UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

LILIAN LIZ REIS SILVA

PARTICIPAÇÃO DA NEUROTRANSMISSÃO DO FATOR LIBERADOR DE CORTICOTROFINA NO CÓRTEX INSULAR NO CONTROLE DAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E ANSIOGÊNICA AO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO EM RATOS

Araraquara
2026

LILIAN LIZ REIS SILVA

Participação da neurotransmissão do fator liberador de corticotrofina no córtex insular no controle das respostas cardiovasculares e ansiogênica ao estresse de restrição em ratos

Tese de Doutorado apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani
Coorientador: Ricardo Luiz Nunes de Souza

Araraquara
2026

R378p

Reis Silva, Lilian Liz

Participação da neurotransmissão do fator liberador de corticotrofina no córtex insular no controle das respostas cardiovasculares e ansiogênica ao estresse de restrição em ratos / Lilian Liz Reis Silva. -- Araraquara, 2026

112 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara

Orientador: Carlos Cesar Crestani

Coorientador: Ricardo Luiz Nunes de Souza

1. córtex insular. 2. fator liberador de corticotrofina. 3. estresse de restrição. 4. córtex cerebral. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: PARTICIPAÇÃO DA NEUROTRANSMISSÃO DO FATOR LIBERADOR DE CORTICOTROFINA NO CÓRTEX INSULAR NO CONTROLE DAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E ANSIOGÊNICA AO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO EM RATOS
AUTORA: LILIAN LIZ REIS SILVA
ORIENTADOR: CARLOS CESAR CRESTANI
COORIENTADOR: RICARDO LUIZ NUNES DE SOUZA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciências Farmacêuticas, Área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI (Participação Virtual)
UNESP / Câmpus de Araraquara - FCF

Prof. Dr. MARCO ANTÔNIO PELIKY FONTES (Participação Virtual)
Departamento de Fisiologia e Biofísica / Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Prof. Dr. GUILHERME FLEURY FINA SPERETTA (Participação Virtual)
Centro de Ciências Biológicas do Departamento de Ciências Fisiológicas / Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Dr. MARCELO TADEU MARIN (Participação Virtual)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / UNESP / Câmpus de Araraquara - FCF

Profa. Dra. SANDRA LIA DO AMARAL CARDOSO (Participação Virtual) Departamento de Educação Física / UNESP / Câmpus de Bauru - FC

Araraquara, 23 de abril de 2026.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por apoiar minhas decisões e se fazer presente, mesmo longe. Em especial, agradeço à minha mãe e à minha irmã por não medirem esforços para me ver feliz. Eu não estaria onde estou sem a força e exemplo dessas duas mulheres. Aos meus sobrinhos por serem o meu escape da realidade e por me lembrarem a delícia de ser criança.

Aos meus amigos, Larissa, Gabriel Silvestre, Carlos Roberto, Giselle, Euler, Maurílio, Leonardo, Wellington, Frank, Gabriel Arthur, Gabriel da Costa e Graziela por serem as melhores companhias, frutos das melhores risadas, pela lealdade e por estarem sempre dispostos a me acolher. Ao Gustavo que, além de melhor amigo, é meu porto seguro nos melhores e nos piores momentos.

Aos professores Carlos Cesar Crestani e Ricardo Luiz Nunes de Souza pela oportunidade de fazer parte dos grupos de pesquisa, por acreditarem e confiarem no meu trabalho, por todos os ensinamentos práticos e teóricos durante toda execução dessa pesquisa, além da contribuição para o meu crescimento acadêmico e profissional.

A todos integrantes do Laboratório de Neuropsicofarmacologia, em especial Lucas Barreto, Alex, Lucas da Mata, Adrielly e Gabriela, por me auxiliarem na execução do projeto. E demais membros do laboratório por todos ensinamentos e momentos compartilhados.

Ao Prof. Dr. Benno Roozendaal e a todos do grupo de *Behavioral Neuroscience* do *Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour*, do *Department of Cognitive Neuroscience* da *Radboud University Medical Center* pelo acolhimento durante o período sanduíche, pelos ensinamentos e pela oportunidade de ampliar minha visão científica e acadêmica.

Aos animais utilizados nesse trabalho, que tiveram suas vidas interrompidas de forma involuntária para que resultados fossem obtidos.

Aos professores do Laboratório de Farmacologia, Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin e a Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta.

À secretária do departamento Tirene Pavanelli e aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFar/UNESP) pelo espaço físico e equipamentos oferecidos para o desenvolvimento do projeto e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de formação profissional.

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processo nº 2020/15352-3.

RESUMO

O estresse é um fator de risco para doenças cardiovasculares e transtornos psiquiátricos, embora seus mecanismos neurobiológicos ainda não sejam completamente compreendidos. O córtex insular (CI) atua na integração autonômica e emocional, apresentando dissociação funcional ao longo do seu eixo rostrocaudal. O sistema do fator liberador de corticotrofina (CRF), um importante modulador das respostas ao estresse, foi identificado no CI. Entretanto, o papel da neurotransmissão CRFérgica no CI na regulação das respostas autonômicas e comportamentais frente ao estresse ainda não havia sido elucidado. Desse modo, este estudo investigou o papel da neurotransmissão CRFérgica, mediado pela ativação do receptor CRF_1, nas sub-regiões anterior (CIa), posterior-rostral (CIpr) e posterior-caudal (CIpc) do CI no controle das respostas cardiovasculares e comportamentais ao estresse de restrição em ratos. Para isso, ratos Wistar foram submetidos à cirurgia estereotáxica para a implantação bilateral de cânulas-guia em uma das sub-regiões do CI. Grupos independentes de animais receberam microinjeções locais de veículo (100 nL), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF_1, 5 nmol/100 nL) ou CRF (0,07 nmol/100 nL) e foram expostos a uma sessão de estresse de restrição agudo ou à 10ª sessão de estresse de restrição repetido (ERR). As respostas cardiovasculares [pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda (TCC)] foram avaliadas durante o estresse agudo e a 10ª sessão de estresse, enquanto o efeito do tipo ansiogênico e a ativação neuronal (imunorreatividade à proteína Fos) foram avaliados após o estresse agudo. Também foram avaliados os níveis do receptor CRF_1 nas sub-regiões do CI após exposição repetida ao estresse. Observamos que o antagonismo do CRF_1 no CIa atenuou a taquicardia e aumentou a queda da TCC durante o estresse de restrição agudo. No CIpr, a mesma abordagem farmacológica reduziu a resposta pressora e aumentou a queda da TCC. No CIpc observou-se diminuição das respostas pressora e taquicárdica após o antagonismo do receptor CRF_1. O ERR alterou o controle da neurotransmissão CRFérgica sobre as respostas cardiovasculares no CIpr e no CIpc, mas não no CIa. Essas alterações foram caracterizadas por uma atenuação dos efeitos observados com o antagonismo do receptor CRF_1 durante a 10ª sessão em relação aos efeitos observados nos animais estressados agudamente, enquanto a administração local de CRF provocou efeitos nos animais estressados cronicamente que não foram observados em animais submetidos a uma única sessão de estresse. O bloqueio do receptor CRF_1 no CIa e CIpc inibiu o comportamento tipo-ansiogênico induzido pelo estresse agudo, efeito que foi replicado no CIpr pela administração de CRF. O estresse de restrição agudo aumentou a ativação neuronal no CIa e CIpr e reduziu no CIpc. A microinjeção de CP376395 no CIa aumentou a ativação neuronal local, enquanto a administração de CRF no CIpc reverteu a alteração induzida pela restrição. O ERR não alterou a expressão do receptor CRF_1 em nenhuma das sub-regiões do CI. Em síntese, nossos resultados indicam que a neurotransmissão CRFérgica no CI exerce controle sítio-específico sobre as respostas cardiovasculares e comportamentais ao estresse, mediada por uma modulação complexa da ativação neuronal local. Adicionalmente, evidenciamos que esse controle cardiovascular é modulado pela exposição prévia ao estresse.

Palavras-chave: córtex insular; fator liberador de corticotrofina; estresse de restrição; córtex cerebral.

ABSTRACT

Stress is a risk factor for cardiovascular diseases and psychiatric disorders, although its neurobiological mechanisms are not yet fully understood. The insular cortex (IC) plays a key role in autonomic and emotional integration and exhibits functional dissociation along its rostrocaudal axis. The corticotropin-releasing factor (CRF) system, an important modulator of stress responses, has been identified in the IC. However, the role of CRFergic neurotransmission in the IC in regulating autonomic and behavioral responses to stress had not yet been elucidated. Thus, this study investigated the role of CRFergic neurotransmission mediated by activation of the CRF1 receptor in the anterior (aIC), rostral-posterior (rpIC), and caudal-posterior (cpIC) subregions of the IC in the control of cardiovascular and behavioral responses to restraint stress in rats. For this purpose, Wistar rats were submitted to stereotaxic surgery for bilateral implantation of guide cannulae into one of the IC subregions. Independent groups of animals received local microinjections of vehicle (100 nL), CP376395 (selective CRF1 receptor antagonist, 5 nmol/100 nL), or CRF (0.07 nmol/100 nL) and were exposed either to an acute restraint stress session or to the 10th session of repeated restraint stress (RRS). Cardiovascular responses [mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR), and tail skin temperature (TST)] were evaluated during acute stress and during the 10th stress session, whereas anxiety-like behavior and neuronal activation (Fos protein immunoreactivity) were assessed after acute stress exposure. CRF1 receptor levels in IC subregions were also evaluated after repeated stress exposure. We observed that CRF1 receptor antagonism in the aIC attenuated tachycardia and increased the reduction in TST during acute restraint stress. In the rpIC, the same pharmacological approach reduced the pressor response and increased the reduction in TST. In the cpIC, CRF1 receptor antagonism decreased both pressor and tachycardic responses. Repeated restraint stress altered the control exerted by CRFergic neurotransmission over cardiovascular responses in the rpIC and cpIC, but not in the aIC. These changes were characterized by attenuation of the effects observed with CRF1 receptor antagonism during the 10th session compared with those observed in acutely stressed animals, whereas local administration of CRF produced effects in chronically stressed animals that were not observed in animals exposed to a single stress session. Blockade of CRF1 receptors in the aIC and cpIC inhibited acute stress-induced anxiety-like behavior, an effect that was replicated in the rpIC following CRF administration. Acute restraint stress increased neuronal activation in the aIC and rpIC and reduced it in the cpIC. Microinjection of CP376395 into the aIC increased local neuronal activation, whereas CRF administration in the cpIC reversed the alteration induced by restraint stress. Repeated restraint stress did not alter CRF1 receptor expression in any IC subregion. In summary, our results indicate that CRFergic neurotransmission in the IC exerts site-specific control over cardiovascular and behavioral responses to stress through a complex modulation of local neuronal activation. Additionally, we demonstrate that this cardiovascular control is modulated by prior exposure to stress.

Keywords: insular cortex; corticotropin-releasing factor; restraint stress; cerebral cortex.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Localização do córtex insular (CI) nos cérebros humano e de roedores. **(A)** Anatomia do cérebro humano. Canto superior esquerdo: o CI está dobrado abaixo do sulco lateral, encoberto pelos lobos frontal, parietal e temporal. Canto superior direito: o afastamento dos lobos temporal e parietal permite a visualização do CI; o CI é dividido em anterior e posterior pelo sulco insular central. Parte inferior: cortes coronais (1) e horizontais (2) do cérebro humano revelam a posição do CI (em vermelho). **(B)** Canto superior esquerdo: CI localizado na superfície lateral do cérebro, acima da fissura rinal. A artéria cerebral média (ACM) cruza o CI. Canto superior direito: subdivisões e regiões corticais vizinhas do CI. AI, CI agranular; AID, CI agranular, parte dorsal; AIV, CI agranular, parte ventral; AIP, CI agranular, parte posterior; DI, CI disgranular; GI, CI granular. Parte inferior: cortes coronais em diferentes níveis revelam a localização e as camadas do CI de roedores. Modificado de Gogolla et al. (2017). 27

Figura 2 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do papel da neurotransmissão CRFérgica ao longo do eixo anteroposterior do córtex insular (CI) no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição agudo e repetido. **(A)** Linha do tempo ilustrando a sequência dos procedimentos cirúrgicos para implantação bilateral das cânulas-guia direcionadas ao córtex insular anterior (CIa), córtex insular posterior-rostral (CIpr) ou córtex insular posterior-caudal (CIpc) (cirurgia estereotáxica), canulação da artéria femoral e a exposição dos animais ao estresse de restrição agudo ou repetido (ERR, 10 sessões). **(B)** Linha do tempo ilustrando os procedimentos experimentais realizados no dia do teste para a avaliação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição agudo e repetido. 49

Figura 3 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do papel da neurotransmissão CRFérgica ao longo do eixo anteroposterior do córtex insular (CI) no controle da resposta tipo-ansiogênica ao estresse de restrição agudo. Sequência dos procedimentos cirúrgicos para implantação bilateral das cânulas-guia direcionadas ao CI anterior (CIa), CI posterior-rostral (CIpr) ou CI posterior-caudal (CIpc) (cirurgia estereotáxica), bem como dos procedimentos experimentais realizados no dia do teste para a avaliação das respostas comportamentais ao estresse de restrição. 50

Figura 4 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do papel da neurotransmissão CRFérgica ao longo do eixo anteroposterior do córtex insular (CI) na ativação neuronal induzida pelo estresse de restrição agudo. Sequência dos procedimentos cirúrgicos para implantação bilateral das cânulas-guia direcionadas ao CI anterior (CIa), CI posterior-rostral (CIpr) ou CI posterior-caudal (CIpc) (cirurgia estereotáxica), bem como dos procedimentos experimentais realizados no dia do teste para a avaliação da alteração na ativação neuronal induzida pelo estresse. 51

Figura 5 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito da exposição repetida (ERR) ao estresse de restrição sobre os níveis proteicos do receptor CRF_1 ao longo do eixo anteroposterior do córtex insular (CI). 52

Figura 6 – Locais de microinjeção ao longo do eixo rostrocaudal do córtex insular (CI) dos animais utilizados na avaliação do papel da neurotransmissão

CRFérgica ao longo do eixo anteroposterior do CI no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição agudo e repetido**. (A)** Fotomicrografias de cortes coronais do encéfalo mostrando os locais bilaterais de microinjeção (à esquerda) e representações diagramáticas adaptadas de Paxinos e Watson (1997) (à direita), indicando o córtex insular anterior (CIa; IA 12,7 mm), o córtex insular posterior-rostral (CIpr; IA 9,7 mm) e o córtex insular posterior-caudal (CIpc; IA 7,2 mm). **(B)** Representação diagramática baseada no atlas cerebral de ratos de Paxinos e Watson (1997) indicando os locais de microinjeção no CIa, CIpr e CIpc de veículo (CIa, CIpr e CIpc: círculos pretos), CP376395 (CIa: círculos azuis claros; CIpr: círculos lilás; CIpc: círculos rosa claros) ou CRF (CIa: círculos azuis escuros; CIpr: círculos roxos; CIpc: círculos rosa escuros) de animais submetidos ao estresse de restrição agudo ou repetido. 54

Figura 7 – Papel da neurotransmissão CRFérgica no córtex insular anterior (CIa) no controle das respostas pressora e taquicárdica ao estresse de restrição agudo e repetido (ERR). Microinjeção bilateral de veículo (100 nL, branco), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF1, 5 nmol/100 nL, azul claro) ou CRF (0,07 nmol/100 nL, azul escuro) no CIa. Curvas temporais de variação da pressão arterial média (ΔPAM) e frequência cardíaca (ΔFC); e a média da ΔPAM e ΔFC durante os períodos de restrição e recuperação de animais submetidos ao estresse de restrição agudo (superior) e ao estresse de restrição repetido (ERR; 10ª sessão, inferior). A área sombreada indica o período de estresse de restrição. Os círculos e as barras representam a média ± EPM. @P<0,05 naquele ponto específico em comparação com o respectivo grupo controle. ANOVA trifatorial seguida do pós-teste de Tukey. 59

Figura 8 – Papel da neurotransmissão CRFérgica no córtex insular posterior-rostral (CIpr) no controle das respostas pressora e taquicárdica ao estresse de restrição agudo e repetido. Microinjeção bilateral de veículo (100 nL, branco), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF1, 5 nmol/100 nL, lilás) ou CRF (0,07 nmol/100 nL, roxo) no CIpr. Curvas temporais de variação da pressão arterial média (ΔPAM) e frequência cardíaca (ΔFC); e a média da ΔPAM e ΔFC durante os períodos de restrição e recuperação de animais submetidos ao estresse de restrição agudo (superior) e ao estresse de restrição repetido (ERR, 10ª sessão, inferior). A área sombreada indica o período de estresse de restrição. Os círculos e as barras representam a média ± EPM. @P<0,05 naquele ponto específico em comparação com o respectivo grupo controle. #P<0,05 em comparação com o respectivo grupo agudo. *P<0,05 em comparação com o respectivo grupo controle. ANOVA trifatorial seguida do pós-teste de Tukey. 62

Figura 9 – Papel da neurotransmissão CRFérgica no córtex insular posterior-caudal (CIpc) no controle das respostas pressora e taquicárdica ao estresse de restrição agudo e repetido. Microinjeção bilateral de veículo (100 nL, branco), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF1, 5 nmol/100 nL, rosa claro) ou CRF (0,07 nmol/100 nL, magenta) no CIpc. Curvas temporais de variação da pressão arterial média (ΔPAM) e frequência cardíaca (ΔFC); e a média da ΔPAM, ΔFC durante os períodos de restrição e recuperação de animais submetidos ao estresse de restrição agudo (superior) e ao estresse de restrição repetido (ERR; 10ª sessão, inferior). A área sombreada indica o período de estresse de restrição. Os círculos e as barras representam a média ± EPM. @P<0,05 naquele ponto específico em comparação com o respectivo grupo controle.

#P<0,05 em comparação com o respectivo grupo agudo. *P<0,05 em comparação com o respectivo grupo controle. ANOVA trifatorial seguida do pós-teste de Tukey. 65

Figura 10 – Imagens representativas de ratos ilustrando a temperatura cutânea da cauda (TCC) antes, durante e após o estresse de restrição agudo ou repetido (10ª sessão). 66

Figura 11 – Papel da neurotransmissão CRFérgica no córtex insular anterior (CIa) no controle da resposta de queda da temperatura cutânea da cauda (TCC) ao estresse de restrição agudo e repetido. Microinjeção bilateral de veículo (100 nL, branco), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF1, 5 nmol/100 nL, azul claro) ou CRF (0,07 nmol/100 nL, azul escuro) no CIa. Curvas temporais de variação da TCC (ΔTCC) e a média da ΔTCC durante os períodos de restrição e recuperação de animais submetidos ao estresse de restrição agudo (superior) e ao estresse de restrição repetido (ERR; 10ª sessão, inferior). A área sombreada indica o período de estresse de restrição. Os círculos e as barras representam a média ± EPM. @P<0,05 naquele ponto específico em comparação com o respectivo grupo controle. ANOVA trifatorial seguida do pós-teste de Tukey. 67

Figura 12 – Papel da neurotransmissão CRFérgica no córtex insular posterior-rostral (CIpr) no controle da resposta de queda da temperatura cutânea da cauda (TCC) ao estresse de restrição agudo e repetido. Microinjeção bilateral de veículo (100 nL, branco), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF1, 5 nmol/100 nL, lilás) ou CRF (0,07 nmol/100 nL, roxo) no CIpr. Curvas temporais de variação da TCC (ΔTCC) e a média da ΔTCC durante os períodos de restrição e recuperação de animais submetidos ao estresse de restrição agudo (superior) e ao estresse de restrição repetido (ERR, 10ª sessão, inferior). A área sombreada indica o período de estresse de restrição. Os círculos e as barras representam a média ± EPM. @P<0,05 naquele ponto específico em comparação com o respectivo grupo controle. #P<0,05 em comparação com o respectivo grupo agudo. *P<0,05 em comparação com o respectivo grupo controle. ANOVA trifatorial seguida do pós-teste de Tukey. 69

Figura 13 – Papel da neurotransmissão CRFérgica no córtex insular posterior-caudal (CIpc) no controle da resposta de queda da temperatura cutânea da cauda (TCC) ao estresse de restrição agudo e repetido. Microinjeção bilateral de veículo (100 nL, branco), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF_1, 5 nmol/100 nL, rosa claro) ou CRF (0,07 nmol/100 nL, magenta) no CIpc. Curvas temporais de variação da TCC (ΔTCC) e a média da ΔTCC durante os períodos de restrição e recuperação de animais submetidos ao estresse de restrição agudo (superior) e ao estresse de restrição repetido (ERR, 10ª sessão, inferior). A área sombreada indica o período de estresse de restrição. Os círculos e as barras representam a média ± EPM. 70

Figura 14 – Locais de microinjeção ao longo do eixo rostrocaudal do córtex insular (CI) em animais utilizados para avaliação do papel da neurotransmissão CRFérgica ao longo do eixo anteroposterior do CI no controle da resposta tipo-ansiogênica ao estresse de restrição agudo. Representação diagramática baseada no atlas cerebral de ratos de Paxinos e Watson (1997) indicando os locais de microinjeção no CIa, CIpr e CIpc de veículo (CIa, CIpr e CIpc: círculos pretos), CP376395 (CIa: círculos azuis claros; CIpr: círculos lilás; CIpc: círculos

rosa claros) ou CRF (CIa: círculos azuis escuros; CIpr: círculos roxos; CIpc: círculos rosa escuros). 71

Figura 15 – Papel da neurotransmissão CRFérgica no córtex insular anterior (CIa) no controle da resposta tipo-ansiogênica ao estresse de restrição agudo. Microinjeção bilateral de veículo (100 nL, n=8, barras pretas), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF_1, 5 nmol/100 nL, n=11, barras azuis claras) ou CRF (0,07 nmol/100 nL, n=12, barras azuis escuras) no CIa. Os animais que não foram expostos ao estresse de restrição (naive, n=8, barras brancas) foram usados como controle para os efeitos do estresse agudo de restrição. As colunas representam a média ± EPM. *P<0,05. ANOVA monofatorial seguida do pós-teste de Tukey. 72

Figura 16 – Papel da neurotransmissão CRFérgica no córtex insular posterior-rostral (CIpr) no controle da resposta tipo-ansiogênica ao estresse de restrição agudo. Microinjeção bilateral de veículo (100 nL, n=11, barras pretas), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF_1, 5 nmol/100 nL, n=12, barras lilás) ou CRF (0,07 nmol/100 nL, n=11, barras roxas) no CIpr. Os animais que não foram expostos ao estresse de restrição (naive, n=10, barras brancas) foram usados como controle para os efeitos do estresse agudo de restrição. As colunas representam a média ± EPM. *P<0,05. ANOVA monofatorial seguida do pós-teste de Tukey. 73

Figura 17 – Papel da neurotransmissão CRFérgica no córtex insular posterior-caudal (CIpc) no controle da resposta tipo-ansiogênica ao estresse de restrição agudo. Microinjeção bilateral de veículo (100 nL, n=10, barras pretas), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF_1, 5 nmol/100 nL, n=12, barras rosas) ou CRF (0,07 nmol/100 nL, n=13, barras magentas) no CIpc. Os animais que não foram expostos ao estresse de restrição (naive, n=9, barras brancas) foram usados como controle para os efeitos do estresse agudo de restrição. As colunas representam a média ± EPM. *P<0,05. ANOVA monofatorial seguida do pós-teste de Tukey. 74

Figura 18 – Alteração da ativação neuronal ao longo do eixo anteroposterior do córtex insular (CI) induzida pelo estresse de restrição agudo. **(A)** Seções coronais esquemáticas e representativas das sub-regiões anterior (CIa), posterior-rostral (CIpr) e posterior-caudal (CIpc) do CI, mostrando as áreas analisadas para quantificação de células Fos-positivas. As seções coronais esquemáticas foram adaptadas de Paxinos e Watson (1997). **(B)** Seções coronais representativas mostrando células Fos-positivas no CIa, CIpr e CIpc de animais que não foram submetidos ao estresse que receberam microinjeção bilateral de veículo (100 nL, grupo controle) e de animais submetidos ao estresse de restrição que receberam microinjeção bilateral de veículo (100 nL, grupo veículo), CP376395 (antagonista de receptor CRF_1, 5 nmol/100 nL, grupo CP376395) ou de CRF (0,07 nmol/100 nL, grupo CRF). 75

Figura 19 – Papel da neurotransmissão CRFérgica ao longo do eixo anteroposterior do córtex insular (CI) na alteração da ativação neuronal induzida pelo estresse de restrição agudo. Número de neurônios positivos para a proteína Fos em animais não estressados e tratados com veículo (grupo controle) e animais submetidos à sessão aguda de estresse de restrição e tratados com veículo (100 nL, grupo veículo), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF_1, 5 nmol/100 nL, grupo CP376395) ou CRF (0,07 nmol/100 nL, grupo

CRF). **(A)** Valores do CI anterior dos grupos controle (barra branca, n=7), veículo (barra preta, n=7), CP376395 (barra azul claro, n=9) e CRF (barra azul escuro, n=7); **(B)** Valores do CI posterior-rostral dos grupos controle (barra branca, n=11), veículo (barra preta, n=10), CP376395 (barra lilás, n=12) e CRF (barra roxa, n=10); **(C)** Valores do grupo CI posterior-caudal dos grupos controle (barra branca, n=7), veículo (barra preta, n=7), CP376395 (barra rosa, n=9) e CRF (barra magenta, n=7). As barras representam a média ±EPM. * P<0,05, ANOVA monofatorial seguida pelo pós-teste de Tukey..... 76

Figura 20 – Efeito da exposição repetida ao estresse de restrição sobre os níveis proteicos do receptor CRF_1 ao longo do eixo anteroposterior do córtex insular (CI). **(A)** Imagens representativas de Western Blotting ilustrando a marcação do receptor CRF_1 no CI anterior (CIa), CI posterior-rostral (CIpr) e CI posterior-caudal (CIpc) de animais controle (não estressados) e submetidos ao estresse de restrição repetido (ERR). **(B)** Expressão do receptor CRF_1 no CIa, CIpr e CIpc de animais controle (n=9) e submetidos ao ERR (n=9). **(C)** Conteúdo proteico total no CIa, CIpr e CIpc de animais controle (n=9) e submetidos ao ERR (n=9). As barras representam a média ± erro padrão da média (EPM). ANOVA bifatorial. 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Coordenadas de cirurgia estereotáxica utilizadas para implante de cânulas-guia bilaterais direcionadas ao córtex insular anterior (CIa), posterior-rostral (CIpr) ou posterior-caudal (CIpc)..... 40

Tabela 2 – Parâmetros basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda (TCC)**.** Efeito da microinjeção bilateral de veículo (100 nL), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF1, 5 nmol/100 nL) ou CRF (0,07 nmol/100 nL) no córtex insular (CI) anterior (CIa), posterior-rostral (CIpr) e posterior-caudal (CIpc) sobre os valores pré-estresse de PAM, FC e TCC em animais submetidos a sessões de estresse de restrição agudo ou repetido (ERR). 56

Tabela 3 – Sumário dos resultados. Efeitos dos tratamentos farmacológicos com veículo (100 nL), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF_1, 5 nmol/100 nL) ou CRF (0,07 nmol/100 nL) no córtex insular (CI) anterior (CIa), posterior-rostral (CIpr) e posterior-caudal (CIpc) nas respostas cardiovasculares (resposta pressora e taquicárdica) e autonômica [redução da temperatura cutânea da cauda (TCC)] ao estresse de restrição agudo ou repetido (ERR), na resposta comportamental do tipo-ansiogênica [redução da exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE)] ao estresse agudo, na ativação neuronal local em resposta ao estresse agudo, além da análise do efeito da exposição ao ERR sobre os níveis proteicos do receptor CRF_1 e das proteínas totais ao longo do eixo anteroposterior do CI..... 79

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT – Serotonina (5-hidroxitriptamina)
5-HT$_{1A}$ – Receptor de serotonina 1A
5-HT$_{2A}$ – Receptor de serotonina 2A
ACM – Artéria cerebral média
ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico
AI – Córtex insular agranular (*Agranular insular cortex*)
aIC – Córtex insular anterior
AID – Córtex insular agranular, parte dorsal
AIP – Córtex insular agranular, parte posterior
AIV – Córtex insular agranular, parte ventral
AMPA – Receptor de ácido α-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolpropiônico
ANOVA – Análise de Variância (*Analysis of Variance*)
BLA – Amígdala basolateral
BSA – Albumina sérica bovina (*Bovine serum albumin*)
CeA – Núcleo central da amígdala
CI – Córtex insular
CIa – Córtex insular anterior
CIp – Córtex insular posterior
CIpc – Córtex insular posterior-caudal
CIpr – Córtex insular posterior-rostral
CNQX – 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
$CoCl_2$ – Cloreto de cobalto
cpIC – Córtex insular posterior-caudal
CRF – Fator liberador de corticotrofina
CRF-BP – Proteína de ligação do CRF
CRF_1 – Receptor do fator liberador de corticotrofina tipo 1
CRF_2 – Receptor do fator liberador de corticotrofina tipo 2
$CRF_{2\alpha}$ – Receptor do fator liberador de corticotrofina tipo 2 subtipo alfa
$CRF_{2\beta}$ – Receptor do fator liberador de corticotrofina tipo 2 subtipo beta
DI – Córtex insular disgranular
DAB – 3,3′-diaminobenzidina
DCV – Doenças cardiovasculares
ECV – Estresse crônico variado
EPM – Erro padrão da média
ERR – Estresse de restrição repetido
FC – Frequência cardíaca
FE – Fobia específica
GABA – Ácido gama-aminobutírico
GI – Córtex insular granular
HL – Hipotálamo lateral
HPA – Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (ou hipotálamo-pituitária-adrenal)
i.c.v. – Intracerebroventricular
i.p. – Intraperitoneal

IC – Córtex insular
rpIC – Córtex insular posterior-rostral
LCE – Labirinto em cruz elevado
MAGL – Monoacilgliceril lipase
mPFC – Córtex pré-frontal medial
NLET – Núcleo leito da estria terminal
NMDA – Receptor de N-metil-D-aspartato
NTS – Núcleo do trato solitário
OMS – Organização Mundial da Saúde
PA – Pressão arterial
PACAP – Polipeptídeo ativador da adenilato ciclase hipofisária
PAGd – Substância cinzenta periaquedutal dorsal
PAM – Pressão arterial média
PAP – Pressão arterial pulsátil
PBS – Tampão fosfato salina
PVN – Núcleo paraventricular do hipotálamo
PVT – Tálamo paraventricular
RNAm – RNA mensageiro
SAG – Síndrome de adaptação geral
SAM – Sistema simpático-adreno-medular
SNA – Sistema nervoso autônomo
SNC – Sistema nervoso central
SNS – Sistema nervoso simpático
TAG – Transtorno de ansiedade generalizada
TAS – Transtorno de ansiedade social
TCC – Temperatura cutânea da cauda
UCN1 – Urocortina 1
UCN2 – Urocortina 2
UCN3 – Urocortina 3

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
2 REVISÃO DE LITERATURA 21
2.1 O ESTRESSE 21
2.2 O CÓRTEX INSULAR 26
2.3 O FATOR LIBERADOR DE CORTICOTROFINA 33
2.4 O CÓRTEX INSULAR E O FATOR LIBERADOR DE CORTICOTROFINA 36
3 OBJETIVO 38
4 MATERIAL E MÉTODOS 39
4.1 ANIMAIS 39
4.2 CIRURGIA DE ESTEREOTAXIA 39
4.3 CANULAÇÃO DA ARTÉRIA FEMORAL 40
4.4 REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL E DA FREQUÊNCIA CARDÍACA 41
4.5 REGISTRO DA TEMPERATURA CUTÂNEA DA CAUDA 41
4.6 FÁRMACOS E SOLUÇÕES 41
4.7 MICROINJEÇÃO DE DROGAS 42
4.8 ESTRESSE DE RESTRIÇÃO 42
4.8.1 Estresse de restrição agudo 43
4.8.2 Estresse de restrição repetido 43
4.9 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO 43
4.10 DETERMINAÇÃO ANATÔMICA DOS SÍTIOS DE INJEÇÃO 43
4.11 IMUNOHISTOQUÍMICA 44
4.12 WESTERN BLOTTING 45
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA 46
5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS 48
5.1 PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO CRFÉRGICA AO LONGO DO EIXO ANTEROPOSTERIOR DO CI NO CONTROLE DAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES AO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO AGUDO E REPETIDO 48
5.2 PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO CRFÉRGICA AO LONGO DO EIXO ANTEROPOSTERIOR DO CI NO CONTROLE DA RESPOSTA TIPO-ANSIOGÊNICA AO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO AGUDO 49
5.3 PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO CRFÉRGICA AO LONGO DO EIXO ANTEROPOSTERIOR DO CI NA ALTERAÇÃO DA ATIVAÇÃO NEURONAL INDUZIDA PELO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO AGUDO 50
5.4 EFEITO DA EXPOSIÇÃO REPETIDA AO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO SOBRE OS NÍVEIS PROTEICOS DO RECEPTOR CRF_1 AO LONGO DO EIXO ANTEROPOSTERIOR DO CI 51
6 RESULTADOS 53

6.1 PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO CRFÉRGICA AO LONGO DO EIXO ANTEROPOSTERIOR DO CI NO CONTROLE DAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES AO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO AGUDO E REPETIDO 53

6.1.1 Papel da neurotransmissão CRFérgica ao longo do eixo anteroposterior do CI no controle das respostas pressora e taquicárdica ao estresse de restrição agudo e repetido 57

6.1.2 Papel da neurotransmissão CRFérgica ao longo do eixo anteroposterior do CI no controle da resposta de queda da temperatura cutânea da cauda ao estresse de restrição agudo e repetido 66

6.2 PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO CRFÉRGICA AO LONGO DO EIXO ANTEROPOSTERIOR DO CI NO CONTROLE DA RESPOSTA DO TIPO-ANSIOGÊNICA AO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO AGUDO 71

6.3 PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO CRFÉRGICA AO LONGO DO EIXO ANTEROPOSTERIOR DO CI NA ALTERAÇÃO DA ATIVAÇÃO NEURONAL INDUZIDA PELO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO AGUDO 74

6.4 EFEITO DA EXPOSIÇÃO REPETIDA AO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO SOBRE OS NÍVEIS PROTEICOS DO RECEPTOR CRF_1 AO LONGO DO EIXO ANTEROPOSTERIOR DO CI 76

7 DISCUSSÃO 78

8 CONCLUSÕES 94

REFERÊNCIAS 95

ANEXO A – Artigo publicado 112

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) representam o principal desafio em saúde pública em escala global e permanecem como a maior causa de mortalidade no mundo (Victor *et al.*, 2025). Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que entre 2019 e 2021 as DCV foram responsáveis por aproximadamente 18,6 a 20,5 milhões de óbitos anuais, o que corresponde a cerca de um terço de todos os óbitos globais (Di Cesare *et al.*, 2024; Li *et al.*, 2021; Roth *et al.*, 2020). Entre essas condições, a doença isquêmica do coração e o acidente vascular cerebral são as mais prevalentes, respondendo por cerca de 50% e 35% das mortes cardiovasculares, respectivamente (Di Cesare *et al.*, 2024; Mensah; Roth; Fuster, 2019; Roth *et al.*, 2020).

Paralelamente, os transtornos de ansiedade representam os distúrbios mentais mais prevalentes em nível mundial, afetando aproximadamente 3,9-4,4% da população global, o que corresponde a mais de 300 milhões de indivíduos, além de contribuírem para incapacidade funcional e perda de anos de vida saudável (Xiong *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2025). A ansiedade exerce impacto substancial para além do sofrimento psíquico, sendo um importante fator de risco para o desenvolvimento e agravamento das DCV. Estima-se que 30% dos pacientes cardiopatas apresentam transtornos de ansiedade, condição associada a piores desfechos clínicos, menor adesão ao tratamento e maior mortalidade (Celano *et al.*, 2016; Storer *et al.*, 2023). Além disso, evidências epidemiológicas e genéticas indicam que os transtornos de ansiedade podem aumentar em até cinco vezes o risco de eventos coronarianos e insuficiência cardíaca (Peng *et al.*, 2024; Thurston; Rewak; Kubzansky, 2013). Em conjunto, a ansiedade e as DCV impõem custos expressivos às despesas globais em saúde, relacionados a hospitalizações, incapacidade funcional e aposentadorias precoces (Liu *et al.*, 2024; Victor *et al.*, 2025). Apesar dos avanços terapêuticos, a incidência de ambas as condições continua em ascensão (Bie *et al.*, 2024; Victor *et al.*, 2025), reforçando a necessidade de compreender os mecanismos biológicos que integram as respostas emocionais e autonômicas.

Tanto as DCV quanto os transtornos mentais são condições multifatoriais, resultantes da interação entre fatores genéticos e ambientais. Entre os fatores ambientais, o estresse ocupa posição central. Estímulos estressores intensos, persistentes ou repetidos desafiam a homeostase e aumentam a vulnerabilidade

ao desenvolvimento de transtornos de ansiedade e DCV. Durante situações estressantes, ocorre a ativação coordenada de circuitos neurais, mecanismos neuroendócrinos e respostas neuroimunes (Joëls; Baram, 2009). Os principais efetores dessa resposta são o sistema nervoso autônomo (SNA) e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), que culminam na liberação de glicocorticoides (cortisol em humanos e corticosterona em roedores) e catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) (McEwen, 1998). No sistema cardiovascular, as alterações autonômicas promovem o aumento da frequência cardíaca (FC) e da pressão arterial (PA), aumento da força de contração cardíaca, aumento do débito cardíaco, redistribuição do fluxo sanguíneo e ajuste do barorreflexo (Golbidi; Frisbee; Laher, 2015). Simultaneamente, no âmbito emocional, o estresse recruta redes corticolímbicas envolvidas no processamento de ameaça, aumentando a liberação de noradrenalina a partir do *locus coeruleus*, o que intensifica o estado de vigilância e favorece comportamentos relacionados à ansiedade (Daviu *et al.*, 2019).

O enfrentamento eficaz do estresse pressupõe que essa resposta seja iniciada diante de uma ameaça e posteriormente encerrada, permitindo o restabelecimento do equilíbrio fisiológico. Entretanto, quando o estresse é excessivo, repetido ou prolongado, a resposta torna-se desadaptativa, elevando o risco de DCV e favorecendo a persistência de estados ansiosos (Buenrostro-Jáuregui *et al.*, 2025). A ativação crônica do SNA e do eixo HPA contribui para aterosclerose, hipertensão, inflamação sistêmica, disfunção endotelial, aumento da hemostasia e redução sustentada da variabilidade da FC (Brotman; Golden; Wittstein, 2007; Golbidi; Frisbee; Laher, 2015). No âmbito psicológico, o estresse repetido fortalece circuitos associados ao medo e promove alterações em sistemas de neurotransmissão essenciais para a regulação do humor, incluindo os sistemas serotoninérgico, GABAérgico e dopaminérgico (Pêgo *et al.*, 2010).

Nesse contexto integrativo, estruturas como hipocampo, amígdala e regiões do córtex pré-frontal desempenham papel fundamental na integração de informações sensoriais e na modulação de respostas viscerais (Herman *et al.*, 2003; Myers, 2017). O córtex insular (CI) destaca-se como uma região cerebral complexa e multifuncional envolvida na integração de informações sensoriais, emocionais e cognitivas (Gogolla, 2017). Reconhecido como o principal centro de interocepção do encéfalo, o CI atua como uma interface funcional que traduz

estados fisiológicos internos em percepções subjetivas e, reciprocamente, modula a homeostase visceral em função do estado emocional (Gogolla, 2017; Nieuwenhuys, 2012). Contudo, o CI não é uma estrutura homogênea e sua extensão neuroanatômica apresenta organização rostrocaudal com conectividades e especializações funcionais distintas. Evidências indicam que as porções anteriores estão mais associadas ao processamento emocional e cognitivo, enquanto as regiões posteriores participam mais diretamente da integração somatossensorial e autonômica (Gogolla, 2017). No entanto, os mediadores neuroquímicos específicos que permitem que essas sub-regiões do CI controlem a balança entre emoção e função autonômica ainda não são totalmente compreendidos.

Um candidato central nessa regulação é o fator liberador de corticotrofina [do inglês, *corticotropin-releasing factor* (CRF)]. Embora inicialmente descrito como envolvido na primeira etapa para a ativação do eixo HPA através de sua presença no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), o CRF também atua como um neurotransmissor em regiões límbicas e corticais envolvidas no processamento das informações durante estímulos aversivos (Joëls; Baram, 2009). No CI, a presença de terminais CRFérgicos e receptores do tipo CRF_1 sugere um papel modulador local (Chalmers *et al.*, 1996; Henckens; Deussing; Chen, 2016; Potter *et al.*, 1994). Contudo, há uma lacuna no conhecimento sobre como essa neurotransmissão no CI influencia as respostas cardiovasculares e ansiogênica durante o estresse.

Diante desse cenário, a hipótese central deste trabalho é que a neurotransmissão CRFérgica no CI, agindo via ativação do receptor CRF_1, modula de forma sítio-específica ao longo do eixo anteroposterior as respostas cardiovasculares e comportamentais ao estresse de restrição em ratos. E, considerando que a exposição repetida ao estresse altera a expressão de CRF e de seus receptores em diversas estruturas límbicas (Chen; Tang; Yang, 2008; Oliveira *et al.*, 2021; Sutherland *et al.*, 2010), nós também avaliamos a hipótese de que o estresse de restrição repetido (ERR) promove alterações na expressão do receptor CRF_1 no CI e afeta o controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição pela neurotransmissão CRFérgica do CI.

Em suma, por meio dessas abordagens experimentais, este estudo busca contribuir para a compreensão dos mecanismos neurobiológicos envolvidos nas

respostas cardiovasculares e ansiogênica ao estresse, ampliando o entendimento das bases centrais que conectam respostas autonômicas e comportamentais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O ESTRESSE

O conceito de estresse tem raízes profundas na fisiologia e na psicologia, sendo resultado de uma construção teórica que evoluiu ao longo do século XX. Um dos primeiros pesquisadores a descrever sistematicamente as respostas do organismo a situações desafiadoras foi Walter Cannon (1871–1945). Em seus estudos sobre a manutenção da homeostase, Cannon caracterizou a chamada reação de “luta ou fuga”, marcada por alterações autonômicas, como o aumento da FC e a liberação de adrenalina, que preparam o organismo para enfrentar ou escapar de uma ameaça. Embora ainda não utilizasse o termo estresse, Cannon estabeleceu as bases fisiológicas para a compreensão das respostas adaptativas a estímulos aversivos (Robinson, 2018).

Posteriormente, em uma obra clássica e ainda amplamente citada, *The Stress of Life*, publicada pela primeira vez em 1946, Hans Selye (1907–1982) definiu o termo estresse no contexto biológico como “*uma resposta inespecífica do corpo para qualquer demanda*”. Essa definição surgiu da observação de que diferentes agentes nocivos, fossem eles físicos, químicos ou emocionais, provocavam respostas fisiológicas semelhantes, como hipertrofia das adrenais e atrofia do timo. Esse conceito de estresse ainda hoje é reconhecido como a mais simples definição fisiológica da perturbação da homeostase frente a uma situação aversiva.

Selye também propôs a *Síndrome de Adaptação Geral* (SAG), segundo a qual a resposta fisiológica ao estresse progride através de três estágios: i) *estágio de alarme*, que corresponde à reação imediata do organismo diante do agente estressor, com ativação de mecanismos de defesa e liberação de adrenalina, noradrenalina e glicocorticoides; ii) *estágio de resistência*, que ocorre quando o organismo mantém a exposição ao estressor e desenvolve um estado de adaptação relativa, com aumento da resistência ao agente específico, porém com redução da capacidade de resposta a outros tipos de estímulos; iii) *estágio de exaustão*, que surge quando a exposição prolongada excede a capacidade adaptativa, levando ao colapso dos mecanismos de defesa fisiológicos e esgotamento energético (Selye, 1936). Embora o modelo da SAG tenha sido posteriormente revisado e considerado simplificado, ele consolidou o estresse

como objeto central de investigação biomédica e destacou seus efeitos sobre o sistema imunológico e as glândulas suprarrenais (Fink, 2016).

Ainda em suas publicações, Selye diferenciou estressor de estresse, sendo o estressor o agente causador e o estresse a resposta fisiológica a esse agente (Selye, 1984). Em 1974, Hans Selye introduziu os conceitos de *eustresse* e *distresse*. Enquanto no *distresse* o indivíduo experimenta emoções negativas e respostas fisiológicas adversas, no *eustresse*, que pode ser interpretado como "estresse bom", o indivíduo experiencia sentimentos positivos e benefícios à saúde (Lu; Wei; Li, 2021; McEwen, 2019). Contudo, essa divisão entre eustresse e distresse foi confrontada por Dhabhar (2019), que propôs que a duração da resposta biológica ao estresse determina os efeitos adaptativos em relação aos efeitos deletérios, sugerindo que, em alguns casos, mesmo o estresse "negativo" pode ter efeitos benéficos em determinadas condições (Dhabhar, 2019). Além disso, a ideia de resposta "inespecífica" proposta por Selye passou a ser criticada, uma vez que diferentes estressores podem desencadear padrões fisiológicos distintos (Lu; Wei; Li, 2021).

Na década de 1980, Richard Lazarus e Susan Folkman ampliaram o conceito ao introduzirem a teoria transacional do estresse. Para eles, o estresse não é apenas o estímulo ou a resposta, mas uma relação específica "*entre uma pessoa e o ambiente, avaliada pelo indivíduo como onerosa ou excedendo seus recursos e ameaçando seu bem-estar*" (Lazarus; Folkman, 1984). O estresse, nessa perspectiva, é mediado pela avaliação cognitiva do indivíduo sobre a ameaça e sua capacidade de *coping* (enfrentamento).

McEwen (1989) integrou as dimensões fisiológica e psicológica ao propor o conceito de alostase, definido como a capacidade de manter a estabilidade por meio da mudança e o "preço" fisiológico de adaptar-se continuamente. Segundo McEwen, o estresse não é simplesmente um "sistema de emergência", mas sim um processo contínuo em que o cérebro percebe e responde a desafios ambientais, mantendo a homeostase por meio da ativação de sistemas neuroendócrinos (McEwen; Akil, 2020). Atualmente, entende-se que a resposta ao estresse é um processo orquestrado que envolve vários mecanismos para ajustes fisiológicos e metabólicos para enfrentar as demandas de um desafio homeostático (Bali; Jaggi, 2013). Essas mudanças ocorrem nos níveis psicológico, comportamental e biológico. Para isso, durante situações de

estresse é recrutado um adequado e coordenado conjunto de respostas fisiológicas através da ativação do sistema nervoso simpático (SNS) e do eixo HPA (Sterling, 2012; Ulrich-Lai; Herman, 2009).

A ativação do SNS ocorre rapidamente (em milissegundos a segundos) como resposta neural ao estresse. Estruturas límbicas, como a amígdala, detectam a ameaça e estimulam o hipotálamo, especificamente o PVN, e núcleos do tronco encefálico, como o *locus coeruleus* (Azevedo *et al.*, 2023; Godoy *et al.*, 2018). Esse sinal atinge a medula espinhal, ativando neurônios simpáticos pré-ganglionares locais. A partir desse ponto, a resposta pode seguir por dois caminhos distintos:

i) sistema simpático-adreno-medular (SAM): as fibras pré-ganglionares (nervos esplâncnicos) projetam-se diretamente para a medula da glândula adrenal, sem realizar sinapse nos gânglios paravertebrais. Ao chegarem à glândula, liberam acetilcolina nas células cromafins. A ligação deste neurotransmissor aos receptores nicotínicos estimula a secreção imediata de catecolaminas na corrente sanguínea (aproximadamente 80% adrenalina e 20% noradrenalina) (Guérineau, 2024; Ruiz *et al.*, 2021);

ii) a via neural direta (ganglionar): os neurônios pré-ganglionares projetam-se para a cadeia simpática paravertebral, onde liberam acetilcolina. Esse neurotransmissor liga-se a receptores nicotínicos no neurônio pós-ganglionar, propagando o impulso elétrico em direção ao órgão-alvo. No coração, por exemplo, os nervos cardíacos inervam estruturas críticas como o nodo sinoatrial, o nodo atrioventricular e o miocárdio ventricular. Nessas estruturas, as terminações nervosas liberam noradrenalina, que se liga predominantemente aos receptores β-adrenérgicos. Essa interação desencadeia três efeitos fisiológicos imediatos: o aumento da frequência de disparo do marcapasso natural (cronotropismo positivo), a aceleração da condução elétrica entre átrios e ventrículos (dromotropismo positivo) e o aumento da força de contração do músculo cardíaco (inotropismo positivo), otimizando o bombeamento sanguíneo para atender à demanda do estresse (Motiejunaite; Amar; Vidal-Petiot, 2021; Wilfrid Jänig, 2006).

Simultaneamente à ativação nervosa, inicia-se uma cascata endócrina mais lenta através da ativação do eixo HPA, destinada a manter a resistência ao

estressor. O estresse ativa o hipotálamo, onde os neurônios parvocelulares do PVN secretam o CRF, que é liberado no sistema porta-hipofisário (eminência mediana) e atua na hipófise anterior, promovendo a secreção do hormônio adrenocorticotrófico [do inglês, *adrenocorticotropic hormone* (ACTH)] na corrente sanguínea. Por sua vez, o ACTH atua no córtex da glândula adrenal e inicia a síntese e liberação de glicocorticoides (Dampney *et al.*, 2002). A liberação de catecolaminas e glicocorticoides promove mobilização de energia (estímulo à gluconeogênese), economia de recursos (inibição da síntese de proteínas e supressão da resposta imune inflamatória), aumento na PA e FC, redistribuição do fluxo sanguíneo (redução na perfusão cutânea e visceral e aumento na musculatura esquelética), alteração na atividade do barorreflexo e aumento da sensibilidade dos vasos sanguíneos às catecolaminas (Crestani, 2016; Dampney, 2015; Dampney; Horiuchi; McDowall, 2008).

Além das repercussões metabólicas e cardiovasculares, a exposição ao estresse também recruta e altera a funcionalidade de sistemas de regulação emocional, resultando em estados de ansiedade. Em condições fisiológicas específicas e de curto prazo, a ansiedade possui valor adaptativo às ameaças aversivas, por aumentar o estado de alerta e a cognição, além de melhorar o processamento sensorial e as funções executivas (Daviu *et al.*, 2019; McEwen *et al.*, 2012). Entretanto, a ansiedade persistente passa a ter um caráter patológico ao prejudicar o desempenho do organismo ao ocasionar alterações fisiológicas e psicológicas, tais como taquicardia, sudorese, hiperventilação, tensão muscular, tremor, hipervigilância, déficits cognitivos e alterações no sono (Regier; Kuhl; Kupfer, 2013). Durante uma exposição aguda ao estresse, a resposta imediata é caracterizada pela ansiedade de curta duração, um fenômeno fisiológico conhecido como *state anxiety* (ansiedade de estado) (Daviu *et al.*, 2019). Essa reação adaptativa inicia-se com a rápida ativação do *locus coeruleus* (Borodovitsyna; Flamini; Chandler, 2018), que resulta na liberação de noradrenalina em regiões-chave, como o córtex e amígdala, e promove um estado de hipervigilância necessário para a detecção de ameaças (Borodovitsyna; Flamini; Chandler, 2018; Daviu *et al.*, 2019). Embora essa resposta seja aguda, ela possui potencial para induzir alterações duradouras. Estudos em modelos animais demonstraram que um único episódio de estresse intenso (como a combinação de restrição física e odor de predador) é suficiente

para elevar a ansiedade e alterar a excitabilidade dos neurônios do *locus coeruleus* por pelo menos sete dias, sugerindo que mesmo estressores agudos podem deixar "traços" funcionais persistentes nos circuitos de ansiedade (Borodovitsyna; Flamini; Chandler, 2018).

As respostas fisiológicas desencadeadas pelos estímulos aversivos são adaptativas em curto prazo, sendo necessárias para a sobrevivência e a adaptação de todas as espécies (Dhabhar, 2019; Sterling, 2012). Entretanto, a ativação repetida ou prolongada dessas respostas, como observada em situações de estresse crônico, pode transformar a resposta inicialmente adaptativa em desadaptativa, resultando em alterações fisiológicas prejudiciais ao organismo (Crestani, 2016; Dhabhar, 2019). Além disso, a exposição repetida ao mesmo estressor tende a sensibilizar o eixo HPA, e a exposição a um estressor novo e imprevisível pode causar desregulação duradoura desse eixo (Gray *et al.*, 2014; Herman, 2013).

Em condições fisiológicas, os glicocorticoides sinalizam ao hipotálamo e à hipófise para interromperem a produção de CRF e ACTH, o que inibe a resposta ao estresse. A ineficiência dos mecanismos responsáveis pela finalização das respostas ao estresse ou a exposição repetida a estímulos estressores gera sobrecarga alostática, que favorece o surgimento de alterações fisiopatológicas (McEwen, 2007). Nesse contexto, estudos em roedores indicam que a exposição repetida a estímulos estressores promove alterações na função cardiovascular e na atividade autonômica, incluindo: alterações no balanço da atividade autônoma cardíaca (caracterizado pelo aumento da contribuição simpática), aumento nos valores basais de PA e FC, disfunção cardíaca (cardiomiopatia, isquemia e arritmia), comprometimento na atividade do barorreflexo e disfunção vascular (e.g., disfunção endotelial) (Carnevali *et al.*, 2017; Golbidi; Frisbee; Laher, 2015; Sgoifo; Carnevali; Grippo, 2014).

A exposição repetida ao estresse também desencadeia o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, como a ansiedade (Campos *et al.*, 2013; Carnevali *et al.*, 2017; Cohen; Janicki-Deverts; Miller, 2007; Daviu *et al.*, 2019; Moreno-Peral *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015). Evidências demonstraram que o estresse social crônico promoveu um estado pró-inflamatório periférico, caracterizado pelo aumento de citocinas circulantes e por alterações na população de linfócitos T, o que culminou na ativação microglial na amígdala

basolateral (BLA) e no aumento da excitabilidade neuronal local (Munshi *et al.*, 2020). Adicionalmente, o estresse crônico desviou o metabolismo do triptofano da síntese de serotonina para a via das quinureninas, reduzindo a disponibilidade serotoninérgica e comprometendo a regulação do humor (Luo *et al.*, 2025).

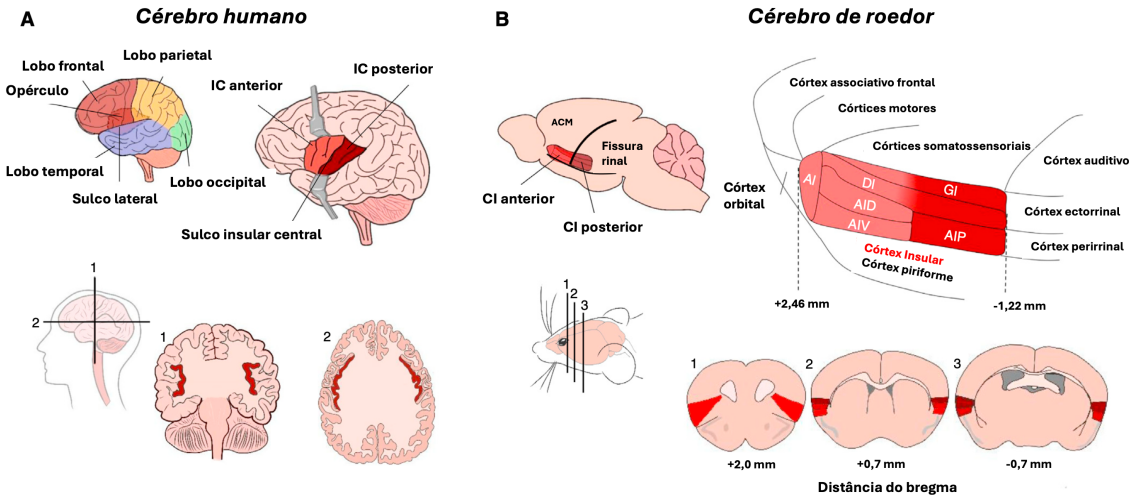
Interessantemente, a ansiedade é considerada um fator de risco para a morbidade e mortalidade cardiovascular, ao passo que doenças cardiovasculares podem aumentar a incidência de quadros de ansiedade (Hare *et al.*, 2014; Rozanski; Blumenthal; Kaplan, 1999; Sgoifo; Carnevali; Grippo, 2014), o que sugere uma possível relação entre alterações comportamentais e disfunções cardiovasculares induzidas pelo estresse.

A ativação do HPA e as alterações na atividade do SNA são mediadas por estruturas límbicas no sistema nervoso central (SNC), através da ação de vários mecanismos neuroquímicos (Lamotte; Shouman; Benarroch, 2021; Schaeuble; Myers, 2022; Ulrich-Lai; Herman, 2009). Dentre elas, a ativação do CI foi reportada durante situações aversivas (Cechetto, 2014; Cullinan *et al.*, 1995; Gianaros *et al.*, 2007; Tomeo *et al.*, 2022; Yokoyama; Sasaki, 1999) e implicada na integração e processamento de informações límbicas em humanos e animais (Augustine, 1996; Gogolla, 2017; Nieuwenhuys, 2012; Uddin, 2015).

2.2 O CÓRTEX INSULAR

Em primatas, incluindo humanos, o CI localiza-se profundamente na altura do sulco lateral de cada hemisfério cerebral, abaixo de porções dos lobos frontal, parietal e temporal. Em roedores, o CI encontra-se exposto na superfície lateral dos hemisférios, posicionado acima da metade rostral do sulco rinal. Apesar da diferença anatômica na localização, existe vasta homologia na citoarquitetura, conectividade e funções do CI entre as espécies (Gogolla, 2017; Namkung; Kim; Sawa, 2017). Em ambos, a citoarquitetura do CI varia conforme a densidade de células granulares, subdividindo-se em três áreas: granular, disgranular e agranular. Em roedores, essa organização segue predominantemente um eixo dorsoventral, enquanto em humanos e primatas, o gradiente citoarquitetônico se distribui ao longo do eixo rostrocaudal (Gogolla, 2017). Além disso, o CI é macroscopicamente dividido em porções anterior e posterior ao longo do eixo rostrocaudal (Gehrlach *et al.*, 2020; Gogolla, 2017; Namkung; Kim; Sawa, 2017) (Figura 1).

Figura 1 – Localização do córtex insular (CI) nos cérebros humano e de roedores. **(A)** Anatomia do cérebro humano. Canto superior esquerdo: o CI está dobrado abaixo do sulco lateral, encoberto pelos lobos frontal, parietal e temporal. Canto superior direito: o afastamento dos lobos temporal e parietal permite a visualização do CI; o CI é dividido em anterior e posterior pelo sulco insular central. Parte inferior: cortes coronais (1) e horizontais (2) do cérebro humano revelam a posição do CI (em vermelho). **(B)** Canto superior esquerdo: CI localizado na superfície lateral do cérebro, acima da fissura rinal. A artéria cerebral média (ACM) cruza o CI. Canto superior direito: subdivisões e regiões corticais vizinhas do CI. AI, CI agranular; AID, CI agranular, parte dorsal; AIV, CI agranular, parte ventral; AIP, CI agranular, parte posterior; DI, CI disgranular; GI, CI granular. Parte inferior: cortes coronais em diferentes níveis revelam a localização e as camadas do CI de roedores.



Fonte: Adaptado de Gogolla *et al*. (2017).

A composição celular do CI inclui neurônios glutamatérgicos, interneurônios GABAérgicos e células não neuronais. Os neurônios glutamatérgicos correspondem a aproximadamente 73% da população neuronal local. São predominantemente piramidais de projeção e apresentam múltiplos subtipos com propriedades morfológicas e eletrofisiológicas distintas entre as sub-regiões anterior e posterior (Iezzi *et al*., 2024; Ju *et al*., 2020). Os interneurônios GABAérgicos representam cerca de 27% da população neuronal e organizam-se nas principais classes descritas para o neocórtex, incluindo neurônios positivos para parvalbumina, somatostatina, peptídeo intestinal vasoativo, além daqueles positivos para LAMP5 e Id2. Esses neurônios exercem papel fundamental no controle do balanço entre excitação e inibição (Fang *et al*., 2022; Mao; Staiger, 2024). O tecido insular é sustentado por células não neuronais, como astrócitos, oligodendrócitos, precursores de oligodendrócitos, micróglia, células endoteliais e células murais, que garantem suporte estrutural, metabólico e imunológico (Bakken *et al*., 2021; Fang *et al*., 2022; Hodge *et al*., 2019).

Devido à heterogeneidade citoarquitetônica e diferenças nos padrões de conectividade, as divisões anterior e posterior do CI possuem diferenças funcionais importantes. Estudos em humanos indicam que a porção anterior do CI (CIa), predominantemente agranular, integra informações interoceptivas com processos emocionais e memória, atuando como interface entre sensação, emoção e cognição (Benarroch, 2019; Evrard, 2019; Gogolla, 2017; Zhang; Deng; Xiao, 2024). Essa região também está associada à experiência subjetiva de sentimentos, autoconsciência, empatia, tomada de decisão, avaliação de risco, percepção do tempo e controle executivo (Evrard, 2019, 2025; Gogolla, 2017; Kurth *et al.*, 2010; Zhang; Deng; Xiao, 2024). Além disso, o CIa constitui um núcleo central da rede de saliência, sendo essencial para a detecção de estímulos relevantes e para a alternância entre redes neurais envolvidas no controle executivo (Cai; Menon, 2025; Molnar-Szakacs; Uddin, 2022; Uddin *et al.*, 2014).

A região intermediária do CI, majoritariamente disgranular, integra sinais interoceptivos provenientes do CI posterior (CIp) com informações emocionais e sensoriais externas (Evrard, 2019; Kittleson *et al.*, 2024). Essa integração contribui para a consciência corporal e para estados afetivos relacionados às sensações internas, como ansiedade relacionada à cardiocepção (Kittleson *et al.*, 2024; Kurth *et al.*, 2010). Essa região também participa do processamento gustativo e olfatório em humanos (Kurth *et al.*, 2010). Por sua vez, o CIp, mais granular, está envolvido no processamento sensorial e interoceptivo do estado corporal. Essa região é crítica para o mapeamento homeostático e a percepção consciente de sinais fisiológicos, como batimentos cardíacos, respiração, distensão vesical, fome e sede, além de desempenhar papel central na dor aguda e crônica (Kittleson *et al.*, 2024; Kurth *et al.*, 2010; Zhang; Deng; Xiao, 2024).

Os estudos ainda indicam que a integração entre sinais sensoriais do ambiente e informações do estado fisiológico interno, consciência e experiência emocional pelo CI seguem um gradiente anteroposterior de organização funcional: a porção posterior recebe e processa sinais sensoriais e interoceptivos; a porção intermediária realiza a integração sensório-afetiva, gustatória e visceroceptiva; e a porção anterior coordena a avaliação emocional,

processos cognitivos, memória e a regulação da saída autonômica (Centanni *et al*., 2021; Evrard, 2019; Ghaziri *et al*., 2018; Menon *et al*., 2020).

Essa complexidade funcional do CI é sustentada por conexões extensas com estruturas corticais e subcorticais (Augustine, 1996; Gehrlach *et al*., 2020; Gogolla, 2017; Nieuwenhuys, 2012). Em roedores, as porções anteriores apresentam forte conectividade com estruturas límbicas e estriatais (Gehrlach *et al*., 2020; McGregor; LaLumiere, 2023). Recebem aferências do tálamo e do córtex pré-frontal, estabelecem conexões recíprocas com os córtices orbitofrontal, pré-frontal medial, cingulado e parietal e enviam projeções robustas ao estriado ventral (especialmente núcleo *accumbens*), amígdala, hipocampo, hipotálamo, área tegmental ventral e áreas motoras (Gehrlach *et al*., 2020; Mathiasen; Aggleton; Witter, 2023; McGregor; LaLumiere, 2023; Reep; Winans, 1982). Tal arquitetura sustenta o papel dessa porção do CI na rede de saliência, nos circuitos de recompensa e no controle executivo, com influência direta sobre processos de decisão e emoção (Centanni *et al*., 2021). A porção intermediária do CI participa do aprendizado e processamento gustativo através de conexões recíprocas com hipotálamo, projeções para o CeA e o núcleo leito da estria terminal (NLET), entre outras áreas envolvidas na regulação autonômica e emocional (Gehrlach *et al*., 2020; O'Shea *et al*., 2024). Já as porções caudais recebem informações sensoriais do córtex somatossensorial, auditivas e viscerais do tronco encefálico, incluindo núcleos da rafe e parabranquial (Gehrlach *et al*., 2020). As áreas posteriores se projetam para a amígdala, NLET, hipotálamo lateral (HL) e núcleos do tronco cerebral, sustentando a integração sensório-interoceptiva e o controle autonômico (Gehrlach *et al*., 2020; McGregor; LaLumiere, 2023; Reep; Winans, 1982).

Em condições basais, o CI exerce controle sítio-específico sobre funções cardiovasculares. Em roedores não submetidos ao estresse, a estimulação elétrica ou química com aminoácidos excitatórios no CI desencadeou alterações na PA e FC dependentes da região estimulada (Hardy; Holmes, 1988; Hardy; Mack, 1990; Ruggiero *et al.*, 1987; Yasui *et al.*, 1991). A estimulação de regiões mais anteriores do CI promoveu predominantemente quedas na PA (Hardy; Holmes, 1988; Hardy; Mack, 1990; Sun, 1992). Na porção posterior, foram observadas tanto resposta pressora acompanhada de taquicardia (em sítios mais rostrais) quanto diminuição na PA acompanhada de bradicardia (em sítios

mais caudais) (Verberne; Owens, 1998). Estudos recentes confirmaram as evidências de respostas pressora e depressora sítio-específicas na porção posterior do CI (Marins *et al.*, 2016, 2021). A estimulação dos receptores NMDA no CI revelou a presença de um sítio simpático-inibidor cardíaco, localizado mais rostralmente, e um sítio simpático-excitatório, mais caudal (Marins *et al*., 2016).

O controle sítio-específico também se estende ao comportamento relacionado à ansiedade inata (de Paiva *et al.*, 2021; Méndez-Ruette *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2020). A inativação local por microinjeção de CNQX (antagonista de receptores glutamatérgicos AMPA) no CI intermediário ou no CIp induziu efeitos ansiogênicos, enquanto a ativação por microinjeção de bicuculina (antagonista de receptores $GABA_A$) produziu efeito ansiolítico (Méndez-Ruette *et al.*, 2019). Em contraste, a inativação de áreas mais rostrais gerou efeito ansiolítico, e sua ativação produziu efeito ansiogênico (Méndez-Ruette *et al.*, 2019). Outro estudo mostrou que a lesão eletrolítica no CIp não afetou o comportamento tipo-ansioso no labirinto em cruz elevado (LCE), mas no CI intermediário a mesma lesão induziu comportamento do tipo-ansiolítico e prejudicou a memória do medo (Shi *et al.*, 2020). Recentemente, nosso grupo demonstrou que o tratamento com CP376395 (antagonista do receptor CRF_1) na região anterior do CI e a microinjeção de CRF no CIp aumentaram a exploração nos braços abertos do LCE (Lopes *et al.*, 2024).

Apesar de estudos em humanos identificarem principalmente ativação da porção anterior do CI durante situações aversivas (Cechetto, 2014), evidências recentes do nosso grupo indicaram que o estresse de restrição causou alteração no número de células marcadas com a proteína Fos (marcador de ativação neuronal) tanto na região anterior quanto em sítios da região posterior do CI (Santos *et al.*, 2025; Tomeo *et al.*, 2022). Por isso, o presente trabalho propõe investigar o CI considerando três sub-regiões: CI anterior (CIa), CI posterior-rostral (CIpr) e CI posterior-caudal (CIpc).

No que diz respeito ao controle das respostas fisiológicas ao estresse, estudos identificaram que o bloqueio sináptico não seletivo através da microinjeção local de cloreto de cobalto ($CoCl_2$) no CIa de ratos reduziu as respostas cardiovasculares induzidas pelo medo condicionado ao contexto e pelo estresse de restrição (Alves *et al.*, 2013; Alves; Crestani; Corrêa, 2010). A microinjeção de antagonistas seletivos de adrenoceptores α_1 e α_2 no CIa também

reduziu as respostas cardiovasculares induzidas pelo estresse de restrição agudo, indicando o envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica local no controle das respostas cardiovasculares provocadas pelo estresse (Alves *et al.*, 2014). Por sua vez, o antagonismo de receptores NMDA no CIa facilitou as respostas cardiovasculares ao estresse de restrição, sugerindo que a neurotransmissão glutamatérgica também está envolvida nessas respostas (Goulart *et al.*, 2022). Em um trabalho do nosso grupo, o tratamento com $CoCl_2$ no CIa não afetou as respostas cardiovasculares evocadas pelo estresse de restrição, mas no CIpr reduziu o efeito pressor e no CIpc diminuiu a resposta taquicárdica (Tomeo *et al.*, 2022). Adicionalmente, o trabalho mais recente do nosso grupo indicou que o tratamento com um coquetel de antagonistas dos receptores $GABA_A$ + $GABA_B$ no CIpr aumentou a taquicardia provocada pelo estresse de restrição, enquanto a mesma abordagem farmacológica no CIpc diminuiu essa resposta (Santos *et al.*, 2025). Por fim, Belém-Filho e colaboradores (2025) demonstraram que a inibição da enzima monoacilgliceril lipase (MAGL), responsável pela degradação do 2-araquidonoilglicerol, no CIa atenuou a taquicardia provocada pelo estresse de restrição (Belem-Filho *et al.*, 2025).

Quanto ao controle das respostas comportamentais ao estresse pelo CI, foi relatado que a microinjeção de $CoCl_2$ no CIa diminuiu a resposta comportamental de congelamento no modelo de medo condicionado ao contexto (Alves *et al.*, 2013). A microinjeção de muscimol (agonista do receptor $GABA_A$) no CIpc reduziu a resposta de diminuição da exploração social induzida pelo estresse de choque na cauda (Christianson *et al.*, 2011). Além disso, as alterações comportamentais do tipo-depressivas induzidas por um estressor crônico (administração de corticosterona) foram acompanhadas de aumento na atividade neuronal no CI (Ju *et al.*, 2020; Van Laeken *et al.*, 2018). Os estudos também indicam que a coabitação com um coespecífico em dor crônica aumenta a ativação neuronal do CIa (FosB) e induz comportamento do tipo-ansioso, efeito revertido pela inativação funcional local com $CoCl_2$ (Benassi-Cezar *et al.*, 2021). Ademais, a inibição optogenética do CIp reverteu a resposta do tipo-ansiogênica provocada por choque nas patas (Gehrlach *et al.*, 2019), enquanto a inibição eletrolítica do CIa reduziu os comportamentos de medo e ansiedade observados pelo enterramento de um objeto semelhante ao restritor após uma sessão de

seis horas de estresse de restrição (Park; Cho; Huh, 2022). Em um trabalho publicado pelo nosso grupo, observamos que a microinjeção de $CoCl_2$ nas sub-regiões rostral ou caudal do CIp não afetou as mudanças comportamentais evocadas pelo estresse de restrição no LCE, porém no CI posterior-intermediário o mesmo tratamento farmacológico inibiu o efeito tipo-ansiogênico causado pela restrição (Vitorio *et al.*, 2023). Um estudo mais recente indicou que a inibição da MAGL no CIa reverteu o efeito tipo-ansiogênico evocado pelo estresse de restrição (Belem-Filho *et al.*, 2025).

Apesar das evidências que indicam um papel do CI na regulação das respostas fisiológicas e comportamentais a estímulos aversivos, os mecanismos neuroquímicos locais envolvidos, especialmente considerando o controle sítio-específico ao longo do eixo rostrocaudal do CI, são pouco compreendidos.

A excitabilidade neuronal e a plasticidade sináptica no CI são moduladas por múltiplos sistemas neuroquímicos. Por exemplo, a serotonina (5-HT) exerce forte modulação local através dos receptores $5\text{-}HT_{1A}$ e $5\text{-}HT_{2A}$, que estão amplamente expressos no CI (Ju *et al.*, 2020). Muitos neurônios que projetam para amígdala e HL expressam esses receptores, sugerindo modulação direta de circuitos emocionais e viscerais por essa neurotransmissão (Coffeen *et al.*, 2024; Ju *et al.*, 2020). Além disso, a dopamina, proveniente da área tegmental ventral, é liberada no CI em resposta a estímulos novos e atua via receptores D1/D5, sendo necessária para a consolidação de memórias aversivas e plasticidade sináptica (Osorio-Gómez; Bermúdez-Rattoni; Guzmán-Ramos, 2021; Rodríguez-Durán *et al.*, 2023). A noradrenalina também sinaliza estados de alerta e saliência no CI, tendo sua liberação aumentada durante mal-estar visceral e exposição a novidade (Osorio-Gómez; Bermúdez-Rattoni; Guzmán-Ramos, 2021; Osorio-Gómez; Guzmán-Ramos; Bermúdez-Rattoni, 2017). Outros neuromoduladores, como peptídeos (CRF, peptídeo intestinal vasoativo, somatostatina) e aspartato (em condições de dor neuropática) modulam a excitabilidade local (Ibrahim *et al.*, 2020; Jones, 1986; Mao; Staiger, 2024). Em conjunto, essa rede neuroquímica confere ao CI a capacidade de ajustar a intensidade das respostas ao estresse, amplificando ou atenuando saídas autonômicas e comportamentais de forma dependente da sub-região recrutada. Nesse contexto, a sinalização pelo sistema CRFérgico destaca-se como um

mecanismo central na orquestração das respostas cardiovasculares e de ansiedade frente a estímulos aversivos.

2.3 O FATOR LIBERADOR DE CORTICOTROFINA

O CRF é um neuropeptídeo composto por 41 aminoácidos, pertencente à família secretina/calcitonina (Michalec *et al.*, 2020; Vale; Vaughan; Perrin, 1997). Originalmente identificado no hipotálamo, o CRF foi descrito como o principal mediador neuroendócrino da resposta ao estresse, atuando como o regulador primário da secreção do ACTH pela hipófise anterior e, consequentemente, da ativação do eixo HPA (Vale *et al.*, 1981). Estudos subsequentes revelaram que o CRF e seus receptores possuem uma ampla distribuição em outras regiões encefálicas (Phelix; Paull, 1990; Reul; Holsboer, 2002; Swanson *et al.*, 1983), incluindo córtex cerebral, bulbo olfatório, septo medial, NLET e *locus coeruleus*; além de estarem presentes em tecidos periféricos como baço, glândulas adrenais, placenta e fígado (Bagosi *et al.*, 2023; Behan *et al.*, 1995; Boorse; Denver, 2006; Souza, 1995). No SNC, o CRF atua como neurotransmissor e neuromodulador, coordenando respostas cardiovasculares e comportamentais ao estresse de forma independente do eixo HPA (Chudoba; Dabrowska, 2023; Deussing; Chen, 2018; Henckens; Deussing; Chen, 2016; Stengel; Taché, 2010; Vasconcelos *et al.*, 2020; Wood, 2014).

O sistema CRFérgico inclui, além do próprio CRF, outros três peptídeos denominados urocortina 1 (UCN1), urocortina 2 (UCN2) e urocortina 3 (UCN3). Os efeitos do CRF e dos demais peptídeos são mediados por dois receptores acoplados à proteína G, o CRF_1 e o CRF_2, que apresentam padrões distintos de expressão e funções fisiológicas (Bale; Vale, 2004; Hauger *et al.*, 2003; Henckens; Deussing; Chen, 2016). O receptor CRF_1 é expresso principalmente no SNC, especialmente em regiões corticais (pré-frontal, cingulado e insular), hipocampo, amígdala, tronco encefálico e hipófise anterior (Chalmers; Lovenberg; Souza, 1995; Hauger *et al.*, 2008; Van Pett *et al.*, 2000). Também é encontrado em tecidos periféricos como gônadas, pele, células imunes e trato gastrointestinal (Dermitzaki *et al.*, 2017; Mano-Otagiri *et al.*, 2025; Perrin; Vale, 2006). Funcionalmente, o CRF_1 é o principal mediador da resposta clássica ao estresse, sendo essencial para a ativação do eixo HPA e para a modulação de

comportamentos do tipo-ansiogênico e do tipo-depressivo, além de respostas nociceptivas (Bale; Vale, 2004; Deussing; Chen, 2018).

Em contrapartida, o CRF_2 apresenta distribuição central mais restrita, predominando em regiões subcorticais, como septo lateral, NLET, amígdala medial, hipocampo ventral, núcleos hipotalâmicos, núcleos da rafe e núcleo do trato solitário (NTS) (Chalmers; Lovenberg; Souza, 1995; Van Pett *et al.*, 2000); além da expressão periférica no coração, músculo esquelético e trato gastrointestinal (Lovenberg *et al.*, 1995). Em roedores, o CRF_2 ocorre em duas variantes de *splicing,* $CRF_{2\alpha}$ (predominantemente no encéfalo) e $CRF_{2\beta}$ (predominantemente na periferia), embora ambas compartilhem o mesmo perfil farmacológico (Lovenberg *et al.*, 1995). De maneira geral, o receptor CRF_2 está associado à modulação de respostas autonômicas, viscerais e afetivas ao estresse, frequentemente exercendo papel complementar ou modulador em relação ao CRF_1 (Chalmers *et al.*, 1996; Chalmers; Lovenberg; Souza, 1995; Domin; Śmiałowska, 2024; Hauger *et al.*, 2008).

Os ligantes endógenos apresentam diferenças no perfil farmacológico de ligação aos receptores CRF_1 e CRF_2. O CRF possui uma afinidade maior ao receptor CRF_1, ao passo que a UCN2 e a UCN3 ligam-se seletivamente ao receptor CRF_2. A UCN1 possui afinidade semelhante para ambos os receptores (Deussing; Chen, 2018; Hauger *et al.*, 2003; Henckens; Deussing; Chen, 2016). As ações dos peptídeos do sistema CRFérgico são também moduladas pela ligação à proteína de ligação do CRF (CRF-BP). Essa proteína se liga ao CRF e à UCN1 com afinidade maior que a afinidade dos ligantes aos receptores CRFérgicos, mas tem menor afinidade para UCN2 e UCN3 (Jahn *et al.*, 2004). Os estudos sugerem que a função da CRF-BP depende do contexto celular (Peto *et al.*, 1999). No meio extracelular, pode reduzir a biodisponibilidade dos peptídeos CRFérgicos ao sequestrar o peptídeo livre, limitando a ativação dos receptores e prevenindo hiperativação do eixo HPA (Behan *et al.*, 1995). Já no meio intracelular, a CRF-BP pode atuar como uma proteína de escolta para tráfego de receptor $CRF_{2\beta}$ até a membrana plasmática (Slater *et al.*, 2016). Em comparação aos receptores CRFérgicos, o papel da CRF-BP foi muito menos investigado. Portanto, essa proteína pode ter outras ações intracelulares e extracelulares que são ainda pouco compreendidas (Deussing; Chen, 2018; Henckens; Deussing; Chen, 2016).

Apesar do papel do sistema CRFérgico na regulação do eixo HPA estar bem estabelecido, sua atuação como neurotransmissor em circuitos límbicos no controle integrado das respostas fisiológicas a estímulos aversivos ainda não é totalmente esclarecida. Nesse sentido, evidências indicam que a neurotransmissão CRFérgica no encéfalo desempenha papel importante na modulação da função cardiovascular e das respostas comportamentais ao estresse (Gao; Gao, 2019; Henckens; Deussing; Chen, 2016). No que tange ao sistema cardiovascular, foi observado que a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de antagonistas não seletivos dos receptores CRFérgicos reduz as respostas cardiovasculares a diferentes estressores (Morimoto *et al.*, 1993; Nakamori; Morimoto; Murakami, 1993; Nijsen *et al.*, 2000). Além disso, antagonistas não seletivos dos receptores CRFérgicos reduziram as respostas comportamentais do tipo-ansiogênica e do tipo-depressiva induzidas pelo estresse (Heinrichs *et al.*, 1992, 1994; Koob, 1999; Menzaghi *et al.*, 1994). Entretanto, os sítios encefálicos específicos onde os peptídeos desse sistema atuam para modular essas respostas ainda não estão completamente esclarecidos.

Em relação ao sistema cardiovascular, Sheng e colaboradores (2021) demonstraram que neurônios CRFérgicos no CeA contribuem para o desenvolvimento da hipertensão induzida por estresse crônico. Dados do nosso laboratório indicaram que ambos os receptores CRFérgicos no HL participam na geração da resposta taquicárdica a estímulos aversivos, sendo o controle pelo receptor CRF_1 sensibilizado pela exposição repetida ao estresse (Barretto-de-Souza *et al.*, 2021, 2022). Além disso, observamos que o estresse crônico variado aumenta a expressão local de CRF_2 e que o bloqueio farmacológico de receptores CRF_1 ou CRF_2 nessa região inibiu o comprometimento do barorreflexo induzido por esse protocolo de estresse (Barretto-de-Souza *et al.*, 2024). O NLET também tem sido implicado na modulação cardiovascular mediada pelo sistema CRFérgico frente ao estresse. Nijsen e colaboradores (2001) demonstraram que a microinjeção de antagonista não seletivo para os receptores CRFérgicos no NLET reduziu o intervalo PQ no eletrocardiograma e potencializou a taquicardia induzida por estresse emocional. Posteriormente, Oliveira e colaboradores (2015) mostraram que, nessa região, o receptor CRF_1 está envolvido nas respostas pressora e taquicárdica induzidas pelo estresse de

restrição, enquanto o receptor CRF_2 local participa seletivamente da resposta pressora. Além disso, o estresse crônico reduziu a expressão dos receptores CRF_1 e CRF_2 no NLET, alteração associada ao prejuízo da função barorreflexa (Oliveira *et al.*, 2021).

Quanto às respostas comportamentais, Heinrichs e colaboradores (1992) relataram que a administração de αhCRF $_{9–41}$ (antagonista CRFérgico não seletivo) no CeA reverteu a resposta do tipo-ansiogênica induzida pelo estresse de derrota social. A microinjeção desse mesmo antagonista na substância cinzenta periaqueductal dorsal (PAGd) reverteu a resposta do tipo-ansiogênica (Martins; Marras; Guimarães, 2000) e no *locus coeruleus* reverteu a resposta comportamental de retirada defensiva, ambas induzidas pelo estresse de restrição (Smagin; Harris; Ryan, 1996). De modo geral, essas evidências indicam que a ativação dos receptores CRF_1 parece estar envolvida na expressão de comportamentos do tipo-ansiogênico (Contarino; Heinrichs; Gold, 1999; Hauger, 2003; Vasconcelos *et al.*, 2020). Em relação ao CRF_2, estudos com camundongos *knockout* sugerem um possível papel ansiolítico para esse receptor (Bale; Vale, 2004). Contudo, resultados obtidos por abordagem farmacológica são inconsistentes, de modo que o papel dos receptores CRF_2 não é completamente compreendido (Vasconcelos *et al.*, 2020). Para além dessas evidências, o controle das respostas cardiovasculares e comportamentais ao estresse pela neurotransmissão CRFérgica em outros sítios encefálicos ainda requer estudo.

2.4 O CÓRTEX INSULAR E O FATOR LIBERADOR DE CORTICOTROFINA

O receptor CRF_1 é amplamente expresso no SNC, incluindo diversas regiões do córtex cerebral, como o CI (Chalmers; Lovenberg; Souza, 1995; Deussing; Chen, 2018; Henckens; Deussing; Chen, 2016; Potter *et al.*, 1994). Por outro lado, o receptor CRF_2 apresenta distribuição mais localizada e não foi detectado no CI de ratos (Chalmers *et al.*, 1996; Deussing; Chen, 2018; Henckens; Deussing; Chen, 2016; Potter *et al.*, 1994; Rieger *et al.*, 2022; Van Pett *et al.*, 2000).

Axônios imunorreativos para a UCN1 são escassos no córtex cerebral (Bittencourt *et al.*, 1999), indicando que o CRF provavelmente constitui o principal ligante endógeno do receptor CRF_1 no CI (Henckens; Deussing; Chen,

2016). Embora fibras imunorreativas para o CRF tenham sido descritas no CI (Potter *et al.*, 1994), o RNAm desse peptídeo não foi identificado nessa região (Rieger *et al.*, 2022), sugerindo que o CRF é liberado no CI a partir de aferências provenientes de outras regiões cerebrais. Neurônios que sintetizam CRF foram identificados no CeA, no NLET e no PVN (Schulkin; Morgan; Rosen, 2005). Essas regiões estabelecem projeções recíprocas com o CI (Gehrlach *et al.*, 2020), e, portanto, podem constituir fontes potenciais de CRF para essa área cortical.

Apesar dessas evidências anatômicas indicando a presença de componentes do sistema CRFérgico no CI, o papel funcional do receptor CRF_1 no CI na modulação das respostas cardiovasculares e comportamentais do tipo-ansiogênico ao estresse ainda não havia sido investigado até a realização deste estudo.

3 OBJETIVO

O objetivo geral do presente estudo foi investigar a participação da neurotransmissão CRFérgica no CI, atuando através da ativação do receptor CRF_1 local, no controle das respostas cardiovasculares e do tipo-ansiogênica desencadeadas pelo estresse de restrição em ratos. Os seguintes objetivos específicos foram avaliados:

1) Papel da neurotransmissão CRFérgica no CI, avaliando diferenças entre as sub-regiões ao longo do eixo anteroposterior, nas respostas cardiovasculares ao estresse de restrição agudo e repetido;
2) Papel da neurotransmissão CRFérgica no CI, avaliando diferenças entre as sub-regiões ao longo do eixo anteroposterior, na resposta comportamental do tipo-ansiogênica induzida por uma sessão aguda de estresse de restrição;
3) Papel da neurotransmissão CRFérgica ao longo do eixo anteroposterior do CI na alteração da ativação neuronal induzida pelo estresse de restrição agudo;
4) Efeito da exposição repetida ao estresse de restrição sobre os níveis proteicos do receptor CRF_1 no CI, avaliando as diferentes sub-regiões ao longo do eixo anteroposterior.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar com peso corporal entre 240-260 g (60 dias). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil) e transferidos para o Biotério do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAr/UNESP) no mínimo sete dias antes do início dos procedimentos experimentais. Os animais foram mantidos em salas climatizadas (temperatura de 23 ± 2ºC; umidade 50 ± 10%) com ciclo claro-escuro 12:12 h (luzes acesas entre 7h e 19h), com livre acesso a água e a ração. Todos os protocolos experimentais do presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA, FCFAr/UNESP, protocolo 03/2021).

4.2 CIRURGIA DE ESTEREOTAXIA

Os ratos foram anestesiados com isoflurano (5% para indução e 1,8% para manutenção), administrado por meio de um sistema de anestesia de baixo fluxo (Bonther, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). A cabeça do animal foi imobilizada em um aparelho estereotáxico (Stoelting, Wood Dale, Illinois, EUA), foi realizada a tricotomia, seguida da limpeza da região cirúrgica com solução de iodo a 2%. Uma solução anestésica com vasoconstritor (lidocaína a 2% + epinefrina 1:200.000) foi administrada por via subcutânea para anestesia local e redução do sangramento. O crânio foi exposto, o periósteo foi afastado e o osso foi limpo com peróxido de hidrogênio a 10%, seguido de solução de iodo a 2%. Cânulas-guia de aço inoxidável (26 G, 12 mm de comprimento) foram implantadas bilateralmente em uma das sub-regiões do CI. Todas as coordenadas tiveram como referência parâmetros obtidos do atlas do encéfalo de ratos de Paxinos & Watson (1997) e estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Coordenadas de cirurgia estereotáxica utilizadas para implante de cânulas-guia bilaterais direcionadas ao córtex insular anterior (CIa), posterior-rostral (CIpr) ou posterior-caudal (CIpc).

Parâmetro	CIa	CIpr	CIpc
Anteroposterior (distância em relação interaural)	**+12,7 mm**	**+9,7mm**	**+7,5mm**
Lateral (distância a partir da sutura média)	**+4 mm**	**+5mm**	**+6,2mm**
Vertical (distância a partir do osso)	**-4,5mm**	**-5,0mm**	**-6,0 mm**
Incisivo		**-3,2 mm**	

Fonte: Elaborada pela autora, 2026.

Pequenos parafusos de aço inoxidável foram previamente implantados na calota craniana para fixação da resina e as cânulas foram fixadas ao crânio com uma resina acrílica autopolimerizável (Simples, DFL, Ind. Com., Rio de Janeiro, Brasil). Um mandril (33 G) de diâmetro foi introduzido nas cânulas para evitar a obstrução durante o período de recuperação. Como medida profilática, ao final da cirurgia os animais receberam pentabiótico veterinário (560 mg/mL/kg; Fountoura-Wyeth, São Paulo, Brasil) por via intramuscular e anti-inflamatório não esteroidal flunixina meglumina (0,5 mg/mL/kg; Banamine®, Schering Plough, São Paulo, Brasil) por via subcutânea.

4.3 CANULAÇÃO DA ARTÉRIA FEMORAL

Um dia antes do experimento cardiovascular, os animais foram submetidos à anestesia inalatória com isoflurano (5% para indução e 1,8% para manutenção), administrado por meio de um sistema de anestesia de baixo fluxo (Bonther, Ribeirão Preto, São Paulo), para a canulação da artéria femoral e posterior registro dos parâmetros cardiovasculares. O cateter, confeccionado a partir de um segmento de 4–5 cm de polietileno PE-10 soldado a um segmento de 12–13 cm de polietileno PE-50 (Clay Adams, Parsippany, EUA), foi previamente preenchido com solução de heparina (50 UI/mL, Hepamax-S®, Blausiegel, São Paulo, Brasil) diluída em solução salina (NaCl 0,9%) e obstruído com pino metálico. O cateter foi exteriorizado na região dorsal do animal e fixado à pele por sutura cirúrgica. Como medida profilática, os animais receberam anti-

inflamatório não esteroidal flunixina meglumina (0,5 mg/mL/kg) (Banamine®, Schering Plough, Brasil) por via subcutânea. Cada animal foi mantido em caixa individual durante todo o período pós-operatório e de registro cardiovascular.

4.4 REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL E DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

O cateter implantado na artéria femoral foi conectado a um transdutor de pressão (DPT100, Utah Medical Products Inc., Utah, EUA) através de um segmento de polietileno PE-50. A pressão arterial pulsátil (PAP) foi registrada utilizando um amplificador (Bridge AMp, ML221, ADInstruments, Austrália), conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (PowerLab 4/30, ML 866, ADInstruments, Austrália) com o software Lab Chart PRO (ADInstruments, Austrália). Os valores de pressão arterial média (PAM) e FC foram obtidos a partir do sinal de pressão arterial pulsátil.

4.5 REGISTRO DA TEMPERATURA CUTÂNEA DA CAUDA

O aumento da atividade simpática vasomotora durante situações aversivas diminui o fluxo sanguíneo cutâneo (Blessing, 2003) que, por sua vez, diminui a temperatura da pele (Vianna; Carrive, 2005). Desse modo, a diminuição da temperatura cutânea da cauda foi avaliada como uma medida indireta da resposta simpática vasomotora em leitos cutâneos durante o estresse de restrição.

Os registros da temperatura cutânea da cauda foram feitos utilizando um termovisor (IRI4010, InfraRed Integrated Systems Ltd, Northampton, Inglaterra). A análise foi feita através de um software para análise termográfica, e a temperatura foi representada como variações de intensidade de cor (Vianna; Carrive, 2005). Para a análise das imagens, a medida da temperatura foi realizada em cinco pontos ao longo da cauda do animal e a média foi calculada para cada registro (Oliveira *et al.*, 2015).

4.6 FÁRMACOS E SOLUÇÕES

O CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF_1; 5 nmol/100 nL; Tocris, Westwoods Business Park, Ellisville, Missouri, EUA), o CRF (0,07 nmol/100 nL; Tocris, Westwoods Business Park, Ellisville, Missouri, EUA) e a uretana (Sigma–Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) foram dissolvidos em

solução salina (NaCl 0,9%). O isoflurano (Isoforine®, Cristália, Itapira/SP), o pentabiótico (Pentabiótico®; Fort Dodge, Campinas, São Paulo, Brasil) e o anti-inflamatório não esteroidal flunixina meglumina (Banamine®, Schering-Plough, São Paulo, Brasil) foram utilizados conforme fornecidos pelos fabricantes.

4.7 MICROINJEÇÃO DE DROGAS

As agulhas injetoras (33G, Small Parts, Miami Lakes, Florida, EUA) utilizadas para as microinjeções intracerebrais das drogas mediam 1 mm a mais do que as cânulas guias previamente fixadas ao crânio e foram conectadas a uma seringa de 2 µl (7002-KH, Hamilton, EUA) através de um tubo de polietileno PE-10. As drogas foram injetadas no volume de 100 nL/lado (Alves *et al.*, 2014; Alves; Crestani; Corrêa, 2010; Marins *et al.*, 2016; Tomeo *et al.*, 2022), durante um período de 30 segundos. A agulha foi mantida na cânula-guia por mais 30 segundos após a microinjeção para permitir a difusão do fármaco antes de ser removida.

4.8 ESTRESSE DE RESTRIÇÃO

O estresse de restrição é um modelo experimental de estresse psicológico amplamente empregado em estudos em roedores (Bali; Jaggi, 2015; Buynitsky; Mostofsky, 2009). Por ser simples, de fácil execução e indolor, esse estresse não causa debilitação dos animais (Buynitsky; Mostofsky, 2009), além de produzir respostas fisiológicas e comportamentais pronunciadas e facilmente reprodutíveis (Bali; Jaggi, 2015). Estudos prévios que investigaram o envolvimento do CI nas respostas cardiovasculares induzidas por estímulos aversivos não condicionados utilizaram esse modelo experimental de estresse (Alves *et al.*, 2014; Alves; Crestani; Corrêa, 2010; Tomeo *et al.*, 2022). Desse modo, os dados obtidos com o estresse de restrição permitem ampla comparação com dados da literatura.

No presente estudo, o estresse de restrição consistiu na introdução dos animais em tubos cilíndricos plásticos (6,5 cm de diâmetro, 15 cm de comprimento), ventilados por buracos de ½ polegada que preenchiam aproximadamente 20% da superfície do tubo. Foi realizado, em grupos independentes de animais, uma sessão aguda ou a exposição repetida ao estresse por restrição.

4.8.1 Estresse de restrição agudo

No protocolo de estresse agudo os animais foram mantidos por um período de 60 minutos no tubo de restrição (Alves *et al.*, 2014; Alves; Crestani; Corrêa, 2010), e cada animal submetido a apenas uma sessão de restrição para evitar habituação (Benini *et al.*, 2019).

4.8.2 Estresse de restrição repetido

Para o estresse de restrição repetido (ERR), os animais foram submetidos a sessões diárias de 60 minutos de estresse de restrição por 10 dias consecutivos (Benini *et al.*, 2019). Em todas as sessões o estresse foi iniciado às 9:00 horas.

4.9 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O teste do LCE foi utilizado para avaliação dos efeitos do estresse de restrição e dos tratamentos farmacológicos no CI sobre comportamentos relacionados à ansiedade (Pellow S *et al.*, 1985). O aparato utilizado para o teste consistiu em dois braços abertos e dois braços fechados, com 50 cm de comprimento e 10 cm de largura, unidos perpendicularmente e elevados 50 cm do solo. Os braços fechados possuíam paredes de madeira de 40 cm de altura que os circundam, e os braços abertos uma borda lateral de acrílico de 1 cm para evitar a queda dos animais do aparato.

Os roedores evitam os braços abertos, e fármacos ansiolíticos normalmente aumentam a exploração dos braços abertos, sem interferir no número de entradas nos braços fechados (Pellow S *et al.*, 1985). Desse modo, no presente estudo foi quantificado o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados. No intervalo entre cada animal, o labirinto foi limpo com uma solução de álcool a 20% para eliminar pistas olfativas. O comportamento foi gravado por um período de 5 minutos. Os vídeos foram analisados utilizando o programa Anymaze (Stoelting, EUA).

4.10 DETERMINAÇÃO ANATÔMICA DOS SÍTIOS DE INJEÇÃO

Ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados com uretana [1,2 g/kg, intraperitoneal (i.p.)] e 100 nL do corante azul de Evans (1%) foi

microinjetado bilateralmente para determinação do sítio de injeção intracerebral. Em seguida, os encéfalos foram removidos, pós-fixados e posteriormente seccionados em cortes frontais de 40 µm de espessura no criostato (CM1900, Leica, Alemanha) para análise dos sítios de injeção. A localização da injeção foi determinada de acordo com o atlas de encéfalo de ratos de Paxinos & Watson (1997). Os animais cujos sítios de microinjeção estavam localizados fora das sub-regiões do CI foram considerados negativos e, portanto, excluídos das análises.

4.11 IMUNOHISTOQUÍMICA

A proteína Fos, produto do proto-oncogene *c-fos*, é amplamente utilizada como marcador indireto de ativação neuronal, uma vez que sua expressão é rapidamente induzida em resposta a estímulos estressores e a alterações na neurotransmissão local (Morgan; Curran, 1991). Essa estratégia permitiu mapear, com resolução sub-regional, o impacto da neurotransmissão CRFérgica sobre o recrutamento neuronal ao longo do eixo anteroposterior do CI durante o estresse de restrição agudo.

Os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg, i.p.) e perfundidos transcardiacamente com solução de tampão fosfato salina (PBS; pH 7,4), seguida de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (pH 7,4). Em seguida, o encéfalo foi removido, pós-fixado em paraformaldeído por 24 horas e transferido para solução de sacarose a 30% em PBS, a 4°C, por 48 horas. Os encéfalos foram armazenados a -80°C até o processamento. Cortes coronais (35 µm de espessura) foram obtidos em criostato a -20°C (CM1900, Leica, Alemanha), de acordo com as coordenadas de Paxinos e Watson (1997), e armazenados em solução crioprotetora até o dia do teste de imunohistoquímica.

Os cortes foram inicialmente lavados três vezes (10 min cada) em PBS e incubados em solução bloqueadora contendo 0,25% de Triton X-100 e 3% de soro normal de cabra (NGS) em PBS por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram transferidos para uma solução contendo o anticorpo primário (anti-c-Fos de coelho, 1:2.000; Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, EUA), 0,25% de Triton X-100 e 3% de NGS em PBS e foram incubados *overnight* a 4°C sob agitação. No dia seguinte, todas as etapas foram realizadas em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados três vezes (10 min cada) em

PBS e incubados por 2 horas com o anticorpo secundário (anti-coelho, 1:600; Vector Laboratories, Burlingame, Califórnia, EUA) em solução bloqueadora contendo 0,25% de Triton X-100 e 1% de NGS em PBS. Em seguida, os cortes foram lavados três vezes (10 min cada) em PBS e incubados por 1 hora em solução de avidina-biotina-peroxidase (kit ABC Elite, PK-6100; Vector Laboratories, Burlingame, Califórnia, EUA) contendo 0,5% de Triton X-100 em PBS. Posteriormente, foram lavados três vezes (10 min cada) e incubados em 3,3′-diaminobenzidina (DAB) por aproximadamente 7 minutos. Após quatro lavagens (5 min cada), as secções foram transferidas para PBS e montadas em lâminas gelatinizadas. Após a secagem, as lâminas foram hidratadas em água destilada e desidratadas em gradiente crescente de etanol (30%, 60%, 90%, 95% e 100%), seguido de xilol (LabSynth, São Paulo, Brasil). Por fim, as lâminas foram cobertas com Permount (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e lamínulas.

A imunomarcação de Fos foi capturada em microscópio acoplado à câmera (Zeiss Axioskop 2). A quantificação foi realizada em áreas fixas das sub-regiões CIa, CIpr e CIpc. Pelo menos duas secções por sub-região e por animal foram analisadas. As células Fos-positivas foram contadas utilizando o software ImageJ (versão 1.52q; disponível em: https://imagej.nih.gov/ij/download.html) por um experimentador cego aos tratamentos experimentais. Os resultados foram expressos como o número médio de células Fos-positivas por mm².

4.12 WESTERN BLOTTING

Os animais foram eutanasiados por decapitação, e os encéfalos foram rapidamente removidos, congelados em isopentano sobre gelo seco (-20 °C) e armazenados em freezer a -80 °C até o processamento. Microdissecções do CI foram realizadas a partir de secções coronais obtidas em criostato (-20 °C) (CM1900, Leica, Alemanha) utilizando uma agulha de ponta chata 14 G. As amostras do CI foram obtidas a partir das seguintes coordenadas em relação à linha interaural: CIa (12,7 mm a 11,7 mm em relação a interaural), CIpr (10,2 mm a 9,2 mm em relação a interaural) e CIpc (8,1 mm a 7,1 mm em relação a interaural), conforme o atlas de Paxinos & Watson (1997). Após a dissecação, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80 °C para análises posteriores.

Os níveis do receptor CRF_1 no CI foram quantificados utilizando a técnica de *Western blotting* (Marin; Cruz; Planeta, 2008). As amostras foram homogeneizadas por ultrassom em solução de SDS a 1% contendo coquetel de inibidores de fosfatases e proteases (Sigma-Aldrich®, EUA). O conteúdo total de proteína foi determinado pelo ensaio de proteínas DC (Bio-Rad®, Hercules, Califórnia, EUA) e a concentração final foi ajustada para 40 µg. As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida-SDS a 9% e transferidas para membranas de PVDF-LFP (GE Healthcare, Illinois, EUA). Após bloqueio com solução de albumina sérica bovina (BSA) a 5% em tampão TBST por 1 h à temperatura ambiente sob agitação, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário contra o receptor CRF_1 (1:500, anticorpo policlonal anti-CRF1 de coelho; Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, EUA) por 18 h (*overnight*) a 4 °C. Em seguida, após lavagem em tampão TBST por 5 minutos, as membranas foram incubadas por 1 h em temperatura ambiente com o anticorpo secundário conjugado a fluoróforo (1:1000, Goat-α-Rabbit IgG-Cy3, GE Healthcare, Illinois, EUA). As membranas foram secas sobre papel filtro (protegidas da luz), a fluorescência das bandas foi detectada diretamente utilizando o scanner Syngene G:Box Chemi XRQ (Syngene, Frederick, Maryland, EUA) e quantificada com o software GeneTools (Syngene). A quantidade de receptor CRF_1 foi expressa como porcentagem relativa ao grupo controle. A proteína total foi quantificada pela coloração das membranas de PVDF com azul de Coomassie, sendo utilizada como controle de carregamento (Barretto-de-Souza *et al.*, 2022; Oliveira *et al.*, 2021).

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Todos os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism versão 10.3.1 (GraphPad Software Inc., La Jolla, California, EUA).

Os parâmetros cardiovasculares basais de PAM, FC e temperatura cutânea da cauda (TCC) após tratamento farmacológico no CI foram comparados por meio de ANOVA bifatorial com tratamento (veículo vs. CP376395 vs. CRF) e estresse (agudo vs. repetido) como medidas principais. As curvas temporais de variação da PAM, FC e TCC, bem como os valores médios de resposta durante a restrição e o período de recuperação [*valores*

obtidos a partir do cálculo da média de todos os pontos das curvas temporais durante o período de restrição (minutos 2-60) e recuperação (minutos 62-120)] foram analisadas usando ANOVA trifatorial com tratamento no CI (veículo vs. CP376395 vs. CRF) e estresse (agudo vs. repetido) como medidas principais e tempo como medida repetida. Os parâmetros comportamentais no LCE e o número de células positivas para a proteína Fos após uma sessão aguda de estresse de restrição foram comparados por meio da ANOVA monofatorial. A análise dos resultados dos níveis proteicos do receptor CRF_1 nos animais controle e submetidos ao ERR foram analisados utilizando ANOVA bifatorial com estresse (controle vs estressado) e região do CI (CIa vs. CIpr vs. CIpc) como medidas principais. Quando a ANOVA indicou interação entre os fatores, o teste post-hoc de Tukey foi utilizado para avaliar diferenças específicas entre os grupos experimentais. Resultados com $P<0,05$ foram considerados significativos em todas as análises.

5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

5.1 PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO CRFÉRGICA AO LONGO DO EIXO ANTEROPOSTERIOR DO CI NO CONTROLE DAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES AO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO AGUDO E REPETIDO

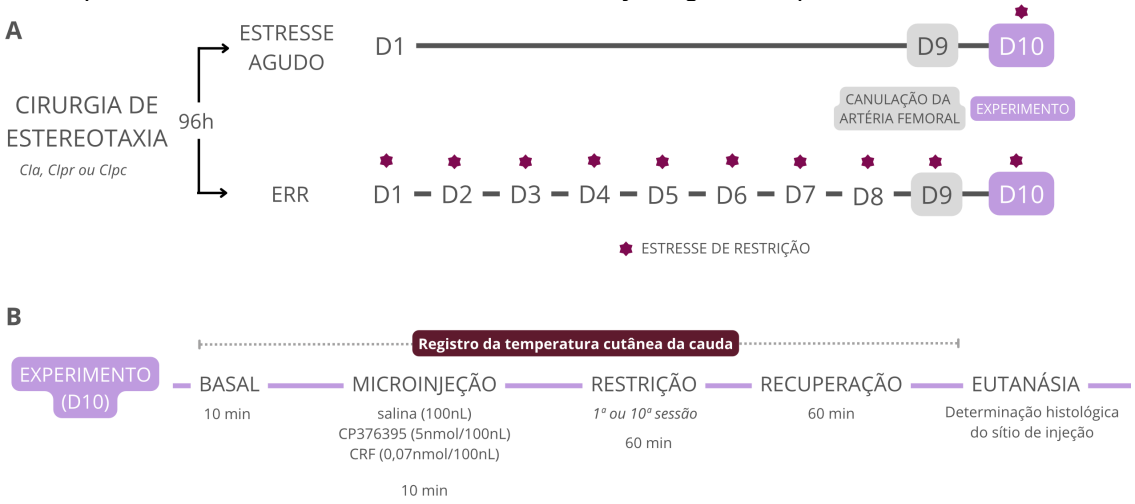
Diferentes grupos de animais foram submetidos ao estresse de restrição agudo ou ERR. Todos os animais foram inicialmente submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação bilateral de cânulas-guia direcionadas às regiões CIa, CIpr ou CIpc, seguida de um período de recuperação de quatro dias. Em ambas as condições, os animais foram aleatoriamente designados para receber microinjeções de veículo (100 nL), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF_1, 5 nmol/100 nL) ou CRF (agonista do receptor CRF_1, 0,07 nmol/100 nL).

Os animais dos grupos ERR foram expostos diariamente a sessões de restrição de 60 minutos por 10 dias consecutivos, sempre iniciadas às 9h. Após o término da 9ª sessão, foi realizada a canulação da artéria femoral para permitir o registro da PAP durante a 10ª sessão de restrição. Os animais dos grupos agudos permaneceram sem manipulação durante o mesmo período experimental, exceto para limpeza das caixas e manutenção de água e ração. As cirurgias e os registros cardiovasculares dos grupos agudos foram conduzidos em paralelo aos dos grupos de estresse repetido.

Após a cirurgia de canulação da artéria femoral, os animais foram transferidos para a sala de experimentação e permaneceram em caixas individuais, sob condições controladas de temperatura (23 ± 2ºC) e umidade (50 ± 10%), com ciclo claro-escuro 12:12 h e livre acesso a água e a ração. No dia do experimento, cada animal foi conectado ao sistema de registro cardiovascular em sua respectiva caixa. Inicialmente, foi realizado um registro de 20 minutos da PAM e da FC para determinação dos valores basais. Dez minutos antes do início da sessão de estresse, grupos independentes de animais receberam microinjeções bilaterais de CP376395, CRF ou veículo nas regiões CIa, CIpr ou CIpc. Os registros cardiovasculares de PAM e FC foram mantidos durante toda a sessão de restrição (fase de restrição) e continuaram por 60 minutos após o término da sessão (fase de recuperação).

A temperatura cutânea da cauda foi medida 10 e 1 minutos antes da restrição; aos 0, 5, 10, 20, 40 e 60 minutos durante a restrição; e aos 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos durante o período de recuperação (Figura 2).

Figura 2 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do papel da neurotransmissão CRFérgica ao longo do eixo anteroposterior do córtex insular (CI) no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição agudo e repetido. **(A)** Linha do tempo ilustrando a sequência dos procedimentos cirúrgicos para implantação bilateral das cânulas-guia direcionadas ao córtex insular anterior (CIa), córtex insular posterior-rostral (CIpr) ou córtex insular posterior-caudal (CIpc) (cirurgia estereotáxica), canulação da artéria femoral e a exposição dos animais ao estresse de restrição agudo ou repetido (ERR, 10 sessões). **(B)** Linha do tempo ilustrando os procedimentos experimentais realizados no dia do teste para a avaliação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição agudo e repetido.



5.2 PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO CRFÉRGICA AO LONGO DO EIXO ANTEROPOSTERIOR DO CI NO CONTROLE DA RESPOSTA TIPO-ANSIOGÊNICA AO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO AGUDO

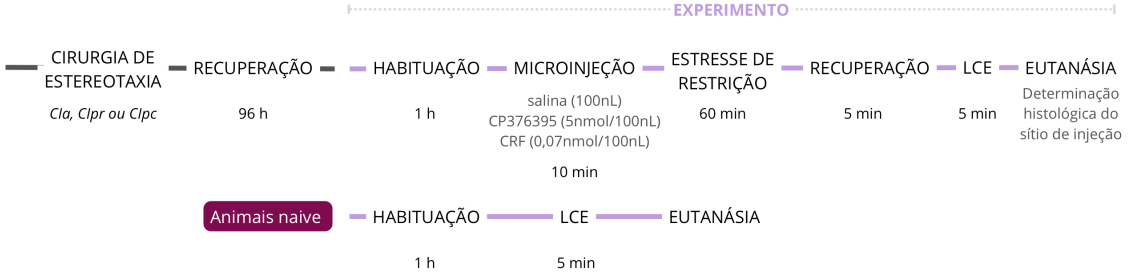
Os animais foram aleatoriamente designados para pertencerem ao grupo *naive* (não estressado e sem procedimento cirúrgico), para receber microinjeções de veículo, CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF_1, 5 nmol/100 nL) ou CRF (agonista do receptor CRF_1, 0,07 nmol/100 nL). Os animais que receberam microinjeção foram inicialmente submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação bilateral de cânulas-guia direcionadas às regiões CIa, CIpr ou CIpc, seguida de um período de recuperação de quatro dias.

No dia do teste, os animais foram transferidos para a sala experimental, mantida sob condições controladas de temperatura (23 ± 2 °C) e umidade (50 ± 10%) e acusticamente isolada das demais dependências. Em seguida, os mandris foram cuidadosamente removidos das cânulas-guia e os animais

permaneceram em repouso por 1 hora antes do início do experimento, para se habituarem ao novo ambiente. Dez minutos antes do início da sessão de restrição, grupos independentes de animais receberam microinjeções bilaterais de CP376395, CRF ou veículo nas regiões CIa, CIpr ou CIpc.

Imediatamente após o término da sessão aguda de restrição, os animais foram colocados individualmente em caixas plásticas por 5 minutos para permitir uma breve recuperação da exposição ao estresse. Em seguida, foram colocados individualmente no LCE por 5 minutos para avaliação dos comportamentos relacionados à ansiedade. O comportamento foi registrado por uma câmera posicionada acima do aparato. O efeito ansiogênico induzido pelo estresse de restrição foi avaliado comparando o comportamento dos animais estressados com o dos animais controle não estressados (*naive*) (Figura 3).

Figura 3 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do papel da neurotransmissão CRFérgica ao longo do eixo anteroposterior do córtex insular (CI) no controle da resposta tipo-ansiogênica ao estresse de restrição agudo. Sequência dos procedimentos cirúrgicos para implantação bilateral das cânulas-guia direcionadas ao CI anterior (CIa), CI posterior-rostral (CIpr) ou CI posterior-caudal (CIpc) (cirurgia estereotáxica), bem como dos procedimentos experimentais realizados no dia do teste para a avaliação das respostas comportamentais ao estresse de restrição.



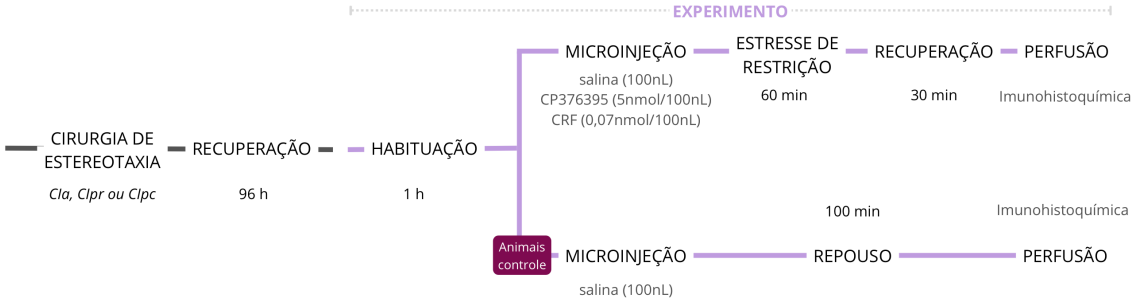
5.3 PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO CRFÉRGICA AO LONGO DO EIXO ANTEROPOSTERIOR DO CI NA ALTERAÇÃO DA ATIVAÇÃO NEURONAL INDUZIDA PELO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO AGUDO

Os animais foram aleatoriamente designados para receber microinjeções de veículo, CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF_1, 5 nmol/100 nL) ou CRF (agonista do receptor CRF_1, 0,07 nmol/100 nL). Todos os animais foram inicialmente submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação bilateral de cânulas-guia direcionadas às regiões CIa, CIpr ou CIpc, seguida de um período de recuperação de quatro dias.

No dia do teste, os animais foram transferidos para a sala experimental, mantida sob condições controladas de temperatura (23 ± 2 °C) e umidade (50 ± 10%) e acusticamente isolada das demais dependências. Em seguida, os mandris foram cuidadosamente removidos das cânulas-guia e os animais permaneceram em repouso por 1 hora antes do início do experimento, para se habituarem ao novo ambiente. Dez minutos antes do início da sessão de restrição, grupos independentes de animais receberam microinjeções bilaterais de CP376395, CRF ou veículo nas regiões CIa, CIpr ou CIpc.

Após a sessão de restrição, os animais foram retornados às suas caixas moradia, onde permaneceram por 30 minutos. Em seguida, todos os animais foram anestesiados com uretana e perfundidos transcardiacamente. O efeito do estresse de restrição agudo sobre a ativação neuronal no CI foi avaliado pela comparação do número de células Fos-positivas entre os animais estressados e os não estressados que receberam microinjeções de veículo 100 minutos antes da eutanásia (correspondendo a 10 minutos antes da restrição, 60 minutos de restrição e 30 minutos de recuperação) (Figura 4).

Figura 4 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do papel da neurotransmissão CRFérgica ao longo do eixo anteroposterior do córtex insular (CI) na ativação neuronal induzida pelo estresse de restrição agudo. Sequência dos procedimentos cirúrgicos para implantação bilateral das cânulas-guia direcionadas ao CI anterior (CIa), CI posterior-rostral (CIpr) ou CI posterior-caudal (CIpc) (cirurgia estereotáxica), bem como dos procedimentos experimentais realizados no dia do teste para a avaliação da alteração na ativação neuronal induzida pelo estresse.



5.4 EFEITO DA EXPOSIÇÃO REPETIDA AO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO SOBRE OS NÍVEIS PROTEICOS DO RECEPTOR CRF_1 AO LONGO DO EIXO ANTEROPOSTERIOR DO CI

Grupos independentes de animais foram submetidos a sessões diárias de 60 minutos de estresse de restrição durante 10 dias consecutivos (grupo repetido) ou mantidos sem manipulação, exceto pela limpeza das caixas, pelo

mesmo período experimental dos animais submetidos ao protocolo de restrição (grupo controle).

Vinte e quatro horas após a última sessão de estresse, os animais de ambos os grupos foram eutanasiados por decapitação. Os cérebros foram rapidamente removidos e armazenados a -80 °C até o processamento posterior. As regiões CIa, CIpr e CIpc foram microdissecadas para a determinação dos níveis proteicos do receptor CRF_1 (Figura 5).

Figura 5 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito da exposição repetida (ERR) ao estresse de restrição sobre os níveis proteicos do receptor CRF_1 ao longo do eixo anteroposterior do córtex insular (CI).



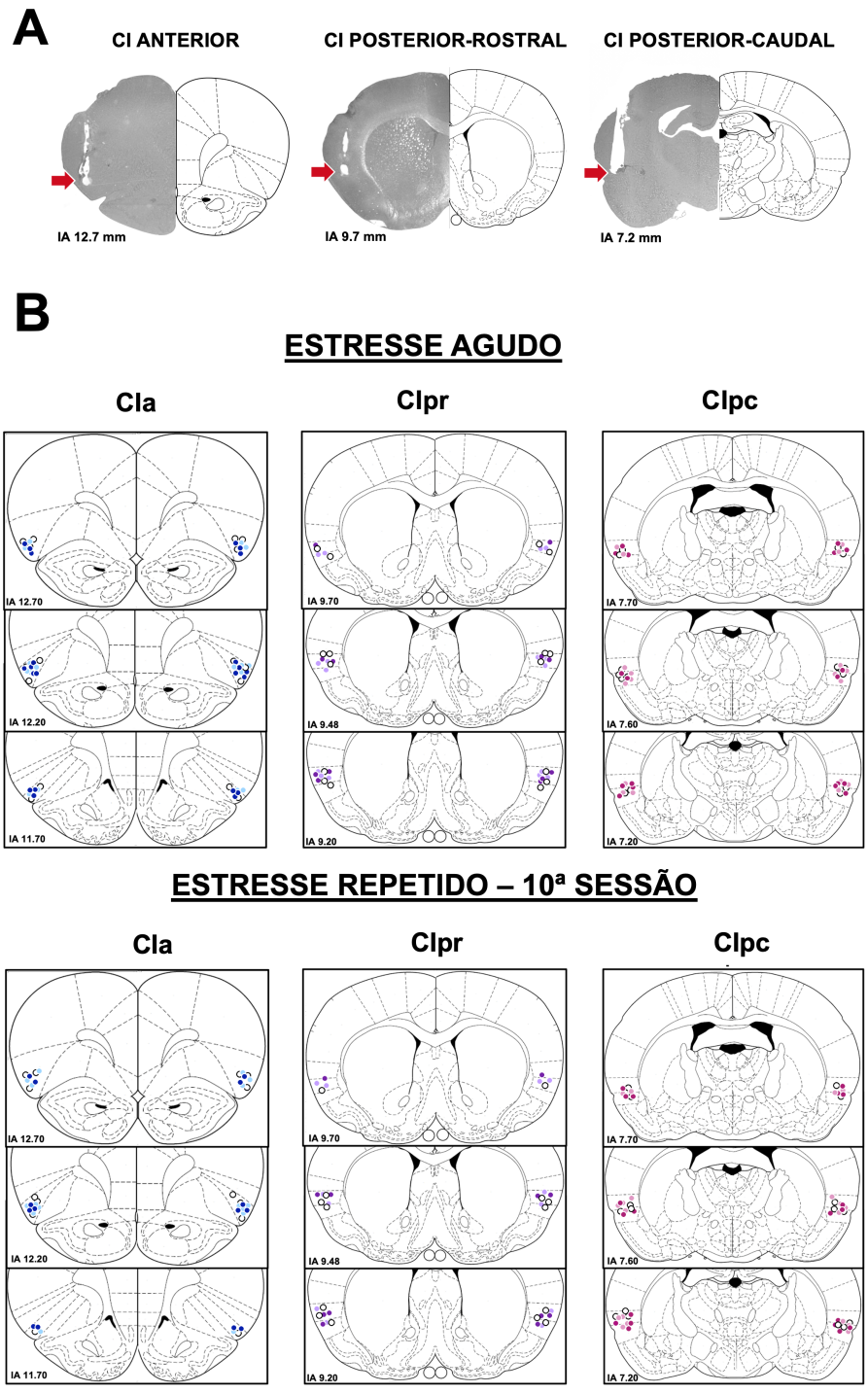
6 RESULTADOS

6.1 PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO CRFÉRGICA AO LONGO DO EIXO ANTEROPOSTERIOR DO CI NO CONTROLE DAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES AO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO AGUDO E REPETIDO

Os dados apresentados nessa seção foram publicados integralmente no periódico *Autonomic Neuroscience* (ver Anexo A).

A Figura 6 apresenta representações esquemáticas, baseadas no Atlas de Paxinos & Watson (1997), indicando os sítios de microinjeção distribuídos ao longo do eixo rostrocaudal do CI. Os sítios de microinjeção estão discriminados de acordo com o tratamento administrado (veículo, CP376395 ou CRF) e com a condição experimental (estresse agudo ou repetido). A Figura 6 também apresenta fotomicrografia de animais representativos ilustrando os sítios de microinjeção em cada uma das sub-regiões do CI.

Figura 6 – Locais de microinjeção ao longo do eixo rostrocaudal do córtex insular (CI) dos animais utilizados na avaliação do papel da neurotransmissão CRFérgica ao longo do eixo anteroposterior do CI no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição agudo e repetido**. (A)** Fotomicrografias de cortes coronais do encéfalo mostrando os locais bilaterais de microinjeção (à esquerda) e representações diagramáticas adaptadas de Paxinos e Watson (1997) (à direita), indicando o córtex insular anterior (CIa; IA 12,7 mm), o córtex insular posterior-rostral (CIpr; IA 9,7 mm) e o córtex insular posterior-caudal (CIpc; IA 7,2 mm). **(B)** Representação diagramática baseada no atlas cerebral de ratos de Paxinos e Watson (1997) indicando os locais de microinjeção no CIa, CIpr e CIpc de veículo (CIa, CIpr e CIpc: círculos pretos), CP376395 (CIa: círculos azuis claros; CIpr: círculos lilás; CIpc: círculos rosa claros) ou CRF (CIa: círculos azuis escuros; CIpr: círculos roxos; CIpc: círculos rosa escuros) de animais submetidos ao estresse de restrição agudo ou repetido.



Os valores basais de PAM, FC e TCC foram avaliados em animais submetidos ao estresse agudo ou repetido recebendo microinjeções intra-CI de veículo (100 nL), de CP376395 (antagonista do receptor CRF_1, 5 nmol/100 nL) ou CRF (0,07 nmol/100 nL) no CIa, CIpr ou CIpc. Os dados são apresentados na Tabela 2.

A análise dos dados do CIa indicou que animais submetidos ao ERR e tratados com veículo (P=0,006) ou CRF (P=0,0057) apresentaram valores de PAM aumentados quando comparados ao respectivo grupo agudo. A análise dos dados do CIpr revelou que animais tratados com CRF expostos ao ERR apresentaram maior TCC em relação ao respectivo grupo agudo (P=0,0328). A FC basal permaneceu inalterada entre as sub-regiões do CI, tratamentos e condições de estresse.

Tabela 2 – Parâmetros basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda (TCC)**.** Efeito da microinjeção bilateral de veículo (100 nL), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF1, 5 nmol/100 nL) ou CRF (0,07 nmol/100 nL) no córtex insular (CI) anterior (CIa), posterior-rostral (CIpr) e posterior-caudal (CIpc) sobre os valores pré-estresse de PAM, FC e TCC em animais submetidos a sessões de estresse de restrição agudo ou repetido (ERR). #P<0,05 comparado com o respectivo grupo agudo. ANOVA seguida do pós-teste de Tukey.

Grupo	n	PAM (mmHg)	FC (bpm)	TCC (°C)
CIa				
Agudo				
veículo	*8*	**98 ± 1**	**360 ± 13**	**29,8 ± 0,2**
CP376395	*8*	**105 ± 4**	**371 ± 12**	**30,7 ± 0,5**
CRF	*11*	**101 ± 2**	**376 ± 7**	**30,2 ± 0,7**
ERR				
veículo	*7*	**110 ± 4#**	**372 ± 15**	**29,5 ± 0,3**
CP376395	*8*	**108 ± 2**	**361 ± 8**	**30,6 ± 0,5**
CRF	*7*	**113 ± 3#**	**393 ± 9**	**29,1 ± 0,9**
Tratamento		$F_{(2,43)}$=0,6079, P=0,5491	$F_{(2,43)}$=2,102, P=0,1346	$F_{(2,43)}$= 1,481, P=0,2387
Estresse		$F_{(1,43)}$=13,93, P=0,006	$F_{(1,43)}$= 0,5055, P=0,4809	$F_{(1,43)}$= 0,8191, P=0,3705
Interação		$F_{(2,43)}$=1,666, P=0,201	$F_{(2,43)}$= 0,9233, P=0,405	$F_{(2,43)}$= 0,4054, P=0,6692
CIpr				
agudo				
veículo	*8*	**102 ± 3**	**335 ± 6**	**30,9 ± 0,7**
CP376395	*8*	**106 ± 3**	**339 ± 8**	**32,1 ± 0,8**
CRF	*6*	**100 ± 2**	**340 ± 9**	**32,1 ± 0,6**
ERR				
veículo	*7*	**107 ± 3**	**330 ± 16**	**31,8 ± 0,5**
CP376395	*6*	**91 ± 7**	**327 ± 15**	**32,7 ± 1**
CRF	*6*	**95 ± 9**	**315 ± 21**	**34,8 ± 0,8#**
Tratamento		$F_{(2,35)}$= 2,371, P=0,1082	$F_{(2,35)}$=0,1167, P=0,8902	$F_{(2,35)}$=3,675, P=0,0356
Estresse		$F_{(1,35)}$=1,815, P=0,1866	$F_{(1,35)}$=1,710, P=0,1995	$F_{(1,35)}$=4,938, P=0,0328
Interação		$F_{(2,35)}$=2,371, P=0,1082	$F_{(2,35)}$=0,3360, P=0,7169	$F_{(2,35)}$=1,017, P=0,3723
CIpc				
agudo				
veículo	*8*	**100 ± 2**	**350 ± 6**	**30,5 ± 0,5**
CP376395	*9*	**103 ± 2**	**372 ± 9**	**28,7 ± 0,4**
CRF	*9*	**104 ± 2**	**367 ± 13**	**30,4 ± 0,7**
ERR				
veículo	*8*	**110 ± 4**	**329 ± 12**	**29,9 ± 0,7**
CP376395	*10*	**103 ± 1**	**360 ± 11**	**30,3 ± 0,5**
CRF	*10*	**100 ± 2**	**352 ± 11**	**31,1 ± 0,7**
Tratamento		$F_{(2,47)}$=0,4814, P=0,6209	$F_{(2,47)}$=2,516, P=0,0916	$F_{(2,47)}$=1,895, P=0,1616
Estresse		$F_{(1,47)}$=0,6702, P=0,4171	$F_{(1,47)}$=2,791, P=0,1014	$F_{(1,47)}$=0,4097, P=0,5252
Interação		$F_{(2,47)}$=3,455, P=0,0398	$F_{(2,47)}$=0,03058, P=0,9699	$F_{(2,47)}$=1,889, P=0,1625

Fonte: Elaborada pela autora, 2026.

6.1.1 Papel da neurotransmissão CRFérgica ao longo do eixo anteroposterior do CI no controle das respostas pressora e taquicárdica ao estresse de restrição agudo e repetido

CIa – A análise das curvas temporais da alteração da PAM indicou efeito do tempo ($F_{(65,2795)}$=26,8909, P<0,0001), bem como interações tempo x estresse ($F_{(65,2795)}$=2,1905, P<0,0001), tempo x tratamento ($F_{(130,2795)}$=1,3724, P=0,0039) e tempo x tratamento x estresse ($F_{(130,2795)}$=1,5467, P=0,0001). Não foram observados efeitos significativos no tratamento ($F_{(2,43)}$=0,2687, P=0,7656), estresse ($F_{(1,43)}$=3,1900, P=0,0810) ou interação estresse x tratamento ($F_{(2,43)}$=0,9255, P=0,4040). O pós-teste de Tukey indicou que animais tratados com CRF apresentaram resposta pressora reduzida durante os seis minutos iniciais do estresse de restrição agudo (P<0,05) (Figura 7).

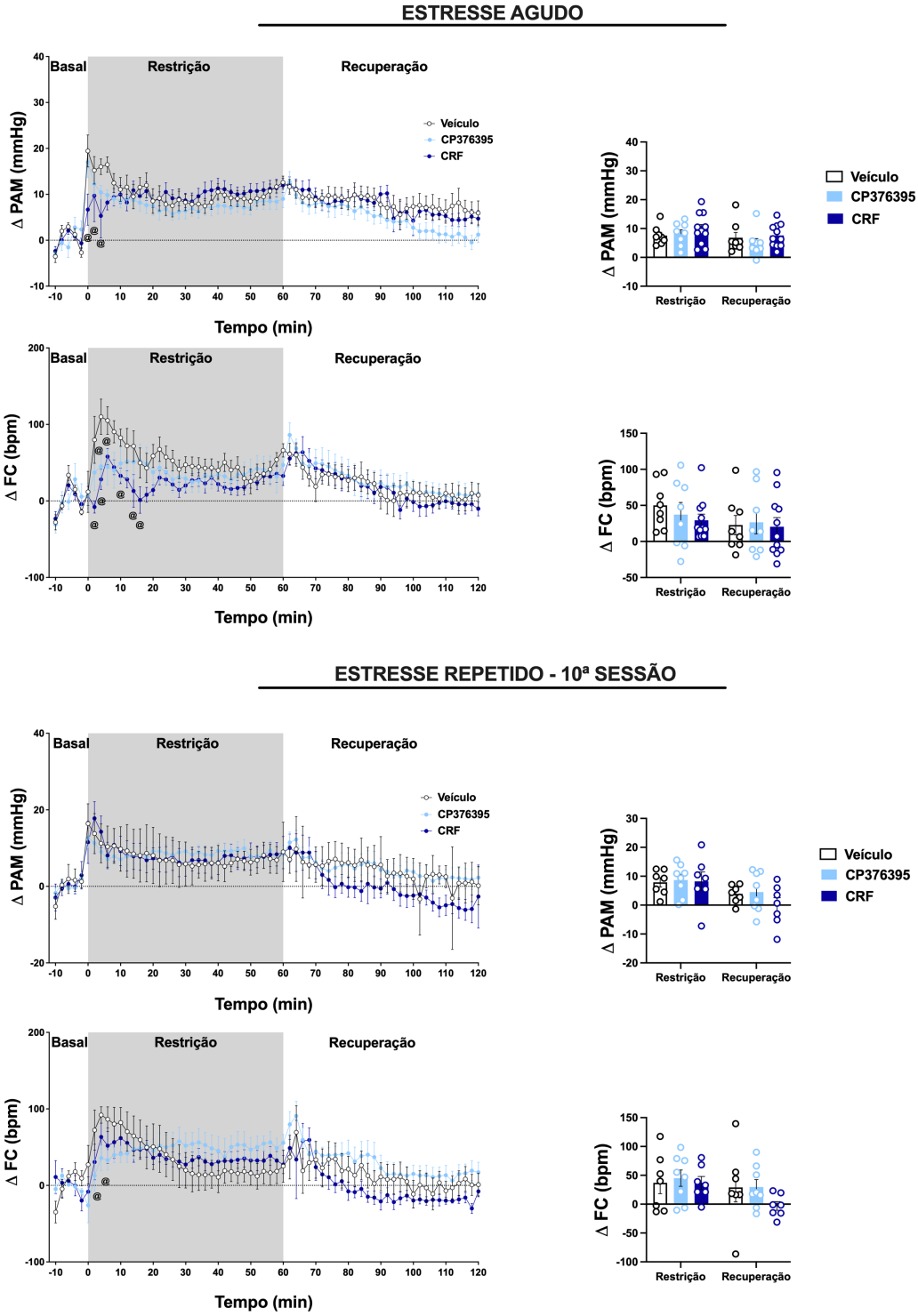
A análise da resposta média da PAM durante os períodos de restrição e recuperação indicou efeito do tempo ($F_{(1,86)}$=12,3023, P=0,0007), mas sem influência do estresse ($F_{(1,86)}$=3,2174, P=0,0763) ou tratamento ($F_{(2,86)}$=0,0139, P=0,9861). A análise também não indicou interações estresse x tempo ($F_{(1,86)}$=2,5154, P=0,1164), estresse x tratamento ($F_{(2,86)}$=1,7398, P=0,1816), tempo x tratamento ($F_{(2,86)}$=0,5929, P=0,5549) ou estresse x tempo x tratamento ($F_{(2,86)}$=0,5317, P=0,5895) (Figura 7).

A análise das curvas temporais de variação da FC indicou um efeito do tempo ($F_{(65,2795)}$=18,3429, P<0,0001) e uma interação tempo x tratamento ($F_{(130,2795)}$=1,9054, P<0,0001). A análise não indicou efeito de estresse ($F_{(1,43)}$=0,1043, P=0,7482) ou tratamento ($F_{(2,43)}$=1,0894, P=0,3454) ou interações estresse x tratamento ($F_{(2,43)}$=0,2694, P=0,7651), tempo x estresse ($F_{(65,2795)}$=0,7198, P=0,9556) e tempo x estresse x tratamento ($F_{(130,2795)}$=1,1853, P=0,0787). O pós-teste de Tukey indicou que o tratamento com CRF reduziu a resposta taquicárdica aos 2, 4, 10, 14 e 16 minutos do estresse de restrição agudo (P<0,05); enquanto o tratamento com CP376395 diminuiu a resposta aos 4 e 6 minutos (P<0,05). O pós-teste também mostrou que animais tratados com CP376395 exibiram taquicardia reduzida aos 2 e 4 minutos do estresse repetido (P<0,05) (Figura 7).

A análise da alteração média da FC durante os períodos de restrição e recuperação indicou efeito do tempo ($F_{(1,86)}$=4,8649, P=0,0300). No entanto, a análise não indicou efeitos de estresse ($F_{(1,86)}$=0,0496, P=0,8242) ou tratamento

($F_{(2,86)}$=1,2498, P=0,2916); ou interações estresse x tempo ($F_{(1,86)}$=0,1051, P=0,7465), estresse x tratamento ($F_{(2,86)}$=0,2321, P=0,7933), tempo x tratamento ($F_{(2,86)}$=0,1639, P=0,8490) e estresse x tempo x tratamento ($F_{(2,86)}$=0,7677, P=0,4672) (Figura 7).

Figura 7 – Papel da neurotransmissão CRFérgica no córtex insular anterior (CIa) no controle das respostas pressora e taquicárdica ao estresse de restrição agudo e repetido (ERR). Microinjeção bilateral de veículo (100 nL, branco), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF1, 5 nmol/100 nL, azul claro) ou CRF (0,07 nmol/100 nL, azul escuro) no CIa. Curvas temporais de variação da pressão arterial média (ΔPAM) e frequência cardíaca (ΔFC); e a média da ΔPAM e ΔFC durante os períodos de restrição e recuperação de animais submetidos ao estresse de restrição agudo (superior) e ao estresse de restrição repetido (ERR; 10ª sessão, inferior). A área sombreada indica o período de estresse de restrição. Os círculos e as barras representam a média ± EPM. @P<0,05 naquele ponto específico em comparação com o respectivo grupo controle. ANOVA trifatorial seguida do pós-teste de Tukey.



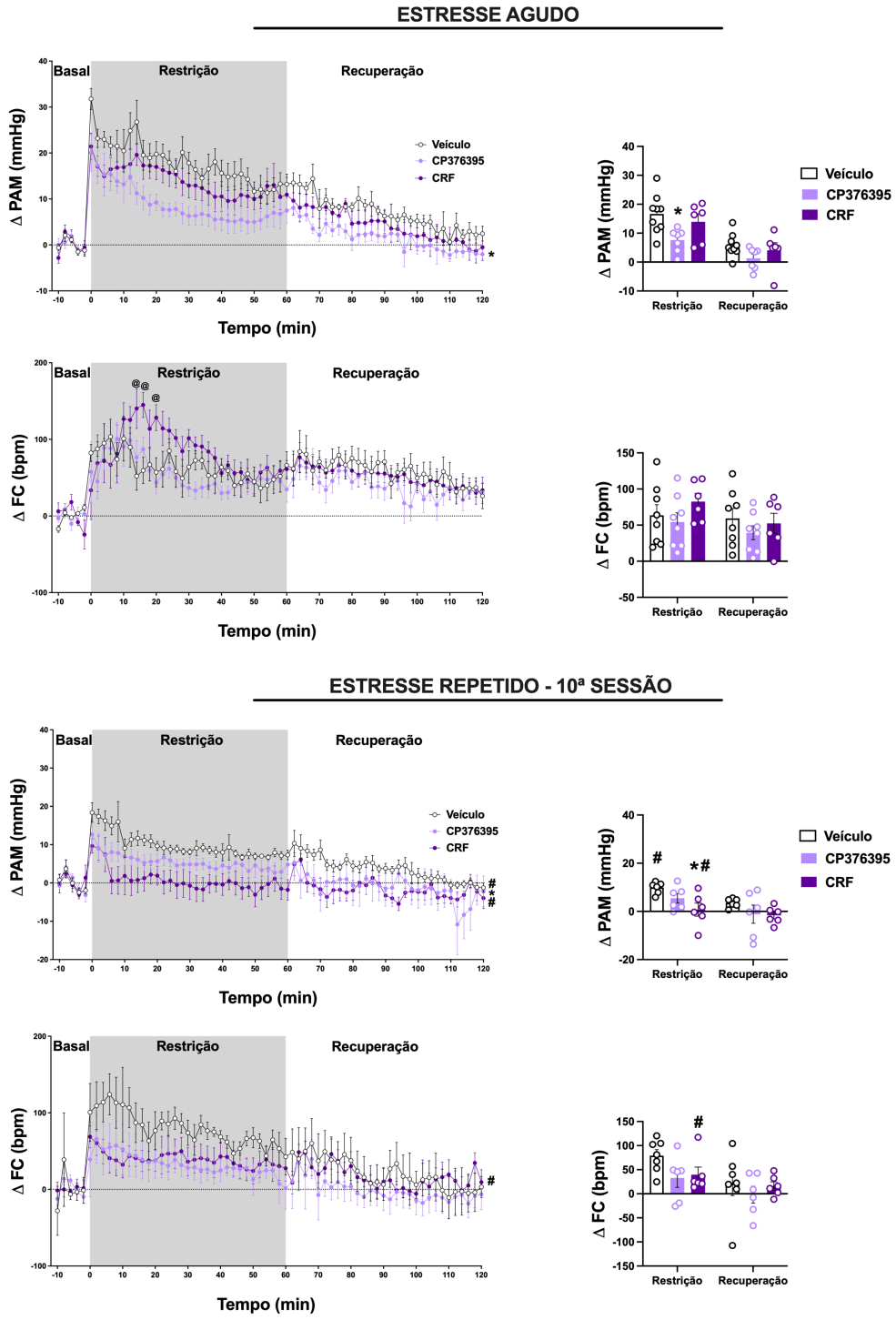
CIpr – A análise das curvas temporais de alteração da PAM indicou efeito do tempo ($F_{(65,2275)}$=33,9563, P<0,0001), estresse ($F_{(1,35)}$=17,5673, P=0,0001) e tratamento ($F_{(2,35)}$=7,1253, P=0,0025), bem como interação tempo x estresse ($F_{(65,2275)}$=3,6655, P<0,0001). A análise não indicou interações estresse x tratamento ($F_{(2,35)}$=1,5865, P=0,2190), tempo x tratamento ($F_{(130,2275)}$=1,1584, P=0,1119) e tempo x estresse x tratamento ($F_{(130,2275)}$=1,0247, P=0,4089). O pós-teste de Tukey revelou que a resposta pressora ao ERR foi significativamente reduzida em animais tratados com veículo ou CRF em comparação com o respectivo grupo agudo (P<0,05). O pós-teste também indicou que o tratamento com CP376395 atenuou a resposta pressora durante o estresse de restrição agudo (P<0,05), enquanto o tratamento com CRF reduziu a resposta pressora durante a 10ª sessão de estresse (P<0,05) (Figura 8).

A análise da alteração média da PAM durante os períodos de restrição e recuperação indicou efeitos do tempo ($F_{(1,70)}$=34,3700, P<0,0001), estresse ($F_{(1,70)}$=21,8706, P<0,0001) e tratamento ($F_{(2,70)}$=7,7041, P=0,0009). A análise não indicou interações estresse x tempo ($F_{(1,70)}$=2,8238, P=0,0973), estresse x tratamento ($F_{(2,70)}$=2,2937, P=0,1084), tempo x tratamento ($F_{(2,70)}$=0,3228, P=0,7251) e estresse x tempo x tratamento ($F_{(2,\ 0)}$=0,6687, P=0,5156). O pós-teste de Tukey mostrou que a alteração da PAM foi reduzida em animais tratados com veículo ou CRF submetidos ao estresse repetido em comparação com o respectivo grupo agudo durante o período de restrição (P<0,05). O pós-teste revelou ainda que o tratamento com CP376395 atenuou a resposta pressora durante a restrição em ratos submetidos ao estresse agudo (P<0,05), enquanto o tratamento com CRF diminuiu a resposta pressora durante a restrição em animais cronicamente estressados (P<0,05) (Figura 8).

A análise das curvas temporais de alteração da FC indicou efeito do estresse ($F_{(1,35)}$=6,8204, P=0,0131), tempo ($F_{(65,2275)}$=12,0434, P<0,0001) e interação tempo x estresse ($F_{(65,2275)}$=1,7009, P=0,0004). A análise não indicou efeito do tratamento ($F_{(2,35)}$=1,9944, P=0,1512); ou interações estresse x tratamento ($F_{(2,35)}$=0,7067, P=0,5001), tempo x tratamento ($F_{(130,2275)}$=0,7472, P=0,9842) e tempo x estresse x tratamento ($F_{(130,2275)}$=1,0487, P=0,3396). O pós-teste de Tukey indicou que animais tratados com CRF apresentaram taquicardia reduzida durante a 10ª sessão de estresse de restrição em comparação com o respectivo grupo agudo (P<0,05) (Figura 8).

A análise da resposta média de FC durante os períodos de restrição e recuperação indicou efeitos significativos do tempo ($F_{(1,70)}$=9,8414, P<0,01) e estresse ($F_{(1,70)}$=9,7646, P<0,01), mas sem efeito principal do tratamento ($F_{(2,70)}$=2,8312, P=0,0657). Não ocorreram interações entre estresse x tempo ($F_{(1,70)}$=1,6142, P=0,2008), estresse x tratamento ($F_{(2,70)}$=0,9234, P=0,4019), tempo x tratamento ($F_{(2,70)}$=0,0517, P=0,9496) ou estresse x tempo x tratamento ($F_{(2,70)}$=1,0087, P=0,3699). O pós-teste revelou que animais tratados com CRF exibiram taquicardia reduzida durante a 10ª sessão de restrição em comparação com o respectivo grupo agudo (P<0,05) (Figura 8).

Figura 8 – Papel da neurotransmissão CRFérgica no córtex insular posterior-rostral (CIpr) no controle das respostas pressora e taquicárdica ao estresse de restrição agudo e repetido. Microinjeção bilateral de veículo (100 nL, branco), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF1, 5 nmol/100 nL, lilás) ou CRF (0,07 nmol/100 nL, roxo) no CIpr. Curvas temporais de variação da pressão arterial média (ΔPAM) e frequência cardíaca (ΔFC); e a média da ΔPAM e ΔFC durante os períodos de restrição e recuperação de animais submetidos ao estresse de restrição agudo (superior) e ao estresse de restrição repetido (ERR, 10ª sessão, inferior). A área sombreada indica o período de estresse de restrição. Os círculos e as barras representam a média ± EPM. @P<0,05 naquele ponto específico em comparação com o respectivo grupo controle. #P<0,05 em comparação com o respectivo grupo agudo. *P<0,05 em comparação com o respectivo grupo controle. ANOVA trifatorial seguida do pós-teste de Tukey.



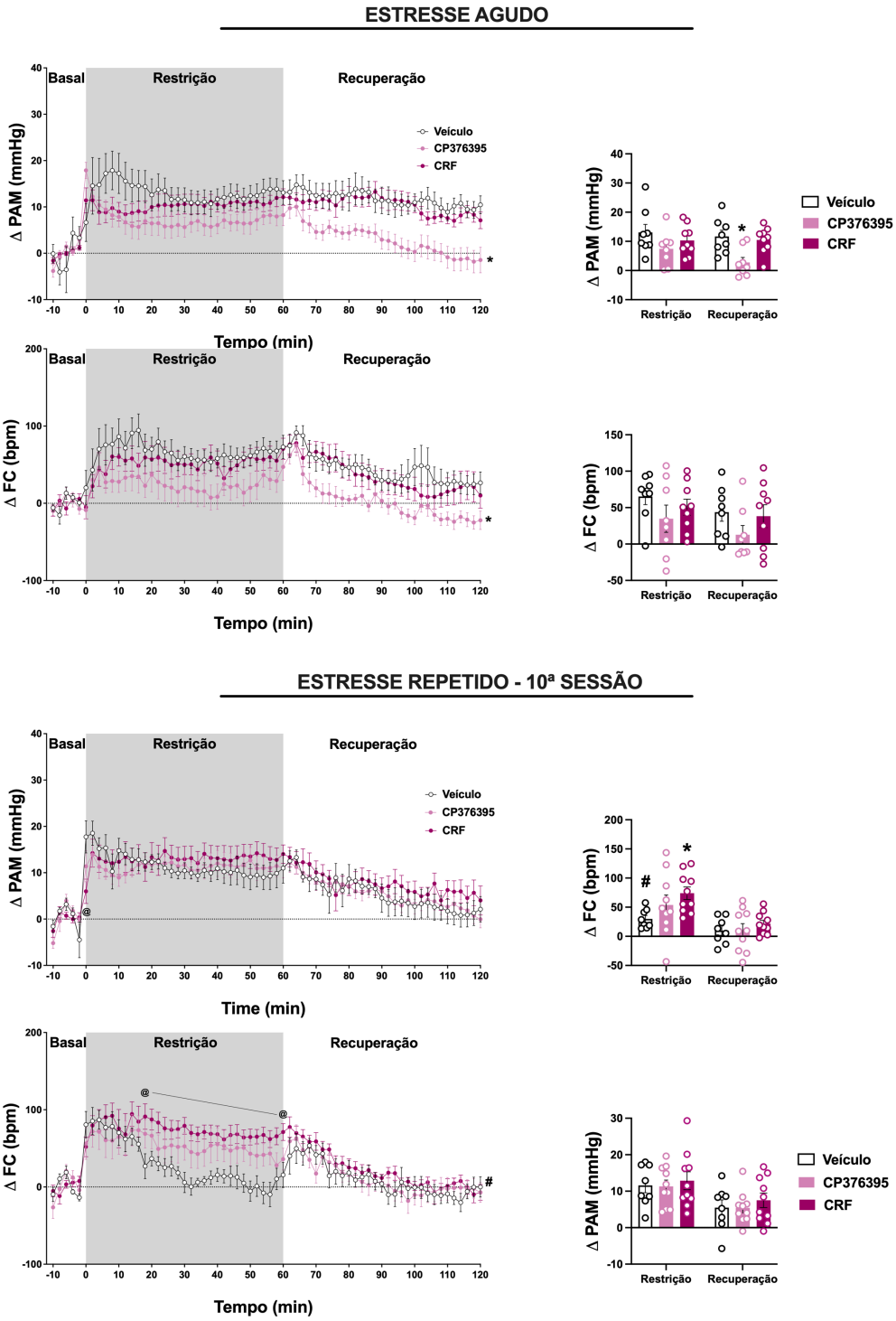
CIpc – A análise das curvas temporais de alteração da PAM indicou efeito do tempo ($F_{(65,3055)}$=29,6236, P<0,0001) e interações tempo x estresse ($F_{(65,3055)}$=3,0446, P<0,0001), tempo x tratamento ($F_{(130,3055)}$=1,7624, P<0,0001) e tempo x estresse x tratamento ($F_{(130,3055)}$=1,4275, P=0,0013). Não foram encontrados efeitos significativos para estresse ($F_{(1,47)}$=0,0318, P=0,8593), tratamento ($F_{(2,47)}$=2,4811, P=0,0945) e interação estresse x tratamento ($F_{(2,47)}$=1,7660, P=0,1821). O pós-teste de Tukey revelou que a resposta pressora no grupo tratado com CP376395 e submetido ao estresse agudo foi reduzida em relação ao grupo veículo (P<0,05), enquanto animais tratados com CRF exibiram redução da resposta pressora no primeiro minuto da 10ª sessão de restrição (P<0,05) (Figura 9).

A análise da alteração média da PAM durante os períodos de restrição e recuperação indicou efeitos do tempo ($F_{(1,95)}$=11,7286, P=0,0009) e tratamento ($F_{(2,95)}$=4,4643, P=0,0140). Nenhum efeito significativo foi encontrado para o estresse ($F_{(1,95)}$=0,0391, P=0,8437). A análise também não revelou interações significativas para estresse x tempo ($F_{(1,95)}$=2,6984, P=0,1037), estresse x tratamento ($F_{(2,95)}$=3,0188, P=0,0535), tempo x tratamento ($F_{(2,95)}$=0,4729, P=0,6246) ou estresse x tempo x tratamento ($F_{(2,95)}$=0,3255, P=0,7229). O pós-teste de Tukey indicou que animais que receberam CP376395 e submetidos ao estresse de restrição agudo apresentaram uma resposta pressora reduzida durante o período de recuperação (P<0,01) (Figura 9).

A análise das curvas temporais de alteração da FC indicou efeito do tempo ($F_{(65,3055)}$=27,4030, P<0,0001). Interações significativas foram encontradas para tempo x estresse ($F_{(65,3055)}$=3,2387, P<0,0001), tempo x tratamento ($F_{(130,3055)}$=1,4296, P=0,0012), estresse x tratamento ($F_{(2,47)}$=3,2591, P=0,0472) e tempo x estresse x tratamento ($F_{(130,3055)}$=1,2793, P=0,0197). Nenhum efeito principal significativo foi encontrado para estresse ($F_{(1,47)}$=0,1572, P=0,6935) ou tratamento ($F_{(2,47)}$=2,3957, P=0,1021). O pós-teste de Tukey revelou que a taquicardia foi reduzida em animais tratados com veículo submetidos ao ERR em comparação com o grupo agudo (P<0,05). O pós-teste também revelou que animais tratados com CP376395 mostraram taquicardia reduzida durante o estresse de restrição agudo quando comparados ao grupo veículo (P<0,05), enquanto animais tratados com CRF exibiram taquicardia aumentada do minuto 20 até o final da 10ª sessão de restrição (P<0,05) (Figura 9).

A análise da alteração média da FC durante os períodos de restrição e recuperação indicou efeito do tempo ($F_{(1,95)}$=16,3945, P=0,0001) e interação estresse x tratamento ($F_{(2,95)}$=3,3605, P=0,0388). Nenhum efeito significativo ocorreu para tratamento ($F_{(2,95)}$=2,2518, P=0,1107) ou estresse ($F_{(1,95)}$=1,0713, P=0,3032). Além disso, nenhuma interação significativa foi indicada entre estresse x tempo ($F_{(1,95)}$=1,8856, P=0,1729), tempo x tratamento ($F_{(2,95)}$=0,2512, P=0,7783) e estresse x tempo x tratamento ($F_{(2,95)}$=0,7554, P=0,4726). O pós-teste de Tukey indicou que animais tratados com CRF exibiram taquicardia aumentada durante o período de restrição da 10ª sessão de restrição (P<0,05), e animais cronicamente estressados tratados com veículo apresentaram taquicardia reduzida em relação ao respectivo grupo agudo (Figura 9).

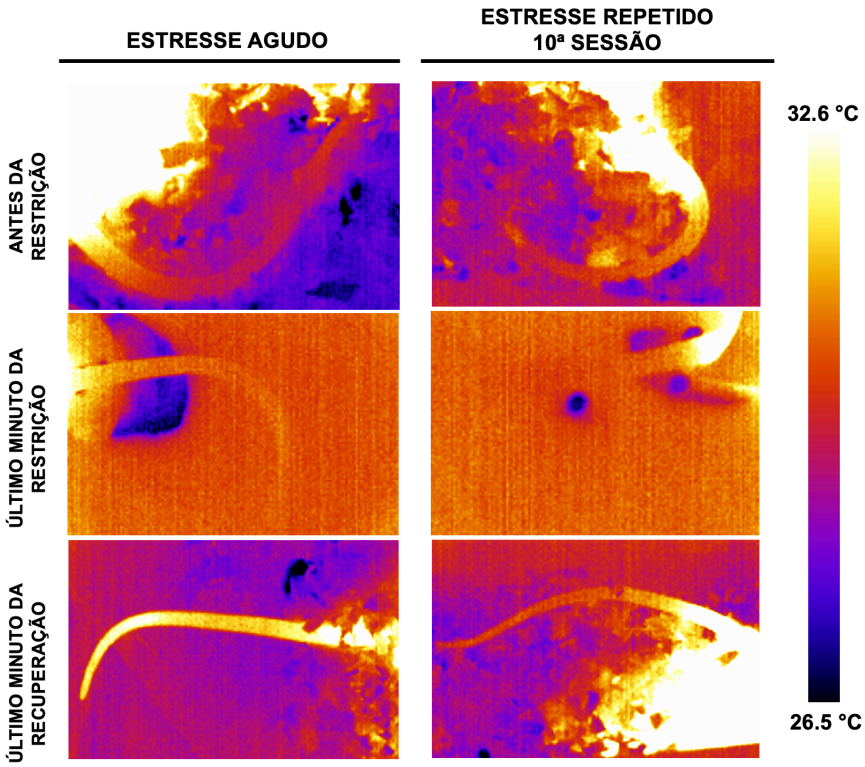
Figura 9 – Papel da neurotransmissão CRFérgica no córtex insular posterior-caudal (CIpc) no controle das respostas pressora e taquicárdica ao estresse de restrição agudo e repetido. Microinjeção bilateral de veículo (100 nL, branco), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF1, 5 nmol/100 nL, rosa claro) ou CRF (0,07 nmol/100 nL, magenta) no CIpc. Curvas temporais de variação da pressão arterial média (ΔPAM) e frequência cardíaca (ΔFC); e a média da ΔPAM, ΔFC durante os períodos de restrição e recuperação de animais submetidos ao estresse de restrição agudo (superior) e ao estresse de restrição repetido (ERR; 10ª sessão, inferior). A área sombreada indica o período de estresse de restrição. Os círculos e as barras representam a média ± EPM. @P<0,05 naquele ponto específico em comparação com o respectivo grupo controle. #P<0,05 em comparação com o respectivo grupo agudo. *P<0,05 em comparação com o respectivo grupo controle. ANOVA trifatorial seguida do pós-teste de Tukey.



6.1.2 Papel da neurotransmissão CRFérgica ao longo do eixo anteroposterior do CI no controle da resposta de queda da temperatura cutânea da cauda ao estresse de restrição agudo e repetido

A Figura 10 apresenta imagens representativas da TCC registradas antes da restrição, no último minuto da sessão de restrição e no último minuto do período de recuperação, tanto na sessão aguda quanto na 10ª sessão de estresse de restrição, em animais tratados com veículo.

Figura 10 – Imagens representativas de ratos ilustrando a temperatura cutânea da cauda (TCC) antes, durante e após o estresse de restrição agudo ou repetido (10ª sessão).

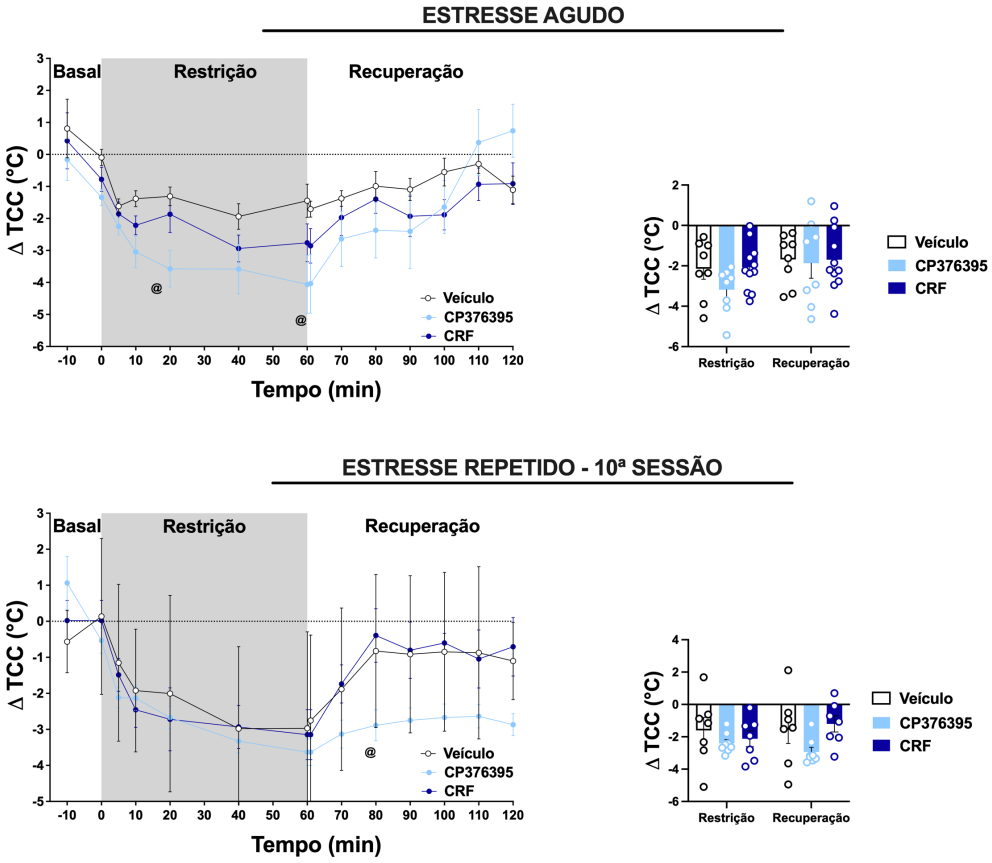


CIa – A análise das curvas temporais da resposta de queda da TCC indicou efeito do tempo ($F_{(12,516)}$=32,3474, P<0,0001), bem como interações tempo x estresse ($F_{(12,516)}$=2,7948, P=0,0010) e tempo x estresse x tratamento ($F_{(24,516)}$=3,4991, P<0,0001). No entanto, a análise não indicou efeito do tratamento ($F_{(2,43)}$=2,6944, P=0,0789) ou do estresse ($F_{(1,43)}$=0,2771, P=0,6013); ou interações tratamento x estresse ($F_{(2,43)}$=0,2937, P=0,7469) e tempo x tratamento ($F_{(24,516)}$=1,3739, P=0,1119). O pós-teste de Tukey indicou que animais tratados com CP376395 apresentaram queda mais acentuada da TCC aos 20 (P=0,0102) e 60 (P=0,0259) minutos do estresse de restrição agudo. Por

outro lado, animais tratados com CP376395 exibiram uma queda aumentada na TCC aos 20 minutos do período de recuperação da 10ª sessão de restrição (P<0,05) (Figura 11).

A análise da resposta média da TCC durante os períodos de restrição e recuperação indicou efeito do tratamento ($F_{(2,86)}$=3,3864, P=0,0384). A análise não indicou efeito do estresse ($F_{(1,86)}$=0,2065, P=0,6506) ou tempo ($F_{(1,86)}$=1,9996, P=0,1609); ou interações estresse x tempo ($F_{(1,86)}$=0,8908, P=0,3479), estresse x tratamento ($F_{(2,86)}$=0,2227, P=0,8008), tempo x tratamento ($F_{(2,86)}$=0,1430, P=0,8669) e estresse x tempo x tratamento ($F_{(2,86)}$=1,3561, P=0,2631) (Figura 11).

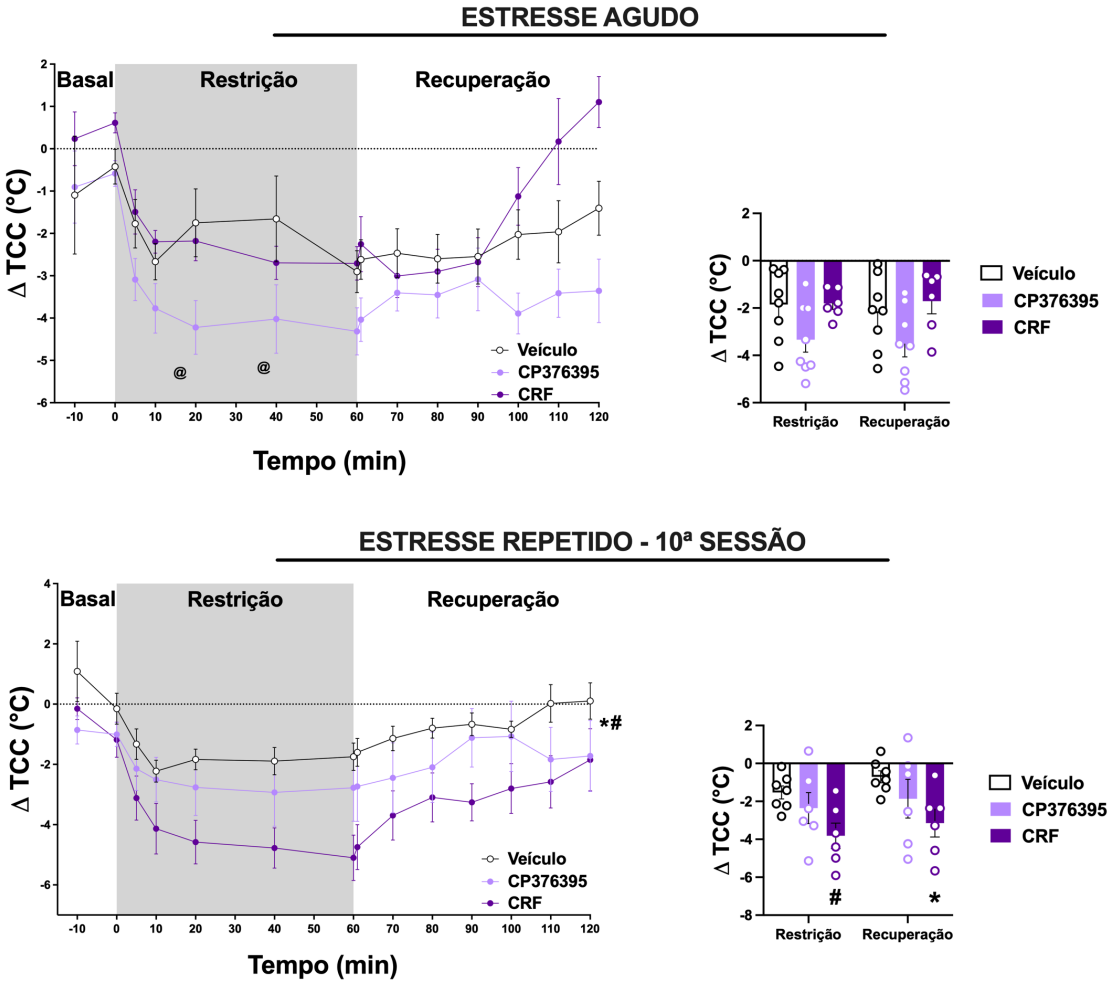
Figura 11 – Papel da neurotransmissão CRFérgica no córtex insular anterior (CIa) no controle da resposta de queda da temperatura cutânea da cauda (TCC) ao estresse de restrição agudo e repetido. Microinjeção bilateral de veículo (100 nL, branco), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF1, 5 nmol/100 nL, azul claro) ou CRF (0,07 nmol/100 nL, azul escuro) no CIa. Curvas temporais de variação da TCC (ΔTCC) e a média da ΔTCC durante os períodos de restrição e recuperação de animais submetidos ao estresse de restrição agudo (superior) e ao estresse de restrição repetido (ERR; 10ª sessão, inferior). A área sombreada indica o período de estresse de restrição. Os círculos e as barras representam a média ± EPM. @P<0,05 naquele ponto específico em comparação com o respectivo grupo controle. ANOVA trifatorial seguida do pós-teste de Tukey.



CIpr – A análise das curvas temporais da resposta de queda da TCC indicou efeitos do tempo ($F_{(12,420)}$=22,1988, P<0,0001), bem como interações tempo x estresse ($F_{(12,420)}$=2,8781, P=0,0007), tempo x tratamento ($F_{(24,420)}$=2,3216, P=0,0004) e estresse x tratamento ($F_{(2,35)}$=3,6000, P=0,0376). Nenhum efeito significativo foi indicado para estresse ($F_{(1,35)}$=0,2822, P=0,5986) ou tratamento ($F_{(2,35)}$=1,0926, P=0,3465); ou interação tempo x estresse x tratamento ($F_{(24,420)}$=1,3749, P=0,1130). O pós-teste de Tukey revelou que animais que receberam microinjeções de CP376395 no CIpr exibiram maior queda na TCC entre os minutos 20 e 40 durante o estresse agudo (P<0,05). O pós-teste também mostrou que animais tratados com CRF tiveram uma queda menor na TCC durante a 10ª sessão de restrição em comparação com o respectivo grupo agudo (P<0,05) e uma resposta de TCC maior do que o grupo veículo durante essa sessão (P<0,05) (Figura 12).

A análise da resposta média da TCC durante os períodos de restrição e recuperação indicou efeito do tratamento ($F_{(2,70)}$=5,0805, P=0,0087) e interação estresse x tratamento ($F_{(2,70)}$=7,2898, P=0,0013). A análise não revelou efeitos para estresse ($F_{(1,70)}$=0,2511, P=0,6178) ou tempo ($F_{(1,70)}$=0,5562, P=0,4582). Não foram identificadas interações entre estresse x tempo ($F_{(1,70)}$=1,4128, P=0,2386), tempo x tratamento ($F_{(2,70)}$=0,0365, P=0,9641) e estresse x tempo x tratamento ($F_{(2,70)}$=0,0818, P=0,9215). O pós-teste de Tukey indicou que animais tratados com CRF exibiram uma diminuição maior na TCC durante a 10ª sessão de restrição quando comparados ao respectivo grupo agudo (P<0,05). O pós-teste também revelou que animais tratados com CRF exibiram maior diminuição da TCC durante a recuperação da 10ª sessão (Figura 12).

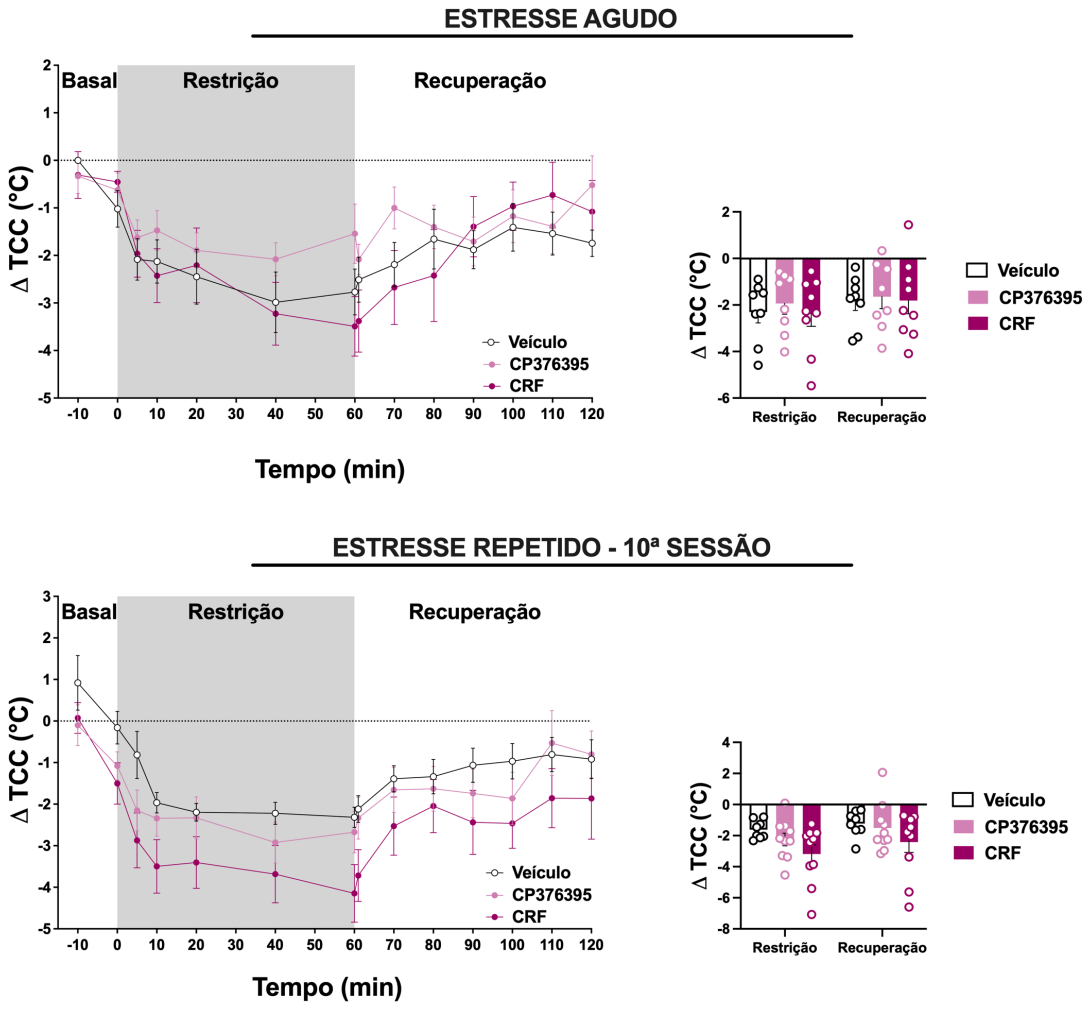
Figura 12 – Papel da neurotransmissão CRFérgica no córtex insular posterior-rostral (CIpr) no controle da resposta de queda da temperatura cutânea da cauda (TCC) ao estresse de restrição agudo e repetido. Microinjeção bilateral de veículo (100 nL, branco), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF1, 5 nmol/100 nL, lilás) ou CRF (0,07 nmol/100 nL, roxo) no CIpr. Curvas temporais de variação da TCC (ΔTCC) e a média da ΔTCC durante os períodos de restrição e recuperação de animais submetidos ao estresse de restrição agudo (superior) e ao estresse de restrição repetido (ERR, 10ª sessão, inferior). A área sombreada indica o período de estresse de restrição. Os círculos e as barras representam a média ± EPM. @P<0,05 naquele ponto específico em comparação com o respectivo grupo controle. #P<0,05 em comparação com o respectivo grupo agudo. *P<0,05 em comparação com o respectivo grupo controle. ANOVA trifatorial seguida do pós-teste de Tukey.



CIpc – A análise das curvas temporais da queda da TCC indicou efeito do tempo ($F_{(12,564)}$=23,1419, P<0,0001). Nenhum efeito significativo foi encontrado para estresse ($F_{(1,47)}$=0,2253, P=0,6372) ou tratamento ($F_{(2,47)}$=1,7044, P=0,1929). Nenhuma interação significativa foi identificada entre estresse x tratamento ($F_{(2,47)}$=1,1339, P=0,3304), tempo x estresse ($F_{(12,564)}$=0,8889, P=0,5581), tempo x tratamento ($F_{(24,564)}$=1,4495, P=0,0776) e tempo x estresse x tratamento ($F_{(24,564)}$=0,9379, P=0,5494) (Figura 13).

A análise da resposta média durante os períodos de restrição e recuperação não indicou efeito para estresse ($F_{(1,95)}$=0,0490, P=0,8252), tempo ($F_{(1,95)}$=3,7018, P=0,0573), ou tratamento ($F_{(1,95)}$=2,5264, P=0,0853). Não foram indicadas interações significativas entre estresse x tempo ($F_{(1,95)}$=0,0747, P=0,7852), estresse x tratamento ($F_{(2,95)}$=1,7383, P=0,1813), tempo x tratamento ($F_{(2,95)}$=0,0463, P=0,9548), estresse x tempo x tratamento ($F_{(2,95)}$=0,0942, P=0,9102) (Figura 13).

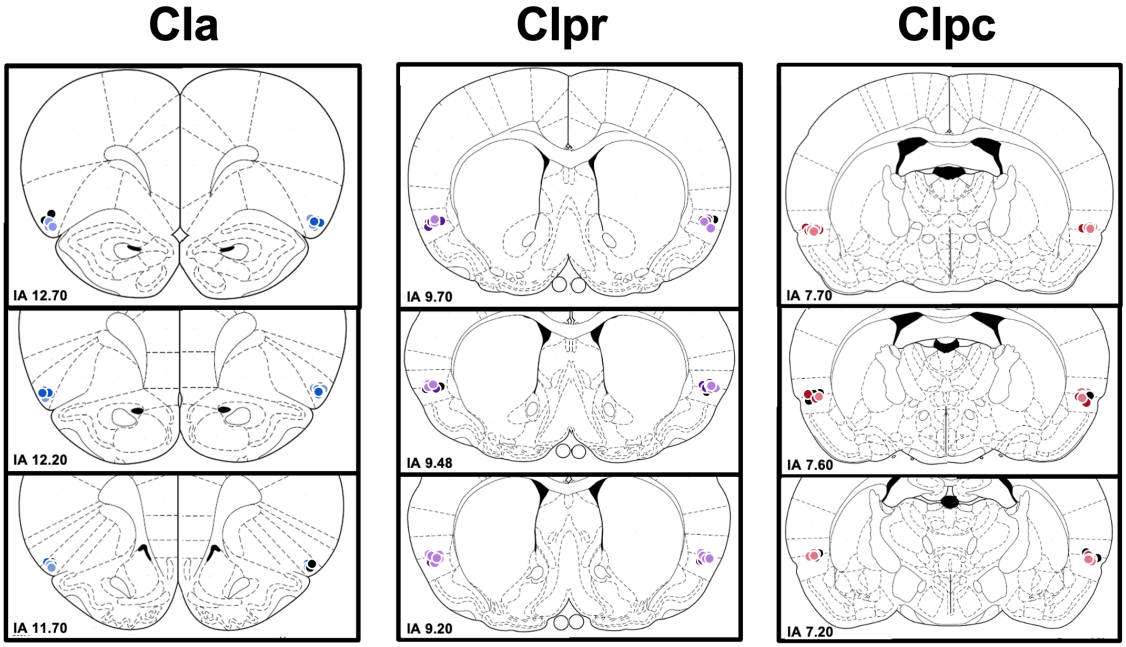
Figura 13 – Papel da neurotransmissão CRFérgica no córtex insular posterior-caudal (CIpc) no controle da resposta de queda da temperatura cutânea da cauda (TCC) ao estresse de restrição agudo e repetido. Microinjeção bilateral de veículo (100 nL, branco), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF_1, 5 nmol/100 nL, rosa claro) ou CRF (0,07 nmol/100 nL, magenta) no CIpc. Curvas temporais de variação da TCC (ΔTCC) e a média da ΔTCC durante os períodos de restrição e recuperação de animais submetidos ao estresse de restrição agudo (superior) e ao estresse de restrição repetido (ERR, 10ª sessão, inferior). A área sombreada indica o período de estresse de restrição. Os círculos e as barras representam a média ± EPM.



6.2 PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO CRFÉRGICA AO LONGO DO EIXO ANTEROPOSTERIOR DO CI NO CONTROLE DA RESPOSTA DO TIPO-ANSIOGÊNICA AO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO AGUDO

A Figura 14 apresenta representações diagramáticas baseadas no Atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção ao longo do eixo rostrocaudal do CI de todos os animais usados nesse protocolo. Os sítios de injeção são diferenciados pelo tratamento (veículo, CP376395 ou CRF) nas sub-regiões CIa, CIpr ou CIpc.

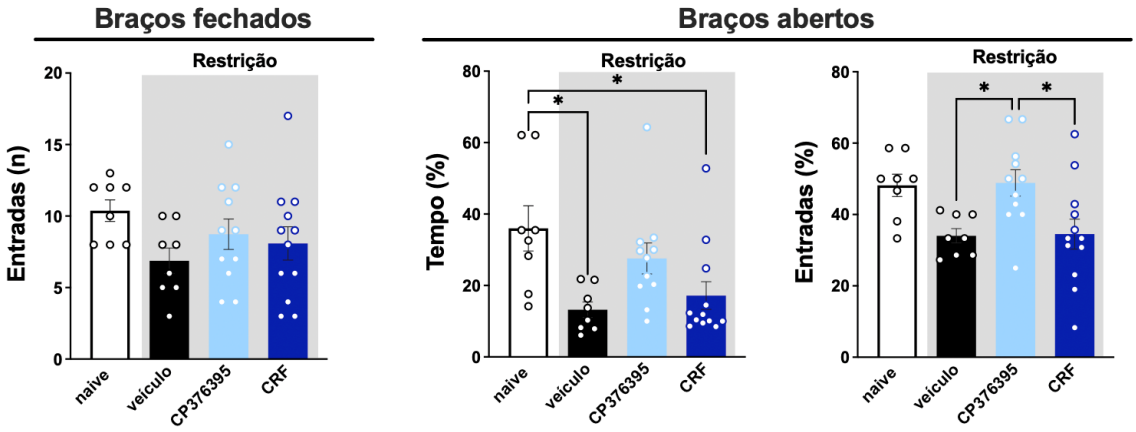
Figura 14 – Locais de microinjeção ao longo do eixo rostrocaudal do córtex insular (CI) em animais utilizados para avaliação do papel da neurotransmissão CRFérgica ao longo do eixo anteroposterior do CI no controle da resposta tipo-ansiogênica ao estresse de restrição agudo. Representação diagramática baseada no atlas cerebral de ratos de Paxinos e Watson (1997) indicando os locais de microinjeção no CIa, CIpr e CIpc de veículo (CIa, CIpr e CIpc: círculos pretos), CP376395 (CIa: círculos azuis claros; CIpr: círculos lilás; CIpc: círculos rosa claros) ou CRF (CIa: círculos azuis escuros; CIpr: círculos roxos; CIpc: círculos rosa escuros).



CIa – A análise do número de entradas nos braços fechados do LCE não revelou diferença significativa entre os grupos ($F_{(3,35)}$=1,594; P=0,2083). A análise indicou diferenças significativas entre os grupos quanto às porcentagens de tempo ($F_{(3,35)}$=4,878; P=0,0061) e de número de entradas ($F_{(3,35)}$=5,001; P=0,0054) nos braços abertos. O pós-teste de Tukey mostrou que o estresse de restrição reduziu a porcentagem de tempo (P=0,0108), mas não a porcentagem de entradas (P=0,0845) nos braços abertos em animais que

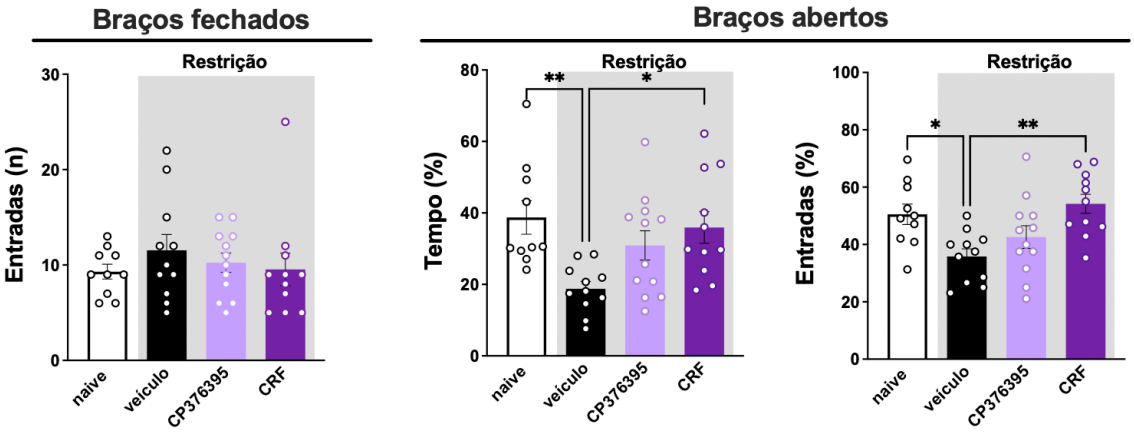
receberam microinjeção de veículo no CIa, em comparação com o grupo *naive*. Animais tratados com CP376395 (antagonista seletivo de receptores CRF_1) apresentaram maior porcentagem de entradas nos braços abertos em comparação com o grupo veículo (P=0,0418) e com o grupo CRF (P=0,0249) (Figura 15).

Figura 15 – Papel da neurotransmissão CRFérgica no córtex insular anterior (CIa) no controle da resposta tipo-ansiogênica ao estresse de restrição agudo. Microinjeção bilateral de veículo (100 nL, n=8, barras pretas), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF_1, 5 nmol/100 nL, n=11, barras azuis claras) ou CRF (0,07 nmol/100 nL, n=12, barras azuis escuras) no CIa. Os animais que não foram expostos ao estresse de restrição (*naive*, n=8, barras brancas) foram usados como controle para os efeitos do estresse agudo de restrição. As colunas representam a média ± EPM. *P<0,05. ANOVA monofatorial seguida do pós-teste de Tukey.



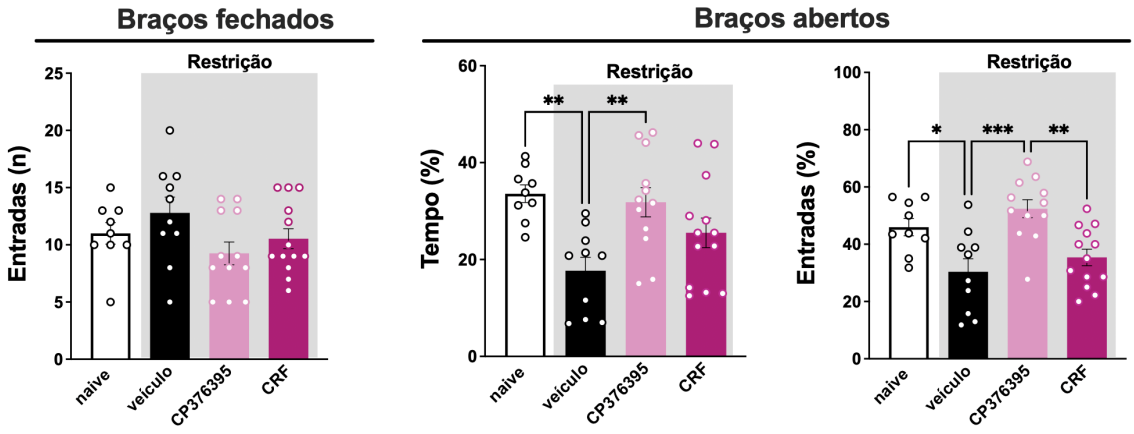
CIpr – A análise do número de entradas nos braços fechados do LCE não indicou diferença entre os grupos experimentais ($F_{(3,40)}$=0,5391; P=0,6583). A análise das porcentagens de tempo ($F_{(3,40)}$=4,911; P=0,0053) e de entradas ($F_{(3,40)}$=5,662; P=0,0025) nos braços abertos indicou diferença significativa entre os grupos experimentais. O pós-teste de Tukey revelou que uma sessão aguda de estresse de restrição diminuiu tanto o tempo (P=0,0061) quanto as entradas (P=0,0262) nos braços abertos do LCE de animais tratados com veículo no CIpr em comparação com o grupo *naive*. Além disso, a microinjeção de CRF aumentou as porcentagens de tempo (P=0,0186) e de entradas (P=0,0028) nos braços abertos em relação ao grupo veículo (Figura 16).

Figura 16 – Papel da neurotransmissão CRFérgica no córtex insular posterior-rostral (CIpr) no controle da resposta tipo-ansiogênica ao estresse de restrição agudo. Microinjeção bilateral de veículo (100 nL, n=11, barras pretas), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF_1, 5 nmol/100 nL, n=12, barras lilás) ou CRF (0,07 nmol/100 nL, n=11, barras roxas) no CIpr. Os animais que não foram expostos ao estresse de restrição (*naive*, n=10, barras brancas) foram usados como controle para os efeitos do estresse agudo de restrição. As colunas representam a média ± EPM. *P<0,05. ANOVA monofatorial seguida do pós-teste de Tukey.



CIpc – A análise do número de entradas nos braços fechados do LCE não indicou diferença entre os grupos experimentais ($F_{(3,40)}$=1,934; P=0,1396). A análise indicou diferenças entre os grupos experimentais nas porcentagens de tempo ($F_{(3,40)}$=5,807; P=0,0022) e de número de entradas ($F_{(3,40)}$=8,640; P<0,001) nos braços abertos. O pós-teste revelou que o estresse de restrição diminuiu tanto o tempo (P=0,0040) quanto o número de entradas (P=0,0232) nos braços abertos em animais que receberam veículo no CIpc, em comparação com o grupo *naive*. Além disso, animais tratados com CP376395 apresentaram maior porcentagens de tempo (P=0,0065) e de número de entradas (P<0,001) nos braços abertos em comparação com o grupo veículo, além de um número maior de entradas (P=0,0029) em relação ao grupo que recebeu CRF (Figura 17).

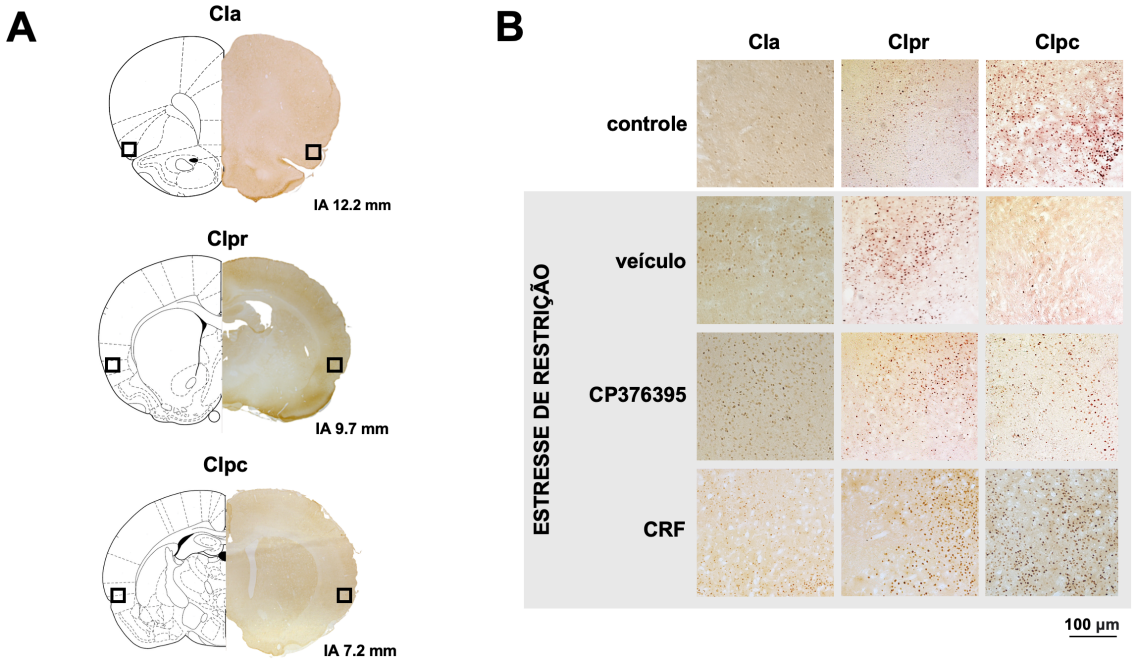
Figura 17 – Papel da neurotransmissão CRFérgica no córtex insular posterior-caudal (CIpc) no controle da resposta tipo-ansiogênica ao estresse de restrição agudo. Microinjeção bilateral de veículo (100 nL, n=10, barras pretas), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF_1, 5 nmol/100 nL, n=12, barras rosas) ou CRF (0,07 nmol/100 nL, n=13, barras magentas) no CIpc. Os animais que não foram expostos ao estresse de restrição (*naive*, n=9, barras brancas) foram usados como controle para os efeitos do estresse agudo de restrição. As colunas representam a média ± EPM. *P<0,05. ANOVA monofatorial seguida do pós-teste de Tukey.



6.3 PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO CRFÉRGICA AO LONGO DO EIXO ANTEROPOSTERIOR DO CI NA ALTERAÇÃO DA ATIVAÇÃO NEURONAL INDUZIDA PELO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO AGUDO

A Figura 18 apresenta seções coronais esquemáticas baseadas em Paxinos & Watson (1997) e fotomicrografias representativas ilustrando os locais nas sub-regiões anterior, posterior-rostral e posterior-caudal do CI selecionadas para a quantificação de células Fos-positivas. A figura também mostra imagens representativas da marcação de Fos em cada sub-região do CI de animais não foram submetidos ao estresse (grupo controle, tratado com veículo) e de animais submetidos a 60 minutos de estresse por restrição que receberam microinjeção de veículo (grupo veículo), de CP376395 (antagonista de receptor CRF_1, grupo CP376395) ou de CRF (grupo CRF).

Figura 18 – Alteração da ativação neuronal ao longo do eixo anteroposterior do córtex insular (CI) induzida pelo estresse de restrição agudo. **(A)** Seções coronais esquemáticas e representativas das sub-regiões anterior (CIa), posterior-rostral (CIpr) e posterior-caudal (CIpc) do CI, mostrando as áreas analisadas para quantificação de células Fos-positivas. As seções coronais esquemáticas foram adaptadas de Paxinos e Watson (1997). **(B)** Seções coronais representativas mostrando células Fos-positivas no CIa, CIpr e CIpc de animais que não foram submetidos ao estresse que receberam microinjeção bilateral de veículo (100 nL, grupo controle) e de animais submetidos ao estresse de restrição que receberam microinjeção bilateral de veículo (100 nL, grupo veículo), CP376395 (antagonista de receptor CRF_1, 5 nmol/100 nL, grupo CP376395) ou de CRF (0,07 nmol/100 nL, grupo CRF).



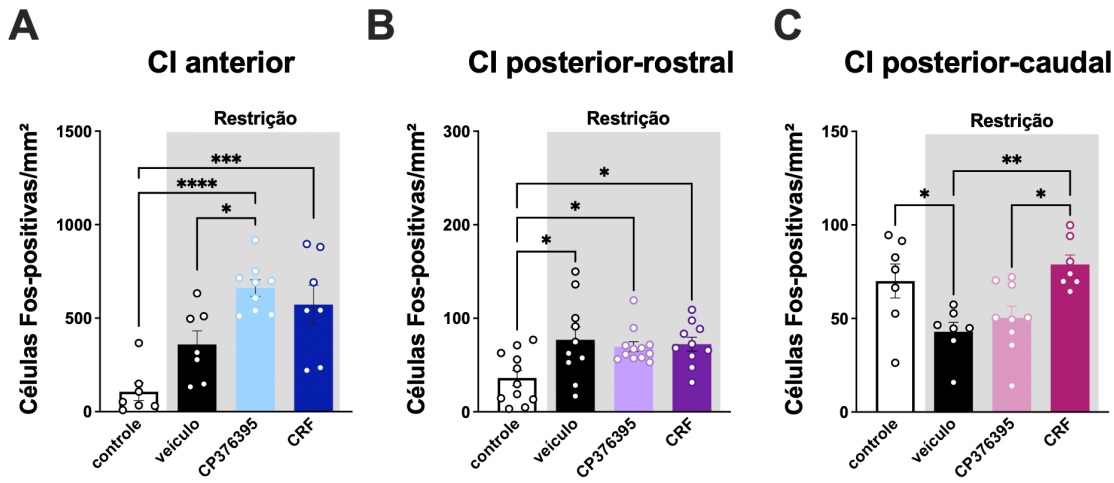
CIa – A análise do número de neurônios positivos para a proteína Fos no CIa indicou diferença significativa entre os grupos ($F_{(3,26)}$= 13,26 P<0,0001). O pós-teste de Tukey mostrou que a exposição a uma sessão de estresse de restrição causou uma tendência de aumento no número de células expressando a proteína Fos (P=0,0786). As microinjeções bilaterais de CP376395 (P<0,0001) ou CRF (P<0,001) aumentaram significativamente a expressão de Fos em comparação ao grupo controle. Além disso, a administração de CP376395 aumentou a expressão de Fos em relação ao grupo veículo (P=0,0173) (Figura 19).

CIpr – A análise do número de neurônios Fos-positivos no CIpr revelou diferença significativa entre os grupos ($F_{(3,39)}$=4,470, P=0,008). O pós-teste de Tukey mostrou que a exposição a uma sessão de estresse de restrição aumentou o

número de células positivas para a proteína Fos nos animais tratados com veículo (P=0,0131), CP376395 (P=0,0419) ou CRF (P=0,0329) (Figura 19).

CIpc – A análise do número de neurônios positivos para a proteína Fos no CIpc indicou diferença significativa entre os grupos ($F_{(3,26)}$=6,268, P=0,0024). O pós-teste revelou que a exposição a uma sessão de estresse de restrição reduziu o número de células Fos-positivas (P=0,0421). A microinjeção bilateral de CRF inibiu o efeito causado pelo estresse de restrição (P=0,0047). O pós-teste também indicou diferença significativa entre os grupos CP376395 e CRF (P=0,0201) (Figura 19).

Figura 19 – Papel da neurotransmissão CRFérgica ao longo do eixo anteroposterior do córtex insular (CI) na alteração da ativação neuronal induzida pelo estresse de restrição agudo. Número de neurônios positivos para a proteína Fos em animais não estressados e tratados com veículo (grupo controle) e animais submetidos à sessão aguda de estresse de restrição e tratados com veículo (100 nL, grupo veículo), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF_1, 5 nmol/100 nL, grupo CP376395) ou CRF (0,07 nmol/100 nL, grupo CRF). **(A)** Valores do CI anterior dos grupos controle (barra branca, n=7), veículo (barra preta, n=7), CP376395 (barra azul claro, n=9) e CRF (barra azul escuro, n=7); **(B)** Valores do CI posterior-rostral dos grupos controle (barra branca, n=11), veículo (barra preta, n=10), CP376395 (barra lilás, n=12) e CRF (barra roxa, n=10); **(C)** Valores do grupo CI posterior-caudal dos grupos controle (barra branca, n=7), veículo (barra preta, n=7), CP376395 (barra rosa, n=9) e CRF (barra magenta, n=7). As barras representam a média ±EPM. * P<0,05, ANOVA monofatorial seguida pelo pós-teste de Tukey.



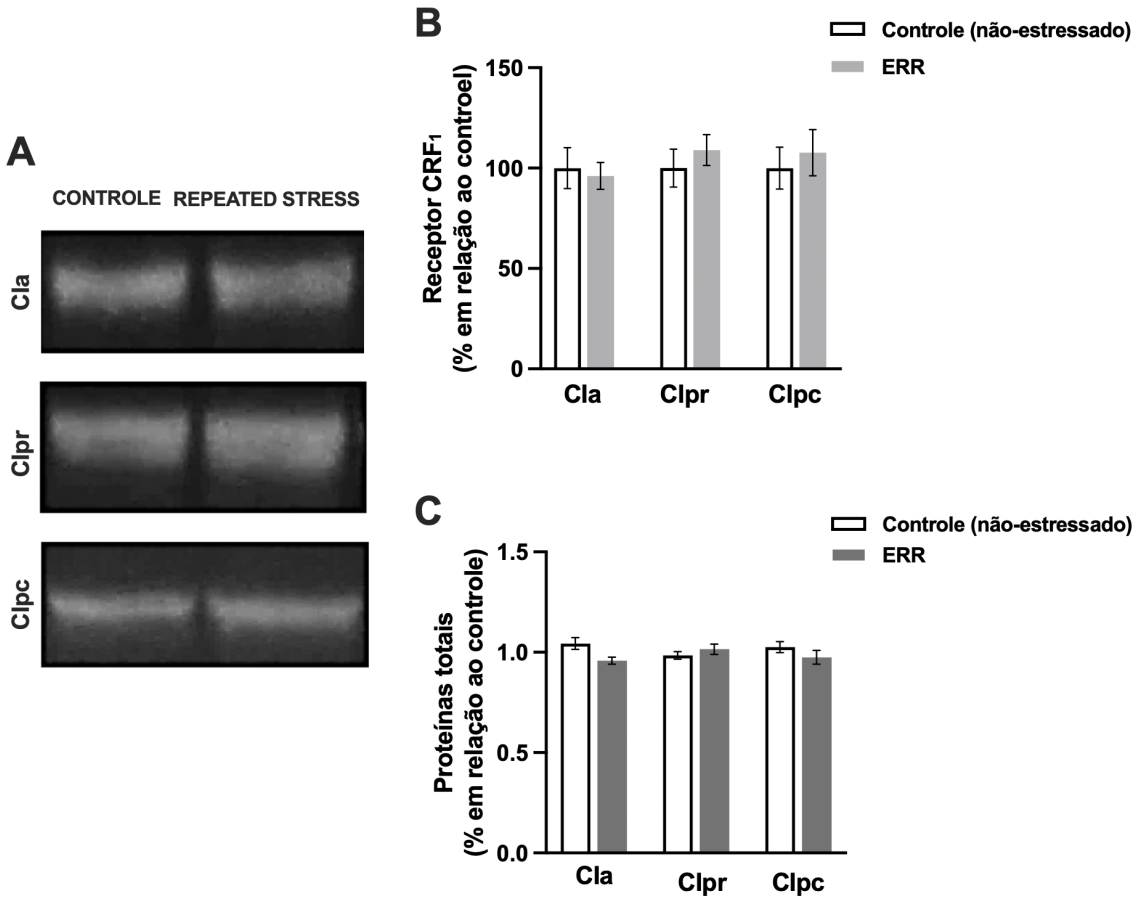
6.4 EFEITO DA EXPOSIÇÃO REPETIDA AO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO SOBRE OS NÍVEIS PROTEICOS DO RECEPTOR CRF_1 AO LONGO DO EIXO ANTEROPOSTERIOR DO CI

Os dados apresentados nessa seção foram publicados integralmente no periódico *Autonomic Neuroscience* (ver Anexo A).

A exposição a 10 sessões de estresse de restrição não alterou os níveis proteicos do receptor CRF_1 no CIa, CIpr ou CIpc. A análise do percentual de expressão do receptor CRF_1 não indicou efeito do estresse ($F_{(1,48)}$=0,3040, P=0,5839), da região do CI ($F_{(2,48)}$= 0,2788, P=0,7579) ou interação entre estresse x região do CI ($F_{(2,48)}$=0,2788, P=0,7579) (Figura 20).

De forma semelhante, os níveis de proteína total no CIa, CIpr e CIpc não foram afetados pelo ERR. A análise indicou ausência de efeito do estresse ($F_{(1,48)}$=2,595, P=0,1138), da região do CI ($F_{(2,\ 48)}$=1,18 × 10^{-11}, P>0,999) ou interação entre estresse x região do CI ($F_{(2,\ 48)}$=2,533, P=0,0900) (Figura 20).

Figura 20 – Efeito da exposição repetida ao estresse de restrição sobre os níveis proteicos do receptor CRF_1 ao longo do eixo anteroposterior do córtex insular (CI). **(A)** Imagens representativas de *Western Blotting* ilustrando a marcação do receptor CRF_1 no CI anterior (CIa), CI posterior-rostral (CIpr) e CI posterior-caudal (CIpc) de animais controle (não estressados) e submetidos ao estresse de restrição repetido (ERR). **(B)** Expressão do receptor CRF_1 no CIa, CIpr e CIpc de animais controle (n=9) e submetidos ao ERR (n=9). **(C)** Conteúdo proteico total no CIa, CIpr e CIpc de animais controle (n=9) e submetidos ao ERR (n=9). As barras representam a média ± erro padrão da média (EPM). ANOVA bifatorial.



7 DISCUSSÃO

Os dados apresentados neste estudo fornecem a primeira evidência de que a neurotransmissão CRFérgica no CI modula as respostas cardiovasculares, comportamentais e a atividade neuronal local frente a estímulos aversivos. Os resultados também indicam que a regulação das respostas cardiovasculares ao estresse é moldada pela exposição repetida ao estresse. Além disso, os achados demonstram que a modulação das respostas ao estresse mediada pela neurotransmissão CRFérgica ocorre de maneira sítio-específica ao longo do eixo rostrocaudal do CI. Por fim, observamos que a exposição repetida ao estresse de restrição não altera os níveis proteicos do receptor CRF_1 nas diferentes sub-regiões do CI. A Tabela 3 apresenta um sumário dos principais resultados obtidos.

Tabela 3 – Sumário dos resultados. Efeitos dos tratamentos farmacológicos com veículo (100 nL), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF_1, 5 nmol/100 nL) ou CRF (0,07 nmol/100 nL) no córtex insular (CI) anterior (CIa), posterior-rostral (CIpr) e posterior-caudal (CIpc) nas respostas cardiovasculares (resposta pressora e taquicárdica) e autonômica [redução da temperatura cutânea da cauda (TCC)] ao estresse de restrição agudo ou repetido (ERR), na resposta comportamental do tipo-ansiogênica [redução da exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE)] ao estresse agudo, na ativação neuronal local em resposta ao estresse agudo, além da análise do efeito da exposição ao ERR sobre os níveis proteicos do receptor CRF_1 e das proteínas totais ao longo do eixo anteroposterior do CI.
↓, diminuição/reversão do efeito; ↑, aumento do efeito; =, sem efeito significativo;
Em parênteses é apresentado o fármaco que causou o efeito.

	CIa	**CIpr**	**CIpc**
Respostas cardiovasculares e autonômicas			
Estresse de restrição agudo			
Resposta pressora	↓(CRF)	↓(CP376395)	↓(CP376395)
Resposta taquicárdica	↓(CP376395, CRF)	=	↓(CP376395)
Redução da TCC	↑ (CP376395)	↑(CP376395)	=
ERR			
Resposta pressora	=	↓(CRF)	=
Resposta taquicárdica	↓(CP376395)	=	↑(CRF)
Redução da TCC	↑(CP376395)	↑(CRF)	=
Resposta comportamental			
Redução da exploração dos braços abertos do LCE	↓(CP376395)	↓(CRF)	↓(CP376395)
Número de neurônios Fos-positivos			
Efeito do estresse de restrição	↑	↑	↓
Efeito do tratamento farmacológico	↑ (CP376395)	=	↑(CRF)
Níveis proteicos			
Receptor CRF_1	=	=	=
Proteínas totais	=	=	=

Fonte: Elaborada pela autora, 2026.

O estresse de restrição é um modelo experimental amplamente utilizado para investigar os efeitos do estresse em roedores (Bali; Jaggi, 2015; Buynitsky; Mostofsky, 2009). Esse paradigma desencadeia respostas fisiológicas reprodutíveis entre diferentes laboratórios, incluindo taquicardia, aumento da PA, vasoconstrição cutânea mediada pelo sistema nervoso simpático e modulação da atividade barorreflexa (Benini *et al.*, 2025b, 2025a; Crestani, 2016; Dos Reis *et al.*, 2014). Além disso, a restrição promove ativação do eixo HPA, resultando em elevação dos níveis circulantes de corticosterona (Bali; Jaggi, 2015;

Buynitsky; Mostofsky, 2009). Quando aplicado de forma repetida, esse protocolo pode induzir alterações cardiovasculares sustentadas, disfunção autonômica e comportamentos do tipo-ansioso e depressivo (Benini *et al.*, 2025b, 2025a; Duarte; Planeta; Crestani, 2023; Vieira *et al.*, 2018), consolidando este modelo como uma ferramenta experimental relevante para o estudo dos mecanismos neurobiológicos do estresse agudo e crônico.

A neurotransmissão CRFérgica constitui um mecanismo-chave relacionado às respostas fisiológicas ao estresse (Chudoba; Dabrowska, 2023; Deussing; Chen, 2018; Vasconcelos *et al.*, 2020). Estudos anteriores identificaram que a administração i.c.v. de antagonistas não seletivos de receptores CRFérgicos reduziu as respostas cardiovasculares a diferentes estressores (Morimoto *et al.*, 1993; Nakamori; Morimoto; Murakami, 1993; Nijsen *et al.*, 2000). No entanto, os sítios cerebrais específicos responsáveis por esses efeitos ainda não são totalmente compreendidos. Evidências prévias implicaram diversas regiões, como o núcleo motor dorsal do vago, onde a neurotransmissão CRFérgica modula a função cardiovascular e a ativação parassimpática (Stiedl, 2005); CeA, onde contribui para a hipertensão induzida por estresse crônico (Sheng *et al.*, 2021); o HL, onde medeia a resposta taquicárdica (Barretto-de-Souza *et al.*, 2021, 2022); e o NLET, onde promove respostas pressora e taquicárdica ao estresse de restrição (Oliveira *et al.*, 2015).

De forma semelhante, estudos também demonstraram o envolvimento da neurotransmissão CRFérgica na regulação de respostas comportamentais ao estresse. A administração do antagonista CRFérgico não seletivo α-helical CRF (9-41) na CeA (Heinrichs *et al.*, 1992) ou na PAGd (Martins; Marras; Guimarães, 2000) reduziu comportamentos do tipo-ansiogênico após estresse de derrota social e estresse de restrição, respectivamente. Já o bloqueio do receptor CRF_1 no HL aboliu o efeito ansiogênico evocado pela restrição (Barretto-de-Souza *et al.*, 2022). Nesse contexto, nossos resultados ampliam esse conhecimento ao demonstrar que o CI também participa da regulação das respostas cardiovasculares e comportamentais ao estresse por meio da neurotransmissão CRFérgica.

No presente estudo, observamos que o antagonismo do receptor CRF_1 no CIa, via microinjeção local de CP376395, reduziu a taquicardia e potencializou a queda da TCC durante o estresse agudo. Alves e colaboradores (2010)

observaram que a inibição sináptica não seletiva nessa sub-região reduziu os aumentos de PAM e FC provocados pelo estresse de restrição, sugerindo que o CIa exerce controle sobre essas respostas. Nesse sentido, nossos dados indicam que esse controle envolve, ao menos em parte, a ativação de receptores CRF_1 locais. No entanto, resultados divergentes foram reportados por Tomeo e colaboradores (2022), que não identificaram efeitos da inibição sináptica no CIa no controle das respostas cardiovasculares ou autonômicas ao estresse. Além disso, o antagonismo de receptores glutamatérgicos no CIa aumentou as respostas pressora e taquicárdica evocadas pela restrição (Goulart *et al.*, 2022), um efeito oposto em relação à inibição sináptica não seletiva (Alves; Crestani; Corrêa, 2010). Portanto, a modulação da taquicardia pelo receptor CRF_1 parece estar associada à modulação inibitória de neurônios piramidais locais. A influência do receptor CRF_1 em aumentar a resposta de queda da TCC também parece envolver o recrutamento de circuitos inibitórios locais no CIa. Essa hipótese é sustentada por Goulart e colaboradores (2022), que observaram a diminuição da queda da TCC após o antagonismo de receptores glutamatérgicos no CIa (Goulart *et al.*, 2022).

A diminuição da resposta taquicárdica e o aumento da resposta vasoconstritora induzidos pelo antagonista de CRF1 no CIa foram acompanhados por uma potencialização da ativação neuronal local evocada pelo estressor, evidenciado pelo aumento da expressão da proteína Fos. Esse resultado sugere que a sinalização CRFérgica no CIa exerce um efeito inibitório sobre subpopulações neuronais recrutadas pelo estresse, possivelmente por meio de interneurônios locais. Portanto, a ativação fisiológica do receptor CRF_1 no CIa durante o estresse parece ser necessária tanto para a expressão da resposta de taquicardia quanto para limitar a ativação simpática vasomotora periférica.

Ainda no CIa, o antagonismo do receptor CRF_1 no CIa não afetou a resposta pressora evocada pela restrição, enquanto a microinjeção de CRF exógeno reduziu esse parâmetro. Esses achados indicam que, embora os mecanismos endógenos de liberação de CRF no CIa não sejam naturalmente recrutados para controlar a resposta da PA durante esse modelo de estresse, a sua ativação farmacológica é suficiente para modular esse efeito. Esse efeito inibitório da microinjeção de CRF é consistente com evidências anteriores que

demonstraram um papel inibitório da neurotransmissão glutamatérgica local no CIa sobre as alterações cardiovasculares da restrição (Goulart *et al.*, 2022). Portanto, os mecanismos locais recrutados para modular a resposta pressora parecem ser distintos daqueles que medeiam o controle CRFérgico endógeno sobre as respostas de FC e TCC, e estão provavelmente relacionados a vias neuronais de natureza excitatória.

O presente estudo também demonstrou que a administração de CP376395 no CIpr atenuou a resposta pressora e aumentou a queda da TCC durante o estresse agudo. Em um trabalho prévio do nosso grupo, identificamos que a inibição sináptica não seletiva do CIpr reduziu a resposta pressora, sem afetar a taquicardia e a queda da TCC evocadas pela restrição (Tomeo *et al.*, 2022). Além disso, outro estudo recente revelou que o controle da resposta pressora evocada pela restrição, mediado pelo CIpr, não é dependente de mecanismos glutamatérgicos ou GABAérgicos (Santos *et al.*, 2025). Sob essa ótica, os dados obtidos no presente estudo fornecem a primeira evidência do mecanismo neuroquímico subjacente ao controle do efeito pressor evocado pela restrição pelo CIpr, indicando um papel para o receptor CRF_1 local. Esse envolvimento na regulação da resposta pressora é corroborado por dados obtidos em animais não estressados, os quais indicam que a ativação do CIpr está relacionada à ativação simpática e à geração de efeitos pressores (Marins *et al.*, 2016, 2021; Tomeo *et al.*, 2022; Verberne; Owens, 1998).

No que diz respeito à vasoconstrição cutânea mediada pelo sistema simpático, estudos anteriores relataram que a inibição sináptica não seletiva do CIpr não produziu efeito (Tomeo *et al.*, 2022), provavelmente devido às influências opostas simultâneas de mecanismos glutamatérgicos (facilitadores) e GABAérgicos (inibitórios) locais (Santos *et al.*, 2025). Nesse sentido, nossos achados, que revelam um papel inibitório dos receptores CRF_1 no CIpr na queda da TCC, são consistentes com a modulação GABAérgica local dessa resposta descrita anteriormente (Santos et al., 2025). Mecanisticamente, já foi demonstrado que a ativação do receptor CRF_1 despolarizou neurônios piramidais e suprimiu a neurotransmissão GABAérgica pré-sináptica na porção posterior do CI (Rieger et al., 2022). Portanto, um possível recrutamento de vias de inibição local mediado pelo receptor CRF_1 na modulação da TCC pode envolver a ativação de interneurônios locais que, em última instância, suprimem

os neurônios piramidais do CI responsáveis por projetar informações para os centros simpatoexcitatórios do hipotálamo e do tronco encefálico.

Ao analisarmos a porção CIpc, os resultados obtidos no presente estudo indicam que a neurotransmissão CRFérgica, atuando via ativação de receptor CRF_1, é um mecanismo neuroquímico envolvido tanto no controle da resposta pressora quanto na resposta taquicárdica ao estresse de restrição. Este resultado apresenta divergências em relação a achados anteriores que mostraram que o CIpc regula especificamente a taquicardia ao estresse, mas sem afetar a PA (Tomeo *et al.*, 2022). Outro estudo indicou que o controle da taquicardia evocada pela restrição também é mediado pela neurotransmissão GABAérgica no CIpc (Santos *et al.*, 2025). Nesse contexto de sobreposição, nosso estudo fornece novas evidências de que a neurotransmissão CRFérgica local também está envolvida neste mesmo controle.

Como discutido anteriormente, a ativação do receptor CRF_1 suprime a neurotransmissão GABAérgica pré-sináptica no CIp (Rieger *et al.*, 2022), de modo que o controle da taquicardia evocada pela restrição, seja por via CRF ou por GABA no CIpc, parece envolver mecanismos neuronais locais independentes ou em vias distintas. Nossos dados constituem a primeira evidência de que o CIpc está envolvido na expressão da resposta de PA ao estresse. A ausência de alterações no efeito pressor observada anteriormente após inibição sináptica não seletiva do CIpc (Tomeo *et al.*, 2022) pode refletir a existência de mecanismos opostos (contrarregulatórios) ao controle mediado por CRF_1 nesta sub-região. Entretanto, este mecanismo contrarregulatório parece não ser impulsionado por vias glutamatérgicas ou GABAérgicas locais (Santos *et al.*, 2025). Nosso resultado ganha suporte em evidências anteriores obtidas em ratos não estressados, que indicaram que a estimulação de regiões caudais do CIp provocou bradicardia, enquanto taquicardia foi observada em regiões rostrais do CIp, sendo ambas respostas mediadas pela atividade simpática (Oppenheimer; Cechetto, 1990). Adicionalmente, animais com lesão total do CIp (incluindo porções caudais) apresentaram um aumento tônico da PAM, sugerindo que o CIp possui um papel contínuo de inibição tônica sobre a atividade simpática reguladora da função cardiovascular (Butcher; Cechetto, 1995).

Do ponto de vista da adaptação crônica, a exposição repetida a um estressor homotípico normalmente induz a redução progressiva da ativação do eixo HPA e do sistema simpato-adrenal, um processo conhecido como habituação (McCarty, 2016). Acredita-se que este fenômeno envolva mudanças de neuroplasticidade em regiões cerebrais responsáveis por regular as respostas ao estresse (Chagra *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 1995), modulando o grau de reatividade ao estresse. Nossos dados revelam que a exposição repetida ao ERR altera o controle CRFérgico das respostas cardiovasculares no CIpr e no CIpc, mas não no CIa. A constatação de que o antagonismo do receptor CRF_1 falhou em alterar as respostas nessas sub-regiões do CIp em animais cronicamente estressados indica que, sob condições de ERR, a sinalização CRFérgica endógena deixa de ser recrutada. Apesar disso, os efeitos provocados pela microinjeção de CRF na resposta de FC no CIpc indicam que os receptores e a maquinaria intracelular envolvida nesse controle (observado nos animais agudamente estressados) permanecem funcionalmente intactos. Em contraste, os efeitos observados após agonismo (ativação) do receptor CRF_1 no CIpr sugerem uma completa inversão de papel, adotando uma função oposta à observada durante o estresse agudo. A neuroplasticidade induzida pelo ERR não se limita ao "desligamento" de vias, mas envolve uma complexa modulação funcional da população neuronal que expressa receptores CRF_1, particularmente no CIpr.

Nossos resultados também indicaram que os tratamentos farmacológicos no CIa e no CIpr alteraram as respostas cardiovasculares e autonômicas ao estresse de restrição de forma temporalmente restrita. No CIa, a microinjeção de CRF atenuou a resposta pressora nos primeiros seis minutos e a taquicardia aos 2, 4, 10, 14 e 16 minutos do estresse agudo, enquanto o CP376395 reduziu a taquicardia aos 4 e 6 minutos; no estresse repetido, apenas o CP376395 reduziu a taquicardia, nos minutos 2 e 4. No CIpr, o tratamento com CRF aumentou a resposta de FC em animais submetidos ao estresse agudo. Em relação à resposta vasoconstritora cutânea, o bloqueio do receptor CRF_1 com CP376395 no CIa acentuou a queda da TCC aos 20 e 60 minutos do estresse agudo e aos 20 minutos do período de recuperação da 10ª sessão; no CIpr, o CP376395 também intensificou a queda da TCC entre os minutos 20 e 40 do estresse agudo. Contudo, em nenhuma das sub-regiões os tratamentos foram capazes

de modificar as respostas cardiovasculares e autonômicas médias ao longo de toda a sessão de restrição ou recuperação. Esse padrão é consistente com a ideia de que a resposta cardiovascular ao estresse de restrição não é um fenômeno unitário, mas resulta da integração temporal de mecanismos autonômicos distintos: a fase inicial, caracterizada por um pico abrupto de PA e FC, é predominantemente mediada por descarga simpática vasoconstritora periférica (o componente simpatovascular), enquanto a manutenção da resposta ao longo dos 60 minutos depende, em maior grau, da ativação do eixo simpato-adrenal, com liberação de adrenalina pela medula adrenal, e da modulação exercida por estruturas como o córtex pré-frontal medial e o núcleo paraventricular do hipotálamo (Busnardo *et al.*, 2024; Dos Reis *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2021; Vavřínová *et al.*, 2024). Assim, tratamentos que interferem predominantemente com o componente simpatovascular rápido tendem a atenuar o pico inicial sem afetar a fase sustentada, que passa a ser mantida por mecanismos paralelos – como o eixo simpato-adrenal e outros sistemas moduladores centrais – que independem da sinalização CRFérgica no CI (REIS et al., 2014; BRASIL et al., 2017). Dessa forma, os presentes resultados sugerem que a neurotransmissão CRFérgica no CIa e no CIpr participa do recrutamento precoce das respostas autonômicas ao estresse, sem exercer papel determinante sobre os mecanismos responsáveis por sua sustentação.

Para avaliar os impactos emocionais dessas vias, utilizamos o LCE, um teste amplamente empregado e validado para avaliar respostas do tipo-ansiogênicas em roedores após a exposição a estímulos estressantes, como o estresse de restrição (Bali; Jaggi, 2015; Buynitsky; Mostofsky, 2009; Campos *et al.*, 2013). O princípio biológico deste aparato baseia-se no conflito entre o medo e a curiosidade: há uma preferência inata dos roedores por espaços fechados e seguros (impulsionada pela tigmotaxia, a necessidade do contato das vibrissas com paredes) versus a necessidade de explorar a novidade nos braços abertos (Pellow S *et al.*, 1985). Após a exposição ao estresse de restrição, os roedores tipicamente apresentam aumento do comportamento do tipo-ansioso, o que se traduz pela redução do tempo de permanência e do número de entradas nos braços abertos (Barretto-de-Souza *et al.*, 2022; Vitorio *et al.*, 2023). Inversamente, o aumento da exploração dos braços abertos é interpretado como um efeito ansiolítico, como observado com ansiolíticos clinicamente eficazes

(Carobrez; Bertoglio, 2005). Por sua vez, a atividade locomotora geral é avaliada pelo número de entradas nos braços fechados (Pellow S *et al.*, 1985). Ao utilizarmos este paradigma para investigar os receptores CRF1 no CI, comparamos animais controles (estressados e tratados com salina) com animais naïve (não estressados), confirmando o estabelecimento de uma clara resposta ansiogênica ao estresse. Importante ressaltar que nem o procedimento de estresse nem os tratamentos farmacológicos comprometeram a atividade locomotora dos animais, como indicado pela ausência de diferenças no número de entradas nos braços fechados, validando que as alterações de exploração refletem especificamente variações no estado de ansiedade.

Estudos de neuroimagem e morfológicos em humanos têm implicado o CI em transtornos relacionados à ansiedade. Pacientes diagnosticados com transtorno de ansiedade social (TAS), fobia específica (FE) e transtorno de estresse pós-traumático frequentemente apresentam hiperatividade basal no CI (Etkin; Wager, 2007). De forma convergente, a exposição a estímulos fóbicos intensifica a atividade insular em indivíduos ansiosos (Rauch *et al.*, 1997), enquanto desafios farmacológicos conhecidos por induzir ataques de pânico (como lactato ou colecistoquinina) causam forte aumento do fluxo sanguíneo regional na estrutura (Nagai; Kishi; Kato, 2007). Além das alterações funcionais momentâneas, modificações estruturais do CI também foram descritas, incluindo redução volumétrica em pacientes com TAS (Kawaguchi *et al.*, 2016), transtorno de ansiedade generalizada (TAG) (Moon; Kim; Jeong, 2014) e transtorno do pânico (Kang; Lee; Lee, 2017), bem como aumento volumétrico em indivíduos com FE (Scarano *et al.*, 2025). Especificamente, estudos de neuroimagem em humanos destacaram as porções anteriores do CI como uma região-chave no processamento emocional (Benarroch, 2019; Kurth *et al.*, 2010).

Estudos em animais *naive* confirmam o papel do CIa na manifestação de comportamentos de ansiedade basal. Recentemente, nosso grupo demonstrou que a ativação do receptor CRF_1 no CIa contribui para a manutenção do comportamento tipo-ansioso inato em ratos (Lopes *et al.*, 2024). Outras evidências experimentais revelaram que a lesão local ou o antagonismo de receptores glutamatérgicos não NMDA no CIa induziram efeitos ansiolíticos no LCE (Méndez-Ruette *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2020). De forma oposta, a ativação optogenética seletiva de neurônios produtores de polipeptídeo ativador da

adenilato ciclase hipofisária (PACAP) nessa sub-região do CI aumentou o comportamento do tipo-ansioso em camundongos (Nguyen *et al.*, 2024). Em sintonia com essa literatura, os resultados do nosso estudo fornecem novas evidências de que esse papel do CIa sobre a ansiedade não se restringe a condições basais, sendo também recrutado frente ao estresse de restrição, e que esse envolvimento requer a ativação de receptores CRF_1 locais. Nossos dados são suportados por evidências de estudos em roedores que identificaram que a inibição quimiogenética dos neurônios do CIa que se projetam para o tálamo paraventricular (PVT) (Zhao *et al.*, 2022) e a inibição da MAGL (enzima responsável pela degradação do endocanabinoide 2-araquidonoilglicerol) local (Belem-Filho *et al.*, 2025) preveniram o efeito ansiogênico provocado pelo estresse de restrição. Contudo, é importante destacar que o CIa parece não estar envolvido em todas as manifestações de respostas comportamentais relacionadas à ansiedade, visto que a inibição química temporária dessa sub-região não afetou as respostas comportamentais de condicionamento ao contexto e ao som (de Paiva *et al.*, 2021).

O presente estudo também indicou que o antagonismo do receptor CRF_1 no CIa potencializou o aumento de células Fos-positivas provocado pela restrição, sugerindo que a ativação endógena do receptor CRF_1 atua para inibir a atividade neuronal local gerada pelo estressor. Tomados em conjunto com os dados comportamentais, observa-se que o alívio da ansiedade (efeito ansiolítico pelo bloqueio de CRF_1) ocorreu em paralelo ao aumento global da ativação neuronal da região. Em contraste, Méndez-Ruette e colaboradores (2019) mostraram que, em animais não estressados, a ativação neuronal no CIa induzida por bicuculina (antagonista de receptores $GABA_A$) causou efeito ansiogênico. Essa discrepância aparente – onde a ativação neuronal induzida por bicuculina é associada a efeitos ansiogênicos, enquanto a evocada pelo antagonismo do receptor CRF_1 produz efeitos ansiolíticos – pode refletir influências diferenciais em distintas populações neuronais. Especificamente, a administração de bicuculina pode engajar preferencialmente neurônios piramidais de saída (por exemplo, aqueles que se projetam para o PVT e BLA e promovem medo/ansiedade) (Nicolas *et al.*, 2023; Zhao *et al.*, 2022). Em contraste, o bloqueio do receptor CRF_1 parece exercer seus efeitos primariamente através de interneurônios inibitórios locais. Essa ideia é

corroborada por evidências de que a ativação optogenética seletiva de interneurônios GABAérgicos no CIa resulta em comportamentos ansiolíticos (Shi *et al.*, 2020). Essa rede de interneurônios do CIa está anatomicamente bem posicionada para essa função, visto que recebem aferências diretas da amígdala estendida (Gehrlach *et al.*, 2020), que compreende núcleos ricos em neurônios que fornecem inervação CRFérgica para diversas áreas encefálicas (Dabrowska *et al.*, 2016; Giardino *et al.*, 2018; Paul; Chen, 2017; Rinker *et al.*, 2017).

Movendo-nos para a porção mais caudal, observamos que, de forma semelhante ao CIa, a microinjeção de CP376395 no CIpc também inibiu o efeito tipo-ansiogênico provocado pela restrição. Evidências anteriores indicaram que o antagonismo do receptor CRF_1 no CIpc não influenciou o comportamento no LCE em ratos não estressados (Lopes *et al.*, 2024). Juntos com essa evidência anterior, nossos dados sugerem que os mecanismos CRFérgicos no CIpc são recrutados para a expressão de respostas ansiogênicas induzidas pelo estresse, mas não regulam o tom basal de ansiedade (inata). No entanto, esse resultado diverge de dados obtidos por Vitório et al. (2023), onde a inibição sináptica não seletiva do CIpc não teve efeito sobre a ansiedade provocada pela restrição; e de achados onde lesões estruturais da mesma área não alteraram o comportamento no LCE de camundongos (Shi *et al.*, 2020). Essa ausência de efeito em abordagens não seletivas (inibição sináptica ou lesão) resulta da inibição simultânea de mecanismos neuroquímicos que possuem ações contrapostas (contrarregulatórios) na modulação da ansiedade gerada pelo estresse. Em favor dessa interpretação, estudos identificaram que o bloqueio de receptores de glutamato não NMDA no CIpc diminuiu a exploração dos braços abertos do LCE, sugerindo um papel ansiolítico dessa sub-região (Méndez-Ruette *et al.*, 2019). Embora nunca tenha sido relatado um papel da neurotransmissão glutamatérgica nas respostas ansiogênicas evocadas pelo estresse de restrição no LCE, foi relatado que a neurotransmissão glutamatérgica no CI é recrutada durante esse estressor (Goulart *et al.*, 2022). Assim, esse sistema excitatório pode contrarregular o controle comportamental pelos receptores CRF_1 nessa sub-região do CI. No entanto, mais estudos são necessários para testar esta hipótese.

O tratamento farmacológico do CIpr com o antagonista de receptor CRF_1 CP376395 não afetou o efeito ansiogênico provocado pelo estresse de restrição.

Este achado comportamental é consistente com as análises histológicas, onde o bloqueio não interferiu na atividade neuronal (Fos) do CIpr induzida pela restrição. Adicionalmente, esse resultado converge com o estudo de Vitório e colaboradores (2023), que constatou que a inibição sináptica não seletiva no CIpr não afetou o comportamento do tipo-ansiogênico evocado pela restrição. O conjunto dessas evidências sustenta que o CIpr não está envolvido em mudanças comportamentais induzidas pelo estresse de restrição. No entanto, é importante destacar que estudos anteriores indicaram que a lesão local ou o bloqueio de receptores glutamatérgicos no CIpr aumenta a exploração dos braços abertos em animais não estressados (Méndez-Ruette *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2020), o que sugere um papel local na regulação da ansiedade inata em roedores.

Apesar da ausência de efeito após o antagonismo do receptor CRF_1 no CIpr, a estimulação farmacológica do CIpr via microinjeção local de CRF foi suficiente para suprimir o comportamento ansiogênico evocado pelo estresse, indicando um papel ansiolítico para a sinalização CRFérgica nesta região. Assim, apesar da neurotransmissão CRFérgica local não ser fisiologicamente recrutada para o comportamento tipo-ansiogênico evocado pelo estresse de restrição (baseado na ausência de efeito do antagonista), esse mecanismo pode estar envolvido na modulação de respostas comportamentais provocadas por outros estímulos aversivos. De fato, o silenciamento quimiogenético do CIpr diminuiu o rebote de interações sociais após períodos de isolamento social (Hiyoshi; Matsushita; Watabe, 2025). Além disso, o CIp como um todo (incluindo o CIpr) está envolvido na resposta comportamental ao medo condicionado ao som (de Paiva *et al.*, 2021) e os mecanismos CRFérgicos estão envolvidos na expressão das respostas condicionadas ao medo (Chudoba; Dabrowska, 2023).

Complementando as análises fisiológicas e comportamentais, a análise da atividade neuronal pela expressão da proteína Fos indicou uma tendência de aumento da ativação neuronal no CIa após o estresse de restrição agudo. Esse aumento ocorreu em paralelo às respostas autonômicas periféricas, como os aumentos de PAM e FC e a redução da TCC. Esses achados estão em consonância com estudos em humanos que demonstram que a maior reatividade cardiovascular ao estresse está associada a maior ativação da ínsula anterior (Gianaros *et al.*, 2005, 2007). De forma semelhante, durante o estresse

psicossocial, a atividade da ínsula, particularmente em sua porção anterior, correlaciona-se positivamente com a magnitude da taquicardia (Erhart *et al.*, 2024; Huber *et al.*, 2025), sugerindo que essa região desempenha um papel central na integração entre estados emocionais e respostas autonômicas. Por outro lado, esse aumento de Fos diverge de dados prévios do nosso grupo, que demonstraram redução da atividade neuronal no CIa durante o estresse de restrição (Tomeo *et al.*, 2022). Essa divergência pode estar relacionada a diferenças metodológicas no delineamento cirúrgico. Diferente do estudo de Tomeo e colaboradores (2022), os animais utilizados para a análise da ativação neuronal no presente estudo foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas intra-CI, procedimento que pode influenciar a linha de base da reatividade tecidual local. Em relação às respostas emocionais, o aumento da atividade neuronal no CIa, associado ao comportamento do tipo-ansiogênico evocado pelo estresse de restrição, é consistente com evidências de neuroimagem em humanos, nos quais a hiperatividade da ínsula é um marcador de transtornos de ansiedade (Etkin; Wager, 2007; Nagai; Kishi; Kato, 2007). Estudos recentes em roedores também demonstram o recrutamento do CIa em modelos experimentais de ansiedade induzidos por estresse (Zhao *et al.*, 2022), reforçando o papel dessa região na modulação dos estados emocionais negativos e de suas consequências autonômicas.

A análise da expressão de Fos nas porções posteriores indicou um aumento da ativação neuronal no CIpr e uma redução no CIpc em animais submetidos ao estresse de restrição agudo. Esse padrão de ativação é consistente com os achados anteriores do nosso grupo para essas áreas (Tomeo *et al.*, 2022). Inesperadamente, o antagonismo de CRF_1 com CP376395 no CIpr ou no CIpc não alterou as mudanças induzidas pelo estresse na ativação neuronal local. Contudo, a administração de CRF exógeno no CIpc inibiu a redução da ativação neuronal causada pela restrição, o que indica um papel potencial para a sinalização CRFérgica na modulação da atividade neuronal sob condições aversivas.

A ausência de efeito do antagonista de CRF_1 sobre o número de células Fos-positivas no CIpc contrasta com as alterações significativas observadas nas respostas fisiológicas (redução da resposta pressora e taquicárdica) e comportamentais (redução do comportamento do tipo-ansiogênico). Uma

explicação neurobiológica provável é que essa abordagem farmacológica pode ter efeitos diferenciais em subpopulações neuronais distintas no CIp. Semelhante ao sugerido para o CIa, a ativação de interneurônios inibitórios locais pode suprimir a atividade dos neurônios piramidais, resultando na ausência de alteração no número total de células Fos-positivas. Além disso, evidências anteriores indicam que a ativação do receptor CRF_1 despolariza neurônios piramidais no CIp e aciona mecanismos endocanabinoides para suprimir a liberação pré-sináptica de GABA, facilitando a neurotransmissão excitatória local (Rieger *et al.*, 2022). Se esse mecanismo ocorrer no CIpc, a microinjeção de CRF exógeno explicaria a prevenção da redução de Fos induzida pelo estresse. Portanto, estudos futuros são necessários para elucidar as dinâmicas do CRF_1 atuando sobre redes inibitórias e excitatórias locais.

A expressão dos receptores CRFérgicos e os níveis de CRF vêm sendo estudados em diferentes regiões cerebrais de animais submetidos a diferentes estressores crônicos (Chen; Tang; Yang, 2008; Oliveira *et al.*, 2021; Sutherland *et al.*, 2010; Waters *et al.*, 2015). No presente estudo, não detectamos alterações nos níveis proteicos totais do receptor CRF_1 em nenhuma sub-região do CI após a exposição ao ERR. A manutenção dos níveis do receptor no CIa é coerente com a ausência de alterações funcionais observada, uma vez que o estresse crônico não afetou o controle cardiovascular mediado pelo CRF_1 nessa região. No entanto, embora o ERR tenha alterado as respostas funcionais mediadas pelo CIpr e CIpc, os níveis proteicos totais do receptor permaneceram inalterados. Isso sugere que as adaptações funcionais nessas regiões, induzidas pela cronicidade, ocorrem de forma independente de mudanças na quantidade total de receptores CRF_1 na membrana.

Evidências anteriores indicam que os efeitos do estresse crônico sobre a expressão dos receptores CRFérgicos não são uniformes e dependem de diversos fatores. Por exemplo, foi observado um aumento da expressão de CRF_1 (mas não de CRF_2) no hipocampo de ratos Brown Norway (mas não em ratos Wistar-Kyoto) submetidos a um protocolo de ERR, enquanto as expressões na amígdala, hipotálamo e córtex frontal permaneceram inalteradas em ambas linhagens (Sutherland *et al.*, 2010). Em outro estudo, o estresse de evitação de água por sete dias aumentou a expressão de ambos os receptores CRFérgicos no NLET (Tran; Schulkin; Greenwood-Van Meerveld, 2014), ao passo que o

estresse crônico variado (ECV) reduziu essas populações na mesma região em ratos Wistar (Oliveira *et al.*, 2021). No PVN, o estresse crônico por imobilização reduziu a expressão de RNAm do receptor CRF1 em comparação ao estresse agudo (Bonaz; Rivest, 1998). No HL, dez sessões de ERR não alteraram a expressão quantitativa dos receptores CRFérgicos (Barretto-de-Souza *et al.*, 2022); contudo, a exposição ao ECV aumentou a expressão de CRF_2 sem alterar o CRF_1 (Barretto-de-Souza *et al.*, 2024). Em conjunto, esses dados demonstram que a modulação do sistema CRFérgico varia conforme a região cerebral, a linhagem animal e o paradigma de estresse utilizado. Assim, a ausência de alterações quantitativas do receptor CRF_1 no CI observada em nosso estudo é consistente com a literatura, reforçando que as adaptações ao estresse crônico podem ocorrer sem mudanças no conteúdo proteico total do receptor.

A ausência de alterações na quantidade total do receptor CRF_1 após o ERR sugere que as modificações funcionais observadas no CIpr e CIpc podem estar relacionadas a adaptações na eficiência do sistema de sinalização celular. O estresse crônico pode modular vias efetoras intracelulares, alterando a afinidade do receptor pelo CRF, promovendo oligomerização estrutural, induzindo a expressão de isoformas alternativas, ou causando o desacoplamento das proteínas G e alterações nas cascatas enzimáticas (Grammatopoulos; Ourailidou, 2017; Slater *et al.*, 2016). Além dessas alterações moleculares, pode remodelar a atividade de subpopulações neuronais específicas (como interneurônios versus neurônios piramidais) que expressam o receptor CRF_1, sem alterar a expressão proteica total na região. Também é plausível que ocorram alterações na liberação pré-sináptica de CRF no CI. Como mencionado anteriormente, não foi identificada expressão de RNAm para CRF no CI (Rieger *et al.*, 2022), indicando que o peptídeo é liberado a partir de aferências de outras regiões. Nesse sentido, foram relatadas alterações na expressão de CRF e na excitabilidade de neurônios positivos para CRF em regiões cerebrais conectadas ao CI, como o NLET, após exposição ao estresse crônico (Hu *et al.*, 2023; Maita; Roepke; Samuels, 2022).

A literatura demonstra que a exposição repetida ao estresse causa alterações neurofuncionais no CI, impactando o controle de respostas comportamentais e autonômicas ao estresse de restrição (Luchsinger *et al.*, 2021; Scheich *et al.*, 2017; Wei *et al.*, 2018). O estresse crônico de evitação de

água aumentou a expressão de c-Fos e da subunidade 2B do receptor NMDA (NR2B), e reduziu os níveis de 5-HT e do receptor 5-HT_{1A} no CI (Sun *et al.*, 2016). O trauma neonatal por privação materna aumentou a expressão e a atividade do receptor P2X7 na idade adulta (Zhang *et al.*, 2017), enquanto o nado forçado repetido aumentou a expressão da forma fosforilada da proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc (pCREB) e c-Fos no CI (Imbe *et al.*, 2014). Alterações na neurotransmissão dopaminérgica também foram registradas no CI de animais que conviveram cronicamente com um co-específico com dor neuropática crônica (Baptista-de-Souza *et al.*, 2022). Em protocolos mais longos de ERR (4 a 5 semanas de restrição diária por 6 horas), foram observadas alterações na atividade neuronal do CI (Scheich *et al.*, 2017; Wei *et al.*, 2018). Apesar das evidências mencionadas acima, pouco se sabe sobre os mecanismos que controlam a expressão dos receptores CRFérgicos no cérebro, sendo o presente estudo o primeiro estudo que buscou identificar o efeito do estresse crônico na neurotransmissão CRFérgica no CI.

Em um contexto mais amplo, a literatura demonstra que alterações desadaptativas na neurotransmissão CRFérgica em diversas estruturas encefálicas são motores fundamentais para o desenvolvimento de distúrbios crônicos e disfunções fisiológicas (Grammatopoulos; Ourailidou, 2017; Hauger *et al.*, 2009; Vasconcelos *et al.*, 2020). Em geral, a exposição crônica ao estresse altera a forma como o organismo lida com desafios, resultando frequentemente na facilitação de respostas a estressores novos (isto é, diferentes daqueles usados durante o estresse crônico) e na atenuação de respostas a estressores familiares (Crestani, 2016; Herman, 2013; Herman *et al.*, 2016). Os nossos achados, que revelam uma profunda alteração funcional no controle cardiovascular mediado pelo receptor CRF1 no CI posterior após o estresse repetido, ilustram exatamente esse tipo de neuroplasticidade. Portanto, as evidências documentadas no presente estudo não apenas posicionam o CI e o sistema CRFérgico como reguladores essenciais da resposta aguda a ameaças, mas também sugerem que o desbalanço dessa via constitui um importante mecanismo neuroquímico subjacente à etiologia e manifestação de transtornos somáticos e comportamentais relacionados ao estresse crônico.

8 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo indicam que a neurotransmissão CRFérgica no CI desempenha papel importante na modulação das respostas autonômicas e emocionais ao estresse. Os achados demonstram que esse controle ocorre de forma sítio-específica ao longo do eixo rostrocaudal do CI e que a exposição prévia ao estresse é capaz de modificar esse controle. Em conjunto, os resultados apresentados aqui ampliam o entendimento sobre os mecanismos neurobiológicos que integram o processamento emocional e o controle autonômico durante situações estressoras, destacando o CI como um importante centro cortical envolvido nessa integração. Além disso, ao identificar a neurotransmissão CRFérgica como um componente relevante nesse processo, o presente estudo fornece bases para investigações futuras sobre os mecanismos neurais pelos quais o estresse influencia a função cardiovascular e o comportamento emocional. Esses achados também podem contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas voltadas à prevenção ou tratamento de doenças cardiovasculares e transtornos neuropsiquiátricos associados à exposição ao estresse.

REFERÊNCIAS

ALVES, F. H. F. *et al*. Both α1- and α2-adrenoceptors in the insular cortex are involved in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 1, 2014.

ALVES, F. H. F. *et al*. Involvement of the insular cortex in the consolidation and expression of contextual fear conditioning. **European Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 38, n. 2, p. 2300–2307, 2013.

ALVES, F. H. F.; CRESTANI, C. C.; CORRÊA, F. M. A. The insular cortex modulates cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Brain Research**, [S. l.], v. 1333, p. 57–63, 2010.

AUGUSTINE, J. R. Circuitry and functional aspects of the insular lobe in primates including humans. **Brain Research Reviews**, [S. l.], v. 22, n. 3, p. 229–244, 1996.

AZEVEDO, M. *et al*. Molecular pathways underlying sympathetic autonomic overshooting leading to fear and traumatic memories: looking for alternative therapeutic options for post-traumatic stress disorder. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [S. l.], v. 16, 2023.

BAGOSI, Z. *et al*. The Role of Corticotropin-Releasing Factor (CRF) and CRF-Related Peptides in the Social Behavior of Rodents. **Biomedicines**, [S. l.], v. 11, n. 8, 2023.

BAKKEN, T. E. *et al*. Comparative cellular analysis of motor cortex in human, marmoset and mouse. **Nature**, [S. l.], v. 598, n. 7879, 2021.

BALE, T. L.; VALE, W. W. CRF and CRF Receptors: Role in Stress Responsivity and Other Behaviors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, [S. l.], v. 44, 2004.

BALI, A.; JAGGI, A. S. Angiotensin as stress mediator: Role of its receptor and interrelationships among other stress mediators and receptors. **Pharmacological Research**, [S. l.], v. 76, p. 49–57, 2013.

BALI, A.; JAGGI, A. S. Preclinical experimental stress studies: Protocols, assessment and comparison. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 746, p. 282–292, 2015.

BAPTISTA-DE-SOUZA, D. *et al*. Behavioral, hormonal, and neural alterations induced by social contagion for pain in mice. **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 203, 2022.

BARRETTO-DE-SOUZA, L. *et al*. Corticotropin-releasing factor neurotransmission in the lateral hypothalamus modulates the tachycardiac response during acute emotional stress in rats. **Brain Research Bulletin**, [S. l.], v. 166, p. 102–109, 2021.

BARRETTO-DE-SOUZA, L. *et al*. Role of corticotropin-releasing factor neurotransmission in the lateral hypothalamus on baroreflex impairment evoked by chronic variable stress in rats. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, [S. l.], v. 476, n. 3, p. 351–364, 2024.

BARRETTO-DE-SOUZA, L. *et al*. Role of CRF1 and CRF2 receptors in the lateral hypothalamus in cardiovascular and anxiogenic responses evoked by restraint stress in rats: Evaluation of acute and chronic exposure. **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 212, p. 109061, 2022.

BEHAN, D. P. *et al*. Corticotropin releasing factor (CRF) binding protein: A novel regulator of CRF and related peptides. **Frontiers in Neuroendocrinology**, [S. l.], 1995.

BELEM-FILHO, I. J. A. *et al*. Role of endocannabinoid neurotransmission in the insular cortex on cardiovascular, autonomic and behavioral responses evoked by acute restraint stress in rats. **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 271, p. 110404, 2025.

BENARROCH, E. E. Insular cortex: Functional complexity and clinical correlations. **Neurology**, [S. l.], v. 93, n. 21, 2019.

BENASSI-CEZAR, G. *et al*. Differential modulation of the anterior cingulate and insular cortices on anxiogenic-like responses induced by empathy for pain. **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 192, 2021.

BENINI, R. *et al*. Habituation of the cardiovascular responses to restraint stress in male rats: influence of length, frequency and number of aversive sessions. **Stress**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 151–161, 2019.

BENINI, R. *et al*. Influence of strain on expression and habituation of autonomic and cardiovascular responses to restraint stress in rats. **Physiology and Behavior**, [S. l.], v. 290, 2025a.

BENINI, R. *et al*. Role of Sex and Age on Cardiovascular and Autonomic Responses During Acute and Repeated Restraint Stress in Rats. **Psychophysiology**, [S. l.], v. 62, n. 5, 2025b.

BIE, F. *et al*. Rising global burden of anxiety disorders among adolescents and young adults: trends, risk factors, and the impact of socioeconomic disparities and COVID-19 from 1990 to 2021. **Frontiers in Psychiatry**, [S. l.], v. 15, 2024.

BITTENCOURT, J. C. *et al*. Urocortin expression in rat brain: Evidence against a pervasive relationship of urocortin-containing projections with targets bearing type 2 CRF receptors. **Journal of Comparative Neurology**, [S. l.], v. 415, n. 3, p. 285–312, 1999.

BLESSING, W. W. Lower brainstem pathways regulating sympathetically mediated changes in cutaneous blood flow. **Cellular and Molecular Neurobiology**, [S. l.], v. 23, n. 4–5, p. 527–538, 2003.

BONAZ, B.; RIVEST, S. Effect of a chronic stress on CRF neuronal activity and expression of its type 1 receptor in the rat brain. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, [S. l.], v. 275, n. 5, 1998.

BOORSE, G. C.; DENVER, R. J. Widespread tissue distribution and diverse functions of corticotropin-releasing factor and related peptides. **General and Comparative Endocrinology**, [S. l.], v. 146, n. 1, 2006.

BORODOVITSYNA, O.; FLAMINI, M. D.; CHANDLER, D. J. Acute Stress Persistently Alters Locus Coeruleus Function and Anxiety-like Behavior in Adolescent Rats. **Neuroscience**, [S. l.], v. 373, 2018.

BROTMAN, D. J.; GOLDEN, S. H.; WITTSTEIN, I. S. The cardiovascular toll of stress. **Lancet**, [S. l.], v. 370, n. 9592, 2007.

BUENROSTRO-JÁUREGUI, M. H. *et al*. A Comprehensive Overview of Stress, Resilience, and Neuroplasticity Mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 26, n. 7, 2025.

BUSNARDO, C. *et al*. The influence of paraventricular nucleus of the hypothalamus soluble guanylate cyclase on autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress in rats. **European Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 60, n. 8, 2024.

BUTCHER, K. S.; CECHETTO, D. F. Autonomic responses of the insular cortex in hypertensive and normotensive rats. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, [S. l.], v. 268, n. 1, 1995.

BUYNITSKY, T.; MOSTOFSKY, D. I. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 33, n. 7, p. 1089–1098, 2009.

CAI, W.; MENON, V. Heterogeneity of human insular cortex: five principles of functional organization across multiple cognitive domains. **Brain Structure and Function**, [S. l.], v. 230, n. 8, 2025.

CAMPOS, A. C. *et al*. Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, [S. l.], v. 35, n. suppl 2, p. S101–S111, 2013.

CARNEVALI, L. *et al*. Rodent models of depression-cardiovascular comorbidity: Bridging the known to the new. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 76, p. 144–153, 2017.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [S. l.], 2005.

CECHETTO, D. F. Cortical control of the autonomic nervous system. **Experimental Physiology**, [S. l.], v. 99, n. 2, p. 326–331, 2014.

CELANO, C. M. *et al*. **Anxiety Disorders and Cardiovascular Disease**. [S. l.]: [s. n.], 2016.

CENTANNI, S. W. *et al*. Better living through understanding the insula: Why subregions can make all the difference. **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 198, 2021.

CHAGRA, S. L. *et al*. Acute and repeated restraint differentially activate orexigenic pathways in the rat hypothalamus. **Regulatory Peptides**, [S. l.], v. 167, n. 1, 2011.

CHALMERS, D. T. *et al*. Corticotrophin-releasing factor receptors: From molecular biology to drug design. **Trends in Pharmacological Sciences**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 166–172, 1996.

CHALMERS, D. T.; LOVENBERG, T. W.; SOUZA, E. B. Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. **The Journal of Neuroscience**, [S. l.], 1995.

CHEN, J. X.; TANG, Y. T.; YANG, J. X. Changes of glucocorticoid receptor and levels of CRF mRNA, POMC mRNA in brain of chronic immobilization stress rats. **Cellular and Molecular Neurobiology**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 237–244, 2008.

CHRISTIANSON, J. P. *et al*. Safety signals mitigate the consequences of uncontrollable stress via a circuit involving the sensory insular cortex and bed nucleus of the stria terminalis. **Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 70, n. 5, p. 458–464, 2011.

CHUDOBA, R.; DABROWSKA, J. Distinct populations of corticotropin-releasing factor (CRF) neurons mediate divergent yet complementary defensive behaviors in response to a threat. **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 228, 2023.

COFFEEN, U. *et al*. The Role of the Insular Cortex and Serotonergic System in the Modulation of Long-Lasting Nociception. **Cells**, [S. l.], v. 13, n. 20, 2024.

COHEN, S.; JANICKI-DEVERTS, D.; MILLER, G. E. Psychological stress and disease. **JAMA**, [S. l.], v. 298, n. 14, 2007.

CONTARINO, A.; HEINRICHS, S. C.; GOLD, L. H. Understanding corticotropin releasing factor neurobiology: Contributions from mutant mice. **Neuropeptides**, [S. l.], v. 33, n. 1, 1999.

CRESTANI, C. C. Emotional stress and cardiovascular complications in animal models: A review of the influence of stress type. **Frontiers in Physiology**, [S. l.], v. 7, 2016.

CULLINAN, W. E. *et al*. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. **Neuroscience**, [S. l.], v. 64, n. 2, p. 477–505, 1995.

DABROWSKA, J. *et al*. Targeting Corticotropin-Releasing Factor Projections from the Oval Nucleus of the Bed Nucleus of the Stria Terminalis Using Cell-Type Specific Neuronal Tracing Studies in Mouse and Rat Brain. **Journal of Neuroendocrinology**, [S. l.], v. 28, n. 12, 2016.

DAMPNEY, R. A. L. *et al*. Central mechanisms underlying short- and long-term regulation of the cardiovascular system. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, [S. l.], 2002.

DAMPNEY, R. A. L. Central mechanisms regulating coordinated cardiovascular and respiratory function during stress and arousal. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, [S. l.], v. 309, n. 5, p. R429–R443, 2015.

DAMPNEY, R. A. L.; HORIUCHI, J.; MCDOWALL, L. M. Hypothalamic mechanisms coordinating cardiorespiratory function during exercise and defensive behaviour. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, [S. l.], v. 142, n. 1–2, p. 3–10, 2008.

DAVIU, N. *et al*. Neurobiological links between stress and anxiety. **Neurobiology of Stress**, [S. l.], v. 11, 2019.

DE PAIVA, J. P. Q. *et al*. The posterior insular cortex is necessary for the consolidation of tone fear conditioning. **Neurobiology of Learning and Memory**, [S. l.], v. 179, 2021.

DERMITZAKI, E. *et al*. The Multi-faceted Profile of Corticotropin-releasing Factor (CRF) Family of Neuropeptides and of their Receptors on the Paracrine/Local Regulation of the Inflammatory Response. **Current Molecular Pharmacology**, [S. l.], v. 11, n. 1, 2017.

DEUSSING, J. M.; CHEN, A. The corticotropin-releasing factor family: Physiology of the stress response. **Physiological Reviews**, [S. l.], v. 98, n. 4, p. 2225–2286, 2018.

DHABHAR, F. S. The power of positive stress–a complementary commentary. **Stress**, [S. l.], v. 22, n. 5, p. 526–529, 2019.

DI CESARE, M. *et al*. The Heart of the World. **Global Heart**, [S. l.], v. 19, n. 1, 2024.

DOMIN, H.; ŚMIAŁOWSKA, M. The diverse role of corticotropin-releasing factor (CRF) and its CRF1 and CRF2 receptors under pathophysiological conditions: Insights into stress/anxiety, depression, and brain injury processes. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 163, 2024.

DOS REIS, D. G. *et al*. Role of the autonomic nervous system and baroreflex in stress-evoked cardiovascular responses in rats. **Stress**, [S. l.], v. 17, n. 4, 2014.

DUARTE, J. O.; PLANETA, C. S.; CRESTANI, C. C. Vulnerability and resilience to cardiovascular and neuroendocrine effects of stress in adult rats with historical of chronic stress during adolescence. **Life Sciences**, [S. l.], v. 318, 2023.

ERHART, M. *et al*. Capturing inter-individual variability in stress dynamics with heart rate traces reveals activity in the bilateral hippocampus, amygdala, and insula. **Imaging Neuroscience**, [S. l.], v. 2, 2024.

ETKIN, A.; WAGER, T. D. Functional neuroimaging of anxiety: A meta-analysis of emotional processing in PTSD, social anxiety disorder, and specific phobia. **American Journal of Psychiatry**, [S. l.], v. 164, n. 10, 2007.

EVRARD, H. C. The Isle of Craig: Neuroanatomical and Functional Evidence for a Role of the Insular Cortex in Subjective Feelings. In: **Current Topics in Behavioral Neurosciences**. [S. l.]: Springer, 2025. v. 70.

EVRARD, H. C. The organization of the primate insular cortex. **Frontiers in Neuroanatomy**, [S. l.], v. 13, 2019.

FANG, R. *et al*. Conservation and divergence of cortical cell organization in human and mouse revealed by MERFISH. **Science**, [S. l.], v. 377, n. 6601, 2022.

FINK, G. **Stress: Concepts, Cognition, Emotion, and Behavior: Handbook of Stress**. [S. l.]: Academic Press, 2016. v. 1.

GAO, H. R.; GAO, H. Y. Cardiovascular functions of central corticotropin-releasing factor related peptides system. **Neuropeptides**, [S. l.], v. 75, p. 18–24, 2019.

GEHRLACH, D. A. *et al*. A whole-brain connectivity map of mouse insular cortex. **eLife**, [S. l.], v. 9, p. 1–78, 2020.

GEHRLACH, D. A. *et al*. Aversive state processing in the posterior insular cortex. **Nature Neuroscience**, [S. l.], v. 22, n. 9, p. 1424–1437, 2019.

GHAZIRI, J. *et al*. Subcortical structural connectivity of insular subregions. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 8596, 2018.

GIANAROS, P. J. *et al*. Anterior cingulate activity correlates with blood pressure during stress. **Psychophysiology**, [S. l.], v. 42, n. 6, 2005.

GIANAROS, P. J. *et al*. Heightened functional neural activation to psychological stress covaries with exaggerated blood pressure reactivity. **Hypertension**, [S. l.], v. 49, n. 1, p. 134–140, 2007.

GIARDINO, W. J. *et al*. Parallel circuits from the bed nuclei of stria terminalis to the lateral hypothalamus drive opposing emotional states. **Nature Neuroscience**, [S. l.], v. 21, n. 8, 2018.

GODOY, L. D. *et al*. A comprehensive overview on stress neurobiology: Basic concepts and clinical implications. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [S. l.], v. 12, 2018.

GOGOLLA, N. **The insular cortex**. [S. l.]: [s. n.], 2017.

GOLBIDI, S.; FRISBEE, J. C.; LAHER, I. X. Chronic stress impacts the cardiovascular system: Animal models and clinical outcomes. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, [S. l.], v. 308, n. 12, p. H1476–H1498, 2015.

GOULART, M. T. *et al*. NMDA receptors in the insular cortex modulate cardiovascular and autonomic but not neuroendocrine responses to restraint stress in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 119, 2022.

GRAMMATOPOULOS, D. K.; OURAILIDOU, S. CRH Receptor Signalling: Potential Roles in Pathophysiology. **Current Molecular Pharmacology**, [S. l.], v. 10, n. 4, 2017.

GRAY, J. D. *et al*. Hippocampal gene expression changes underlying stress sensitization and recovery. **Molecular Psychiatry**, [S. l.], v. 19, n. 11, 2014.

GUÉRINEAU, N. C. Adaptive remodeling of the stimulus-secretion coupling: Lessons from the ‘stressed’ adrenal medulla. In: **Vitamins and Hormones**. [S. l.]: Academic Press, 2024. v. 124.

HARDY, S. G. P.; HOLMES, D. E. Prefrontal stimulus-produced hypotension in rat. **Experimental Brain Research**, [S. l.], v. 73, n. 2, p. 249–255, 1988.

HARDY, S. G. P.; MACK, S. M. Brainstem mediation of prefrontal stimulus-produced hypotension. **Experimental Brain Research**, [S. l.], v. 79, n. 2, p. 393–399, 1990.

HARE, D. L. *et al*. Depression and cardiovascular disease: A clinical review. **European Heart Journal**, [S. l.], v. 35, n. 21, p. 1365–1372, 2014.

HAUGER, R. *et al*. Corticotropin Releasing Factor (CRF) Receptor Signaling in the Central Nervous System: New Molecular Targets. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, [S. l.], v. 5, n. 4, 2008.

HAUGER, R. L. *et al*. International Union of Pharmacology. XXXVI. Current status of the nomenclature for receptors for corticotropin-releasing factor and their ligands. **Pharmacological Reviews**, [S. l.], v. 55, 2003.

HAUGER, R. L. *et al*. Role of CRF receptor signaling in stress vulnerability, anxiety, and depression. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [S. l.], p. 120–143, 2009.

HEINRICHS, S. C. *et al*. Anti-stress action of a corticotropin-releasing factor antagonist on behavioral reactivity to stressors of varying type and intensity. **Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 11, n. 3, 1994.

HEINRICHS, S. C. *et al*. Corticotropin-releasing factor antagonist reduces emotionality in socially defeated rats via direct neurotropic action. **Brain Research**, [S. l.], v. 581, n. 2, 1992.

HENCKENS, M. J. A. G.; DEUSSING, J. M.; CHEN, A. Region-specific roles of the corticotropin-releasing factor-urocortin system in stress. **Nature Reviews Neuroscience**, [S. l.], v. 17, n. 10, p. 636–651, 2016.

HERMAN, J. P. *et al*. Central mechanisms of stress integration: Hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. **Frontiers in Neuroendocrinology**, [S. l.], v. 24, n. 3, 2003.

HERMAN, J. P. *et al*. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. **Comprehensive Physiology**, [S. l.], v. 6, n. 2, 2016.

HERMAN, J. P. Neural control of chronic stress adaptation. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [S. l.], n. May, 2013.

HIYOSHI, K.; MATSUSHITA, D.; WATABE, A. M. Modulation of social valence by insular cortex activity during acute social isolation in mice. **Molecular Brain**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 62, 2025.

HODGE, R. D. *et al*. Conserved cell types with divergent features in human versus mouse cortex. **Nature**, [S. l.], v. 573, n. 7772, 2019.

HU, P. *et al*. SIRT1 in the BNST modulates chronic stress-induced anxiety of male mice via FKBP5 and corticotropin-releasing factor signaling. **Molecular Psychiatry**, [S. l.], v. 28, n. 12, 2023.

HUBER, A. *et al*. Brain activation and heart rate variability as markers of autonomic function under stress. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 15, n. 1, 2025.

IBRAHIM, L. A. *et al*. Mining the jewels of the cortex's crowning mystery. **Current Opinion in Neurobiology**, [S. l.], v. 63, 2020.

IEZZI, D. *et al*. Sexual differences in neuronal and synaptic properties across subregions of the mouse insular cortex. **Biology of Sex Differences**, [S. l.], v. 15, n. 1, 2024.

IMBE, H. *et al*. Repeated forced swim stress enhances CFA-evoked thermal hyperalgesia and affects the expressions of pCREB and c-Fos in the insular cortex. **Neuroscience**, [S. l.], v. 259, p. 1–11, 2014.

JAHN, O. *et al*. Three-amino acid motifs of urocortin II and III determine their CRF receptor subtype selectivity. **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 47, n. 2, 2004.

JOËLS, M.; BARAM, T. Z. The neuro-symphony of stress. **Nature Reviews Neuroscience**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 459–466, 2009.

JONES, E. G. Neurotransmitters in the cerebral cortex. **Journal of Neurosurgery**, [S. l.], v. 65, n. 2, 1986.

JU, A. *et al*. Expression of serotonin 1A and 2A receptors in molecular- and projection-defined neurons of the mouse insular cortex. **Molecular Brain**, [S. l.], v. 13, n. 1, 2020.

KANG, E. K.; LEE, K. S.; LEE, S. H. Reduced cortical thickness in the temporal pole, insula, and pars triangularis in patients with panic disorder. **Yonsei Medical Journal**, [S. l.], v. 58, n. 5, 2017.

KAWAGUCHI, A. *et al*. Insular volume reduction in patients with social anxiety disorder. **Frontiers in Psychiatry**, [S. l.], v. 7, n. Jan, 2016.

KITTLESON, A. R. *et al*. The insula: Leveraging cellular and systems-level research to better understand its roles in health and schizophrenia. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 160, 2024.

KOOB, G. F. Corticotropin-releasing factor, norepinephrine, and stress. **Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 46, n. 9, p. 1167–1180, 1999.

KURTH, F. *et al*. A link between the systems: functional differentiation and integration within the human insula revealed by meta-analysis. **Brain Structure & Function**, [S. l.], v. 214, n. 5–6, 2010.

LAMOTTE, G.; SHOUMAN, K.; BENARROCH, E. E. Stress and central autonomic network. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, [S. l.], v. 235, 2021.

LAZARUS, R. S.; FOLKMAN, S. **Stress, appraisal, and coping**. [S. l.]: Springer Publishing Company, 1984.

LI, Z. *et al*. Global, Regional, and National Death, and Disability-Adjusted Life-Years (DALYs) for Cardiovascular Disease in 2017 and Trends and Risk Analysis From 1990 to 2017 Using the Global Burden of Disease Study and Implications for Prevention. **Frontiers in Public Health**, [S. l.], v. 9, 2021.

LIU, X. *et al*. Thirty-year trends of anxiety disorders among adolescents based on the 2019 Global Burden of Disease Study. **General Psychiatry**, [S. l.], v. 37, n. 2, 2024.

LOPES, L. M. *et al*. Pharmacological Manipulation of Corticotropin-Releasing Factor Receptors in the Anterior and Posterior Subregions of the Insular Cortex Differently Affects Anxiety-Like Behaviors in the Elevated Plus Maze in Rats. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2024, p. 1–9, 2024.

LOVENBERG, T. W. *et al*. Crf2α and crf2βta receptor mRNAS are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. **Endocrinology**, [S. l.], v. 136, n. 9, 1995.

LU, S.; WEI, F.; LI, G. The evolution of the concept of stress and the framework of the stress system. **Cell Stress**, [S. l.], v. 5, n. 6, 2021.

LUCHSINGER, J. R. *et al*. Delineation of an insula-BNST circuit engaged by struggling behavior that regulates avoidance in mice. **Nature Communications**, [S. l.], v. 12, n. 1, 2021.

LUO, Y. *et al*. Chronic unpredictable mild stress-induced anxiety is linked to inflammatory responses and disruptions in tryptophan metabolism in male C57BL/6N mice. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 484, 2025.

MAITA, I.; ROEPKE, T. A.; SAMUELS, B. A. Chronic stress-induced synaptic changes to corticotropin-releasing factor-signaling in the bed nucleus of the stria terminalis. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [S. l.], v. 16, 2022.

MANO-OTAGIRI, A. *et al*. Corticotropin-releasing factor type 1 receptors in the rat nodose ganglion are involved in the transduction of stress-induced visceral sensory signals to the brain. **Journal of Neuroendocrinology**, [S. l.], v. 37, n. 11, 2025.

MAO, X.; STAIGER, J. F. Multimodal cortical neuronal cell type classification. **Pflugers Archiv - European Journal of Physiology**, [S. l.], v. 476, n. 5, 2024.

MARIN, M. T.; CRUZ, F. C.; PLANETA, C. S. Cocaine-induced behavioral sensitization in adolescent rats endures until adulthood: Lack of association with GluR1 and NR1 glutamate receptor subunits and tyrosine hydroxylase. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S. l.], v. 91, n. 1, p. 109–114, 2008.

MARINS, F. R. *et al*. Alamandine but not angiotensin-(1–7) produces cardiovascular effects at the rostral insular cortex. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, [S. l.], v. 321, n. 3, p. R513–R521, 2021.

MARINS, F. R. *et al*. Functional topography of cardiovascular regulation along the rostrocaudal axis of the rat posterior insular cortex. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, [S. l.], v. 43, n. 4, p. 484–493, 2016.

MARTINS, A. P.; MARRAS, R. A.; GUIMARÃES, F. S. Anxiolytic effect of a CRH receptor antagonist in the dorsal periaqueductal gray. **Depression and Anxiety**, [S. l.], v. 12, n. 2, 2000.

MATHIASEN, M. L.; AGGLETON, J. P.; WITTER, M. P. Projections of the insular cortex to orbitofrontal and medial prefrontal cortex: A tracing study in the rat. **Frontiers in Neuroanatomy**, [S. l.], v. 17, 2023.

MCCARTY, R. Learning about stress: neural, endocrine and behavioral adaptations. **Stress**, [S. l.], v. 19, n. 5, p. 449–475, 2016.

MCEWEN, B. S. *et al*. Stress and anxiety: Structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 62, n. 1, p. 3–12, 2012.

MCEWEN, B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain. **Physiological Reviews**, [S. l.], v. 87, n. 3, p. 873–904, 2007.

MCEWEN, B. S. Protective and Damaging Effects of Stress Mediators. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 338, n. 3, 1998.

MCEWEN, B. S. The good side of “stress”. **Stress**, [S. l.], v. 22, n. 5, 2019.

MCEWEN, B. S.; AKIL, H. Revisiting the stress concept: Implications for affective disorders. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 40, n. 1, 2020.

MCGREGOR, M. S.; LALUMIERE, R. T. Still a “hidden island”? The rodent insular cortex in drug seeking, reward, and risk. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 153, p. 105334, 2023.

MÉNDEZ-RUETTE, M. *et al*. The role of the rodent insula in anxiety. **Frontiers in Physiology**, [S. l.], v. 10, n. Mar, 2019.

MENON, V. *et al*. Microstructural organization of human insula is linked to its macrofunctional circuitry and predicts cognitive control. **eLife**, [S. l.], v. 9, 2020.

MENSAH, G. A.; ROTH, G. A.; FUSTER, V. The Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors: 2020 and Beyond. **Journal of the American College of Cardiology**, [S. l.], v. 74, n. 20, 2019.

MENZAGHI, F. *et al*. Characterization of a novel and potent corticotropin-releasing factor antagonist in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [S. l.], v. 269, n. 2, 1994.

MICHALEC, O. M. *et al*. Corticotropin-Releasing Factor: An Ancient Peptide Family Related to the Secretin Peptide Superfamily. **Frontiers in Endocrinology**, [S. l.], v. 11, 2020.

MOLNAR-SZAKACS, I.; UDDIN, L. Q. Anterior insula as a gatekeeper of executive control. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 139, 2022.

MOON, C. M.; KIM, G. W.; JEONG, G. W. Whole-brain gray matter volume abnormalities in patients with generalized anxiety disorder: Voxel-based morphometry. **NeuroReport**, [S. l.], v. 25, n. 3, 2014.

MORENO-PERAL, P. *et al*. Risk factors for the onset of panic and generalised anxiety disorders in the general adult population: A systematic review of cohort studies. **Journal of Affective Disorders**, [S. l.], v. 168, 2014.

MORGAN, J. I.; CURRAN, T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: Involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. **Annual Review of Neuroscience**, [S. l.], v. 14, 1991.

MORIMOTO, A. *et al*. The central role of corticotrophin-releasing factor (CRF-41) in psychological stress in rats. **The Journal of Physiology**, [S. l.], 1993.

MOTIEJUNAITE, J.; AMAR, L.; VIDAL-PETIOT, E. Adrenergic receptors and cardiovascular effects of catecholamines. **Annales d'Endocrinologie**, [S. l.], v. 82, n. 3–4, 2021.

MUNSHI, S. *et al*. Repeated stress induces a pro-inflammatory state, increases amygdala neuronal and microglial activation, and causes anxiety in adult male rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, [S. l.], v. 84, 2020.

MYERS, B. Corticolimbic regulation of cardiovascular responses to stress. **Physiology and Behavior**, [S. l.], v. 172, p. 49–59, 2017.

NAGAI, M.; KISHI, K.; KATO, S. Insular cortex and neuropsychiatric disorders: A review of recent literature. **European Psychiatry**, [S. l.], v. 22, n. 6, 2007.

NAKAMORI, T.; MORIMOTO, A.; MURAKAMI, N. Effect of a central CRF antagonist on cardiovascular and thermoregulatory responses induced by stress or IL-1β. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, [S. l.], 1993.

NAMKUNG, H.; KIM, S. H.; SAWA, A. The Insula: An Underestimated Brain Area in Clinical Neuroscience, Psychiatry, and Neurology. **Trends in Neurosciences**, [S. l.], v. 40, n. 4, p. 200–207, 2017.

NGUYEN, T. T. *et al*. The pivotal role of PACAP/PAC1R signaling from the anterior insular cortex to the locus coeruleus on anxiety-related behaviors of mice. **Neurochemistry International**, [S. l.], v. 180, p. 105879, 2024.

NICOLAS, C. *et al*. Linking emotional valence and anxiety in a mouse insula-amygdala circuit. **Nature Communications**, [S. l.], v. 14, n. 1, 2023.

NIEUWENHUYS, R. The insular cortex. A review. **Progress in Brain Research**, [S. l.], v. 195, p. 123–163, 2012.

NIJSEN, M. J. M. A. *et al*. CRH signalling in the bed nucleus of the stria terminalis is involved in stress-induced cardiac vagal activation in conscious rats. **Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 1–10, 2001.

NIJSEN, M. J. M. A. *et al*. Endogenous corticotropin-releasing hormone inhibits conditioned-fear-induced vagal activation in the rat. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 389, n. 1, p. 89–98, 2000.

OLIVEIRA, L. A. *et al*. Both CRF1 and CRF2 receptors in the bed nucleus of stria terminalis are involved in baroreflex impairment evoked by chronic stress in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 105, 2021.

OLIVEIRA, L. A. *et al*. CRF1 and CRF2 receptors in the bed nucleus of the stria terminalis modulate the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Pharmacological Research**, [S. l.], v. 95–96, p. 53–62, 2015.

OPPENHEIMER, S. M.; CECHETTO, D. F. Cardiac chronotropic organization of the rat insular cortex. **Brain Research**, [S. l.], v. 533, n. 1, 1990.

O'SHEA, M. J. *et al*. An Island of Reil excitation: Mapping glutamatergic (vGlut1+ and vGlut2+) connections in the medial insular cortex. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], v. 230, p. 116637, 2024.

OSORIO-GÓMEZ, D.; BERMÚDEZ-RATTONI, F.; GUZMÁN-RAMOS, K. R. Cortical neurochemical signaling of gustatory stimuli and their visceral consequences during the acquisition and consolidation of taste aversion memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, [S. l.], v. 181, 2021.

OSORIO-GÓMEZ, D.; GUZMÁN-RAMOS, K.; BERMÚDEZ-RATTONI, F. Memory trace reactivation and behavioral response during retrieval are differentially modulated by amygdalar glutamate receptors activity: Interaction between amygdala and insular cortex. **Learning and Memory**, [S. l.], v. 24, n. 1, 2017.

PARK, S.; CHO, J.; HUH, Y. Role of the anterior insular cortex in restraint-stress induced fear behaviors. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 12, n. 1, 2022.

PAUL, E. D.; CHEN, A. Neural Circuitry of Stress, Fear, and Anxiety: Focus on Extended Amygdala Corticotropin-Releasing Factor Systems. In: **Stress: Neuroendocrinology and Neurobiology**. [S. l.]: Academic Press, 2017. v. 2.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. Sidney, Australia: Academic Press, 1997. v. 1.

PÊGO, J. M. *et al*. Stress and the neuroendocrinology of anxiety disorders. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, [S. l.], v. 2, 2010.

PELLOW, S. *et al*. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, [S. l.], v. 14, p. 149–167, 1985.

PENG, B. *et al*. Anxiety disorder and cardiovascular disease: a two-sample Mendelian randomization study. **ESC Heart Failure**, [S. l.], v. 11, n. 2, 2024.

PERRIN, M. H.; VALE, W. W. Corticotropin Releasing Factor Receptors and Their Ligand Family. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [S. l.], v. 885, n. 1, p. 312–328, 2006.

PETO, C. A. *et al*. Ultrastructural localization of the corticotropin-releasing factor-binding protein in rat brain and pituitary. **Journal of Comparative Neurology**, [S. l.], v. 413, n. 2, 1999.

PHELIX, C. F.; PAULL, W. K. Demonstration of distinct corticotropin releasing factor-containing neuron populations in the bed nucleus of the stria terminalis. A light and electron microscopic immunocytochemical study in the rat. **Histochemistry**, [S. l.], v. 94, n. 4, p. 345–364, 1990.

POTTER, E. *et al*. Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 91, n. 19, p. 8777–8781, 1994.

RAUCH, S. L. *et al*. The functional neuroanatomy of anxiety: A study of three disorders using positron emission tomography and symptom provocation. **Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 42, n. 6, 1997.

REEP, R. L.; WINANS, S. S. Efferent connections of dorsal and ventral agranular insular cortex in the hamster, Mesocricetus auratus. **Neuroscience**, [S. l.], v. 7, n. 11, p. 2609–2635, 1982.

REGIER, D. A.; KUHL, E. A.; KUPFER, D. J. The DSM-5: Classification and criteria changes. **World Psychiatry**, [S. l.], v. 12, n. 2, 2013.

REUL, J. M. H. M.; HOLSBOER, F. Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. **Current Opinion in Pharmacology**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 23–33, 2002.

RIEGER, N. S. *et al*. Insular cortex corticotropin-releasing factor integrates stress signaling with social affective behavior. **Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 47, n. 6, p. 1156–1168, 2022.

RINKER, J. A. *et al*. Extended Amygdala to Ventral Tegmental Area Corticotropin-Releasing Factor Circuit Controls Binge Ethanol Intake. **Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 81, n. 11, 2017.

ROBINSON, A. M. Let's talk about stress: History of stress research. **Review of General Psychology**, [S. l.], v. 22, n. 3, 2018.

RODRÍGUEZ-DURÁN, L. F. *et al*. Synergistic photoactivation of VTA-catecholaminergic and BLA-glutamatergic projections induces long-term potentiation in the insular cortex. **Neurobiology of Learning and Memory**, [S. l.], v. 205, 2023.

ROTH, G. A. *et al*. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. **Journal of the American College of Cardiology**, [S. l.], v. 76, n. 25, 2020.

ROZANSKI, A.; BLUMENTHAL, J. A.; KAPLAN, J. Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. **Circulation**, [S. l.], v. 99, n. 16, p. 2192–2217, 1999.

RUGGIERO, D. A. *et al*. A role of insular cortex in cardiovascular function. **Journal of Comparative Neurology**, [S. l.], v. 257, n. 2, p. 189–207, 1987.

RUIZ, J. R. L. *et al*. Stress related network activity in the intact adrenal medulla. [S. l.]: [s. n.], 2021.

SANTOS, A. *et al*. Functional topography of glutamatergic and GABAergic neurotransmissions along the rostrocaudal axis of the posterior insular cortex regulating cardiovascular/autonomic responses to stress in rats. **Cerebral Cortex**, [S. l.], v. 35, n. 11, 2025.

SCARANO, A. *et al*. The phobic brain: Morphometric features correctly classify individuals with small animal phobia. **Psychophysiology**, [S. l.], v. 62, n. 1, 2025.

SCHAEUBLE, D.; MYERS, B. Cortical–Hypothalamic Integration of Autonomic and Endocrine Stress Responses. **Frontiers in Physiology**, [S. l.], v. 13, 2022.

SCHEICH, B. *et al*. Chronic stress-induced mechanical hyperalgesia is controlled by capsaicin-sensitive neurones in the mouse. **European Journal of Pain**, [S. l.], v. 21, n. 8, p. 1417–1431, 2017.

SCHULKIN, J.; MORGAN, M. A.; ROSEN, J. B. A neuroendocrine mechanism for sustaining fear. **Trends in Neurosciences**, [S. l.], v. 28, n. 12, p. 629–635, 2005.

SELYE, H. **The stress of life**. [S. l.]: McGraw-Hill, 1984.

SELYE, H. Thymus and Adrenals in the Response of the Organism To Injuries and Intoxications. **British Journal of Experimental Pathology**, [S. l.], v. 17, n. 3, 1936.

SGOIFO, A.; CARNEVALI, L.; GRIPPO, A. J. The socially stressed heart. Insights from studies in rodents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 39, p. 51–60, 2014.

SHENG, Z. *et al*. Activation of Corticotropin-Releasing Hormone Neurons in the Central Nucleus of Amygdala is required for Chronic Stress-Induced Hypertension. **The FASEB Journal**, [S. l.], v. 35, n. S1, 2021.

SHI, T. *et al*. Role of the anterior agranular insular cortex in the modulation of fear and anxiety. **Brain Research Bulletin**, [S. l.], v. 155, 2020.

SLATER, P. G. *et al*. CRF binding protein facilitates the presence of CRF type 2α receptor on the cell surface. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 113, n. 15, 2016.

SMAGIN, G. N.; HARRIS, R. B. S.; RYAN, D. H. Corticotropin-releasing factor receptor antagonist infused into the locus coeruleus attenuates immobilization stress-induced defensive withdrawal in rats. **Neuroscience Letters**, [S. l.], v. 220, n. 3, 1996.

SMITH, M. A. *et al*. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 15, n. 3, 1995.

SOUZA, E. B. Corticotropin-releasing factor receptors: Physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. **Psychoneuroendocrinology**, [S. l.], v. 20, n. 8, 1995.

STENGEL, A.; TACHÉ, Y. Corticotropin-releasing factor signaling and visceral response to stress. **Experimental Biology and Medicine**, [S. l.], v. 235, n. 10, p. 1168–1178, 2010.

STERLING, P. Allostasis: A model of predictive regulation. **Physiology and Behavior**, [S. l.], v. 106, n. 1, p. 5–15, 2012.

STIEDL, O. Corticotropin-Releasing Factor Receptor 1 and Central Heart Rate Regulation in Mice during Expression of Conditioned Fear. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [S. l.], v. 312, n. 3, p. 905–916, 2005.

STORER, B. *et al*. Global Prevalence of Anxiety in Adult Cardiology Outpatients: A Systematic Review and Meta-analysis. **Current Problems in Cardiology**, [S. l.], v. 48, n. 11, 2023.

SUN, H. *et al*. Role of 5-HT1A receptor in insular cortex mediating stress-induced visceral sensory dysfunction. **Neurogastroenterology and Motility**, [S. l.], v. 28, n. 7, p. 1104–1113, 2016.

SUN, M. K. Medullospinal vasomotor neurones mediate hypotension from stimulation of prefrontal cortex. **Journal of the Autonomic Nervous System**, [S. l.], v. 38, n. 3, p. 209–217, 1992.

SUTHERLAND, J. E. *et al*. The effect of restraint stress on prepulse inhibition and on corticotropin-releasing factor (CRF) and CRF receptor gene expression in Wistar-Kyoto and Brown Norway rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S. l.], v. 97, n. 2, p. 227–238, 2010.

SWANSON, L. W. *et al*. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: An immunohistochemical study. **Neuroendocrinology**, [S. l.], v. 36, n. 3, p. 156–186, 1983.

THURSTON, R. C.; REWAK, M.; KUBZANSKY, L. D. An Anxious Heart: Anxiety and the onset of cardiovascular diseases. **Progress in Cardiovascular Diseases**, [S. l.], v. 55, n. 6, 2013.

TOMEO, R. A. *et al*. Site-Specific Regulation of Stress Responses Along the Rostrocaudal Axis of the Insular Cortex in Rats. **Frontiers in Neuroscience**, [S. l.], v. 16, 2022.

TRAN, L.; SCHULKIN, J.; GREENWOOD-VAN MEERVELD, B. Importance of CRF receptor-mediated mechanisms of the bed nucleus of the stria terminalis in the processing of anxiety and pain. **Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 39, n. 11, p. 2633–2645, 2014.

UDDIN, L. Q. *et al*. Beyond the tripartite cognition-emotion-interoception model of the human insular cortex. **Journal of Cognitive Neuroscience**, [S. l.], v. 26, n. 1, 2014.

UDDIN, L. Q. Salience processing and insular cortical function and dysfunction. **Nature Reviews Neuroscience**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 55–61, 2015.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature Reviews Neuroscience**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 397–409, 2009.

VALE, W. *et al*. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and β-endorphin. **Science**, [S. l.], 1981.

VALE, W.; VAUGHAN, J.; PERRIN, M. Corticotropin-releasing factor (CRF) family of ligands and their receptors. **Endocrinologist**, [S. l.], v. 7, n. 1 SUPPL., 1997.

VAN LAEKEN, N. *et al*. Regional alterations of cerebral [18F]FDG metabolism in the chronic unpredictable mild stress- and the repeated corticosterone depression model in rats. **Journal of Neural Transmission**, [S. l.], v. 125, n. 9, p. 1381–1393, 2018.

VAN PETT, K. *et al*. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. **Journal of Comparative Neurology**, [S. l.], 2000.

VASCONCELOS, M. *et al*. Corticotropin-releasing factor receptor signaling and modulation: Implications for stress response and resilience. **Trends in Psychiatry and Psychotherapy**, [S. l.], v. 42, n. 2, p. 195–206, 2020.

VAVŘÍNOVÁ, A. *et al*. More efficient adaptation of cardiovascular response to repeated restraint in spontaneously hypertensive rats: the role of autonomic nervous system. **Hypertension Research**, [S. l.], v. 47, n. 9, 2024.

VERBERNE, A. J. M.; OWENS, N. C. Cortical modulation of the cardiovascular system. **Progress in Neurobiology**, [S. l.], v. 54, n. 2, p. 149–168, 1998.

VIANNA, D. M. L.; CARRIVE, P. Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. **European Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 21, n. 9, p. 2505–2512, 2005.

VICTOR, G. *et al*. The Global Burden of Cardiovascular Disease in Adults: A Mapping Review. **Journal of Cardiovascular Nursing**, [S. l.], 2025.

VIEIRA, J. O. *et al*. Sex differences in cardiovascular, neuroendocrine and behavioral changes evoked by chronic stressors in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 81, 2018.

VITORIO, A. S. *et al*. Evaluation of the posterior insular cortex involvement in anxiogenic response to emotional stress in male rats: Functional topography along the rostrocaudal axis. **Physiology and Behavior**, [S. l.], v. 258, 2023.

WATERS, R. P. *et al*. Evidence for the role of corticotropin-releasing factor in major depressive disorder. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 58, p. 63–78, 2015.

WEI, K. *et al*. Changes of the brain activities after chronic restraint stress in rats: A study based on 18F-FDG PET. **Neuroscience Letters**, [S. l.], v. 665, p. 104–109, 2018.

WILFRID JÄNIG. Impulse transmission through autonomic ganglia. In: **Integrative Action of the Autonomic Nervous System**. [S. l.]: Cambridge University Press, 2006. p. 211–250.

WOOD, S. K. Cardiac autonomic imbalance by social stress in rodents: Understanding putative biomarkers. **Frontiers in Psychology**, [S. l.], v. 5, n. Aug, 2014.

XIONG, P. *et al*. Trends in the incidence and DALYs of anxiety disorders at the global, regional, and national levels: Estimates from the Global Burden of Disease Study 2019. **Journal of Affective Disorders**, [S. l.], v. 297, 2022.

YANG, L. *et al*. The Effects of Psychological Stress on Depression. **Current Neuropharmacology**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 494–504, 2015.

YASUI, Y. *et al*. Autonomic responses and efferent pathways from the insular cortex in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, [S. l.], v. 303, n. 3, p. 355–374, 1991.

YOKOYAMA, C.; SASAKI, K. Regional expressions of Fos-like immunoreactivity in rat cerebral cortex after stress; restraint and intraperitoneal lipopolysaccharide. **Brain Research**, [S. l.], v. 816, n. 2, p. 267–275, 1999.

ZHANG, P. A. *et al*. Neonatal Maternal Deprivation Enhances Presynaptic P2X7 Receptor Transmission in Insular Cortex in an Adult Rat Model of Visceral Hypersensitivity. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, [S. l.], v. 23, n. 2, p. 145–154, 2017.

ZHANG, R.; DENG, H.; XIAO, X. The Insular Cortex: An Interface Between Sensation, Emotion and Cognition. **Neuroscience Bulletin**, [S. l.], v. 40, n. 11, 2024.

ZHAO, D. *et al*. The altered sensitivity of acute stress induced anxiety-related behaviors by modulating insular cortex-paraventricular thalamus-bed nucleus of the stria terminalis neural circuit. **Neurobiology of Disease**, [S. l.], v. 174, 2022.

ZHOU, J. *et al*. Global, Regional, and National Trends in the Burden of Anxiety Disorders From 1992 to 2021: An Age–Period–Cohort Analysis Based on the Global Burden of Disease Study 2021. **Depression and Anxiety**, [S. l.], v. 2025, n. 1, 2025.

ANEXO A – Artigo publicado

Reis-Silva, L. L., Tomeo, R. A., Barreto-de-Souza, L., Silva, G. A., Santos, A., Busnardo, C., & Crestani, C. C. (2026). Site-specific role of CRF1 receptors along the rostrocaudal axis of the insular cortex in cardiovascular responses evoked by acute and repeated restraint stress in rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 2026; 265.

Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical 265 (2026) 103403

Contents lists available at ScienceDirect

Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical

journal homepage: www.elsevier.com/locate/autneu

Site-specific role of CRF_1 receptors along the rostrocaudal axis of the insular cortex in cardiovascular responses evoked by acute and repeated restraint stress in rats

Lilian L. Reis-Silva, Rodrigo A. Tomeo, Lucas Barreto-de-Souza, Gabriela A. Silva, Adrielly Santos, Cristiane Busnardo, Carlos C. Crestani *

Laboratory of Pharmacology, São Paulo State University (UNESP), School of Pharmaceutical Sciences, Araraquara, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Cerebral cortex
Corticotropin releasing factor
Blood pressure
Emotional stress
Heart rate
Sympathetic activity

ABSTRACT

The present study investigated the contribution of corticotropin-releasing factor (CRF) neurotransmission acting through local CRF_1 receptors in the anterior (aIC), rostral–posterior (rpIC), and caudal–posterior (cpIC) subregions of the insular cortex (IC) to the modulation of cardiovascular responses during acute and repeated (10th session) restraint stress in rats. To this end, we performed targeted microinjections of the selective CRF_1 receptor antagonist CP376395 or the agonist CRF into the IC subregions; and assessed changes in arterial pressure, heart rate, and tail skin temperature (TST). We observed that microinjection of CP376395 into the aIC reduced tachycardia and enhanced TST drop during acute restraint stress, whereas the same pharmacological approach into the rpIC attenuated the pressor response and enhanced the TST drop. CRF_1 receptor antagonism within the cpIC decreased both pressor and tachycardiac responses during acute restraint stress, without affecting the TST drop. Comparisons between acutely and chronically stressed animals showed that repeated restraint stress altered CRF control of cardiovascular responses in the rpIC and cpIC, but not in the aIC. In chronically stressed animals, these alterations were primarily characterized by an attenuation of the effects observed with CRF_1 receptor antagonism, whereas local CRF administration elicited effects not observed in animals subjected to acute restraint. Repeated restraint stress did not alter CRF_1 receptor expression in any of the IC subregions. These results indicate that CRF neurotransmission in the IC plays a critical role in controlling cardiovascular responses to stress. This control is site-specific across rostrocaudal IC subregions and is affected by previous stress experience.

1. Introduction

Stress might be understood as a set of responses to internal and external challenges aimed at maintaining homeostasis (Fink, 2017; Sterling, 2012). The physiological responses involve a coordinated activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and the autonomic nervous system (ANS) (McEwen, 2007; Ulrich-Lai and Herman, 2009). The ANS response includes sympathetic activation, which produces cardiovascular changes such as elevated blood pressure (BP) and heart rate (HR) and blood flow redistribution (Crestani, 2016; Dampney, 2015; Dampney et al., 2008). These physiological effects are adaptative in the short-term, playing a critical role in survival and overall well-being (Crestani, 2016; Dhabhar, 2019; Sterling, 2012). However, repeated activation of these systems during chronic stress exposure causes several diseases and dysfunctions, including changes on cardiovascular function (Crestani, 2016; Dhabhar, 2019; McEwen, 2017, 2007). Consequences of chronic stress exposure might be related to changes in brain control of stress responses (Herman, 2013; Herman et al., 2016). Despite the importance of responses during acute stress and the dysfunctions that arise following chronic exposure to stressful events, the underlying neurobiological mechanisms remain poorly understood.

The insular cortex (IC) plays a prominent role in processing stress-related signals in humans and rodents (Benarroch, 2019; Lamotte et al., 2021). Accordingly, previous studies in rats described that the IC is involved in expression of cardiovascular responses induced by both

* Corresponding author at: Laboratory of Pharmacology, Department of Drugs and Pharmaceutics, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University - UNESP, Rodovia Araraquara-Jau Km 01 (Campus Universitário), Campus Ville, 14800-903, Araraquara, São Paulo, Brazil.
E-mail address: carlos.crestani@unesp.br (C.C. Crestani).

https://doi.org/10.1016/j.autneu.2026.103403
Received 19 January 2026; Received in revised form 25 February 2026; Accepted 5 March 2026
Available online 11 March 2026
1566-0702/© 2026 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).