



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação Farmácia-Bioquímica

LUCAS DA MATA LOPES

**ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DA NEUROTRANSMISSÃO DO FATOR DE
LIBERAÇÃO DE CORTICOTROFINA (CRF) DO CÓRTEX INSULAR NO
CONTROLE DE RESPOSTAS DO TIPO ANSIOSAS EM RATOS**

Araraquara, SP

2023

LUCAS DA MATA LOPES

**ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DA NEUROTRANSMISSÃO DO FATOR DE
LIBERAÇÃO DE CORTICOTROFINA (CRF) DO CÓRTEX INSULAR NO
CONTROLE DE RESPOSTAS DO TIPO ANSIOSAS EM RATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Farmácia Bioquímica da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara,
da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutico
Bioquímico.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani

Coorientadora: Lilian Lis Reis Silva

Araraquara, SP

2023

L864e Lopes, Lucas da Mata.
Estudo da participação da neurotransmissão do fator de liberação de corticotrofina (CRF) do córtex insular no controle de respostas do tipo ansiosas em ratos / Lucas da Mata Lopes. – Araraquara, 2023.
36 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Cursos (Graduação – Farmácia Bioquímica) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Carlos Cesar Crestani.
Coorientadora: Lilian Lis Reis Silva.

1. Ansiedade. 2. Córtex Insular. 3. Receptores CRF₁. 4. Neuropeptídeos. 5. Estresse. I. Crestani, Carlos Cesar, orient. II. Silva, Lilian Lis Reis. III. Título.

DEDICATÓRIA

A todos que me apoiaram nesta caminhada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, por seu apoio inabalável ao longo de minha jornada acadêmica.

Às minhas irmãs, por oferecerem suporte emocional valioso durante meu percurso.

A toda minha família, por incentivar e apoiar meus estudos.

Aos meus queridos colegas da república - André, Lucca e David - que proporcionaram não apenas aprendizado, mas também uma amizade eterna.

À República Várzea e a todos os moradores que enriqueceram minha vida com experiências incríveis.

À minha namorada, Bianca, por seu constante suporte e apoio.

Ao meu professor orientador, Carlos Cesar Crestani, por guiar meu projeto de iniciação científica e TCC.

À minha coorientadora, Lilian Reis, por auxiliar no desenvolvimento do projeto de iniciação científica e TCC.

Ao Laboratório de Farmacologia, por oferecer a oportunidade de realizar meu projeto científico.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia, por compartilharem seu conhecimento.

Ao Departamento de Fármacos e Medicamentos, por fornecer a estrutura necessária para o desenvolvimento do projeto científico.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (financiado pelo CNPq) por apoiar meu projeto científico.

Ao professor José Vanderlei Menani, por me dar a oportunidade de realizar minha primeira iniciação científica.

Ao Laboratório de Fisiologia, por proporcionar o ambiente para desenvolver meu projeto de iniciação científica.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia, por compartilharem seu conhecimento.

Ao Departamento de Fisiologia e Patologia, por fornecer a estrutura necessária para o desenvolvimento do projeto de iniciação científica.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, por sua contribuição inestimável à minha trajetória acadêmica e desenvolvimento técnico e comportamental.

A todos os professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, por proporcionarem conhecimento de alto nível.

Aos funcionários técnicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, por seu suporte constante às atividades da faculdade.

Aos funcionários da limpeza da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, por garantirem o funcionamento adequado da faculdade.

Ao Projeto Voluntário Vivárzea Solidária, por me ajudar a crescer como pessoa e retribuir à sociedade os privilégios da universidade pública.

Ao Centro Acadêmico de Ciências Farmacêuticas (CACIF), por proporcionar experiências que desenvolveram minhas habilidades sociais e geraram laços de amizade.

Ao Conselho das Entidades Representativas da Unesp Araraquara (CERUA), por proporcionar experiências que desenvolveram minhas habilidades técnicas e geraram laços de amizade.

À Bateria Universitária da Farmácia (Bateria), por proporcionar momentos de lazer e criar laços de amizade.

Aos estudantes da turma 88 de Farmácia na Unesp Araraquara, que fizeram parte de minha experiência acadêmica.

À minha amiga Vanessa Silva, por seu carinho constante e companhia ao longo de minha trajetória até a faculdade.

Ao Cursinho Objetivo e ao Cursinho Henfil, por fornecerem o conhecimento necessário para ingressar na universidade pública e pela oportunidade de fazer novos amigos.

Aos colegas de cursinho, por seu suporte emocional e por fazerem parte de minha trajetória.

RESUMO

Os transtornos de ansiedade estão associados ao comprometimento do desempenho em diversas atividades diárias, além de ocasionarem elevados custos econômicos. Dados de neuroimagem em humanos e estudos neurobiológicos em roedores sugerem envolvimento do córtex insular nessas doenças. No entanto, os mecanismos neuroquímicos locais envolvidos ainda são pouco compreendidos. Além disso, vários achados indicam que o controle de respostas fisiológicas e comportamentais pelo Córtex Insular ocorre de maneira sítio-específica ao longo do eixo rostrocaudal desta estrutura cortical. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o papel da neurotransmissão do fator liberador de corticotropina (CRF) nas sub-regiões anterior e posterior do Córtex Insular controle de comportamentos relacionados à ansiedade em ratos. Para isso, grupos independentes de animais receberam microinjeções bilaterais de veículo, o antagonista seletivo do receptor CRF_1 CP376395 ou CRF no Córtex Insular anterior ou posterior. Dez minutos depois, o comportamento no labirinto em cruz elevado (LCE) foi avaliado durante cinco minutos. O tratamento do Córtex Insular anterior com CP376395, mas não com CRF, aumentou o tempo e o número de entradas nos braços abertos do LCE. A microinjeção de CRF, mas não o antagonista do receptor CRF_1 , no Córtex Insular posterior também aumentou a exploração dos braços abertos do LCE. Em conjunto, estes dados indicam que a neurotransmissão CRFérgica no Córtex Insular anterior está envolvida na expressão de comportamentos relacionados à ansiedade. Este mecanismo neuroquímico não parece ser ativado no Córtex insular posterior durante a exposição ao LCE, mas os efeitos causados pela microinjeção do CRF indicam que a ativação dos receptores do CRF nesta sub-região do Córtex Insular pode causar efeitos comportamentais do tipo ansiolíticos.

Palavras-chave: ansiedade; Córtex Insular; receptores CRF_1 ; neuropeptídeos; estresse.

ABSTRACT

Anxiety disorders are associated with impaired performance in several daily activities, in addition to causing high economic costs. Neuroimaging data in humans and neurobiological studies in rodents suggest an involvement of the insular cortex (IC) in these diseases. However, the local neurochemical mechanisms involved are still poorly understood. Additionally, several findings indicate that the control of physiological and behavioral responses by the IC occurs in a site-specific manner along the rostrocaudal axis of this cortical structure. Thus, this study aimed to evaluate the role of corticotropin-releasing factor (CRF) neurotransmission within the anterior and posterior subregions of the IC in controlling anxiety-related behaviors. For this, independent groups of animals received bilateral microinjections of vehicle, the selective CRF₁ receptor antagonist CP376395 or CRF into either the anterior or posterior IC. Ten minutes later, the behavior in the elevated plus maze (EPM) was evaluated for five minutes. Treatment of the anterior IC with CP376395, but not with CRF, increased the time and number of entries into the open arms of the EPM. CRF, but not the CRF₁ receptor antagonist, microinjected into the posterior IC also increased exploration of the EPM open arms. Taken together, these data indicate that CRFergic neurotransmission in the anterior IC is involved in the expression of anxiety-related behaviors. This neurochemical mechanism does not seem to be activated within the posterior IC during exposure to the EPM, but the effects caused by CRF microinjection indicate that activation of CRF receptors in this IC subregion might evokes anxiolytic-like effects.

Keywords: ansiedade; Córtex Insular; receptores CRF₁; neuropeptídeos; estresse.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Localização do córtex insular no cérebro humano e de camundongo.....	17
Figura 2 – Locais de microinjeções nas sub-regiões anterior e posterior do Córtex Insular.....	23
Figura 3 – Papel da neurotransmissão CRFérgica no Córtex Insular posterior controlando comportamentos do tipo ansioso no LCE.....	24
Figura 4 – Papel da neurotransmissão CRFérgica no Córtex Insular anterior controlando comportamentos do tipo ansioso no LCE.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IC: Córtex Insular

CRF: Fator Liberador de Corticotropina (Corticotropin-Releasing Factor em inglês)

CP376395: antagonista do receptor CRF_1 usado na pesquisa.

LCE: Labirinto de cruz elevada

C: Córtex Insular

CRF: Fator Liberador de Corticotropina

EPM: Elevated Plus Maze (Labirinto Elevado em Cruz)

BLA: Amígdala Basolateral

CeA: Núcleo Central da Amígdala

NMDA: Ácido N-Metil-D-Aspartato

HPA: Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

CRF_1 : Receptor CRF_1 , um tipo de receptor que

NaCl: Cloreto de sódio (solução salina)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	18
3. JUSTIFICATIVA	18
4.1 Animais.....	18
4.2 Preparação cirúrgica	19
4.3 Análise comportamental no labirinto em cruz elevado (LCE)	19
4.4 Microinjeção intracerebral de drogas	20
4.5 Determinação histológica de locais de microinjeção no encéfalo	20
4.6 Fármacos e soluções	21
4.7 Análise estatística	21
4.8 Desenho experimental.....	21
5. RESULTADOS	22
5.1 – Papel da neurotransmissão CRFérgica no Córtex Insular anterior controlando o comportamento do tipo ansioso.....	23
5.2 – Papel da neurotransmissão CRFérgica no Córtex Insular posterior controlando o comportamento do tipo ansioso	24
6. DISCUSSÃO	25
7. CONCLUSÃO	29
8. REFERÊNCIAS	30

1.INTRODUÇÃO

A ansiedade é caracterizada por um estado de humor voltado para o futuro, associado à preparação para eventos futuros negativos (BALE; VALE, 2004). Os transtornos de ansiedade estão associados a um desempenho prejudicado em diversas situações e altos custos econômicos (MÜLLER; GUIMARÃES, 2007). Além disso, transtornos de ansiedade podem levar a um risco aumentado de morbidade e mortalidade de outras doenças, como por exemplo doenças cardiovasculares (ALBERT et al., 2005; KAWACHI et al., 1994; SMOLLER et al., 2007).

Ansiedade refere-se à antecipação de uma preocupação futura e está mais associada à tensão muscular e comportamento de evitar. O medo é uma resposta emocional a uma ameaça imediata e está mais associado a uma reação de luta ou fuga - seja para lutar ou sair para escapar do perigo (BALE; VALE, 2004). A síndrome do pânico é um tipo de transtorno de ansiedade. A pessoa sente um medo repentino e intenso que provoca um ataque de pânico. Durante um ataque de pânico, ela pode começar a suar, ter dor no peito e batimento cardíaco acelerado (palpitações). Às vezes, pode sentir que está se sufocando ou tendo um ataque cardíaco (MÜLLER; GUIMARÃES, 2007).

A ansiedade é uma emoção normal. É a maneira do cérebro reagir ao estresse e alertar a pessoa sobre o perigo potencial que está por vir. Todo mundo se sente ansioso de vez em quando. Por exemplo, a pessoa pode se preocupar ao se deparar com um problema no trabalho, antes de fazer um teste ou antes de tomar uma decisão importante (ALBERT et al., 2005). A ansiedade ocasional é natural, mas os transtornos de ansiedade são diferentes. Eles são um grupo de doenças mentais que causam ansiedade e medo constantes e avassaladores. A ansiedade excessiva pode fazer com que a pessoa evite o trabalho, a escola, as reuniões familiares e outras situações sociais que possam desencadear ou agravar seus sintomas (SMOLLER et al., 2007). Apesar da importância dos transtornos de ansiedade e de respostas ansiogênicas, os mecanismos neurobiológicos relacionados, principalmente os mecanismos encefálicos neuroquímicos, não são completamente compreendidos.

O córtex insular [do inglês, *insular cortex* (IC)] é uma estrutura do sistema nervoso central (SNC) que possui integração anatômica com regiões corticais e subcorticais do cérebro, e através dessas conexões participa no controle de funções

sensoriais, emocionais, motivacionais e cognitivas. Nessa estrutura, chegam informações sensitivas tanto de dentro quanto de fora do corpo, incluindo, por exemplo, informações auditivas, somatossensoriais, olfativas, gustativas, visuais e informações interoceptivas (GOGOLLA, 2017). Nesse sentido, o Córtex Insular tem um papel importante na integração da sensação interoceptiva na experiência subjetiva (CRAIG, 2003, HARRIS et al., 2009). Dessa forma, o Córtex Insular pode integrar informações límbicas de diversas estruturas (AUGUSTINE, 1996; NIEUWENHUYS, 2012; UDDIN, 2015; GOGOLLA, 2017). Embora haja diferenças na localização, existe grande semelhança na cito arquitetura, conexões e funções do Córtex Insular em humanos e roedores (Figura 1 B). Em humanos, o Córtex Insular é encontrado na altura do sulco lateral de cada hemisfério, inferior aos lobos frontal, parietal e temporal. Já em roedores, o Córtex Insular está localizado na superfície lateral dos hemisférios, e acima da metade rostral do sulco rinal (Figura 1 A) (MORAGA-AMARO; STEHBERG, 2012; GOGOLLA, 2017; NAMKUNG et al, 2017).

Um circuito envolvendo a amígdala, córtex pré-frontal e o hipocampo tem sido um ponto focal para modelos recentes de transtornos de ansiedade (DECKERSBACH; DOUGHERTY; RAUCH, 2006). Conexões anatômicas entre o Córtex Insular e essas estruturas límbicas sugerem uma participação do Córtex Insular no desenvolvimento de ansiedade patológica (PAULUS; STEIN, 2006). De fato, há evidências de funcionamento alterado do Córtex Insular em pacientes com transtornos de ansiedade, em que foi notado um aumento do fluxo sanguíneo cerebral (RAUCH et al., 1997), enquanto pacientes com fobia social apresentaram redução do fluxo sanguíneo no Córtex Insular durante uma fala em público (LORBERBAUM et al., 2004). Pacientes com transtorno de ansiedade generalizada mostraram uma redução da atividade no Córtex Insular após a redução dos sintomas com administração citalopram (HOEHN-SARIC et al, 2004). Baseado nessas evidências, a atividade do Córtex Insular durante o desempenho de tarefas emocionais foi proposta como um biomarcador para identificar transtornos de ansiedade (PAULUS; STEIN, 2006; SIMMONS et al., 2011).

Estudos de neuroimagem em humanos indicaram a sub-região anterior como um local importante no Córtex Insular envolvido na expressão de emoções (BENARROCH, 2019; GU et al., 2013; KURTH et al., 2010). Estudos em roedores indicaram que o controle dos comportamentos relacionados à ansiedade parece ocorrer de maneira sítio- específica ao longo do eixo rostrocaudal do Córtex Insular

(DE PAIVA et al, 2021; MÉNDEZ-RUETTE et al., 2019; FENG et al, 2020; VITORIO et al, 2023). Por exemplo, foi relatado que a lesão excitotóxica ou antagonismo de receptores glutamatérgicos não-NMDA na sub-região anterior do Córtex Insular causou efeitos do tipo ansiolíticos no labirinto em cruz elevado (LCE) (MÉNDEZ-RUETTE et al., 2019; SHI et al., 2020), enquanto o antagonismo de receptores não-NMDA no Córtex Insular posterior causou efeito comportamental do tipo ansiogênico (MÉNDEZ-RUETTE et al., 2019). Apesar dessas evidências, os mecanismos neuroquímicos locais envolvidos no envolvimento do Córtex Insular no controle de comportamentos relacionados à ansiedade são pouco compreendidos.

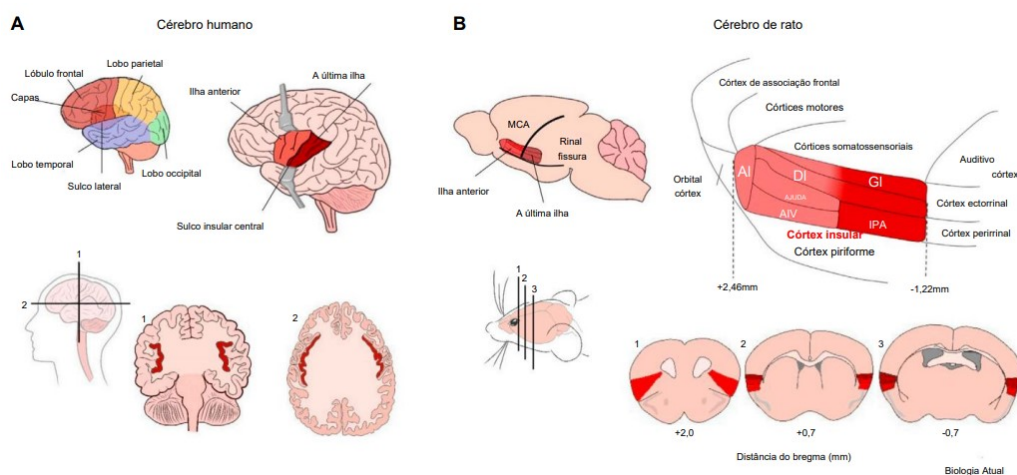
O fator liberador de corticotropina (CRF) foi identificado primeiramente no hipotálamo, cuja função é regular a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na hipófise anterior (SPIESS et al., 1981).

Estudos seguintes evidenciaram a presença de CRF e seus receptores em outras regiões do encéfalo (PHELIX; PAULL, 1990; REUL; HOLSBOER, 2002). Atuando nessas regiões, O CRF está envolvido no controle de respostas independentes do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), incluindo a regulação de comportamentos defensivos (DEDIC et al., 2017; DEUSSING et al., 2018).

O sistema “CRFérgico” e seus mecanismos de regulação do eixo HPA estão retratados de forma detalhada na literatura. Esse sistema dispõe de 4 neurotransmissores endógenos identificados como CRF, urocortina 1, urocortina 2 e urocortina 3, sendo os efeitos de todos os neurotransmissores mediados pela ativação de dois receptores denominados receptores CRF₁ e CRF₂ (BALE; VALE, 2004; HAUGER et al., 2003; DEDIC et al., 2017). Entretanto, os neurotransmissores do sistema CRFérgico possuem afinidade diferente aos dois receptores. O CRF tem maior afinidade ao receptor CRF₁; a urocortina 2 e a urocortina 3 tem maior afinidade ao receptor CRF₂; enquanto a urocortina 1 tem afinidade similar aos dois receptores (BALE; VALE, 2004; HAUGER et al., 2003; RENCKENS et al., 2016; DEDIC et al., 2017).

Estudos apontam que a ativação do receptor CRF₁ desencadeia respostas comportamentais do tipo ansiogênicas (HAUGER et al., 2003). Nesse sentido, circuitos contendo o sistema CRFérgico têm uma função importante na fisiopatologia da ansiedade (REULEHOLSBOER, 2002).

O receptor CRF1 é amplamente expresso no sistema nervoso central, e sua expressão foi amplamente identificada em várias regiões do córtex cerebral, incluindo o IC (POTTER et al., 1994; CHALMERS et al., 1996; HENCKENS et al., 2016; DEUSSING; CHEN, 2018). Por outro lado, a expressão do receptor CRF2 é mais localizada, e a expressão desse receptor não foi reportada no córtex cerebral de ratos (VAN PETT et al., 2000; CHALMERS et al., 1996; HENCKENS et al., 2016; DEUSSING; CHEN, 2018) de modo que o CRF parece ser o principal ligante endógeno do receptor CRF1 no córtex cerebral (HENCKENS et al., 2016). Neste contexto, o CRF é um potencial neurotransmissor chave da interocepção no Córtex Insular (NAQVI; BECHARA, 2009). Contudo, um possível envolvimento da neurotransmissão CRFérgica local no controle comportamental de respostas relacionadas à ansiedade pelo Córtex Insular nunca foi relatada. *Portanto, a hipótese do presente estudo é que o envolvimento do Córtex Insular em respostas comportamentais do tipo ansiosa seja mediada pela ativação do receptor CRF₁ no Córtex Insular, e esse controle ocorra de maneira distintas nas porções anterior e posterior do Córtex Insular.*



(Gogolla, 2017)

Figura 1. Localização do córtex insular no cérebro humano e de camundongo– (A) Anatomia do cérebro humano. Canto superior esquerdo: a ínsula é dobrada abaixo do sulco lateral e escondida pelos opérculos (área sombreada) dos lobos frontal, parietal e temporal. Canto superior direito: quando os lobos temporal e parietal são afastados, a ínsula subjacente pode ser vista; é separado em uma parte anterior e outra posterior pelo sulco insular central. Abaixo: Seções transversais coronais (1) e horizontal (2) do cérebro humano revelam aposição do córtex insular (vermelho). (B) Canto superior esquerdo: no camundongo, a ínsula fica exposta na superfície lateral do cérebro, acima da fissura rinal. A artéria cerebral medial (MCA) atravessa a ínsula. Canto superior direito: subdivisões e regiões corticais vizinhas da ínsula do rato. AI, córtex insular

agranular; AID, córtex insular agranular, parte dorsal; AIV, córtex insular agranular, parte ventral; AIP, córtex insular agranular, parte posterior; DI, córtex insular disgranular; GI, córtex insular granular. Parte inferior: secções transversais coronais em diferentes níveis revelam a localização e as camadas do córtex insular do rato.

2. OBJETIVOS

O objetivo desse estudo foi investigar a participação da neurotransmissão CRFérgica no Córtex Insular anterior e posterior, atuando via o receptor CRF_1 , no controle de respostas comportamentais relacionadas à ansiedade.

3. JUSTIFICATIVA

O tema se justificou porque se promoveu avanço na compreensão dos mecanismos neurobiológicos envolvidos nas complicações comportamentais relacionadas à ansiedade, além de ilustrar que as porções anterior e posterior do Córtex Insular atuam de maneira diferente no controle desses comportamentos.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados 51 ratos Wistar com peso corporal entre 240-250 g (60 dias pós Natal) fornecidos pelo Biotério Central da UNESP (Botucatu, SP, Brasil). Os animais foram ambientados no Biotério do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP (FCFAR-UNESP; Araraquara, SP) por um período de sete dias antes do início dos procedimentos experimentais. Os animais tiveram acesso livre à ração granulada e água durante todo o protocolo (exceto durante os breves períodos de teste), e foram mantidos em salas climatizadas (temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade $50 \pm 10\%$) com ciclo claro-escuro 12-12h (luz 7:00h–19:00h). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCFAR-UNESP (aprovação # 20/2021).

4.2 Preparação cirúrgica

Os animais foram submetidos à anestesia inalatória com isoflurano (2,5%) utilizando vaporizadores de baixo fluxo (Bonther, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil). Depois da tricotomia, a cabeça do rato foi imobilizada em um aparelho estereotáxico (Stoelting, Wood Dale, Illinois, EUA). Para anestesia local e redução do sangramento, foi injetado por via subcutânea 0,3 ml de solução de lidocaína com vasoconstrictor (2% lidocaine + 3% phenylephrine, Harvey Química Farmacêutica Ind. E Comércio Ltda, Catanduva, São Paulo, Brazil). Então, o crânio foi exposto através de uma incisão na pele e a região foi limpa com solução salina e peróxido de hidrogênio a 10%. Todas as coordenadas para implantação do guia cânulas direcionadas para o Córtex Insular anterior ou posterior foram baseadas em parâmetros obtidos do atlas do cérebro de rato de Paxinos e Watson (1997). As coordenadas estereotáxicas foram ântero-posterior: +10,5 mm (Córtex Insular anterior) ou +6,9 mm (Córtex Insular posterior) em relação à interaural; lateral: +3,8 mm (Córtex Insular anterior) ou +6,2 mm (Córtex Insular posterior) a partir da sutura média; vertical: -4,5 mm (Córtex Insular anterior) ou -6,0 mm (Córtex Insular posterior) em relação ao crânio. Após posicionar a cânula de aço inoxidável (26 G, 12 mm), pequenos furos foram feitos no crânio com uma broca dentária, por onde foram introduzidas as cânulas (bilateralmente). As cânulas foram fixadas ao crânio com resina acrílica autopolimerizável. (Simplex, DFL, Ind. Com., Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) e pequenos parafusos de aço foram previamente implantados no crânio para fixação da resina. Um mandril com diâmetro de 0,2 mm foi introduzido nas cânulas para evitar obstrução durante o período de recuperação. Como medida profilática, após o término do procedimento cirúrgico os animais receberam 0,2 mL de pentabiótico veterinário (Fountoura-Wyeth, São Paulo, Brasil) por via intramuscular e 0,3 mL do antiinflamatório não esteroide flunexinameglumina por via subcutânea. Os animais foram mantidos em recuperação por pelo menos quatro dias após o procedimento cirúrgico.

4.3 Análise comportamental no labirinto em cruz elevado (LCE)

O LCE foi utilizado para avaliar os efeitos do tratamento farmacológico do Córtex Insular sobre comportamentos relacionados à ansiedade (PELLOW; CHOPIN; FILE e BRILEY, 1985; GOMES-DE-SOUZA et al., 2021; BARRETTO-DE-SOUZA et al., 2022; GOUVEIA et al., 2016). O aparato utilizado para o teste foi composto por dois braços abertos e dois braços fechados, com 50 cm de comprimento e 10 cm de largura cada, unidos perpendicularmente e elevado a 50 cm do solo. Os braços fechados possuíam paredes de 40 cm de altura que os cercava, e os braços abertos tinham uma borda lateral de acrílico de 1 cm para evitar que a queda dos animais do aparato.

Os roedores evitam os braços abertos e medicamentos ansiolíticos normalmente aumentam a exploração de braços abertos, porém sem interferir no número de entradas em braços fechados (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Assim, no presente estudo o número de entradas nos braços abertos e fechados e o tempo gasto nos braços abertos foram quantificados. No intervalo entre os testes para cada animal, o labirinto foi limpo com solução de álcool (20%). O comportamento foi registrado por um período de 5 minutos e as medidas foram realizadas automaticamente usando o software Anymaze (Stoelting, Wood Dale, IL, EUA)

4.4 Microinjeção intracerebral de drogas

As agulhas de injeção (33 G, SmallParts, Miami Lakes, Flórida, EUA) utilizadas para a microinjeção intracerebral das drogas foram 1 mm mais longa do que as cânulas-guia previamente fixadas ao crânio, e foram conectadas a uma seringa de 2 µl (7002-KH, Hamilton Co., Reno, NV, EUA) através de um tubo de polietileno (PE-10) (Clay Adams, Parsippany, NJ, EUA). As drogas foram injetadas em volume de 100 nL/hemisfério (ALVES et al., 2013; VITORIO et al., 2023; TOMEO et al., 2022).

4.5 Determinação histológica de locais de microinjeção no encéfalo

Ao final de cada experimento os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg, ip) e 100 nL de corante azul de Evans (1%) foram injetados bilateralmente para determinação do sítio de microinjeção no encéfalo. Em seguida, os ratos foram perfundidos e o encéfalo foi removido e pós-fixados em formalina a 10% por pelo

menos 48 horas a 4 °C. Posteriormente, o encéfalo foi seccionado em cortes frontais de 40 µm de espessura usando um criostato (CM1900, Leica, Wetzlar, Alemanha) para análise dos sítios de microinjeção. A localização da microinjeção foi determinada em um microscópio óptico de acordo com o atlas cerebral de rato de Paxinos e Watson (1997).

4.6 Fármacos e soluções

O CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF₁) (Tocris, West-woods Busines Park, Ellisville, Missouri, EUA), o fator liberador de corticotropina (CRF) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e a uretana (Sigma-Aldrich) foram dissolvidas em solução salina (0,9% NaCl). O pentabiótico veterinário (Fort-Dodge, Campinas, SP, Brasil), o isoflurano (Cistrália, Itapira, São Paulo, Brazil) e o anti-inflamatório não-esteroidal (flunixinameglumina Banamine, Schering Plough, Cotia, SP, Brasil) foram utilizados conforme fornecidos pelos fabricantes. As drogas foram injetadas no volume de 100nL/lado (ALVES et al, 2010, 2014; MARINS et al, 2016).

4.7 Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (LCE). Todos os dados foram analisados utilizando o software GraphPadPrism versão 7.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Todos os parâmetros comportamentais no LCE foram comparados usando ANOVA monofatorial. Quando a ANOVA indicou diferenças estatísticas, o pós-teste de Bonferroni foi usado para avaliar diferenças específicas entre os grupos experimentais. Resultados com $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.8 Desenho experimental

Grupos independentes de animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas-guia bilaterais direcionadas para as sub-regiões anterior ou posterior do Córtex Insular baseadas no atlas de Paxinos & Watson (1997), e depois foram mantidos em recuperação por pelo menos quatro dias.

Definições do Córtex Insular rostrocaudal sub-regiões foram baseadas em estudos anteriores (TOMEIO et al. 2022; OPPENHEIMER; CECETTO 2016; SAPER 1982; MARINS et al. 2016; MARINS et al. 2021; GEHRLACH et al. 2020). No dia do teste, os animais foram levados para a sala de ensaio pelo menos 60 minutos antes do início do experimento para habituação às condições da sala. Após o período de habituação, grupos independentes de animais receberam microinjeções bilaterais do antagonista seletivo do receptor CRF_1 CP376395 (5nmol/100nL), CRF (0,07nmol/100nL) ou veículo (solução salina, 100nL) nas sub-regiões anterior ou posterior do Córtex Insular (OLIVEIRA; ALMEIDA; BENINI; CRESTANI, 2015). Dez minutos após o tratamento com CRF_1 CP376395 (5nmol/100nL), CRF (0,07nmol/100nL) ou veículo (solução salina, 100nL) no Córtex Insular, os animais foram colocados individualmente no LCE por 5 minutos para avaliar comportamentos relacionados à ansiedade.

5.RESULTADOS

Representações diagramáticas de secções coronais baseadas no atlas cerebral de ratos de Paxinos e Watson (1997) mostrando locais de microinjeção nas sub-regiões anterior e posterior do Córtex Insular de todos os animais incluídos no presente estudo são apresentadas na Figura 1. A Figura 1 também mostra fotomicrografias de secções coronais do cérebro de animais representativos ilustrando sítios de microinjeções bilaterais no Córtex Insular anterior e posterior.

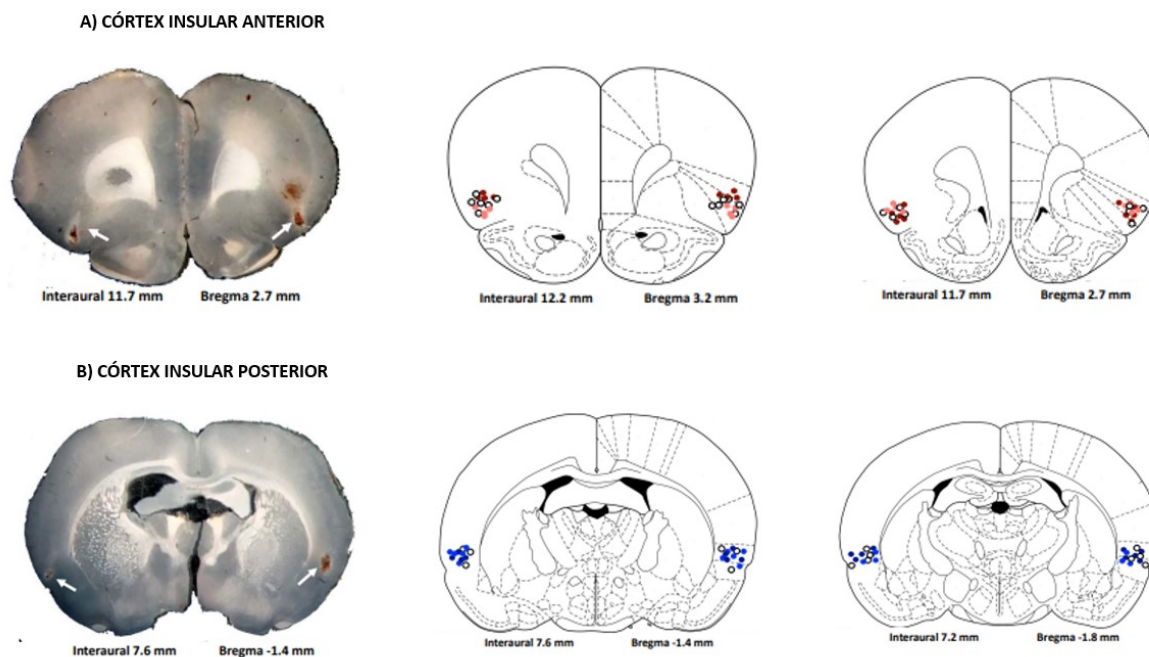


Figura 2 – Sítios de microinjeções nas sub-regiões anterior e posterior do Córtex Insular. **(Superior)** Fotomicrografias de secções coronais do cérebro representando os sítios de microinjeção de animais representativos nas sub-regiões anterior (A) e posterior (B) do Córtex Insular. As setas indicam os sítios de microinjeção. **(Inferior)** Representações diagramáticas modificadas do Atlas cerebral de ratos de Paxinos e Watson 1997 indicando os sítios de microinjeção na sub-região anterior (imagens à esquerda) e posterior (imagens à direita) do Córtex Insular de veículo (círculos brancos), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF1; Córtex Insular anterior: círculos laranja; posterior Córtex Insular: círculos azuis claros) e CRF (Córtex Insular anterior: círculos vermelhos; Córtex Insular posterior: círculos azuis escuros) de todos os animais utilizados no presente estudo. Os números indicam as distâncias em relação à interaural e ao bregma.

5.1 – Papel da neurotransmissão CRFérgica no Córtex Insular anterior controlando o comportamento do tipo ansioso

A análise do percentual de tempo ($F(2,24)=3,7$, $P=0,0384$) e entradas ($F(2,24)=4,429$, $P=0,0231$) nos braços abertos do LCE indicou uma diferença entre os grupos experimentais (Fig. 2). O pós-teste revelou que o antagonismo do receptor CRF1 no Córtex Insular anterior, causado pela microinjeção local de CP376395 ($n = 8$), aumentou o tempo ($P=0,0498$) e o número de entradas ($P=0,0174$) nos braços abertos, quando comparado aos animais que receberam microinjeção bilateral de veículo no Córtex Insular ($n=10$) (Fig. 2). A análise não indicou efeito no tempo ($P>0,05$) e no número de entradas ($P>0,05$) nos braços

abertos em animais que receberam CRF ($n = 9$) no Córtex Insular anterior (Fig. 2). Análise do número de entradas nos braços fechados do LCE também não indicou diferenças entre os grupos experimentais ($F(2,24) = 1,04, P = 0,3689$) (Fig. 2).

CÓRTEX INSULAR ANTERIOR

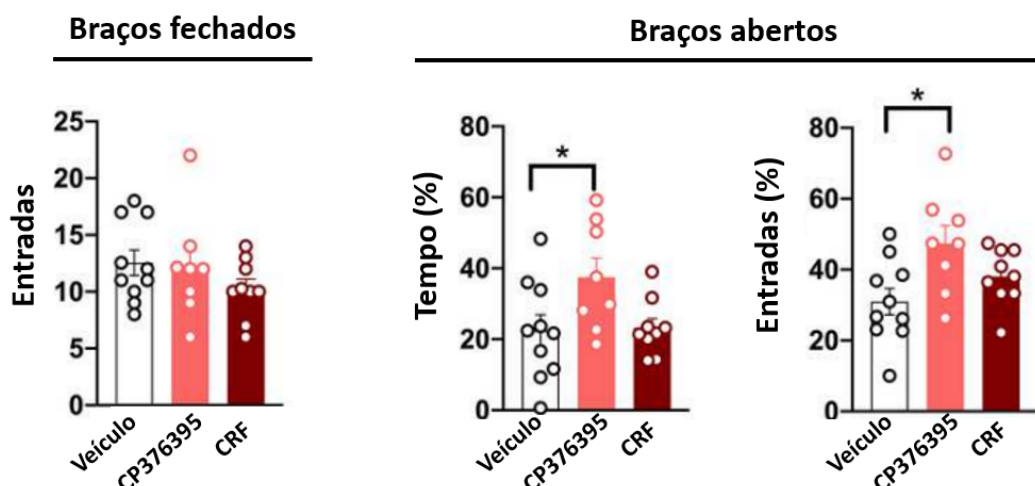


Figura 3 – Papel da neurotransmissão CRFérgica no Córtex Insular anterior controlando comportamentos relacionados à ansiedade no LCE. Efeito da microinjeção bilateral de veículo ($n=10$, solução salina, 100 nL), do antagonista seletivo do receptor CRF1 (CP376395, $n=8$, 5 nmol/100 nL) ou CRF ($n = 9$, 0,1 nmol/100 nL) na sub-região anterior do Córtex Insular na exploração dos braços abertos e fechados do LCE. O tratamento do Córtex Insular anterior foi realizado 10 minutos antes da exposição ao LCE. As barras representam a média $\pm$ SEM. * $P < 0,05$ em relação ao grupo veículo. ANOVA monofatorial seguida do pós-teste de Bonferroni

5.2 – Papel da neurotransmissão CRFérgica no Córtex Insular posterior controlando o comportamento do tipo ansioso

A análise do percentual de tempo ($F(2,21) = 4,29, P = 0,0272$) e entradas ($F(2,21) = 4,13, P = 0,0307$) nos braços abertos do LCE indicou uma diferença entre os grupos experimentais. O pós-teste revelou que a ativação de receptores CRF no Córtex Insular posterior através de microinjeção local de CRF ($n = 9$) aumentou o tempo ($P = 0,0247$) e o número de entradas ($P = 0,0258$) nos braços abertos, quando comparado aos animais que receberam microinjeção local de veículo ($n=7$) (Fig. 3). A análise não indicou nenhum efeito no tempo ($P > 0,05$) ou no número de entradas ($P > 0,05$) nos braços abertos em animais tratados com o antagonista seletivo do

receptor CRF_1 (CP376395) no Córtex Insular posterior (n=8) (Fig. 3). Análise do número de entradas nos braços fechados do LCE também não indicou diferença entre os grupos experimentais ($F(2,21) = 0,98$, $P = 0,3693$) (Fig. 3).

CÓRTEX INSULAR POSTERIOR

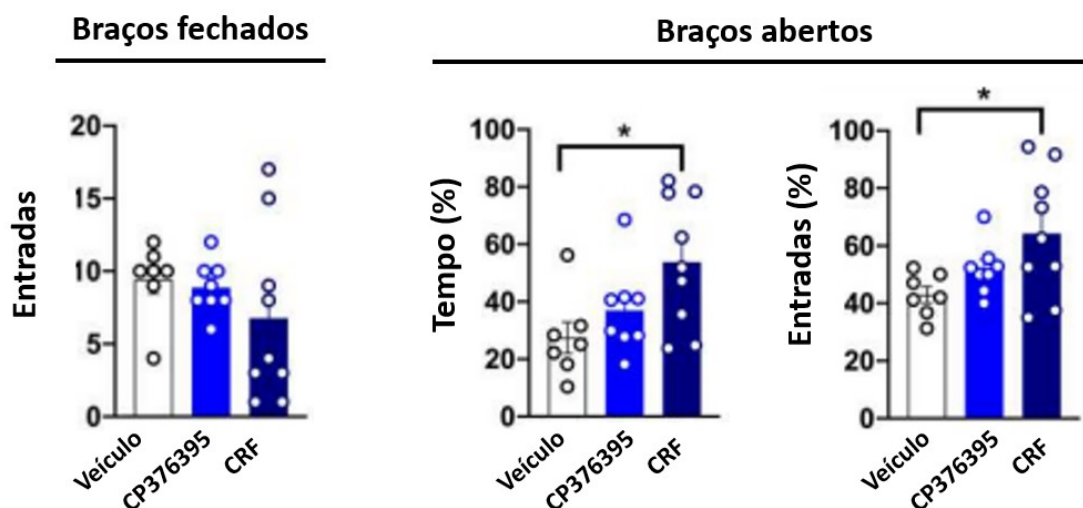


Figura 4 - Papel da neurotransmissão CRFérgica no Córtex Insular posterior controlando comportamentos do tipo ansioso no LCE. Efeito da microinjeção bilateral de veículo (n=7, solução salina, 100 nL), do antagonista seletivo do receptor CRF_1 (CP376395, n=8, 5 nmol/100 nL) ou CRF (n = 9, 0,1 nmol/100 nL) na sub-região posterior do Córtex Insular na exploração dos braços abertos e fechados do LCE. O tratamento do Córtex Insular posterior foi realizado 10 minutos antes da exposição ao LCE. As barras representam a média $\pm$ SEM. * $P < 0,05$ em relação ao grupo veículo. ANOVA monofatorial seguida de pós-teste de Bonferroni

Em comparação entre grupos que receberam injeção de salina na porção anterior e porção posterior do Córtex Insular, não foi observada nenhuma diferença estatística.

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo constituem a primeira evidência de que o controle de comportamentos relacionados à ansiedade pela neurotransmissão CRFérgica local é específica ao longo do eixo rostrocaudal do Córtex Insular. De fato, os nossos dados sugerem que a ativação dos receptores CRF_1 na sub-região anterior do Córtex Insular está envolvida na expressão de comportamentos relacionados à ansiedade no LCE. Por outro lado, a ativação de receptores

CRFérgicos na sub-região posterior do Córtex Insular é capaz de causar efeitos do tipo ansiolítico.

A neurotransmissão do sistema CRFérgico atuando através dos receptores CRF₁ tem sido descrita como um importante mecanismo neuroquímico cerebral relacionado à expressão de respostas comportamentais do tipo ansiosas (VASCONCELOS et al., 2020; REUL; HOLSBOER, 2002; CONTARINO et al., 1999; HAUGER, 2003; DEDIC et al., 2018). Nesse sentido, nossos dados fornecem novas evidências indicando a sub-região anterior do Córtex Insular como um local cerebral relacionado ao controle da expressão de comportamentos de ansiedade pela neurotransmissão CRFérgica. As evidências obtidas no presente estudo estão de acordo com evidências anteriores que indicaram um relevante papel do Córtex Insular anterior na ansiedade. Nesse sentido, estudos de neuroimagem em humanos indicaram a sub-região anterior como um local importante no Córtex Insular envolvido na expressão de emoções (BENARROCH, 2019; Gu et al., 2013; KURTH et al., 2010). Estudos em roedores também identificaram que a lesão eletrolítica ou o antagonismo de receptores de glutamato não-NMDA no Córtex Insular anterior causaram efeitos do tipo ansiolítico no LCE (MÉNDEZ-RUETTE et al., 2019; SHI et al., 2020), enquanto a ativação quimiogénética causou efeito do tipo ansiogênico em animais previamente submetidos ao estresse de restrição (ZHAO et al., 2022). Nesse sentido, os dados obtidos no presente estudo fornecem novas evidências indicando a neurotransmissão CRFérgica como um importante mecanismo neuroquímico local envolvido no controle de comportamentos relacionados à ansiedade pelo Córtex Insular anterior. No entanto, deve-se notar que o Córtex Insular anterior não parece estar envolvido em todas as manifestações de respostas de ansiedade, uma vez que a inibição química desta região não afetou respostas comportamentais (isto é, congelamento) condicionadas ao tom ou ao contexto (de PAIVA; BUENO; DOS SANTOS CORRÊA; OLIVEIRA; FERREIRA; FORNARI, 2021).

Em relação à sub-região posterior do Córtex Insular, observamos que o tratamento farmacológico com o antagonista do receptor CRF₁ não causou alterações comportamentais no LCE. No entanto, a microinjeção bilateral de CRF aumentou a exploração dos braços abertos do LCE, o que indica um efeito do tipo ansiolítico. A falta de efeito do antagonismo do receptor CRF₁ sugere que a neurotransmissão CRFérgica parece não ser recrutada no Córtex Insular posterior

durante a exposição ao LCE. Uma outra hipótese para este resultado é de que existem estímulos mais expressivos que contribuem para que o animal se mantenha neste estado. Nossos achados corroboram com evidências anteriores de que a lesão eletrolítica no Córtex Insular posterior não afetou o comportamento no LCE (SHI; FENG; WEI; ZHOU, 2020); embora esta sub-região do Córtex Insular tenha um papel importante na expressão da resposta de congelamento relacionada ao medo condicionado (de PAIVA et al, 2021; FOILB et al, 2016). No entanto, a mudança na exploração dos braços abertos após a ativação farmacológica de receptores CRFérgicos através da microinjeção local de CRF indica que esse mecanismo neuroquímico pode gerar efeitos ansiolíticos no Córtex Insular posterior. Assim, embora nossos dados indiquem que a neurotransmissão CRFérgica no Córtex Insular posterior não é recrutada para a expressão da ansiedade inata, pode estar envolvida na modulação de respostas ansiogênicas causadas por estímulos que ativam os mecanismos CRFérgicos no córtex cerebral. Nesse sentido, os mecanismos CRFérgicos cerebrais são ativados durante o estresse emocional em várias regiões do cérebro, incluindo o córtex cerebral (DEUSSING; CHEN, 2018; JOËLS; BARAM, 2009). Assim, mais estudos são necessários para explorar um possível papel modulador da neurotransmissão CRFérgica no Córtex Insular posterior em respostas ansiogênicas evocadas pelo estresse.

Em conjunto, os resultados aqui relatados indicam um papel oposto da neurotransmissão CRFérgica nas sub-regiões anterior (papel ansiogênico) e posterior (papel ansiolítico) do Córtex Insular controlando comportamentos no LCE. As descobertas do presente estudo são semelhantes em relação aos obtidos anteriormente após o antagonismo de receptores glutamatérgicos não-NMDA no Córtex Insular (MÉNDEZ-RUETTE et al., 2019). De fato, os resultados obtidos neste estudo anterior evidenciaram um envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica no Córtex Insular anterior na expressão de comportamentos relacionados à ansiedade no LCE, enquanto um papel ansiolítico foi identificado no Córtex Insular posterior (MÉNDEZ-RUETTE et al., 2019). Este controle oposto parece estar relacionado a diferentes conexões das sub-regiões do Córtex Insular. Um estudo que avaliou sistematicamente conexões de diferentes sítios ao longo do eixo rostrocaudal do Córtex Insular identificaram diferenças nas projeções das sub-regiões anterior versus posterior (GEHRLACH et al., 2020). Nesse sentido, foi relatado que o papel do Córtex Insular anterior, mas não do Córtex Insular posterior,

no controle comportamental no LCE parece estar relacionado a projeções para a amígdala basolateral (BLA) (SHI et al, 2020), enquanto o controle da ansiedade pelo Córtex Insular posterior parece ser mediado principalmente pela conexão com o núcleo central da amígdala (CeA) (GEHRLACH et al, 2019). Foi relatado que a expressão das respostas de ansiedade no LCE está relacionada a um aumento na atividade neuronal no Córtex Insular posterior, de modo que uma exploração aumentada do braço aberto foi observada após o silenciamento de neurônios nesta sub-região Córtex Insular (GEHRLACH et al, 2019). Assim, uma possibilidade seria que o papel oposto da neurotransmissão CRFérgica no Córtex Insular anterior e posterior seria mediado por diferentes efeitos na ativação neuronal local. Nesse sentido, o controle pelo Córtex Insular anterior ocorreria através da ativação de neurônios piramidais locais que se projetam para o BLA, o que por sua vez resultaria em efeito ansiogênico. Por outro lado, a ativação de receptores de CRF no Córtex Insular posterior poderia inibir neurônios locais que projetam para CeA, assim causando efeitos ansiolíticos. No entanto, em oposição a essa ideia, um estudo recente identificou que o CRF agindo via receptor CRF_1 despolariza neurônios piramidais no Córtex Insular posterior (RIEGER et al., 2022), tendo em vista que ainda não há relatos na literatura evidenciando a expressão de receptores do tipo CRF_2 no Córtex insular. Portanto, mais estudos são necessários para explorar os mecanismos e circuitos locais relacionados ao papel oposto da neurotransmissão CRFérgica do Córtex Insular no controle de comportamentos relacionados à ansiedade.

Outro mecanismo que pode explicar os efeitos opostos da neurotransmissão CRFérgica no Córtex Insular anterior e posterior é uma eventual influência no fluxo interno de informações locais. Nesse sentido, estudos têm fornecido evidências de um fluxo de informações interoceptivas da sub-região posterior para a anterior, de modo que o Córtex Insular anterior seria responsável por integrar as diversas informações que chegam a esta estrutura cerebral, evocando respostas emocionais (KURTH et al, 2010; CAUDA et al, 2012; MOLNAR-SZAKACS; UDDIN, 2022). Assim, uma possibilidade é que o controle da neurotransmissão CRFérgica no Córtex Insular posterior está relacionado a uma influência nos circuitos internos do Córtex Insular, que por sua vez impedem a ativação neurônios piramidais no Córtex Insular anterior envolvidos na expressão da ansiedade

7. CONCLUSÃO

Os resultados relatados no presente estudo indicam que a neurotransmissão CRFérgica no Córtex Insular está envolvida no controle de comportamentos relacionados à ansiedade, e a regulação ocorre de maneira sítio-específica ao longo do eixo rostrocaudal do Córtex Insular. De fato, os resultados sugerem um envolvimento dos receptores CRF₁ no Córtex Insular anterior na expressão de comportamentos relacionados à ansiedade no LCE. Embora a neurotransmissão CRFérgica pareça não ser recrutada no Córtex Insular posterior durante a exposição ao LCE, nossos achados indicam que a ativação de receptores CRF nesta estrutura cortical pode evocar respostas comportamentais do tipo ansiolíticas. Portanto, mais estudos são necessários para esclarecer um eventual papel da neurotransmissão CRFérgica no Córtex Insular posterior em mudanças comportamentais causadas por estímulos em que esse mecanismo neuroquímico é recrutado em estruturas corticais, como por exemplo eventos estressantes.

8. REFERÊNCIAS

ALVES, F.H.F.; GOMES, V.; REIS, D.G.; CRESTANI, C.C.; CORRÊA, F.M.A.; GUIMARÃES, F.S.; RESSEL, L.B.M. Involvement of the insular cortex in the consolidation and expression of contextual fear conditioning. **Eur. J. Neurosci.** v.38, p. 2300-2307, 2023. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23574437/>

BARRETTO-DE-SOUZA, L.; BENINI, R.; REIS-SILVA, L.L.; CRESTANI, C.C. 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**; v. 212, p. 109061, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2022.109061>.

BENARROCH, E.E. Insular cortex, **Neurology**; v. 93, p. 932-938, 2019. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000008525>.

BENASSI-CEZAR, G.; CARMONA, I.M.; BAPTISTA-DE-SOUZA, S.; NUNES-DE-SOUZA, A. CANTO-DE-SOUZA, Differential modulation of the anterior cingulate and insular cortices on anxiogenic-like responses induced by empathy for pain, **Neuropharmacology**; v. 192, 2021. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2020.108413>.

BROOKS, S.J.; STEIN, D.J. A systematic review of the neural bases of psychotherapy for anxiety and related disorders, **Dialogues Clin. Neurosci.**; v. 17, p. 261, 2015. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2015.17.3/SBROOKS>.

CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO, L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on, **Neurosci. Biobehav. Rev.**; v. 29, p. 1193-1205, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.04.017>.

CHUDOBA, R.; DABROWSKA, J. Distinct populations of corticotropin-releasing factor (CRF) neurons mediate divergent yet complementary defensive behaviors in response to a threat, **Neuropharmacology**. v. 228, p. 109461, 2023.

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2023.109461>.

CONTARINO, A.; HEINRICHS, S.C.; GOLD, L.H. Understanding corticotropin releasing factor neurobiology: contributions from mutant mice, **Neuropeptides**.; v. 33, p. 1-12, 1999. <https://doi.org/10.1054/NPEP.1999.0001>.

CAUDA, F.; COSTA, T.; TORTA, D.M.E.; SACCO, K.; D'AGATA, F.; DUCA, S.; G. GEMINIANI, FOX, P.T.; VERCELLI, A. Meta-analytic clustering of the insular cortex: characterizing the meta-analytic connectivity of the insula when involved in active tasks, **Neuroimage**. v. 62, p. 343-355, 2012.

<https://doi.org/10.1016/J.NEUROIMAGE.2012.04.012>.

DAVIU, N.; BRUCHAS, M.R.; MOGHADDAM, B.; SANDI, C.; BEYELER, A. Neurobiological links between stress and anxiety, **Neurobiol. Stress**.; v. 11, p. 100191, 2019. <https://doi.org/10.1016/J.YNSTR.2019.100191>.

DEDIC, N.; CHEN, A.; DEUSSING, J.M.; The CRF Family of Neuropeptides and their Receptors - Mediators of the Central Stress Response., **Curr. Mol. Pharmacol.**; v. 11, p. 4-31, 2018. <https://doi.org/10.2174/1874467210666170302104053>.

DEDIC, N.; CHEN, A.; DEUSSING, J.M.; The CRF Family of Neuropeptides and their Receptors - Mediators of the Central Stress Response., **Curr. Mol. Pharmacol.**; v. 11, p. 4-31, 2018. <https://doi.org/10.2174/1874467210666170302104053>.

DEUSSING, J.N.; CHEN, A. The Corticotropin-Releasing Factor Family: Physiology of the Stress Response, **Physiol. Rev.**; v. 98, p. 2225-2286, 2018.

<https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2017>.

FOILB, A.R.; FLYER-ADAMS, J.G.; MAIER, S.F.; CHRISTIANSON, J.P. Posterior insular cortex is necessary for conditioned inhibition of fear, **Neurobiol. Learn. Mem.**; v. 134, p. 317, 2016. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2016.08.004>.

GEHRLACH, D.A.,; WEIAND, C.; GAITANOS, T.N.; CHO, E.; KLEIN, A.S.; HENNRICH, A.A.; CONZELMANN, K.K.; GOGOLLA, N. A whole-brain connectivity map of mouse insular **cortex**, **Elife**. v. 9, p. 1-78, 2020.

<https://doi.org/10.7554/eLife.55585>.

GEHRLACH, D.A.; DOLENSEK, N.; KLEIN, A.S.; CHOWDHURY, R.; MATTHYS, A.; JUNGHÄNEL, M.; GAITANOS, T.N.; PODGORNIK, A.; BLACK, T.D.; REDDYVAKA, N.; CONZELMANN, K.K.; GOGOLLA, N. Aversivestate processing in the posterior insular cortex, **Nat. Neurosci.**; v. 22, n. 22, p. 1424-1437, 2019.

<https://doi.org/10.1038/s41593-019-0469-1>.

GOGOLLA, N. The insular cortex, **Curr. Biol.**; v. 27, p. R580-R586, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.010>.

GOMES-DE-SOUZA, L.; BIANCHI, P.C.; COSTA-FERREIRA, W.; TOMEO, R.A.; CRUZ, F.C.; CRESTANI, C.C. CB1 and CB2 receptors in the bed nucleus of the striaterminalis differently modulate anxiety-like behaviors in rats, **Prog. NeuroPsychopharmacology Biol. Psychiatry**; v. 110, p. 110284, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2021.110284>.

GOUVEIA, M.K.; MIGUEL, T.T.; BUSNARDO, C.; SCOPINHO, A.A.; CORRÊA, F.M.A.; NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CRESTANI, C.C. Dissociation in control of physiological and behavioral responses to emotional stress by cholinergic neurotransmission in the bed nucleus of the striaterminalis in rats, **Neuropharmacology**; v. 101, P. 379-388, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.018>.

GU, X.; LIU, X.; VAN DAM, N.T.; HOF, P.R.; FAN, J. Cognition-emotion integration in the anterior insular cortex, **Cereb. Cortex**; v. 23, p. 20-27, 2013.

<https://doi.org/10.1093/CERCOR/BHR367>.

HAUGER, R.L. International Union of Pharmacology. XXXVI. Current Status of the Nomenclature for Receptors for Corticotropin-Releasing Factor and Their Ligands, **Pharmacol. Rev.**, 2003. <https://doi.org/10.1124/pr.55.1.3>.

HENCKENS, M.J.A.G.; DEUSSING, J.M.; CHEN, A. Region-specific roles of the corticotropin-releasing factor-urocortin system in stress, **Nat. Rev. Neurosci.**; v. 17, p.-636–651, 2016. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.94>.

HOEHN-SARIC, R.; SCHLUND, M.W.; WONG S.H.I. Effects of citalopram on worry and brain activation in patients with generalized anxiety disorder, **Psychiatry Res. - Neuroimaging**; v. 131, p. 11-21, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.pscychresns.2004.02.003>.

JOËLS, M.; BARAM, T.Z. The neuro-symphony of stress., **Nat. Rev. Neurosci.**; v. 10, p. 459-466, 2009. <https://doi.org/10.1038/nrn2632>.

KURTH, F.; ZILLES, K.; FOX, P.T.; LAIRD, A.R.; EICKHOFF, S.B. A link between the systems: functional differentiation and integration within the human insula revealed by meta-analysis, **Brain Struct. Funct.**; v. 214, p. 519-534, 2010. <https://doi.org/10.1007/S00429-010-0255-Z>.

LI, H.; CHEN, L.; LI, P.; WANG, H.; ZHAI, H. Insular muscarinic signaling regulates anxiety-like behaviors in rats on the elevated plus-maze, **Behav. Brain Res.**; v. 270 p. 256-260, 2014. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2014.05.017>.

MARINS, F.R.; LIMBORÇO-FILHO, M.; XAVIER, C.H.; BIANCARDI, V.C.; VAZ, G.C.; STERN, J.E.; OPPENHEIMER, S.M.; FONTES, M.A.P. Functional topography of cardiovascular regulation along the rostrocaudal axis of the rat posterior insular cortex., **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**; v. 43, p. 484-493, 2016. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12542>.

MARINS, F.R.; OLIVEIRA, A.C.; F. QADRI, D. MOTTA-SANTOS, N. ALENINA, M. BADER, M.A.P. FONTES, R. SOUZA SANTOS, Alamandine but not angiotensin-(1-

7) produces cardiovascular effects at the rostral insular cortex, **Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.**; 2021. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00308.2020>.

MÉNDEZ-RUETTE, M.; LINSAMBARTH, A.; MORAGA-AMARO, R.; QUINTANA-DONOSO, D.; MÉNDEZ, L.; TAMBURINI, D.; CORNEJO, F.; TORRES, R.F.; STEHBERG, J. The Role of the Rodent Insula in Anxiety, **Front. Physiol.**; v. 10, p. 330, 2019.. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2019.00330>.

MOLNAR-SZAKACS, L.Q. UDDIN, P. Anterior insula as a gatekeeper of executive control, **Neurosci. Biobehav.Rev.**; v. 139, p. 104736, 2022.
<https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2022.104736>.

NIEUWENHUYS, R. The insular cortex: a review, Prog. **Brain Res.**; v. 95, p. 123-163, 2012. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53860-4.00007-6>.

OLIVEIRA, L.A.; ALMEIDA, J.; BENINI, R.; CRESTANI, C.C. CRF 1 and CRF 2 receptors in the bed nucleus of the striaterminalis modulate the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats, **Pharmacol. Res.**; v. 95, n. 96, p. 53-62, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.03.012>.

OPPENHEIMER, S.; CECETTO, D. The Insular Cortex and the Regulation of Cardiac Function, in: Compr. **Physiol.**, Wiley, 2016: pp. 1081–1133.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c140076>.

PAVA, J.P.Q.; BUENO, A.P.A.; SANTOS, M.; CORRÊA, OLIVEIRA, M.G.M.; FERREIRA, T.L.; FORNARI, R.V. The posterior insular cortex is necessary for the consolidation of tone fear conditioning, **Neurobiol. Learn. Mem**; v. 179, p. 107402, 2021. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2021.107402>.

PAULUS, M.P.; FEINSTEIN, J.S., CASTILLO, G.; SIMMONS, A.N.; STEIN, M.B. Dosedependent decrease of activation in bilateral amygdala and insula by lorazepam during emotion processing, **Arch. Gen. Psychiatry**; v. 62, p. 282-288, 2005.
<https://doi.org/10.1001/ARCHPSYC.62.3.282>.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, **Acad. Press**. San Diego. 3rd, (1997. <https://doi.org/10.1002/CNE.902100207>).

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat., **J. Neurosci. Methods**.; v. 14, p. 149-167, 1985.

<https://doi.org/10.1097/WNP.0000000000000377>.

PICÓ-PÉREZ, M.; FULLANA, M.A.; ALBAJES-EIZAGIRRE, A.; VEGA, D.; MARCO-PALLARÉS, J.; VILAR, A.; CHAMORRO, J.; FELMINGHAM, K.L.; HARRISON, B.J.; RADUA, J.; SORIANOMAS, C. Neural predictors of cognitive-behavior therapy outcome in anxiety-related disorders: a meta-analysis of task-based fMRI studies, **Psychol. Med**; p. 1-9, 2022. <https://doi.org/10.1017/S0033291721005444>.

POTTER, S.; SUTTON, C.; DONALDSON, R.; CHEN, M.; PERRIN, K.; LEWIS, P.E.; SAWCHENKO, W. Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary., **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**; v. 91, p. 8777, 1994. <https://doi.org/10.1073/PNAS.91.19.8777>.

RAUCH, S.L.; SAVAGE, V.T.; ALPERT, N.M.; FISCHMAN, A.J.; JENIKE, M.A. The functional neuroanatomy of anxiety: a study of three disorders using positron emission tomography and symptom provocation, **Biol. Psychiatry**.; v. 42, p. 446-452, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(97\)00145-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(97)00145-5).

REUL, J.M.H.M; HOLSBOER, F. Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression, **Curr. Opin.Pharmacol.**; v. 2, p. 23–33, 2020. [https://doi.org/10.1016/S1471-4892\(01\)00117-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4892(01)00117-5).

RIEGER, N.S.; VARELA, A.; NG, A.G.; GRANATA, L.; DJERDJAJ, A.; BRENHOUSE, H.C.; CHRISTIANSON, J.P. Insular cortex corticotropin-releasing factor integrates stress signaling with social affective behavior, **Neuropsychopharmacol.**; v. 476, n. 47, p. 1156-1168, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41386-022-01292-7>.

SAPER, C.B. Convergence of autonomic and limbic connections in the insular cortex of the rat, **J. Comp. Neurol.**; v. 210, p. 163-173, 1982.

<https://doi.org/10.1002/CNE.902100207>.

SHI, S.; FENG, M.; WEI, W.; ZHOU, Role of the anterior agranular insular cortex in the modulation of fear and anxiety, **Brain Res. Bull.**; v. 155, p. 174–183, 2020.

<https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2019.12.003>.

SHIN, L.M.; LIBERZON, J. The Neurocircuitry of Fear, Stress, and Anxiety Disorders, **Neuropsychopharmacology**; v.. 35, p. 169, 2010.

<https://doi.org/10.1038/NPP.2009.83>.

TOMEIO, R.A.; GOMES-DE-SOUZA, L.; BENINI, R.; REIS-SILVA, L.L.; CRESTANI, C.C. Site Specific Regulation of Stress Responses Along the Rostrocaudal Axis of the Insular Cortex in Rats, *Front. Neurosci.*; v. 460, 2022.

<https://doi.org/10.3389/FNINS.2022.878927>.

UDDIN, L.Q.; NOMI, J.S.; HÉBERT-SEROPIAN, B.; GHAZIRI, J.; BOUCHER, I. Structure and function of the human insula, **J. Clin. Neurophysiol**; v. 34, p. 300, 2017. <https://doi.org/10.1097/WNP.0000000000000377>.

VASCONCELOS, m.; STEIN, D.J.; GALLAS-LOPES, M.; LANDAU, L.; ALMEIDA, R.M.M.; Corticotropin-releasing factor receptor signaling and modulation: implications for stress response and resilience, **Trends Psychiatry Psychother.**; v. 42, p. 195-206, 2020. <https://doi.org/10.1590/2237-6089-2018-0027>.

VITORIO, A.S.; REIS-SILVA, L.L.; BARRETTO-DE-SOUZA, L.; GOMES-DE-SOUZA, L.; CRESTANI, C.C. Evaluation of the posterior insular cortex involvement in anxiogenic response to emotional stress in male rats: Functional topography along the rostrocaudal axis, **Physiol. Behav.**; v. 258p. 114006, 2023.

<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2022.114006>.

ZHAO, D.; WANG, D.; WANG, DAI, J.; CUI, M.; WU, M.; LIU, C.; LIU, J.; K. MENG, WANG, K.; HU, F.; LIU, D.; QIU, C.; LI, LI, W. The altered sensitivity of acute stress induced anxiety-related behaviors by modulating insular cortex-paraventricular thalamus-bed nucleus of the striaterminalis neural circuit, **Neurobiol. Dis.**; v. 174, 2022. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2022.105890>.