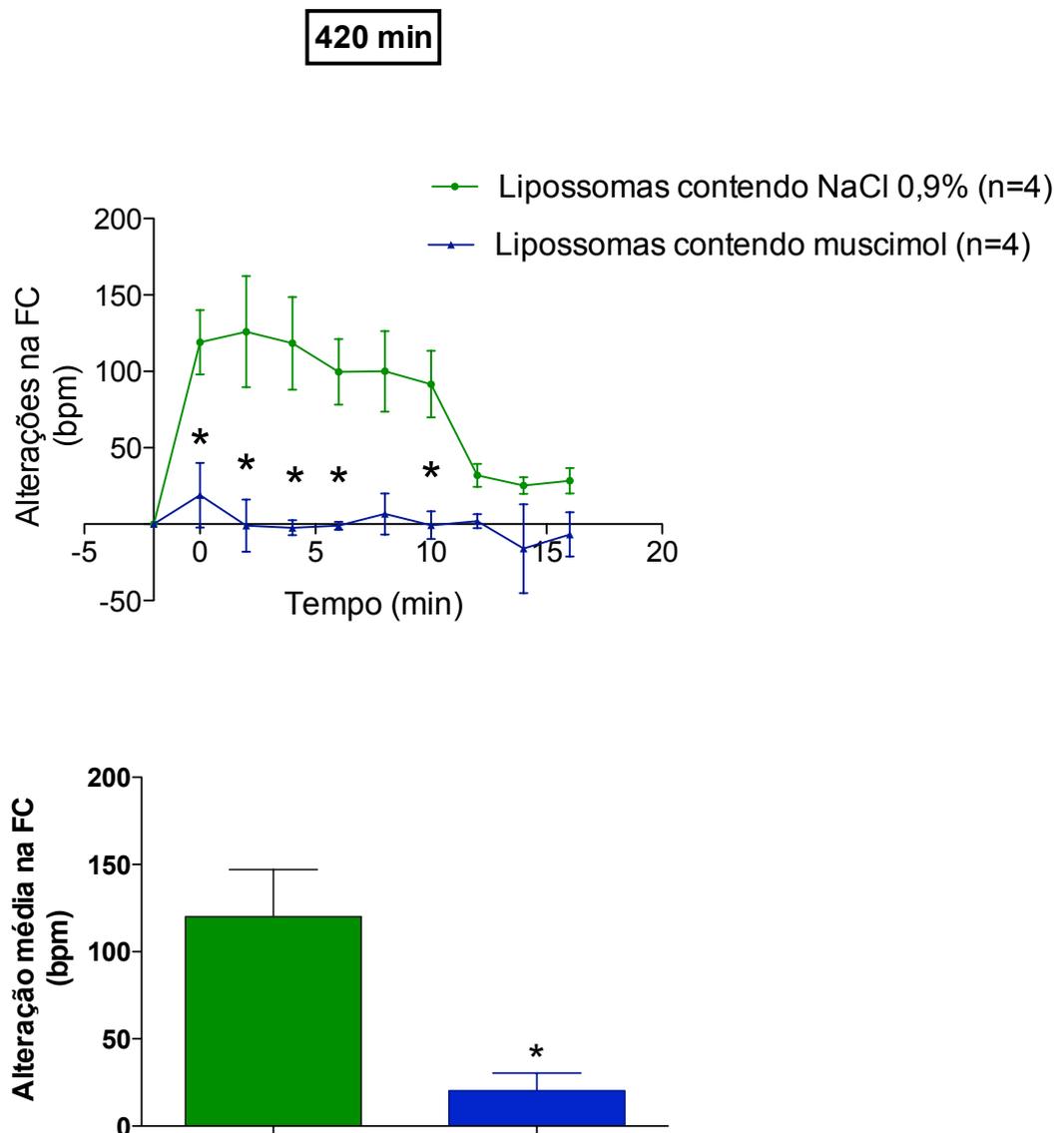


Figura 19: Alterações na FC produzidas pelo estresse por jato de ar (tempo 0 a 10 minutos) em ratos 420 minutos após a microinjeção bilateral de 100 nl de lipossomas contendo veículo (salina 0,9%) ou muscimol encapsulado em lipossomas (9,9 mM). Painel superior: alterações da FC em função do tempo. \* $p < 0,05$  em comparação com o grupo no qual foi feita a microinjeção de lipossomas vazios (two way ANOVA, bonferroni post test). Painel inferior: valor médio das alterações produzidas durante o estresse por jato de ar. \* $p < 0,05$  (*t test*).

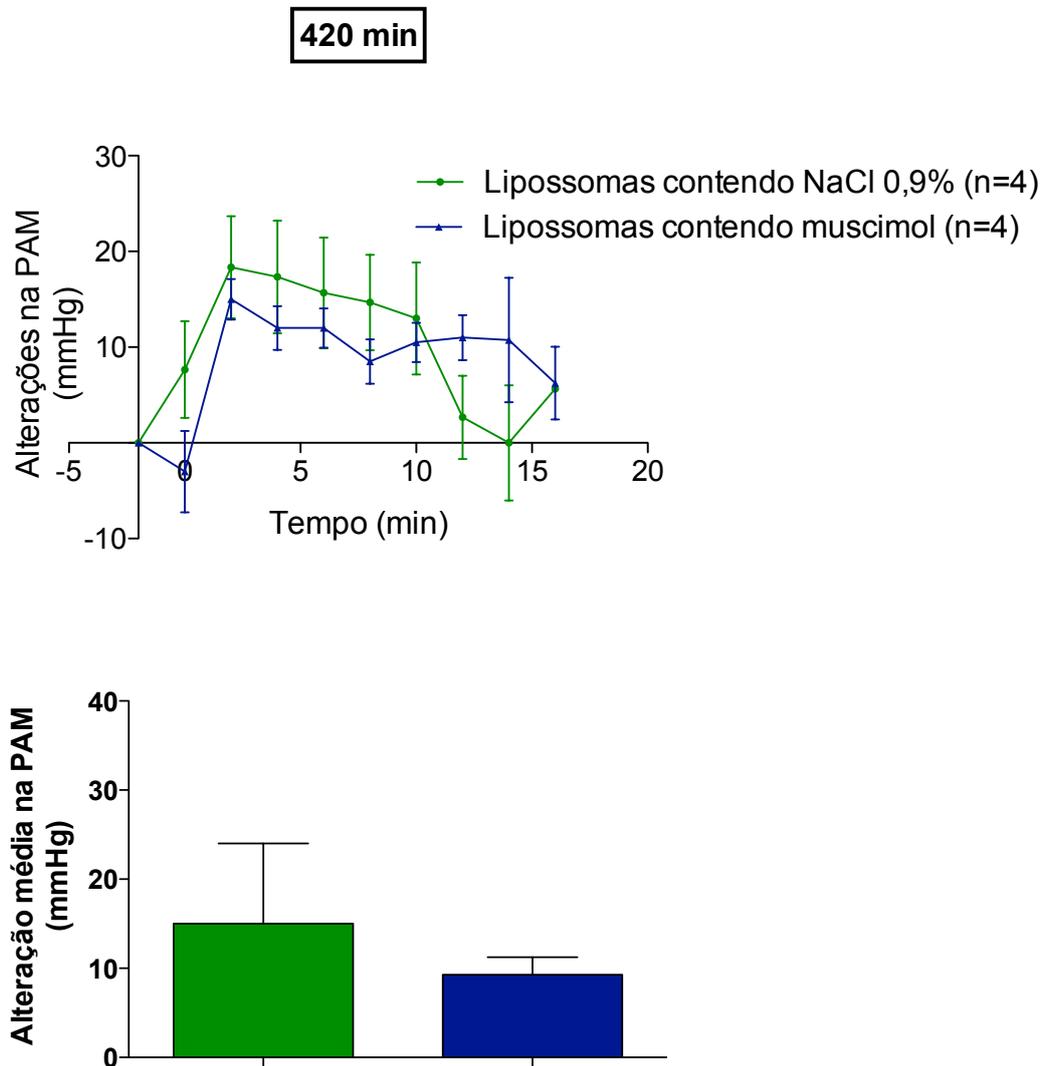


Figura 20: Alterações na PAM produzidas pelo estresse por jato de ar (tempo 0 a 10 minutos) em ratos 420 minutos após a microinjeção bilateral de 100 nl de lipossomas contendo veículo (salina 0,9%) ou muscimol encapsulado em lipossomas (9,9 mM). Painel superior: alterações da FC e PAM em função do tempo. Painel inferior: valor médio das alterações produzidas durante o estresse por jato de ar.

### **Protocolo 3 – Avaliação dos efeitos cardiovasculares produzidos pelo estresse por jato de ar após microinjeção de lipossomas contendo muscimol no DMH de ratos 24 horas após a administração**

Em um grupo separado de animais, o estresse por jato de ar ocorreu 24 horas após a microinjeção de lipossomas contendo muscimol bilateralmente no DMH de ratos. Os valores médios basais pré injeção foram  $106 \pm 4$  mmHg e  $379 \pm 22$  bpm, para pressão arterial e frequência cardíaca, respectivamente.

Os resultados obtidos 24 horas após a microinjeção no DMH de lipossomas contendo muscimol são mostrados nas figuras 21 e 22. Não foi observada redução da taquicardia ou alterações de pressão arterial produzidas pelo estresse por jato de ar, em comparação com o grupo controle.

## 24 horas

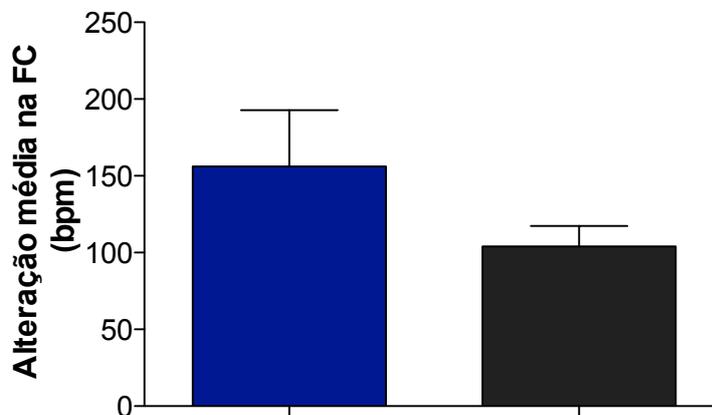
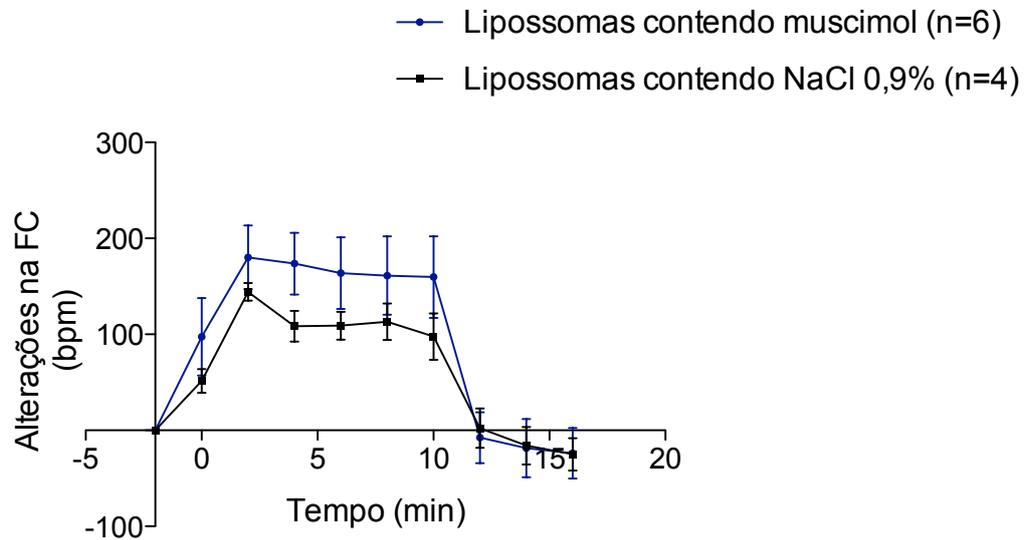


Figura 21: Alterações na FC produzidas pelo estresse por jato de ar (tempo 0 a 10 minutos) em ratos 24 horas após a microinjeção bilateral de 100 nl de lipossomas contendo veículo (salina 0,9%) ou muscimol encapsulado em lipossomas (9,9 mM). Painel superior: alterações da FC em função do tempo. Painel inferior: valor médio das alterações produzidas durante o estresse por jato de ar.

**24 horas**

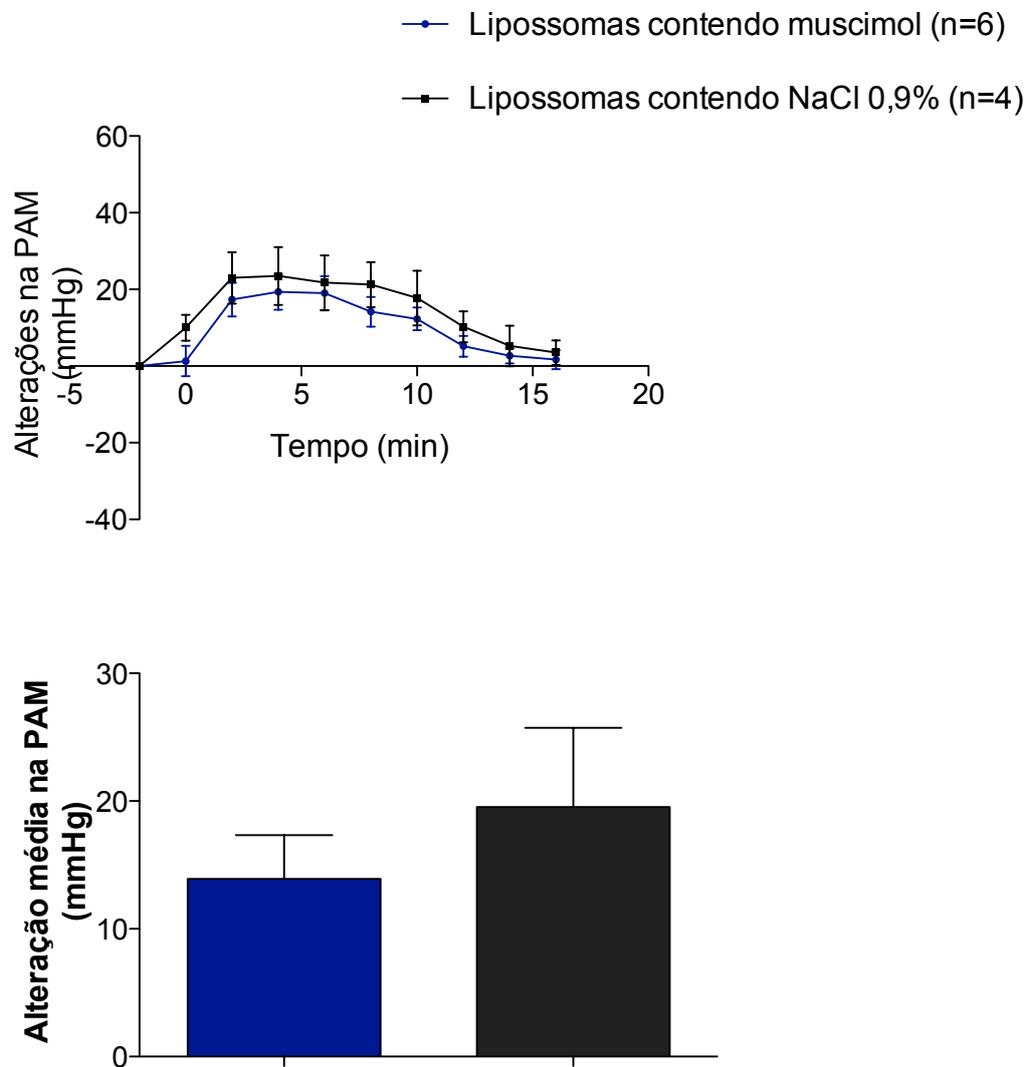


Figura 22: Alterações na PAM produzidas pelo estresse por jato de ar (tempo 0 a 10 minutos) em ratos 24 horas após a microinjeção bilateral de 100 nl de lipossomas contendo veículo (salina 0,9%) ou muscimol encapsulado em lipossomas (9,9 mM). Painel superior: alterações da PAM em função do tempo. Painel inferior: valor médio das alterações produzidas durante o estresse por jato de ar.

#### **Protocolo 4 – Avaliação dos efeitos cardiovasculares produzidos pelo estresse por jato de ar após lesão eletrolítica bilateral no DMH**

A tabela 3 mostra os valores basais de frequência cardíaca e pressão arterial obtidos nos animais antes destes serem submetidos ao estresse por jato de ar. As alterações de frequência cardíaca e pressão arterial média produzidos pelo estresse por jato de ar após lesão eletrolítica bilateral do DMH são mostradas nas figuras 23 e 24. Os valores obtidos foram comparados com os animais que foram submetidos à lesão sham. Não houve alteração significativa nos aumentos de pressão arterial média e frequência cardíaca do grupo que sofreu lesão eletrolítica em comparação com o grupo sham.

	Lesão Eletrolítica bilateral DMH(n=4)		Lesão sham (n=4)	
	FC	PAM	FC	PAM
Valores Basais	391 ± 24	108 ± 8	370 ± 9	107 ± 3

**Tabela 3.** Valores basais e alterações na frequência cardíaca e pressão arterial média produzidas pela lesão eletrolítica bilateral no DMH de ratos ou cirurgia sham

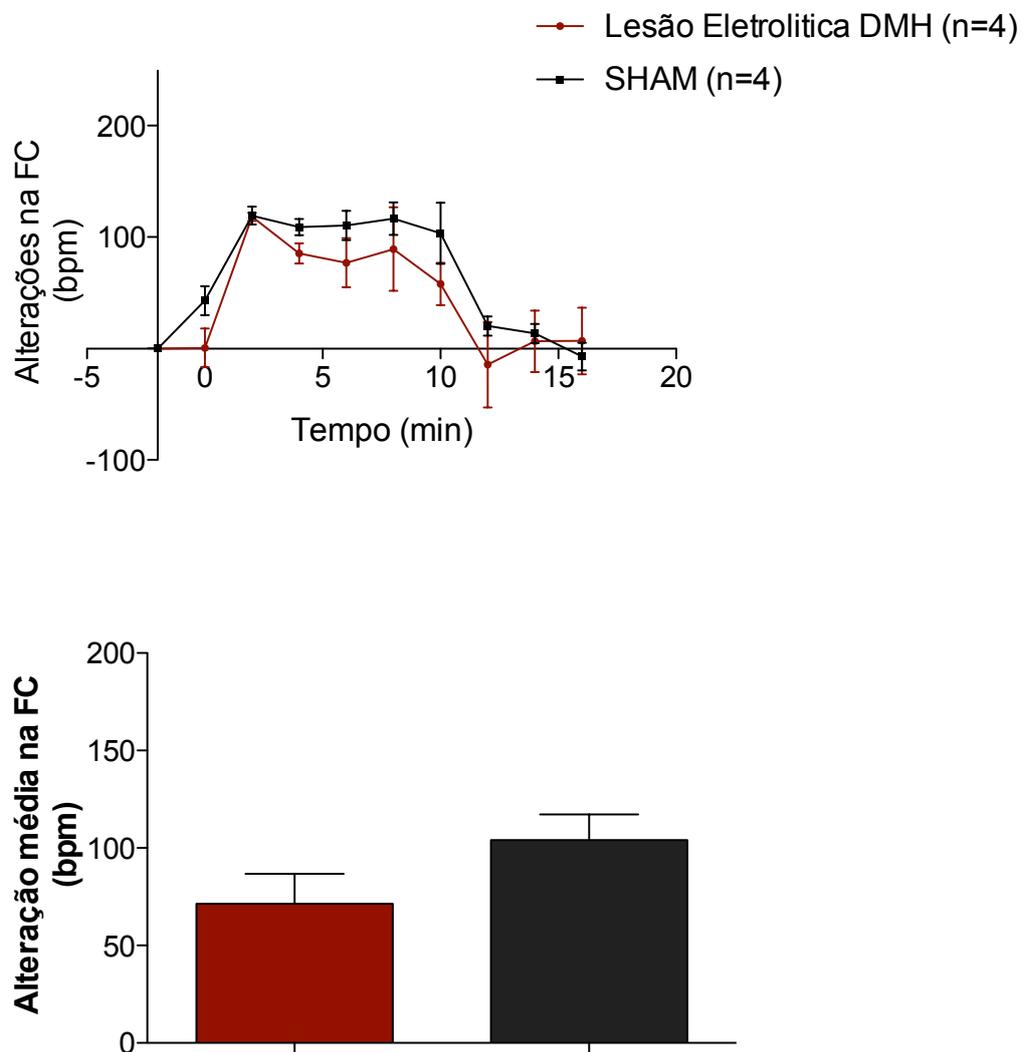


Figura 23: Alterações na FC produzidas pelo estresse por jato de ar (tempo 0 a 10 minutos) em ratos após lesão eletrolítica bilateral no DMH ou animais sham. Painel superior: alterações da FC em função do tempo. Painel inferior: valor médio das alterações produzidas durante o estresse por jato de ar.

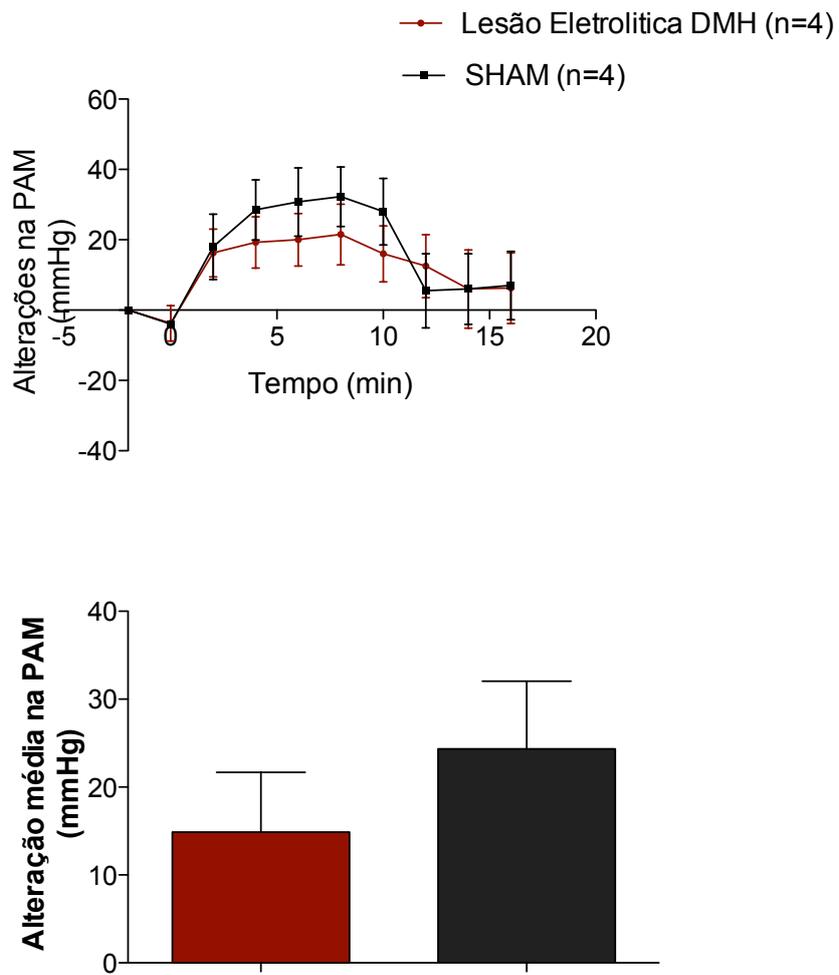


Figura 24: Alterações na PAM produzidas pelo estresse por jato de ar (tempo 0 a 10 minutos) em ratos após lesão eletrolítica bilateral no DMH ou animais sham. Painel superior: alterações da PAM em função do tempo. Painel inferior: valor médio das alterações produzidas durante o estresse por jato de ar.

## 4.2. Análise Histológica

Os locais de microinjeção dos experimentos são apresentados na figura 25. Todos os experimentos em que os dados foram analisados apresentavam sítios de microinjeção ou localizados próximos à zona compacta do DMH, com extensão do nível 3.1 ao 3.6 mm posteriores ao bregma (Paxinos and Watson, 1986). Experimentos que encontravam-se fora dos limites do DMH não foram utilizados na análise (Fig 26).

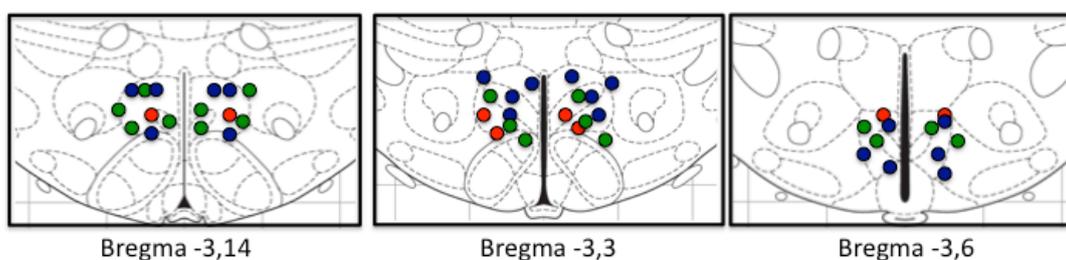


Figura 25: Diagrama esquemático das secções coronais de cérebro de rato ilustrando os sítios de microinjeção no hipotálamo. Os círculos azuis indicam os locais relativos à microinjeção de lipossomas contendo muscimol; os círculos verdes indicam os locais relativos à microinjeção de lipossomas vazios. Os círculos vermelhos indicam os locais relativos à microinjeção de muscimol livre. A distância do bregma é indicada. Adaptado de Paxinos e Watson, 1986.

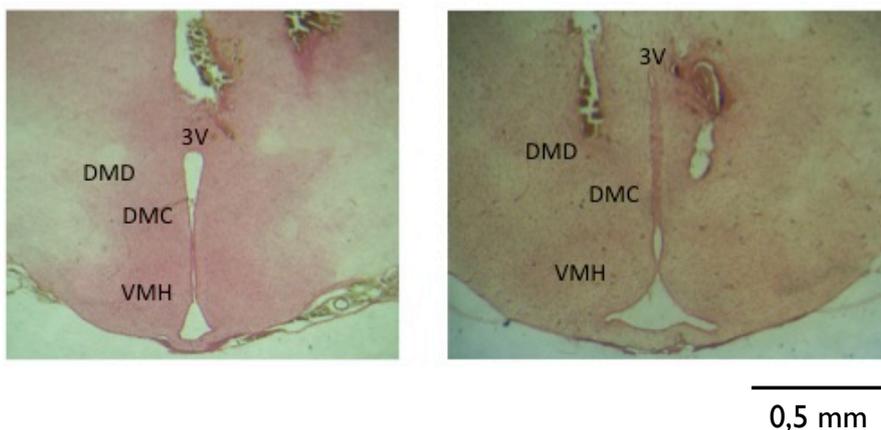


Figura 26 – Fotomicrografias de um corte coronal (50  $\mu$ m) ao nível do DMH para verificação histológica dos sítios de microinjeção. DMC, porção compacta do hipotálamo dorsomedial; DMD, porção difusa do hipotálamo dorsomedial; VMH, hipotálamo ventromedial; 3V, terceiro ventrículo. Painel da esquerda: sítio de microinjeção fora dos limites do DMH (experimento excluído da análise). Painel da direita: sítio de microinjeção dentro dos limites do DMH.

A área de lesão eletrolítica dos animais utilizados nas análises experimentais é exemplificada no diagrama da figura 27. A figura 28 mostra um exemplo de lesão eletrolítica no DMH e um exemplo de lesão SHAM, nos animais utilizados como controle.

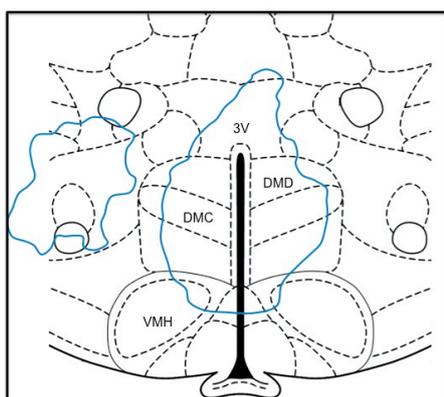


Figura 27: Diagrama esquemático da secção coronal do cérebro do rato, 3,12 milímetros posterior ao bregam, ilustrando a área de lesão no DMH. DMC, porção compacta do hipotálamo dorsomedial; DMD, porção difusa do hipotálamo dorsomedial; VMH, hipotálamo ventromedial; 3V, terceiro ventrículo. Adaptado de Paxinos e Watson, 1986.

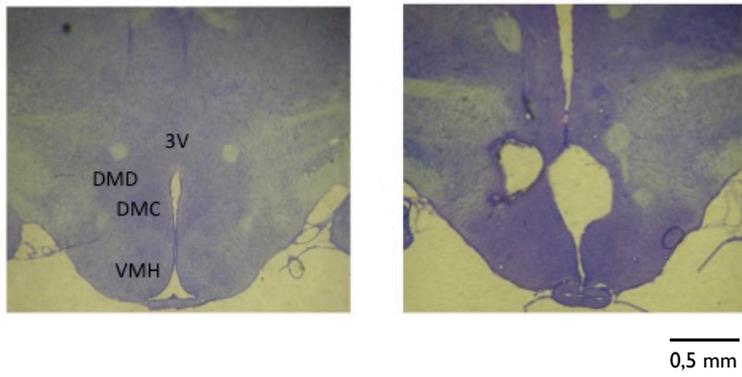


Figura 28: Fotomicrografias de cortes coronais (50  $\mu$ m) ao nível do DMH para verificação histológica da área de lesão eletrolítica. DMC, porção compacta do hipotálamo dorsomedial; DMD, porção difusa do hipotálamo dorsomedial; VMH, hipotálamo ventromedial; 3V, terceiro ventrículo. Painel da esquerda: animal submetido à cirurgia SHAM. Painel da direita: Lesão eletrolítica do DMH.

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo mostra uma ferramenta potencial para a avaliação a longo prazo dos efeitos inibitórios produzidos pelo agonista GABA<sub>A</sub> muscimol no SNC, a partir do encapsulamento dessa substância por lipossomas.

O encapsulamento de um composto em lipossomas possui diversas vantagens metodológicas sobre técnicas convencionais. Considerando-se particularmente drogas de meia vida relativamente curta, ou rápida degradação e remoção do local de administração, os lipossomas impedem a degradação em curto prazo dos compostos pelo metabolismo corporal. Adicionalmente, a liberação lenta e prolongada dos compostos encapsulados permite observações a longo prazo de efeitos produzidos pela administração do composto.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que os lipossomas foram produzidos com sucesso com relação a diâmetro médio – característica importante na permissividade para microinjeção; pouca ou nenhuma toxicidade – fato observado pela ausência de resposta cardiovascular após a microinjeção do lipossoma vazio; e capacidade de encapsulamento do muscimol sem que houvesse perda da sua capacidade funcional. Os experimentos *in vitro* demonstraram ainda que a capacidade do lipossoma em reter o composto encapsulado foi superior a 24 horas, o que possibilita um estudo do SNC através de inibição GABAérgica por um tempo relativamente prolongado em relação à forma livre.

O estudo *in vivo* dos lipossomas também demonstrou sua capacidade em armazenar o composto utilizado e liberar este composto de maneira

controlada, de forma que a inibição do DMH após a microinjeção de lipossomas encapsulando muscimol persiste por, no mínimo, 420 minutos, conforme demonstrado nos resultados.

À comparação do método de microinjeção de lipossomas encapsulando muscimol com o método de lesão eletrolítica para bloqueio crônico da atividade neuronal, pôde-se observar que os parâmetros passíveis de serem avaliados são diferentes. Dessa forma, pode-se considerar que as duas técnicas sejam complementares no entendimento da fisiologia do SNC, já que o método de microinjeção de lipossomas contendo muscimol permite uma avaliação sub-aguda, enquanto o método de lesão eletrolítica permite somente a avaliação dos parâmetros a serem estudados vários dias após os procedimentos de lesão.

A escolha dos lipídeos utilizados é fator determinante no sucesso do encapsulamento de compostos em lipossomas. Para o presente estudo, foi utilizada a distearoil fosfatidilcolina, que apresenta temperatura de transição de fase de 55 graus celsius. Considerando que a Tc desse lipídeo seja maior do que a do meio interno da espécie animal estudada, a membrana dos lipossomas vai encontrar-se em fase rígida ou “gel” (Ulrich, 2002). A membrana nessa fase tem uma estrutura ordenada, com pouca movimentação dos lipídeos. Isso torna a permeabilidade da membrana reduzida, e a capacidade de retenção do composto em seu interior aumentada (Ulrich, 2002; Frezard et al., 2005a; Frezard et al., 2007). A adição de colesterol também é importante na preparação dos lipossomas, pois esse aumenta a força coesiva na membrana (Ulrich, 2002).

O tamanho dos lipossomas deve ser considerado no planejamento de um estudo que vise sua microinjeção no SNC. Primeiramente, os lipossomas quando administrados sistemicamente vão sofrer captação e metabolismo pelas células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) ou sistema retículo endotelial. Para reconhecimento dos lipossomas pelas células do SMF, é necessária a ligação aos lipossomas das opsoninas, que são proteínas capazes de ligar-se a substâncias estranhas ao organismo. Essas são reconhecidas pelos fagócitos, que vão conseqüentemente fazer a digestão das substâncias (Allen et al., 1989; Ishida et al., 2002). No SNC, os lipossomas são provavelmente sujeitos à captação por células com atividade endocítica (células da glia) ou macrófagos do infiltrado inflamatório (este originado pelo processo cirúrgico).

Estudos indicam uma relação importante entre o tamanho dos lipossomas e sua captação pelo SMF (Harashima et al., 2002a; Immordino et al., 2006). Lipossomas de maior tamanho apresentam efeito opsônico mais evidente do que lipossomas menores. Por outro lado, o tamanho da vesícula é determinante da quantidade da substância encapsulada. Vesículas muito pequenas apresentam um compartimento aquoso pequeno. No caso do presente estudo, a substância encapsulada foi o muscimol, e sua solubilidade em água indica que seu encapsulamento ocorreu no compartimento aquoso do lipossoma. Para que o lipossoma pudesse conter uma maior quantidade do composto, foi utilizado neste estudo vesículas grandes unilamelares, de diâmetro de 200 nm. Esse tamanho foi determinado de forma a encapsular uma quantidade considerável do muscimol, sem que a vesícula fosse facilmente reconhecida pelas células fagocitárias.

Uma estratégia importante para manter os lipossomas livres da opsonização é a adição aos lipídeos lipossomais de polímeros de etileno glicol (PEG 2000). Este polímero forma uma camada protetora sobre a superfície lipossomal, impedindo a fusão das membranas e desestabilização. Adicionalmente, o acoplamento às membranas do polímero torna a superfície dos lipossomas recobertas e impede a ligação das opsoninas à membrana. Isso vai fazer com que os lipossomas tornem-se “invisíveis” ou “furtivos” ao SMF, e sua permanência no organismo torna-se prolongada (Torchilin, 2005a; Immordino et al., 2006). O estudo de Silva-Barcellos e colaboradores (2001) utilizou lipossomas furtivos para microinjeção no SNC. A análise da permanência dos lipossomas indicou que estes permaneceram no local da administração por um período superior a 7 dias, indicando que os lipossomas foram removidos lentamente do local de administração.

A cinética de liberação do composto é também um fator determinante na caracterização do lipossoma. Se o composto é armazenado no compartimento aquoso do lipossoma, em condições *in vitro*, a liberação da substância para o meio externo vai ocorrer devido ao gradiente de concentração da substância entre o meio intralipossomal e o meio externo, até que o sistema evolua para o equilíbrio termodinâmico (Frezard et al., 2005a). Dentro do organismo vivo, a liberação do composto pode ocorrer de maneira diferenciada. O contato dos lipossomas com fluidos biológicos pode alterar a permeabilidade da membrana e a velocidade da liberação da substância encapsulada. Substâncias endógenas podem ainda romper a membrana lipossomal, com o conseqüente extravasamento do seu conteúdo (Frezard et al., 2005). No presente estudo, a cinética de liberação dos

lipossomas contendo muscimol *in vitro* mostrou que, 24 horas após incubação dos lipossomas a 37 graus, aproximadamente 40% do composto ainda encontrava-se dentro dos lipossomas. A liberação do muscimol pelos lipossomas foi rápida, se comparada ao estudo de Siva-Barcellos e colaboradores, onde a liberação de angiotensina (1-7) encapsulada em lipossomas permaneceu no interior dos lipossomas por um período maior do que 5 dias (Silva-Barcellos et al., 2001). O baixo peso do muscimol, comparado ao peso molecular da angiotensina (1-7) (114 gramas/mol e 899 gramas/mol, respectivamente) pode explicar essa diferença, uma vez que um menor peso molecular resulta em elevado coeficiente de permeabilidade. Nos estudos *in vivo*, o muscimol encapsulado em lipossomas foi incapaz de exercer seu efeito 24 horas após a administração dos mesmos. Embora alterações de atividade neuronal, como taquifilaxia produzida pelo excesso de estímulo GABAérgico e perda de função dos receptores não possa ser descartada como hipótese para a perda do efeito dos lipossomas 24 horas após a administração, pode-se especular que no ambiente biológico os lipossomas tenham apresentado aceleração na sua cinética de liberação.

A técnica de preparação dos lipossomas também foi escolhida neste estudo de forma a maximizar a taxa de encapsulamento. O método de desidratação e reidratação (Kirby, 1984) permite encapsulamento eficiente de uma grande variedade de compostos em lipossomas. A taxa de encapsulamento deve sempre ser maximizada na preparação dos lipossomas. Altas taxas de encapsulamento significam maior aproveitamento e conseqüentemente menor perda da substância de interesse. A desidratação por liofilização da mistura da suspensão de lipossomas vazios

com a solução aquosa do composto a ser encapsulado faz com que as membranas lipossomais percam sua integridade estrutural. No momento da reidratação, as membranas vão se reconstituir, agora com o composto em seu interior, já que este encontrava-se no meio (Kirby, 1984). O encapsulamento do muscimol apresentou uma taxa de 35%, que é um valor satisfatório dentro das características do composto e da metodologia utilizada.

O crescente uso dos lipossomas em pesquisa experimental e terapeuticamente ocorre por estes apresentarem em sua constituição substâncias não tóxicas, biodegradáveis e praticamente não imunogênicas (Gregoriadis, 2007). O presente estudo reiterou os dados existentes na literatura, mostrando que a microinjeção de lipossomas contendo veículo não parece ter alterado o papel funcional dos neurônios do DMH do ponto de vista do controle cardiovascular. Essa observação indica que o uso de lipossomas para microinjeção em áreas do SNC é uma metodologia viável, e o encapsulamento de neurotransmissores do SNC é uma técnica que pode ser empregada sem que apareçam efeitos colaterais causados pelos lipídeos.

A administração de compostos no SNC através de microinjeções para estudos em neurociência sempre possuiu como fator limitante a dificuldade na avaliação de efeitos crônicos produzidos por estes compostos. Muitos processos fisiológicos e patológicos dependem de atividade crônica de neurotransmissores, e as análises do comportamento do SNC a partir de técnicas de microinjeção de agonistas ou antagonistas de neurotransmissores são muitas vezes incapazes de mimetizar as situações orgânicas, o que prejudica seu entendimento. O encapsulamento do agonista

GABA muscimol pode ser utilizado como ferramenta que traz novas perspectivas à pesquisa em neurociência. Primeiramente, o neurotransmissor GABA tem ações em todas as regiões do SNC (Goodchild et al., 1982; Klein and Harris, 1996; Skilbeck et al., 2010). Várias patologias estão relacionadas com alterações na transmissão GABAérgica; e muitos fármacos atuam através dessa neurotransmissão, como benzodiazepínicos, barbitúricos, anticonvulsivantes, anestésicos gerais entre outros (Katzung, 2004). Dessa forma, o agonista GABA<sub>A</sub> muscimol representa uma ferramenta farmacológica importante para entender o envolvimento de uma população de neurônios em uma via funcional particular devido a sua capacidade de inibir virtualmente todos os neurônios (Brown et al., 1981).

Com relação ao sistema cardiovascular, diversos estudos demonstram que o GABA tem papel importante na sua regulação. Áreas de importância na regulação neural do sistema cardiovascular recebem projeções GABAérgicas, como o núcleo do trato solitário, bulbo rostral ventrolateral, bulbo caudal ventrolateral (Gordon and Sved, 2002a), hipotálamo (Kramer et al., 2000), rafe pallidus (Zaretsky et al., 2003a; Zaretsky et al., 2003b). Adicionalmente, várias patologias do sistema cardiovascular são relacionadas à disfunção GABAérgica em núcleos controladores dessa função. Kramer e colaboradores (Kramer et al., 2000) mostraram que ratos espontaneamente hipertensos apresentam função GABAérgica reduzida no hipotálamo em comparação com animais normotensos, devido à presença de menor quantidade de glutamato descarboxilase – a enzima responsável pela formação de GABA a partir de glutamato. Um outro estudo demonstrou que a microinjeção do agonista GABA<sub>A</sub> muscimol na região paraventricular do

hipotálamo reduziu de maneira importante o tônus vasomotor simpático em ratos espontaneamente hipertensos, apontando para uma redução da atividade GABAérgica nesses animais (Allen, 2002). A presença de GABA ou seus agonistas por períodos prolongados de tempo nas regiões descritas acima pode reverter ou acentuar processos patológicos, indicando novos caminhos no conhecimento das disfunções cardiovasculares determinadas pelo SNC.

Estudos com microinjeção do antagonista dos receptores GABA<sub>A</sub>, bicuculina no DMH indicam que seus neurônios encontram-se sob inibição tônica GABAérgica. Wible e colaboradores (1988), propõem que o estresse agudo resulta em retirada dessa inibição na região do hipotálamo, produzindo ativação do sistema simpatoexcitatório. Adicionalmente, Shekhar (1993) e Shekhar e colaboradores (1996) observaram em ratos acordados que a ativação do DMH pelos antagonistas GABAérgicos BMI e picrotoxina produz aumento de frequência cardíaca, pressão arterial e um padrão de comportamento similar ao observado em estados de ansiedade. Esses resultados indicam que o DMH possui um papel importante na regulação das respostas cardiovasculares e comportamentais.

A similaridade entre o efeito causado pela desinibição dos neurônios do DMH e a resposta ao estresse emocional permitiu sugerir que esta área seria fundamental na integração dessa resposta. Se essa hipótese fosse verdadeira, a inibição da atividade neuronal no DMH deveria reduzir as respostas cardiovasculares induzidas por uma situação de estresse emocional. Nesse sentido, Stotz-Potter e colaboradores (1996b), utilizando um modelo de estresse por jato de ar na face de ratos acordados mostraram

que a inibição bilateral do DMH com muscimol bloqueou o aumento da frequência cardíaca e pressão arterial produzido pela exposição do animal ao jato de ar.

Experimentos subsequentes realizados em ratos acordados mostraram que a ativação do DMH por aminoácidos excitatórios ou BMI produziu aumento de frequência cardíaca, pressão arterial e aumento importante da atividade locomotora em um padrão similar às respostas observadas durante a reação de estresse defensivo (Bailey and Dimicco, 2001). Adicionalmente, Bailey e DiMicco verificaram que, após ativação do DMH, houve um aumento significativo dos níveis plasmáticos de ACTH. Este é um importante sinalizador das respostas neuroendócrinas ao estresse (Pacak and Palkovits, 2001).

O presente estudo corrobora com os resultados anteriormente apresentados, onde as respostas taquicárdica produzida pelo estresse por jato de ar foi reduzida após a microinjeção de muscimol bilateralmente no DMH. Este trabalho, entretanto, acrescenta aos resultados apresentados, já que a técnica empregada permitiu que o estresse emocional nos animais fosse inibido por um período relativamente prolongado. Considerando que as respostas cardiovasculares produzidas pelo estresse emocional são produzidas pela retirada do tônus GABAérgico do DMH, podemos concluir que essa área hipotalâmica foi mantida sob inibição produzida pelo muscimol. Dessa forma, os lipossomas foram eficientes em produzir uma liberação lenta do composto, que durou por no mínimo 7 horas após a administração. Um outro aspecto importante do uso dos lipossomas é sua liberação lenta, que

podem manter uma concentração baixa do composto ativo, produzindo efeitos mais correspondentes àqueles encontrados no ambiente fisiológico.

Embora os lipossomas tenham mostrado uma capacidade em reter o composto *in vitro* por um tempo superior a 24 horas, os experimentos *in vivo* realizados 24 horas após a administração dos lipossomas contendo muscimol foram incapazes de reduzir as respostas cardiovasculares produzidas pelo estresse por jato de ar. Inicialmente, pode-se especular que a liberação do muscimol pelos lipossomas tenha ocorrido de maneira mais rápida, já que o meio interno do organismo vivo é diferente do ambiente *in vitro* (Frezard et al., 2005). Outras hipóteses, entretanto, não podem ser descartadas. Primeiramente, o fluxo de uma substância através da membrana lipossomal depende da concentração da substância no compartimento aquoso interno (Frezard et al., 2005a). Com a redução da concentração do meio interno do lipossoma, o fluxo de muscimol vai necessariamente reduzir. Essa redução pode chegar a níveis onde a concentração do composto que atinge o meio externo seja tão baixa que não possa produzir um bloqueio significativo da atividade neuronal endógena.

A presença do agonista GABA<sub>A</sub> muscimol, e sua consequente ligação ao receptor por períodos prolongados pode trazer alterações celulares. Estudos indicam que a excitação e a inibição de áreas cerebrais estão em equilíbrio, e esse processo é fundamental para o funcionamento do organismo e manutenção da homeostase (Erickson et al., 2006). Exposição crônica de receptores ao seu agonista podem resultar em redução daquela função no sistema. No caso do receptor GABA<sub>A</sub>, algumas hipóteses são propostas para a redução da sua função frente a estimulação crônica.

Dessensibilização e internalização de receptores (Klein and Harris, 1996; Skilbeck et al., 2010), redução do transportador vesicular de aminoácidos inibitórios (com conseqüente redução da liberação sináptica de GABA), aumento dos transportadores vesiculares de glutamato (com aumento da liberação de aminoácidos excitatórios) (Erickson et al., 2006) e até redução dos níveis de RNA's mensageiros das subunidades dos receptores GABA (Klein and Harris, 1996). O presente estudo indica que a microinjeção de muscimol livre no DMH de ratos produziu potenciação da resposta taquicárdica ao estresse por jato de ar após 180 minutos de microinjeção (Figura. 17), que pode corroborar com as hipóteses acima descritas, já que a potenciação dessa resposta pode ser resultante de redução de atividade GABAérgica. O uso dos lipossomas proporciona o aparecimento de novas hipóteses sobre o funcionamento dos receptores no SNC, uma vez que essas situações parecem não ocorrer em estudos onde a intervenção farmacológica na neurotransmissão é aguda.

A comparação do uso de lipossomas contendo muscimol com outra técnica de bloqueio crônico da atividade neuronal foi proposta neste estudo com o intuito de mostrar vantagens e desvantagens do uso dos lipossomas na intervenção a longo prazo do SNC. Os resultados obtidos com o estudo com lesão eletrolítica do DMH indicam que a diferença entre os métodos faz com que sejam utilizados com objetivos diferentes. Primeiramente, o método de lesão eletrolítica não permite avaliação imediata dos parâmetros desejados. O processo cirúrgico exige recuperação do animal de, no mínimo, algumas horas. No caso específico da avaliação de receptores GABA, sua atividade pode estar alterada imediatamente após a cirurgia, uma vez que a

maioria dos anestésicos gerais utilizados são fármacos que atuam interferindo em sinapses GABAérgicas (Katzung, 2004).

Os lipossomas permitem avaliação a curto e a médio prazo. A avaliação a longo prazo do bloqueio de atividade neuronal não foi possibilitada com os lipossomas utilizados nesse estudo. Dessa forma, o método de lesão eletrolítica faz-se vantajoso sobre os lipossomas, caso o objetivo seja produzir alterações duradouras. Por outro lado, a cessação do efeito produzido pelos lipossomas pode ser visto como ponto positivo do emprego dessa técnica, já que preserva a integridade fisiológica e permite ao sistema o retorno às suas condições pré intervenção.

Adicionalmente, os experimentos com lesão eletrolítica do DMH foram incapazes de bloquear as alterações cardiovasculares produzidas pelo estresse por jato de ar. Pode-se especular que, se a área responsável por essas respostas é de fato o DMH, conforme estudos extensos da literatura, o processo de lesão tenha falhado em bloquear esse núcleo. Embora não se possa excluir essa possibilidade, ou a de que alguns neurônios do DMH tenham se mantido íntegros após a lesão eletrolítica, é possível que a lesão do DMH possa produzir deslocamento da via de resposta ao estresse para outra região cerebral. Estudos em ratos acordados demonstraram que lesões eletrolíticas no bulbo rostral ventrolateral – uma região importante na manutenção do tônus simpático (Cochrane and Nathan, 1989, 1993; Dampney, 1994) foram incapazes de reduzir a pressão arterial de ratos. Especulou-se nesses estudos que o organismo tenha utilizado de meios hormonais para a manutenção da pressão arterial, e que o SNC tenha utilizado de vias alternativas para a manutenção da atividade simpática

(Cochrane and Nathan, 1989, 1993). No presente estudo, o tempo dado para a recuperação dos animais (7 dias) permite hipotetizar a possibilidade de substituição da via do estresse emocional para vias neurais alternativas. Mais estudos são necessários, entretanto para confirmar ou refutar essa hipótese.

Em conclusão, os resultados desse estudo apresentam um método alternativo para o estudo da neurotransmissão GABAérgica no SNC, que pode ser vantajoso sobre os métodos convencionais devido à sua capacidade em permitir a avaliação crônica dos efeitos do agonista GABA<sub>A</sub> muscimol. A utilização dos lipossomas como veículos de liberação controlada em sítios cerebrais também abre a possibilidade do encapsulamento de outros neurotransmissores e liberação controlada desses, de forma a adicionar informações ao conhecimento atual sobre o SNC.

## 6. RESUMO

O agonista GABA<sub>A</sub> muscimol é utilizado como um inibidor do sistema nervoso central (SNC). Embora os efeitos do muscimol no bloqueio farmacológico de diversas regiões do SNC sejam bem conhecidos, as alterações produzidas pela inibição crônica de regiões cerebrais são desconhecidas. Os lipossomas são uma ferramenta potencial para a liberação controlada de compostos de rápida distribuição e metabolismo. O objetivo deste estudo foi encapsular o agonista GABA<sub>A</sub> muscimol em lipossomas e avaliar o efeito da sua liberação crônica no hipotálamo dorsomedial (DMH) de ratos – uma região importante na regulação de respostas cardiovasculares ao estresse emocional, sob as alterações cardiovasculares produzidas por esse modelo de estresse.

Lipossomas foram preparados a partir do método de desidratação e reidratação. Os lipídeos utilizados foram DSPC, colesterol e PEG 2000 DSPE. Os lipossomas foram microinjetados bilateralmente no DMH de ratos, que foram submetidos ao estresse por jato de ar 15, 180, 420 minutos e 24 horas após a microinjeção. Lipossomas contendo veículo (NaCl 0,9%) e muscimol na forma livre foram utilizados como controle.

O encapsulamento do muscimol em lipossomas ocorreu de maneira eficiente, com taxa de encapsulamento do 35% e relação final de fármaco lipídeo de 0,01 (p/p). O diâmetro vesicular médio dos lipossomas foi de 192

nm. Os lipossomas foram capazes de reter 40% do muscimol encapsulado após 24 horas e encubação a 37°C em NaCl 0,9%. Os lipossomas foram incapazes de reter o muscimol após 60 horas.

A microinjeção dos lipossomas contendo muscimol inibiu a taquicardia produzida pelo estresse por jato de ar, e essa inibição durou por, no mínimo 420 minutos após a microinjeção (redução da taquicardia de 79, 92 e 71%, 15, 180 e 420 minutos após a microinjeção, respectivamente). Muscimol livre reduziu a taquicardia produzida pelo estresse por jato de ar somente 15 minutos após a microinjeção. Lipossomas contendo veículo (NaCl 0,9%) não produziram bloqueio na resposta taquicárdica produzida pelo estresse por jato de ar. Lipossomas encapsulando muscimol não foram capazes de inibir a taquicardia produzida pelo jato de ar 24 horas após microinjeção. As alterações na pressão arterial não foram revertidas.

Lipossomas contendo muscimol produzem uma atenuação a longo prazo na resposta taquicárdica ao estresse emocional em ratos. Esta técnica torna possível uma intervenção crônica no sistema nervoso central sobre a neurotransmissão mediada pelo GABA e seus agonistas.

## 7. ABSTRACT

The GABA<sub>A</sub> agonist muscimol is widely used as inhibitor of central nervous system (CNS). Although the effects of muscimol microinjections are well known, there is a lack of information regarding the long-term effects of the inhibition of regions in the CNS. Liposomes are a potential tool for sustained release of short half-life compounds. The aim of this study was to encapsulate the GABA<sub>A</sub> agonist muscimol into liposomes and evaluate the effect of chronic release of muscimol into the dorsomedial hypothalamus (DMH) – a brain region involved on integration of cardiovascular response to emotional stress, on the inhibition of stress-induced cardiovascular changes.

Liposomes with encapsulated muscimol were prepared by the dehydration-rehydration method. The lipids used were DSPC, cholesterol and PEG2000-DSPE. Liposomes were injected into the DMH and rats were submitted to the air stress paradigm after 15, 180 and 420 minutes and 24 hours after microinjection. Liposomes containing vehicle (NaCl 0.9%) and free muscimol were used as control.

Muscimol entrapped into liposomes was successfully obtained with an encapsulation efficiency of 35%, and a ratio of encapsulated compound of 0.01 (w/w). We found that muscimol concentration into liposomes was 9.9 mM. The mean vesicle diameter of liposome was 192 nm. Liposome retained 40% of muscimol after 24 hours in incubation at 37°C in NaCl 0.9%.

Liposomes were not able to retain the muscimol for 36 hours.

Microinjection of liposome-entrapped muscimol was found to inhibit the tachycardia induced by air stress paradigm and this inhibition lasted for at least 420 minutes after microinjection (79, 92 and 71% of tachycardia inhibition after microinjection at 15, 180 and 420 minutes respectively). Free muscimol inhibited the air stress-induced cardiovascular changes for only 15 minutes after microinjection. Empty liposomes were not able to block the tachycardia induced by the air stress paradigm. Muscimol entrapped into liposomes were not able to reduce the tachycardia evoked by air stress 24 hours after microinjection. Muscimol-containing liposomes produced a long-term attenuation in the cardiovascular response to emotional stress in rats. This technique will emerge as a potential tool for the chronic intervention on the central nervous system with the neurotransmission mediated by GABA and its agonists.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen AM (2002) Inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus in spontaneously hypertensive rats dramatically reduces sympathetic vasomotor tone. *Hypertension* 39:275-280.
- Allen TM, Hansen C, Rutledge D (1989) Liposomes with prolonged circulation times: Factors affecting uptake by reticuloendothelial and other tissues. *Biochem Biophys Acta* 981:27-35.
- Amiragova MG (1985) Neurophysiological analysis of the development of endocrine and hypertensive reactions in prolonged emotional stress. *Brain Res* 344:303-315.
- Bailey TW, Dimicco JA (2001) Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus elevates plasma ACTH in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280:R8-15.
- Bandler RJ, Jr., Chi CC, Flynn JP (1972) Biting attack elicited by stimulation of the ventral midbrain tegmentum of cats. *Science* 177:364-366.
- Bangham AD, Standish MM, Watkins JC (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 13:238-252.
- Bard P (1928) A diencephalic mechanism for the expression of rage with special reference to the sympathetic nervous system. *American Journal Physiology* 84:490-515.
- Bernard C (1878) *Les Phenomenes de la Vie*. Paris: J-B Bailliere et Fils.
- Bowery NG, Smart TG (2006) GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1:S109-119.

- Brown DA, Higgins AJ, March S, Smart TG (1981) Actions of GABA on mammalian neurones, axons and nerve terminals. New York.
- Callahan MF, Kirby RF, Cunningham JT, Eskridge-Sloop SL, Johnson AK, McCarty R, Gruber KA (1989) Central oxytocin systems may mediate a cardiovascular response to acute stress in rats. *Am J Physiol* 256:H1369-1377.
- Cannon WB (1929) Bodily changes in pain, hunger, fear and rage: an account of recent researches into the function of emotional excitement. New York: Appleton.
- Chi CC, Flynn JP (1971) Neural pathways associated with hypothalamically elicited attack behavior in cats. *Science* 171:703-706.
- Clark JD, Rager DR, Calpin JP (1997) Animal well-being. II. Stress and distress. *Lab Anim Sci* 47:571-579.
- Cochrane KL, Nathan MA (1989) Normotension in conscious rats after placement of bilateral electrolytic lesions in the rostral ventrolateral medulla. *Journal of the Autonomic Nervous System* 26:199-211.
- Cochrane KL, Nathan MA (1993) Pressor systems involved in the maintenance of arterial pressure after lesions of the rostral ventrolateral medulla. *Journal of the Autonomic Nervous System* 46:9-18.
- Critchley HD, Taggart P, Sutton PM, Holdright DR, Batchvarov V, Hnatkova K, Malik M, Dolan RJ (2005) Mental stress and sudden cardiac death: asymmetric midbrain activity as a linking mechanism. *Brain* 128:75-85.
- da Silva LG, de Menezes RC, dos Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Fontes MA (2003) Role of periaqueductal gray on the cardiovascular

- response evoked by disinhibition of the dorsomedial hypothalamus. *Brain Res* 984:206-214.
- Dampney RA (1994) Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev* 74:323-364.
- Davies SJ, Ghahramani P, Jackson PR, Noble TW, Hardy PG, Hippisley-Cox J, Yeo WW, Ramsay LE (1999) Association of panic disorder and panic attacks with hypertension. *Am J Med* 107:310-316.
- de Menezes RC, Zaretsky DV, Fontes MA, DiMicco JA (2006) Microinjection of muscimol into caudal periaqueductal gray lowers body temperature and attenuates increases in temperature and activity evoked from the dorsomedial hypothalamus. *Brain Res* 1092:129-137.
- Diamant M, Kashtanov SI, Fodor M, de Wied D (1992) Corticotropin-releasing factor induces differential behavioral and cardiovascular effects after intracerebroventricular and lateral hypothalamic/perifornical injections in rats. *Neuroendocrinology* 56:750-760.
- DiMicco JA, Samuels BC, Zaretskaia MV, Zaretsky DV (2002) The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. *Pharmacol Biochem Behav* 71:469-480.
- DiMicco JA, Abshire VM, Hankins KD, Sample RH, Wible JH, Jr. (1986) Microinjection of GABA antagonists into posterior hypothalamus elevates heart rate in anesthetized rats. *Neuropharmacology* 25:1063-1066.
- Erickson JD, De Gois S, Varoqui H, Schafer MK, Weihe E (2006) Activity-dependent regulation of vesicular glutamate and GABA transporters: a means to scale quantal size. *Neurochem Int* 48:643-649.

- Farrant M (2001) *Amino Acids: Inhibitory*. New York: John Wiley & Sons Ltd.
- Florey E, McLennan H (1955) The release of an inhibitory substance from mammalian brain, and its effect on peripheral synaptic transmission. *J Physiol* 129:384-392.
- Florey E, Mc LH (1959) The effects of factor I and of gamma-aminobutyric acid on smooth muscle preparations. *J Physiol* 145:66-76.
- Folkow B (1982) Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol Rev* 62:347-504.
- Fontes MA, Tagawa T, Polson JW, Cavanagh SJ, Dampney RA (2001) Descending pathways mediating cardiovascular response from dorsomedial hypothalamic nucleus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H2891-2901.
- Frezard F, Silva-Barcellos NM, Dos Santos RA (2007) A novel approach based on nanotechnology for investigating the chronic actions of short-lived peptides in specific sites of the brain. *Regul Pept* 138:59-65.
- Frezard F, Schettini DA, Rocha OGF, Demicheli C (2005a) Lipossomas: Propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia a base de antimônio. *Quimica Nova* 28:511-518.
- Frezard FG, Schettini DA, Rocha OGF, Demicheli C (2005b) Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Química Nova* 28:511-518.
- Gerin W, Chaplin W, Schwartz JE, Holland J, Alter R, Wheeler R, Duong D, Pickering TG (2005) Sustained blood pressure increase after an acute stressor: the effects of the 11 September 2001 attack on the New York City World Trade Center. *J Hypertens* 23:279-284.

- Goodchild AK, Dampney RA, Bandler R (1982) A method for evoking physiological responses by stimulation of cell bodies, but not axons of passage, within localized regions of the central nervous system. *J Neurosci Methods* 6:351-363.
- Goodchild CS (1993) GABA receptors and benzodiazepines. *Br J Anaesth* 71:127-133.
- Gordon FJ, Sved AF (2002a) Neurotransmitters in central cardiovascular regulation: glutamate and GABA. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 29:522-524.
- Gordon FJ, Sved AF (2002b) Neurotransmitters in central cardiovascular regulation: glutamate and GABA. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29:522-524.
- Goren Z, Aslan N, Berkman K, San T, Sule O, Onat F (1997) Role of paraventricular and dorsomedial nuclei of the hypothalamus and central nucleus of the amygdala on muscimol-induced cardiovascular responses. *Fundam Clin Pharmacol* 11:408-415.
- Gregoriadis G (1976a) The carrier potential of liposomes in biology and medicine (first of two parts). *N Engl J Med* 295:704-710.
- Gregoriadis G (1976b) The carrier potential of liposomes in biology and medicine (second of two parts). *N Engl J Med* 295:765-770.
- Gregoriadis G (2007) *Liposome Technology - Liposome preparation and related techniques*. New York: Informa Healthcare.
- Gregoriadis G, Ryman BE (1972) Fate of protein-containing liposomes injected into rats. An approach to the treatment of storage diseases. *Eur J Biochem* 24:485-491.

- Gregoriadis G, Leathwood PD, Ryman BE (1971) Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS Lett* 14:95-99.
- Harashima H, Ishida T, Kamiya H, Kiwada H (2002a) Pharmacokinetics of targeting with liposomes. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 19:235-275.
- Harashima H, Ishida T, Kamiya H, Kiwada H (2002b) Pharmacokinetics of targeting with liposomes. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 19:235-275.
- Hayashi T (1958) Inhibition and excitation due to gamma-aminobutyric acid in the central nervous system. *Nature* 182:1076-1077.
- Hilton SM (1979) The defense reaction as a paradigm for cardiovascular control. Tokyo: Elsevier.
- Hipolito L, Sanchez-Catalan MJ, Zornoza T, Polache A, Granero L Locomotor stimulant effects of acute and repeated intrategmental injections of salsolinol in rats: role of mu-opioid receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 209:1-11.
- Horiuchi J, McAllen RM, Allen AM, Killinger S, Fontes MA, Dampney RA (2004) Descending vasomotor pathways from the dorsomedial hypothalamic nucleus: role of medullary raphe and RVLM. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287:R824-832.
- Immordino ML, Dosio F, Cattel L (2006) Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int J Nanomedicine* 1:297-315.
- Ishida T, Harashima H, Kiwada H (2002) Liposome clearance. *Biosci Rep* 22:197-224.

- Katzung B (2004) Basic and Clinical Pharmacology, 9th Edition: The McGraw-Hill Companies Inc.
- Kirby CG, G (1984) Dehydration-Rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. *Biotechnology* 2:979-983.
- Klein RL, Harris RA (1996) Regulation of GABAA receptor structure and function by chronic drug treatments in vivo and with stably transfected cells. *Jpn J Pharmacol* 70:1-15.
- Kramer JM, Plowey ED, Beatty JA, Little HR, Waldrop TG (2000) Hypothalamus, hypertension, and exercise. *Brain Res Bull* 53:77-85.
- Krnjevic K, Schwartz S (1966) Is gamma-aminobutyric acid an inhibitory transmitter? *Nature* 211:1372-1374.
- Leor J, Poole WK, Kloner RA (1996) Sudden cardiac death triggered by an earthquake. *N Engl J Med* 334:413-419.
- Lisa M, Filippelli A, Marmo E, Wible JH, Jr., DiMicco JA (1989) Microinjection of muscimol into posterior hypothalamus blocks cardiovascular response to experimental stress in rats. *Pharmacol Res* 21 Suppl 1:9-10.
- Loeb C, Besio G, Mainardi P, Scotto P, Benassi E, Bo GP (1986) Liposome-entrapped gamma-aminobutyric acid inhibits isoniazid-induced epileptogenic activity in rats. *Epilepsia* 27:98-102.
- Lohmeier TE (2001) The sympathetic nervous system and long-term blood pressure regulation. *Am J Hypertens* 14:147S-154S.
- Martin DS, Haywood JR (1993) Hemodynamic responses to paraventricular nucleus disinhibition with bicuculline in conscious rats. *Am J Physiol* 265:H1727-1733.

- Nayar RH, M; Cullis P (1989) Generation of large unilamellar vesicles from long-chain saturated phosphatidilcholines by extrusion technique. *Biochimica et Biophysica Acta* 986:200-206.
- Olson F, Hunt CA, Szoka FC, Vail WJ, Papahadjopoulos D (1979) Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim Biophys Acta* 557:9-23.
- Pacak K, Palkovits M (2001) Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* 22:502-548.
- Parati G, Antonicelli R, Guazzarotti F, Paciaroni E, Mancina G (2001) Cardiovascular effects of an earthquake: direct evidence by ambulatory blood pressure monitoring. *Hypertension* 38:1093-1095.
- Paxinos G, Watson C (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2nd Edition. New York.
- Pedersen CS, Goetghebeur P, Dias R (2009) Chronic infusion of PCP via osmotic mini-pumps: a new rodent model of cognitive deficit in schizophrenia characterized by impaired attentional set-shifting (ID/ED) performance. *J Neurosci Methods* 185:66-69.
- Schmidt B, DiMicco JA (1984) Blockade of GABA receptors in periventricular forebrain of anesthetized cats: effects on heart rate, arterial pressure, and hindlimb vascular resistance. *Brain Res* 301:111-119.
- Shekhar A (1993) GABA receptors in the region of the dorsomedial hypothalamus of rats regulate anxiety in the elevated plus-maze test. I. Behavioral measures. *Brain Res* 627:9-16.

- Shekhar A, Sims LS, Bowsher RR (1993) GABA receptors in the region of the dorsomedial hypothalamus of rats regulate anxiety in the elevated plus-maze test. II. Physiological measures. *Brain Res* 627:17-24.
- Shekhar A, Keim SR, Simon JR, McBride WJ (1996) Dorsomedial hypothalamic GABA dysfunction produces physiological arousal following sodium lactate infusions. *Pharmacol Biochem Behav* 55:249-256.
- Silva-Barcellos NM, Frezard F, Caligiorne S, Santos RA (2001) Long-lasting cardiovascular effects of liposome-entrapped angiotensin-(1-7) at the rostral ventrolateral medulla. *Hypertension* 38:1266-1271.
- Skilbeck KJ, Johnston GA, Hinton T (2010) Stress and GABA receptors. *J Neurochem* 112:1115-1130.
- Smith OA, DeVito JL, Astley CA (1990) Neurons controlling cardiovascular responses to emotion are located in lateral hypothalamus-perifornical region. *Am J Physiol* 259:R943-954.
- Soltis RP, DiMicco JA (1991) GABAA and excitatory amino acid receptors in dorsomedial hypothalamus and heart rate in rats. *Am J Physiol* 260:R13-20.
- Stotz-Potter EH, Morin SM, DiMicco JA (1996a) Effect of microinjection of muscimol into the dorsomedial or paraventricular hypothalamic nucleus on air stress-induced neuroendocrine and cardiovascular changes in rats. *Brain Res* 742:219-224.
- Stotz-Potter EH, Willis LR, DiMicco JA (1996b) Muscimol acts in dorsomedial but not paraventricular hypothalamic nucleus to suppress cardiovascular effects of stress. *J Neurosci* 16:1173-1179.

- Tappaz ML, Brownstein MJ, Kopin IJ (1977) Glutamate decarboxylase (GAD) and gamma-aminobutyric acid (GABA) in discrete nuclei of hypothalamus and substantia nigra. *Brain Res* 125:109-121.
- Torchilin V (2005a) Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews - Drug Discovery* 4:145-160.
- Torchilin VP (2005b) Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov* 4:145-160.
- Ulrich AS (2002) Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Biosci Rep* 22:129-150.
- Villela DC, da Silva LG, Fontes MAP (2009) Activation of 5-HT receptors in the periaqueductal gray attenuates the tachycardia evoked from dorsomedial hypothalamus. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 148:36-43.
- Wible JH, Jr., Luft FC, DiMicco JA (1988) Hypothalamic GABA suppresses sympathetic outflow to the cardiovascular system. *Am J Physiol* 254:R680-687.
- Widmaier R, Strang (2006) Vander, Sherman & Luciano's Human Physiology - The Mechanisms of Body Function, 10th Edition.
- Yang K, Furue H, Kumamoto E, Dong YX, Yoshimura M (2003) Pre- and postsynaptic inhibition mediated by GABA(B) receptors in rat ventrolateral periaqueductal gray neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 302:233-237.
- Zaretsky DV, Zaretskaia MV, DiMicco JA (2003a) Stimulation and blockade of GABA(A) receptors in the raphe pallidus: effects on body temperature,

heart rate, and blood pressure in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R110-116.

Zaretsky DV, Zaretskaia MV, Samuels BC, Cluxton LK, DiMicco JA (2003b) Microinjection of muscimol into raphe pallidus suppresses tachycardia associated with air stress in conscious rats. *J Physiol* 546:243-250.