



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



**Mecanismo neuroquímico local envolvido no controle das
respostas cardiovasculares ao estresse de restrição por
diferentes regiões da porção posterior do córtex insular em
ratos**

Adrielly dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza

Coorientador: Prof. Dra. Cristiane Busnardo Santiago

Araraquara - SP
2023



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Mecanismo neuroquímico local envolvido no controle das
respostas cardiovasculares ao estresse de restrição por
diferentes regiões da porção posterior do córtex insular em
ratos**

Adrielly dos Santos

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas,
Área de Pesquisa e Desenvolvimento de
Fármacos e Medicamentos, para obtenção
do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza

Coorientador: Prof. Dra. Cristiane Busnardo Santiago

Araraquara- SP

2023

S237m Santos, Adrielly dos.
Mecanismo neuroquímico local envolvido no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição por diferentes regiões da porção posterior do córtex insular em ratos / Adrielly dos Santos. – Araraquara, 2023.
74 f. : il.

Orientador: Ricardo Luiz Nunes de Souza.
Coorientadora: Cristiane Busnardo Santiago.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

1. Ínsula. 2. Estresse de restrição. 3. Topografia. 4. Glutamato. 5. GABA. I. Souza, Ricardo Luiz Nunes de, orient. II. Santiago, Cristiane Busnardo, coorient. III. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Mecanismo neuroquímico local envolvido no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição por diferentes regiões da porção posterior do córtex insular em ratos

AUTORA: ADRIELLY DOS SANTOS

ORIENTADOR: RICARDO LUIZ NUNES DE SOUZA

COORIENTADORA: CRISTIANE BUSNARDO SANTIAGO

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

Dra. CRISTIANE BUSNARDO SANTIAGO (Participação Virtual)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciencias Farmaceuticas do Campus de Araraquara da Unesp

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. DANIEL BRESEGHELLO ZOCCAL (Participação Virtual)
Departamento de Fisiologia e Patologia / Faculdade de Odontologia do Campus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 21 de dezembro de 2023

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha mãe, que sempre compreendeu minhas escolhas com carinho e acolhimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à **Deus**, por ter me protegido, dirigido e corrigido em todos os dias da minha vida.

À **minha mãe Silvia e minha irmã Aline**, que me apoiaram durante todas as etapas dessa caminhada. Vocês são a coisa mais importante que eu tenho na vida.

Ao **Prof. Dr. Carlos C. Crestani** pela orientação e acima de tudo pela confiança e acolhimento em todos os momentos, com quem eu aprendi muito, inclusive farmacologia e neurociência. Ao **Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Sousa** pela disponibilidade e a gentileza que sempre demonstrou comigo nesse processo.

Aos professores **Dr. Marcelo Tadeu Marin e Dra. Cleopatra da Silva Planeta** que me receberam no Programa de Aperfeiçoamento e Apoio à Docência no Ensino Superior (PAADES) e compartilharam suas experiências de docência com ensinamentos que levarei para minha carreira.

À minha coorientadora **Profª. Dr. Cristiane Busnardo Santiago (Cris)**, por seus ensinamentos acadêmicos, sua paciência e carinho. Eu tive sorte de ter encontrado você nessa jornada.

A **Profª. Dra. Juliana Alvares Duarte Bonini Campos** e ao **Grupo de Pesquisa LEV**, por nunca deixarem de ser minha família acadêmica.

Aos integrantes do **laboratório de farmacologia da UNESP Araraquara** agradeço pela disposição do dia a dia em ajudar e contribuir para o meu crescimento. Em especial, agradeço aos integrantes onde a convivência diária me permitiu viver momentos felizes e construir amizades além do laboratório: Bianca Meneghetti, Gabriela Arruda, Higor Paz, Leandro Oliveira, Ligia Tavares, Lilian Reis, Luana Giatti, Lucas Gomes, Lucas Barretto, Sarah Zela e Vinicius Pelarin.

A minha psicóloga **Julia Muraro** pelo amparo psicológico. Obrigada por me orientar no processo de recolorir a minha vida.

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.

Agradeço a secretária do departamento **Tirene Pavanelli**, e aos secretários do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas **Cláudia Molina, Victor Picchi Gandin, Denise Daré e Mariana Vicenzo** por todo profissionalismo e atenção.

Aos examinadores de qualificação e defesa, **Profª. Dra. Cleopatra da Silva Planeta, Prof. Dr. Daniel Breseghello Zoccal e Prof. Dr. Guilherme Fleury Fina Speretta** por terem aceitado fazer parte desse momento muito importante na minha carreira e pelas contribuições nesse trabalho e na minha formação acadêmica.

A agência de fomento **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** – processo 2022/03070-9) pelo apoio financeiro.

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

Além disso, meu profundo agradecimento e respeito a todos os **animais** que foram utilizados nesta pesquisa.

EPÍGRAFE

희망이 있는 곳엔 반드시 시련이 있네

Onde há esperança, há dificuldades.

RESUMO

A sobrevivência das espécies diante de eventos aversivos ou estressores depende de um coordenado conjunto de ajustes fisiológicos e comportamentais. O córtex insular [do inglês, *insular cortex* (IC)] é uma estrutura cortical que foi implicada na integração e processamento de informações límbicas em humanos e animais e, nesse sentido, foi reportado estar envolvido na geração de respostas fisiológicas e comportamentais durante situações de estresse. Um estudo recente explorou a participação de sítios específicos ao longo do eixo rostro-caudal do IC no controle da função cardiovascular em roedores no estresse de restrição. Foi evidenciado que o bloqueio sináptico não-seletivo na região anterior do IC não afetou as respostas cardiovasculares ao estresse de restrição, ao passo que bloqueios na porção posterior-rostral reduziu a resposta pressora e a inibição da sub-região posterior-caudal causou redução da resposta taquicárdica. Foi avaliada também a ativação neuronal ao longo do eixo rostro-caudal do IC e foi elucidado que o controle da resposta taquicárdica pela porção caudal foi associada com uma diminuição no número de células positivas para a proteína Fos, o que indica uma redução na ativação neuronal local; ao passo que o controle da resposta pressora pela porção rostral foi acompanhado de aumento de células positivas para Fos. Esses dados indicam que o controle das respostas cardiovasculares ao estresse pelas sub-regiões rostral e caudal da porção posterior do IC seja mediado por diferentes mecanismos neuroquímicos excitatórios ou inibitórios. Assim, o presente estudo visa testar a hipótese de que a resposta de aumento da pressão arterial pela sub-região posterior-rostral está relacionado principalmente com mecanismos glutamatérgicos locais enquanto o controle da resposta taquicárdica pela porção caudal do IC posterior é mediado predominantemente por mecanismos inibitórios. Nós identificamos que o tratamento do IC posterior-rostral com ácido quinurênico (antagonista não-seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos) não afetou significativamente as respostas taquicárdicas e de queda da temperatura cutânea da cauda induzidas pelo estresse de restrição agudo, contudo houve uma tendência de diminuição da resposta pressora. Observamos também que a microinjeção bilateral de um coquetel de SR95531 (gabazina, antagonista do receptor GABA_A) e CGP35348 (antagonista do receptor GABA_B) facilitou a resposta de taquicardia causada pela restrição, porém sem alterar significativamente a resposta pressora e a queda da temperatura cutânea da cauda. Adicionalmente, o tratamento do IC posterior-caudal com ácido quinurênico (antagonista não-seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos) não afetou significativamente as respostas, pressora, taquicárdicas e de queda da temperatura cutânea da cauda induzidas pelo estresse de restrição agudo ao passo que microinjeção bilateral de um coquetel de SR95531 (gabazina, antagonista do receptor GABA_A) e CGP35348 (antagonista do receptor GABA_B) reduziu significativamente a resposta de taquicardia causada pela restrição, porém sem alterar significativamente a resposta pressora e a queda da temperatura cutânea da cauda. Em conjunto, os resultados obtidos até o presente momento sugerem um envolvimento da neurotransmissão GABAérgica nas respostas taquicárdicas ao estresse de restrição agudo ao longo do eixo rostrocaudal no IC posterior, e que na porção rostral essa influência é inibitória enquanto na porção caudal ela é facilitatória.

Palavras-chave: ínsula; estresse de restrição; topografia; glutamato; GABA

ABSTRACT

The survival of species in the face of aversive or stressful events depends on a coordinated set of physiological and behavioral adjustments. The insular cortex (IC) is a cortical structure that has been implicated in the integration and processing of limbic information in humans and animals. In fact, it has been reported to be involved in the generation of physiological and behavioral responses during stressful situations. A recent study explored the participation of specific sites along the rostrocaudal axis of the IC in the control of cardiovascular function in rodents subjected to restraint stress. It was observed that non-selective synaptic blockade in the anterior region of the IC did not affect cardiovascular responses to restraint stress, whereas inhibition in the posterior portion impaired the pressor response and inhibitors in the posterior-caudal portion caused a reduction of the tachycardic response. Neuronal activation along the rostrocaudal axis of the IC was also evaluated and it was elucidated that the control of the tachycardic response by the caudal function was associated with a decrease in the number of cells positive for the Fos protein, which indicates a reduction in neuronal activation local; whereas control of the pressor response by the rostral portion was accompanied by an increase in Fos-positive cells. These data indicate that the control of cardiovascular responses to stress by the rostral and caudal subregions of the posterior portion of the IC is mediated by different excitatory or inhibitory neurochemical mechanisms. Thus, the present study aims to test the hypothesis that the response to increased blood pressure by the posterior-rostral subregion is mainly related to local glutamatergic mechanisms, while the control of the tachycardic response by the caudal portion of the posterior IC is predominantly mediated by inhibitory mechanisms. We identified that treatment of the posterior-rostral IC with kynurenic acid (a non-selective antagonist of ionotropic glutamatergic receptors) did not significantly affect the tachycardic responses and the drop in tail temperature observed induced by acute restraint stress, but there was a tendency for the pressor response to decrease. . We also observed that bilateral microinjection of a cocktail of SR95531 (gabazine, GABA_A receptor antagonist) and CGP35348 (GABA_B receptor antagonist) facilitated the tachycardia response caused by restriction, but without significantly altering the pressor response and the drop in the specific temperature of the tail. Furthermore, treatment of the posterior-caudal IC with kynurenic acid (non-selective antagonist of ionotropic glutamatergic receptors) does not significantly affect the observed pressure, tachycardic and temperature drop responses of the tails caused by acute restraint stress, whereas microinjection bilateral combination of a cocktail of SR95531 (gabazine, GABA_A receptor antagonist) and CGP35348 (GABA_B receptor antagonist) significantly impairs the tachycardia response caused by restriction, but without significantly altering the pressor response and the drop in tail-specific temperature. Taken together, the results obtained suggest an involvement of GABAergic neurotransmission in tachycardic responses to acute restraint stress along the rostrocaudal axis in the posterior IC, and that in the rostral portion this influence is inhibitory while in the caudal position it is facilitatory.

Keywords: insula; restraint stress; topography; glutamate; GABA.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Estresse	20
2.2 Respostas cardiovasculares ao estresse	24
2.3 Córtex Insular	25
3. OBJETIVOS	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Animais	31
4.2 Cirurgia para o implante de cânulas guias direcionadas ao córtex insular	32
4.3 Canulação da artéria femoral	33
4.4 Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca	33
4.5 Registro da temperatura cutânea da cauda	33
4.6 Fármacos e soluções	34
4.7 Microinjeção de drogas no córtex insular	34
4.8 Estresse de restrição	35
4.9 Determinação anatômica dos sítios de injeção no córtex insular	35
4.10 Análise estatística	36
5. Protocolos Experimentais	36
5.1 Estudo do envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica na região posterior-rostral do IC no controle das respostas cardiovasculares durante uma sessão aguda de estresse de restrição	36
6. RESULTADOS	38
6.1 Envolvimento das neurotransmissões glutamatérgica e GABAérgica ao longo do eixo rostrocaudal da porção posterior do IC no controle das respostas cardiovasculares ao estresse por restrição agudo	38
6.1.1 Envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica na região posterior-rostral do IC no controle das respostas cardiovasculares ao estresse por restrição agudo na região posterior-rostral do IC	39
6.1.2 Envolvimento da neurotransmissão GABAérgica no IC posterior-rostral no controle das respostas cardiovasculares ao estresse por restrição agudo	48
6.1.3 Envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica no IC posterior-caudal no controle das respostas cardiovasculares ao estresse por restrição agudo	52
6.1.4 Envolvimento da neurotransmissão GABAérgica no IC posterior-caudal no controle das respostas cardiovasculares ao estresse por restrição agudo	56
7. DISCUSSÃO	60

8.	CONCLUSÃO	64
9.	REFERÊNCIAS.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda após o tratamento farmacológico da região posterior-rostral do IC com ácido quinurênico (antagonista não-seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, 16 nmol/100nL) ou veículo (salina, 100nL).	40
Tabela 2 - Parâmetros basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda após o tratamento farmacológico da região posterior-rostral do IC com ácido quinurênico (antagonista não-seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, 50 nmol/100nL) ou veículo (salina, 100nL).	44
Tabela 3 - Parâmetros basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda após o tratamento farmacológico da região posterior-rostral do IC com SR95531 (antagonista seletivo do receptor GABA _A) + CGP35348 (antagonista seletivo do receptor GABA _B) ou veículo (salina).	48
Tabela 4 - Parâmetros basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda após o tratamento farmacológico da região posterior-caudal do IC com ácido quinurênico (antagonista não-seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, 50 nmol/100nL) ou veículo (salina, 100nL).	52
Tabela 5 - Parâmetros basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda após o tratamento farmacológico da região posterior-rostral do IC com SR95531 (antagonista seletivo do receptor GABA _A) + CGP35348 (antagonista seletivo do receptor GABA _B) ou veículo (salina).	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA).....	23
Figura 2 - Localização do córtex insular (IC) no encéfalo humano e do camundongo	26
Figura 3 - Representação diagramática baseada no atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (1997) indicando os locais de microinjeção de salina (quadrados brancos), ácido quinurênico (antagonista não-seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, círculos pretos) e SR95531 (antagonista seletivo do receptor GABA_A, círculos cinza) + CGP35348 (o antagonista seletivo do receptor GABA_B, círculos cinza) no córtex insular posterior rostral (acima) e córtex insular posterior caudal (abaixo).....	39
Figura 4 - Curvas temporais de variação da pressão arterial média (ΔPAM), frequência cardíaca (ΔFC) e temperatura cutânea da cauda (Δ temperatura da cauda) induzidas pelo estresse de restrição agudo em animais tratados com ácido quinurênico (antagonista não-seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, 16nmol/100nL, n=7) ou veículo (salina, 100nL n=9). A área sombreada indica o período de restrição. Círculos representam a média$\pm$EPM.....	42
Figura 5 - Fotos de ratos representativos mostrando a temperatura cutânea da cauda nos períodos basal em diferentes momentos durante o estresse de restrição em animais tratados com veículo (salina) ou ácido quinurênico 16nmol no IC posterior-rostral.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 6 - Média das respostas de pressão arterial média (ΔPAM), frequência cardíaca (ΔFC) e temperatura cutânea da cauda (Δ temperatura cauda) nos intervalos 0-20min, 20-40min e 40-60min durante o estresse de restrição em animais submetidos ao tratamento do IC posterior-rostral com veículo (salina, barras brancas, n=9) ou ácido quinurênico (barras pretas, n=7). Colunas representam a média e as barras EPM.	43
Figura 7- Curvas temporais de variação da pressão arterial média (ΔPAM), frequência cardíaca (ΔFC) e temperatura cutânea da cauda (Δ temperatura da cauda) induzidas pelo estresse de restrição agudo em animais tratados com ácido quinurênico (antagonista não-seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, 50nmol/100nL, n=6) ou veículo (salina, 100nL n=9). A área sombreada indica o período de restrição. Círculos representam a média$\pm$EPM.....	46
Figura 8 - Fotos de ratos representativos mostrando a temperatura cutânea da cauda nos períodos basal e em diferentes momentos durante o estresse de restrição em animais tratados com veículo (salina) ou ácido quinurênico (50nmol/100nL) no IC posterior-rostral.....	47
Figura 9 - Média das respostas de pressão arterial média (ΔPAM), frequência cardíaca (ΔFC) e temperatura cutânea da cauda (Δ temperatura cauda) nos intervalos 0-20min, 20-40min e 40-60min durante o estresse de restrição em animais submetidos ao tratamento do IC posterior-rostral com veículo (salina, barras brancas, n=9) ou ácido quinurênico (barras pretas, n=6). Colunas representam a média e as barras EPM.	47
Figura 10- Curvas temporais de variação da pressão arterial média (ΔPAM), frequência cardíaca (ΔFC) e temperatura cutânea da cauda (Δ temperatura) induzidas pelo estresse de restrição agudo em animais tratados com SR95531 (antagonista seletivo do receptor GABA_A) + CGP35348 (antagonista seletivo do receptor GABA_B, n=9) ou veículo (salina, 100nL n=9). A área sombreada indica o período de restrição. Círculos representam a média$\pm$EPM.....	50
Figura 11 - Fotos da temperatura cutânea da cauda de ratos representativos mostrando a temperatura da pele nos períodos basal e em diferentes momentos do estresse de restrição em animais tratados com veículo ou SR95531+CGP35348 no IC posterior-rostral.	51
Figura 12 - Média das respostas de pressão arterial média (ΔPAM), frequência cardíaca (ΔFC) e temperatura cutânea da cauda (Δ temperatura cauda) nos intervalos: 0-20min, 20-40min e 40-60min, durante o estresse de restrição em animais submetidos ao tratamento do CI com veículo (barras brancas) ou SR95531 + CGP35348 (barras pretas). Colunas representam a média e as barras EPM. *P <0,05, teste t de Student.	51

Figura 13 - Curvas temporais de variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea da cauda (Δ temperatura da cauda) induzidas pelo estresse de restrição agudo em animais tratados com ácido quinurênico (antagonista não-seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, 50nmol/100nL, n=6) ou veículo (salina, 100nL n=8). A área sombreada indica o período de restrição. Círculos representam a média $\pm$ EPM. **Erro!**

Indicador não definido.

Figura 14 - Fotos de ratos representativos mostrando a temperatura cutânea da cauda nos períodos basal em diferentes momentos durante o estresse de restrição em animais tratados com veículo (salina) ou ácido quinurênico no IC posterior-rostral. 55

Figura 15 - Média das respostas de pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea da cauda (Δ temperatura cauda) nos intervalos 0-20min, 20-40min e 40-60min durante o estresse de restrição em animais submetidos ao tratamento do IC posterior-caudal com veículo (salina, barras brancas, n=8) ou ácido quinurênico (barras pretas, n=6). Colunas representam a média e as barras EPM. 55

Figura 16 - Curvas temporais de variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea da cauda (Δ temperatura) induzidas pelo estresse de restrição agudo em animais tratados com SR95531 (antagonista seletivo do receptor GABA_A) + CGP35348 (antagonista seletivo do receptor GABA_B, n=7) ou veículo (salina, 100nL n=8). A área sombreada indica o período de restrição. Círculos representam a média $\pm$ EPM. 58

Figura 17 - Fotos da temperatura cutânea da cauda de ratos representativos mostrando a temperatura da pele nos períodos basal e em diferentes momentos do estresse de restrição em animais tratados com veículo ou SR95531+CGP35348 no IC posterior-rostral. 59

Figura 18 - Média das respostas de pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea da cauda (Δ temperatura cauda) nos intervalos: 0-20min, 20-40min e 40-60min, durante o estresse de restrição em animais submetidos ao tratamento do CI com veículo (barras brancas) ou SR95531 + CGP35348 (barras pretas). Colunas representam a média e as barras EPM. *P <0,05, teste t de Student. 59

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH - hormônio adrenocorticotrófico
AMPA - α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-ácido propiônico
AVP - arginina vasopressina
CRH - hormônio liberador de corticotropina
FC - frequência cardíaca
GAD - enzima glutamato descarboxilase
GABA- ácido gama-aminobutírico
HPA - hipotálamo-hipófise-adrenocortical
IC – córtex insular
KA - cainato
L-Glu – Glutamato
LH - hipotálamo lateral
mPFC -córtex pré-frontal medial
NMDA - N-metil-D-aspartato
NLET- núcleo leito da estria terminal
NTS - núcleo do trato solitário
PA - pressão arterial
PAM - pressão arterial média
PAG - substância cinzenta periarquedutal
PVN - núcleo paraventricular do hipotálamo
RVLM - bulbo ventrolateral rostral
SNC - sistema nervoso central

1. INTRODUÇÃO

Diante da exposição a eventos estressantes e aversivos todas as espécies desencadeiam um conjunto coordenado de respostas adaptativas fisiológicas e comportamentais que visam a manutenção da homeostasia e a preservação da vida (CRESTANI, 2016; STERLING, 2012; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). Esses ajustes fisiológicos ao estresse são promovidos por alterações no sistema nervoso central (SNC) e incluem alterações autônomas, cardiovasculares, neuroendócrinas, metabólicas e imunológicas (CRESTANI, 2016; DAMPNEY, 2015; HERMAN, 2022; ZEFFERINO *et al.*, 2021). As alterações autônomas são imediatas e se caracterizam principalmente pelo aumento da atividade nervosa simpática e das catecolaminas circulantes, e também por alterações na atividade do barorreflexo, esse conjunto de alterações resulta em respostas cardiovasculares induzidas pelo estresse que incluem aumento na pressão arterial (PA) e na frequência cardíaca (FC) e alterações na temperatura da cauda, que é resultado da redistribuição do fluxo sanguíneo, caracterizado por uma redução na perfusão cutânea e visceral e aumento na musculatura esquelética (CRESTANI, 2016; DAMPNEY, 2015; DAMPNEY *et al.*, 2008).

As respostas fisiológicas ao estresse são mediadas por estruturas límbicas no SNC, e através da ação de diferentes neurotransmissores (DAMPNEY, 2015; FONTES *et al.*, 2011; JOËLS; BARAM, 2009; MYERS, 2017; NAKAMURA; MORRISON, 2022; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). Entre as estruturas responsáveis pela integração e processamento de informações límbicas podemos destacar uma estrutura cortical denominada córtex insular [do inglês, insular cortex (IC)], cuja ativação diante de situações aversivas foi reportada em humanos e roedores (AUGUSTINE, 1996; CECHETTO, 1994; CULLINAN *et al.*, 1995; GIANAROS *et al.*, 2007; GOGOLLA, 2017; NIEUWENHUYS, 2012; UDDIN, 2015; YOKOYAMA; SASAKI, 1999). A

localização dessa estrutura difere entre humanos e roedores. Enquanto nos primatas, incluindo humanos, o IC localiza-se profundamente na altura do sulco lateral de cada hemisfério, abaixo de partes dos lobos frontal, parietal e temporal; nos roedores o IC encontra-se exposto na superfície lateral dos hemisférios, e localiza-se acima da metade rostral do sulco rinal (GOGOLLA, 2017; OPPENHEIMER; CECETTO, 2016). Contudo, apesar da diferença na localização, observa-se vasta homologia na citoarquitetura, conexões e funções do IC em ambas as espécies (GOGOLLA, 2017; MORAGA-AMARO; STEHBERG, 2012; NAMKUNG *et al.*, 2017).

O envolvimento do IC na geração de respostas aos estímulos aversivos se relaciona com suas conexões com um extensivo conjunto de estruturas corticais e subcorticais, o que permite a integração de informações sensoriais, emocionais, motivacionais e cognitivas (GOGOLLA, 2017; MORAGA-AMARO; STEHBERG, 2012; NIEUWENHUY, 2012; SCHAEUBLE; MYERS, 2022; UDDIN, 2015). Por exemplo, o IC é conectado com vários núcleos amigdaloides, bem como com o córtex pré-frontal medial (mPFC), o núcleo leito da estria terminal (NLET), o hipotálamo lateral (LH), a substância cinzenta periaqueductal (PAG), entre outras áreas límbicas (ALLEN *et al.*, 1991; AUGUSTINE, 1996; NOMI *et al.*, 2018; SAPER, 1982; SHI; CASSELL, 1998). Nesse sentido, o IC integra informações límbicas diversas e através de conexões com estruturas hipotalâmicas e do tronco cerebral está envolvido na geração de respostas fisiológicas e comportamentais durante situações de estresse.

Uma participação do IC na rede neural envolvida na função cardiovascular já foi evidenciada na literatura. Contudo, vale ponderar que as respostas cardiovasculares observadas após a estimulação do IC em animais em repouso (isto é, não-estressados) apresentaram um perfil sítio-específico. Por exemplo, a estimulação da porção anterior causou diminuição da PA (HARDY; HOLMES, 1988; HARDY; MACK, 1990; SUN,

1992) enquanto a estimulação de sítios na porção posterior causou redução na resposta pressora acompanhada de taquicardia ou uma redução tanto da PA quanto da FC (VERBERNE; OWENS, 1998). Vale destacar que as respostas cardiovasculares variadas decorrentes da estimulação da porção posterior foram dependentes da região estimulada, de modo que as respostas pressora e taquicárdica foram mediadas por regiões localizadas em sítios mais rostrais do que as regiões em que a estimulação gerou respostas de queda de PA e FC (SCHAEUBLE; MYERS, 2022; VERBERNE; OWENS, 1998). Estudos mais recentes confirmaram um controle sítio-específico da função cardiovascular em condições de repouso pela porção posterior do IC (MARINS *et al.*, 2016, 2021). No contexto do estresse também foi observado um envolvimento do IC na expressão das respostas cardiovasculares. O bloqueio sináptico não-seletivo na porção anterior do IC em ratos causado pelo tratamento local com CoCl_2 reduziu as respostas cardiovasculares induzidas tanto por estímulos aversivos condicionado (medo condicionado ao contexto) quanto não-condicionado (estresse de restrição) (ALVES *et al.*, 2010, 2013), o que evidenciou um envolvimento do IC no controle das respostas cardiovasculares induzidas durante ameaças aversivas. Foi observado também que o antagonismo da neurotransmissão glutamatérgica (NMDA) no IC de maneira não sítio-específica facilitou o aumento da resposta pressora e a taquicardia induzidas pelo estresse de restrição (GOULART *et al.*, 2022).

Apesar das evidências de um controle sítio-específico da função cardiovascular pelo IC em condições de repouso, bem como da ativação dessa estrutura cortical por estímulos estressores, o papel de regiões específicas ao longo do eixo rostro-caudal do IC no controle das respostas cardiovasculares ao estresse ainda é pouco compreendido. Nesse sentido, um estudo recente explorou o papel das porções anterior e posterior do IC no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição agudo em ratos

(TOMEIO *et al.*, 2022). Foi observado nesse estudo que o bloqueio sináptico não-seletivo causado pela microinjeção de CoCl_2 na região anterior do IC não afetou as respostas de aumento da PA e FC e queda da temperatura cutânea da cauda (*medida indireta da resposta de vasoconstrição cutânea mediada pela ativação vasomotora simpática*) observadas durante uma sessão aguda de estresse de restrição (TOMEIO *et al.*, 2022). Por outro lado, o bloqueio sináptico de diferentes sub-regiões da porção posterior do IC causou efeitos sítio-específicos. O bloqueio de sítios rostrais da porção posterior do IC reduziu exclusivamente a resposta de aumento da PA, ao passo que a microinjeção de CoCl_2 em regiões caudais do IC posterior reduziu a resposta de taquicardia (TOMEIO *et al.*, 2022). Esses dados indicaram que a região posterior do IC está envolvida na expressão das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição, porém esse controle é sítio-específico (TOMEIO *et al.*, 2022).

Destaca-se que no mesmo estudo também foi avaliado o perfil de ativação neuronal induzida pelo estresse de restrição ao longo do eixo rostro-caudal do IC (TOMEIO *et al.*, 2022). É sabido que a exposição a eventos estressores pode alterar características das estruturas encefálicas e a investigação dessas alterações contribui para a elucidação dos mecanismos envolvidos nas respostas observadas. Nesse sentido, foi evidenciado que as situações aversivas podem levar a um aumento no número de células positivas para a proteína Fos em estruturas encefálicas, o que indica ativação neuronal induzida pelo estresse. Contudo, o perfil de ativação neuronal causado pelo estresse ao longo do eixo rostro-caudal do IC foi pouco explorado (CULLINAN *et al.*, 1995; DAMPNEY, 2015). Nesse trabalho foi evidenciado que o controle da resposta pressora ao estresse de restrição por sítios na região posterior-rostral do IC foi acompanhado de aumento no número de células marcadas com a proteína Fos. Por outro lado, de maneira inesperada, o controle da resposta de FC pela região posterior-caudal foi associada com

uma diminuição no número de células positivas para proteína Fos após a exposição ao estresse de restrição, o que indica redução na ativação neuronal. Desse modo, o controle da resposta pressora ao estresse pela região rostral do IC posterior parece ser mediado pela ativação de mecanismos neuroquímicos excitatórios e/ou inibição de mecanismos inibitórios locais, enquanto o envolvimento da região caudal do IC posterior na resposta taquicardia parece ocorrer via ativação de mecanismos inibitórios e/ou inibição de mecanismos neuroquímicos excitatórios locais (TOMEIO *et al.*, 2022).

A literatura destaca que o glutamato (L-Glu) é o principal e mais abundante neurotransmissor excitatório do SNC, sendo considerado um importante mediador no controle da função cardiovascular em múltiplas regiões do SNC (BUSNARDO *et al.*, 2009; DANBOLT, 2001; PELOSI *et al.*, 2015). Alterações nas respostas pressoras e na FC provenientes da microinjeção de L-Glu já foram relatadas em diferentes regiões cerebrais, entre elas, no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (BUSNARDO *et al.*, 2009), na área cinzenta periarquedutal (PAG) (PELOSI *et al.*, 2015) e no hipotálamo lateral (LH) (PUGLIESI PAJOLLA *et al.*, 2005). As respostas glutamatérgicas ocorrem a partir da interação do L-glu com os seus receptores, que estão distribuídos ao longo de todo o SNC. Nesse sentido, dados prévios confirmaram a presença desses receptores em todas as regiões da porção posterior do IC (MARINS *et al.*, 2016). Além disso, foi documentado a participação desse mecanismo neuroquímico no controle da função cardiovascular em condição de repouso em diferentes sítios da região posterior do IC (MARINS *et al.*, 2016; RANJBAR *et al.*, 2015) e na condição de estresse de maneira não sítio-específica (GOULART *et al.*, 2022). *Contudo, apesar dessas evidências, o papel de mecanismos glutamatérgicos local no controle das respostas cardiovasculares ao estresse pelo IC foi pouco estudado.*

Outro neurotransmissor envolvido no controle da função cardiovascular é o GABA, que se trata do principal neurotransmissor inibitório do SNC (BOWERY; SMART, 2006; GORDON; SVED, 2002; JORGENSEN, 2005). Respostas moduladoras da atividade cardiovascular mediadas por receptores GABAérgicos já foram relatadas no bulbo ventrolateral rostral (RVLM) (SCHREIHOFFER; GUYENET, 2002), no núcleo do trato solitário (NTS) (GORDON; SVED, 2002), no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (DUPONT; LÉGAT, 2020) e também no IC. De fato, dados prévios indicaram um papel tônico inibitório do receptor GABA_A (sem influência do receptor GABA_B) em sítios rostrais da porção posterior do IC na manutenção da PA e da atividade simpática em ratos em repouso (SALEH *et al.*, 2005). Como detalhado acima, achados recentes sugerem que mecanismos inibitórios no IC podem desempenhar um papel relevante no controle das respostas cardiovasculares ao estresse. *Vale ponderar, no entanto, que um envolvimento de mecanismos GABAérgicos do IC no controle das respostas cardiovasculares ao estresse nunca foi avaliado.*

Diante do exposto, foi proposta realização desse estudo que visou testar as hipóteses de que o controle da resposta taquicárdica ao estresse de restrição agudo pela região caudal do IC posterior é mediado predominantemente por mecanismos inibitórios GABAérgicos, ao passo que o envolvimento da região rostral na resposta pressora a esse estressor está relacionado principalmente com mecanismos excitatórios glutamatérgicos locais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estresse

O pesquisador Hans Selye definiu nos anos 50 o estresse como *uma resposta não-específica do organismo a um agente estressor* (MYERS *et al.*, 2014; ROM; REZNICK,

2015) e nomeou essa resposta como Síndrome Geral de Adaptação, classificando-a em três estágios progressivos (SELYE, 1946) :

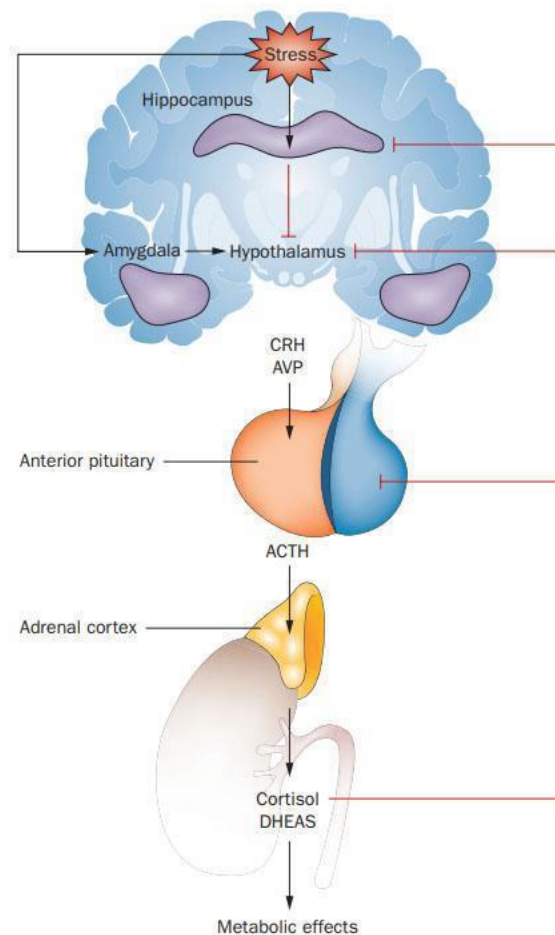
1. Reação de Alarme na qual o organismo reage produzindo e liberando adrenalina, noradrenalina e glicocorticóides;
2. Resistência, caracterizada pela adaptação, o corpo aprende a lidar eficientemente com o agente estressor e
3. Exaustão caracterizado por um esgotamento das reservas de energia e a perda da capacidade adaptativa, levando a fadiga ou doenças relacionadas ao estresse.

Contudo, a discussão acerca da definição e dos aspectos relacionados ao estresse, bem como de seu conceito continuou presente na literatura, e outros conceitos foram propostos, como aquele proposto por McEwen, que definiu o estresse como *uma ameaça real ou implícita a integridade fisiológica ou psicológica do indivíduo* (MCEWEN; AKIL, 2020). Atualmente o termo estresse é entendido como um conjunto de eventos que se inicia com um estímulo estressor, que é percebido pelo cérebro e resulta na ativação de sistemas fisiológicos no organismo, isto é, uma resposta aguda e adaptativa a um estímulo (DHABHAR, 2019; DHABHAR; MCEWEN, 1997; MCEWEN; AKIL, 2020).

Os estímulos estressores (internos ou externos) acarretam um desafio para a manutenção das condições fisiológicas do organismo, de modo que diante de situações aversivas repostas autônomas, endócrinas e comportamentais são desencadeadas com o objetivo de manutenção da homeostasia e garantia da sobrevivência (CRESTANI, 2016; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). Esse conjunto coordenado de respostas ao estresse é gerado e controlado pela atuação integrada de diferentes circuitos cerebrais e sistemas neuroquímicos (CRESTANI, 2016; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009), sendo as ativações do eixo hipotálamo-hipófise-adrenocortical (HPA) e do sistema nervoso autônomo simpático as principais respostas adaptativas ao estresse.

A ativação do eixo HPA (Figura 1) é um dos principais mecanismos endócrinos desencadeados pelo estresse. Diante de um estímulo estressor, ocorre a liberação do hormônio liberador de corticotropina (CRH) e da arginina vasopressina (AVP) pelos neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) na hipófise anterior do hipotálamo, e esses neuropeptídeos estimulam a hipófise anterior a liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na circulação, que por sua vez estimula a produção e liberação de glicocorticóides (cortisol em humanos e corticosterona em roedores) a partir do córtex das glândulas adrenais (BORNSTEIN *et al.*, 1999; MCEWEN ; AKIL, 2020). A literatura tem sugerido que os glicocorticóides desempenham um papel fundamental na resposta ao estresse, e evidenciado que quando há uma exposição persistente ao estresse pode ocorrer uma desregulação no eixo HPA, que leva a um aumento nas concentrações do cortisol plasmático. Essas alterações, em longo prazo, podem impactar na fisiologia dos terminais sinápticos, reduzir o número de ramos dendríticos e de neurônios, assim interferindo nos mecanismos nervosos envolvidos na resposta ao estresse e podendo desencadear doenças (SAPOLSKY *et al.*, 2000).

Figura 1 - Representação esquemática do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA).



A ativação dos neurônios parvocelulares no núcleo paraventricular do hipotálamo leva à síntese de CRH e AVP. Ambos são secretados no sistema porta hipofisário que transporta esses hormônios para a hipófise anterior. CRH e AVP atuam sinergicamente na hipófise para estimular a liberação de ACTH, que por sua vez atua nas suprarrenais para estimular a síntese e liberação de corticosteróides. Os corticosteróides regulam sua própria secreção por meio de um mecanismo de controle de feedback negativo, que é exercido através de receptores mineralocorticóides e glicocorticóides no nível do hipocampo, hipotálamo e glândula pituitária. ACTH, hormônio adrenocorticotrófico; AVP, arginina vasopressina; CRH, hormônio liberador de corticotropina; DHEAS, sulfato de dehidroepiandrosterona. Permissão obtida da Macmillan Publishers © Sandi, C. Nat. Rev. Neurosci. 5, 917-930 (2004). **Fonte:** Papadopoulos; Cleare, 2012.

As respostas autonômicas promovidas pelo estresse desencadeiam majoritariamente alteração cardiovasculares, que são caracterizadas principalmente por aumento na PA e FC (CRESTANI, 2016). Além disso, é observado queda da temperatura cutânea como resultado de uma redistribuição do fluxo sanguíneo durante situações aversivas dos leitos cutâneos para a musculatura esquelética, coração e cérebro (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). A atividade do barorreflexo também é alterada durante o estresse. Os barorreceptores compõem um mecanismo de controle da pressão arterial

“momento-a-momento”, eles se localizam no arco aórtico e no seio carotídeo e possuem canais mecano-sensíveis que são acionados quando ocorrem alterações na distensão dos vasos arteriais, e através de uma ação conjunta com outros núcleos centrais busca restabelecer a pressão arterial. Durante o estresse ocorre um deslocamento da curva do barorreflexa para a direita e essa alteração de “set-point” permite um aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca simultaneamente durante o estresse (CRESTANI, 2016; DAMPNEY, 2015; DAMPNEY *et al.*, 2008).

2.2 Respostas cardiovasculares ao estresse

Dados publicados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) no ano de 2019 (período pré-pandemia da Covid-19) apresentaram que no período entre os anos 2000-2019 as doenças cardiovasculares (isquemia cardíaca e acidente vascular encefálico) ocupavam as primeiras posições do ranking das dez principais causas de morte no mundo (OMS, 2019). O estresse tem sido ostensivamente atribuído como um fator de risco para o desencadeamento de doenças cardiovasculares (KIVIMÄKI; STEPTOE, 2018; SGOIFO *et al.*, 2014; WIRTZ; VON KÄNEL, 2017). Vale salientar que, as alterações cardiovasculares induzidas pelo estresse podem ser consideradas adaptativas a curto prazo sendo necessárias para a sobrevivência e a adaptação das espécies (luta ou fuga) (STERLING, 2012), nesse sentido os danos cardiovasculares associados ao estresse agudo estão mais fortemente relacionados a condições pré-existentes (OSBORNE *et al.*, 2020), porém é majoritariamente na situação de estresse prolongado e/ou repetido (estresse crônico) que pode resultar em alterações morfofuncionais que irão comprometer a função cardiovascular, resultando em respostas inadequadas ou insuficientes, favorecendo o aparecimento de doenças (CRESTANI, 2016; DHABHAR, 2019; MCEWEN, 2007, 2017). Estudos recentes têm demonstrado que a exposição a protocolos crônicos de estresse causa diversas alterações na atividade autônoma e na função

cardiovascular, incluindo: desbalanço na atividade autônoma cardíaca no sentido de aumento da contribuição simpática, aumento nos valores basais de PA e FC, comprometimento na função barorreflexa, disfunção vascular e cardiomiopatias (DUARTE *et al.*, 2015).

Como apresentado acima, a cronicidade do estresse é um fator importante no comprometimento cardiovascular, contudo diante de uma situação aversiva aguda o sistema nervoso autônomo promove as respostas imediatas ao estresse que podem ser observadas em modelos experimentais, como é o caso do estresse agudo de restrição.

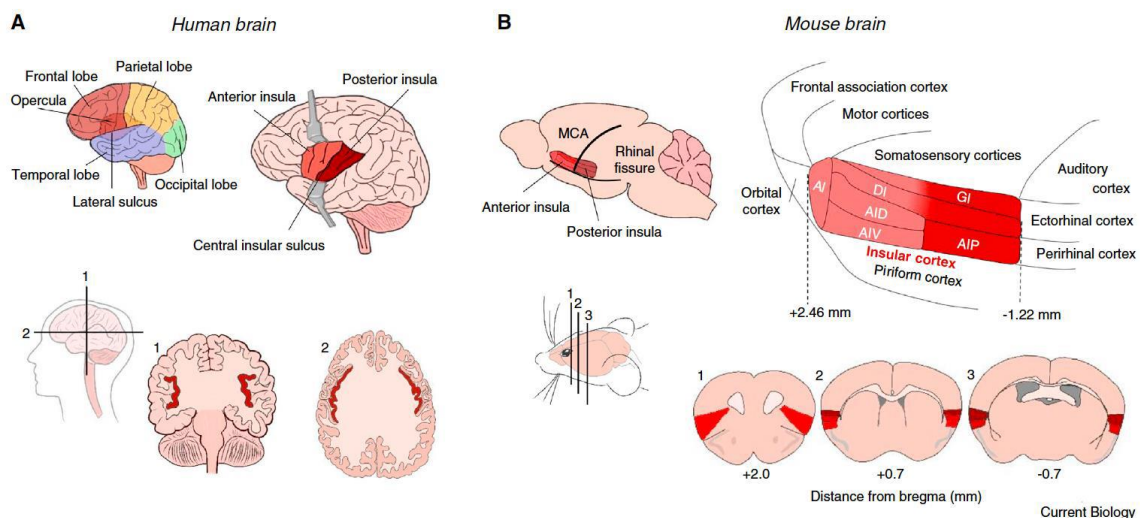
O estresse agudo de restrição é um modelo de estresse psicológico (CRESTANI, 2016) combinado com confinamento físico (HARRIS, 2015; JAGGI *et al.*, 2011) capaz de causar respostas neuroendócrinas, como elevação nos níveis plasmáticos de glicocorticoides e autônomas como aumento da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC), modulação da atividade do barorreflexo e redução da temperatura cutânea, as quais são mantidas durante todo o período de estresse (ALVES *et al.*, 2010; BARRON ; VAN LOON, 1989; MATSUHISA *et al.*, 2014). Adicionalmente, estudos recentes têm evidenciado alterações comportamentais do tipo ansiogênicas decorrentes do estresse agudo de restrição (BUSNARDO *et al.*, 2019; HARTMANN *et al.*, 2019; VITORIO *et al.*, 2023).

2.3 Córtex Insular

O IC é uma estrutura cortical descrita pela primeira vez pelo neurologista alemão Johann-Christian Reil, no século 19 (GOGOLLA, 2017). O nome ínsula (latim de ilha) faz referência a sua localização em primatas, incluindo humanos, uma vez que, ela se encontra “escondida” abaixo lobos frontal, parietal e temporal; de modo que a ínsula também pode ser designada como “ilha de Reil” e “quinto lóbulo oculto” (GOGOLLA, 2017; NIEUWENHUYTS, 2012). Como mencionado na seção “Introdução”, o IC de

humanos e roedores apresenta uma diferença exclusivamente restrita a localização (Figura 2), porém resultados clínicos e pré-clínicos em estudos comportamentais e de neuroimagem tem evidenciado uma equivalência funcional entre as espécies e um perfil análogo no que diz respeito a organização celular e projeções (aferências e eferências) (GOGOLLA, 2017).

Figura 2 - Localização do córtex insular (IC) no encéfalo humano e do camundongo.



(A) Anatomia do cérebro humano. Superior esquerdo: o IC é localizado abaixo do sulco lateral e é oculto pelos lobos frontal, parietal e temporal. Acima a direita: quando os lobos temporais e parietais são empurrados para o lado, o IC pode ser visto; e separado em uma parte anterior e posterior pelo sulco insular central. Parte inferior: seções coronais (1) e horizontal (2) do cérebro humano indicam a posição do IC (vermelho). (B) Anatomia do cérebro do camundongo. * Superior esquerdo: o IC fica exposto na superfície lateral do cérebro acima da fissura rinal. A artéria cerebral medial (do inglês, MCA) atravessa o IC. Superior direito: subdivisões e regiões corticais vizinhas do IC no encéfalo do camundongo. 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. Inferior: cortes transversais coronais em diferentes níveis revelam a localização e as camadas do IC no camundongo. Adaptado de Gogolla (2017). * A anatomia do IC em ratos é similar àquela apresentada em camundongos.

A insula é dividida anatomicamente em duas porções no sentido rostrocaudal: anterior e posterior. As regiões anterior e posterior podem variar morfológicamente e em suas conexões com estruturas encefálicas. O IC é também dividido em três sub-regiões no sentido dorso-ventral: granular, disgranular e agranular; e essas regiões diferenciam-se pela presença ou ausência da camada granular interna (IV). A camada granular é estruturada em seis camadas de células granulares, na região disgranular ocorre uma

diminuição das células granulares na camada IV, e por fim, a camada IV é completamente ausente na porção agranular. Apesar dessas regiões serem interconectadas de maneira robusta, a atividade funcional parece ser sítio-específica, onde a camada agranular medeia funções afetivas, a camada disgranular desempenha um papel majoritariamente cognitivo e a camada granular atua no contexto somatossensorial (UDDIN, 2015).

A participação do IC no controle das emoções e dos sentimentos foi negligenciada por muito tempo (NAMKUNG *et al.*, 2017). Entretanto, uma participação do IC na integração de informações límbicas foi sugerida a partir da observação da vasta rede de conexões entre o IC e estruturas do sistema límbico como os núcleos amigdaloides, o córtex pré-frontal medial, o núcleo leito da estria terminal, o hipotálamo lateral, a substância cinzenta periaqueducal, entre outras áreas (ALLEN *et al.*, 1991; AUGUSTINE, 1996; NOMI *et al.*, 2018; SAPER, 1982; SHI; CASSELL, 1998). Desde então estudos tem sugerido a participação do IC como mediador de diversas funções cerebrais, como o processamento de informações sensoriais externas e corporais, autoconsciência, regulação emocional, sentimentos e funções socioafetivas complexas como a empatia, alternância entre redes cerebrais de larga escala e na geração de respostas fisiológicas e comportamentais durante situações aversivas (GEHRLACH *et al.*, 2020).

De fato, tem sido amplamente evidenciado o envolvimento do IC no controle das respostas cardiovasculares induzidas durante ameaças aversivas. Foi identificado que o bloqueio sináptico não-seletivo no IC em ratos causado pelo tratamento local com CoCl_2 reduziu as respostas cardiovasculares induzidas tanto por estímulos aversivos condicionados (medo condicionado ao contexto) quanto não-condicionados (estresse por restrição) (ALVES *et al.*, 2010, 2013). Com relação as respostas comportamentais ao estresse, foi relatado um envolvimento do IC na resposta comportamental de congelamento no modelo de medo condicionado ao contexto (ALVES *et al.*, 2013) e no

efeito ansiogênico no estresse de restrição, nesse último a resposta foi sítio-específica, indicando um papel proeminente da porção intermediária nessa resposta (VITORIO *et al.*, 2023)

No que diz respeito ao impacto da organização topográfica do IC nas respostas cardiovasculares, estudos anteriores reportaram em animais não-estressados alterações na PA e FC que foram dependentes da região do IC estimulada (HARDY; HOLMES, 1988; HARDY; MACK, 1990; RUGGIERO *et al.*, 1987; YASUI *et al.*, 1991). A estimulação de regiões anteriores do IC promoveu predominantemente quedas na PA (HARDY; HOLMES, 1988; HARDY; MACK, 1990), enquanto a estimulação da porção posterior causou tanto resposta pressora quando depressora, que foram acompanhadas de alterações na FC. Nesse sentido, foi identificado que os sítios envolvidos no aumento da PA e FC estavam localizados mais rostralmente do que os envolvidos na geração de respostas depressora e bradicárdica (VERBERNE; OWENS, 1998). O componente sítio-específico das respostas pressora na porção posterior do IC também foi observado em estudos recentes (MARINS *et al.*, 2016; MARINS, OLIVEIRA, *et al.*, 2021).

Foi documentado recentemente que diante de situações aversivas apenas os sítios posteriores do IC estavam envolvidos nas respostas cardiovasculares, e esse controle pela sub-região posterior ocorreu de uma maneira sítio-específica (TOMEIO *et al.*, 2022). Uma topografia funcional ao longo do eixo rostrocaudal do IC também foi relatada no controle da expressão e extinção do medo condicionado (DE PAIVA *et al.*, 2021; SHI; CASSELL, 1998). Em conjunto, esses dados indicaram que os sítios ao longo do eixo rostrocaudal do IC regulam de maneira diferente as respostas ao estresse.

Tipicamente, a exposição a eventos estressores causa aumento no número de células positivas para a proteína Fos em estruturas encefálicas, o que indica ativação neuronal. Entretanto, apesar de em estudo do nosso grupo nós encontramos que na porção

posterior-rostral do IC o controle da resposta pressora ao estresse de restrição foi acompanhado de aumento no número de células marcadas com a proteína Fos, de maneira inesperada nós observamos que o controle da resposta de FC pela porção caudal do IC posterior foi associada com uma diminuição no número de células positivas para a proteína Fos nessa área, o que indica uma redução na ativação neuronal local (TOMEIO *et al.*, 2022). Esses dados indicam que o controle das respostas cardiovasculares pelas porções rostral e caudal do IC posterior seja mediado por diferentes mecanismos neuroquímicos. O controle pela porção caudal parece ser mediado predominantemente por mecanismos inibitórios, ao passo que mecanismos excitatórios locais estão envolvidos no controle pelo IC posterior rostral.

O principal neurotransmissor excitatório do SNC é o glutamato. A síntese desse neurotransmissor envolve a hidrólise da glutamina em glutamato pela enzima mitocondrial glutaminase (BAK *et al.*, 2006), e uma vez sintetizado o glutamato permanece armazenado em vesículas nos terminais pré-sinápticos, pois sua liberação é dependente da ativação de um mecanismo cálcio (Ca^{2+}) dependente (MELDRUM, 2000). Uma vez que esteja presente na fenda sináptica este neurotransmissor pode interagir com dois grandes grupos de receptores: metabotrópicos (mGlu), que podem ser divididos em oito subgrupos (mGlu1-8) e cujas ações são mediadas pela proteína G; e/ou receptores ionotrópicos (iGlu), um grupo de receptores permeáveis aos íons sódio (Na^+) e Ca^{2+} , que podem ser do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-ácido propiônico (AMPA) e cainato (KA) (ZHOU *et al.*, 2014).

A participação das neurotransmissões glutamatérgica tem sido proposta em inúmeros processos fisiológicos e comportamentais, bem como a sua participação no desenvolvimento de patologias neurodegenerativas (MELDRUM, 2000; PETROFF, 2002). No IC, um envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica nas respostas

cardiovasculares em animais não-estressados foi relatada na literatura (BUTCHER; CECHETTO, 1995; RANJBAR *et al.*, 2015; RUGGIERO *et al.*, 1987), Marins e colaboradores (2016) encontraram recentemente que a estimulação química de receptores ionotrópicos do tipo NMDA esteve associada a uma resposta simpática sítio-específica (MARINS *et al.*, 2016). No contexto das respostas cardiovasculares evocadas pelo estresse, um estudo recente relatou que o antagonismo de receptores NMDA esteve envolvido com o aumento de PA e FC evocados pelo estresse de restrição em ratos, enquanto o antagonismo de receptores não-NMDA não afetou as respostas cardiovasculares (GOULART *et al.*, 2022).

O principal neurotransmissor envolvido nas respostas inibitórias e na manutenção do equilíbrio elétrico do SNC é o GABA_A. A síntese desse neurotransmissor é dependente da conversão do glutamato pela enzima glutamato descarboxilase (GAD) (WALLS *et al.*, 2015); e assim como o glutamato, o GABA_A fica armazenado em vesículas pré-sinápticas e após sua liberação nos terminais sinápticos atuam em receptores específicos que podem ser metabotrópicos (receptores GABA_B) ou ionotrópicos (receptores GABA_A). Os receptores GABA_A são ionotrópicos e sua ativação permite a difusão de íons Cl⁻ através da membrana da célula, o que acarreta hiperpolarização da membrana. Os receptores GABA_B são metabotrópicos e pertencem a família dos receptores acoplados a proteína G, assim sua ativação inibe a enzima adenilato ciclase, reduzindo os níveis de AMPc e a atividade da proteína quisase A (PKA) (PETROFF, 2002; ROTH; DRAGUHN, 2012).

O envolvimento de mecanismos GABAérgicos no controle de repostas cardiovasculares ao estresse pelo IC já foi evidenciado. Nesse sentido, foi identificado um papel tônico inibitório do receptor GABA_A na porção posterior do IC na manutenção da PA e da atividade simpática em ratos em repouso (SALEH *et al.*, 2005). A neurotransmissão GABAérgica no IC foi também reportada estar envolvida no controle

de respostas comportamentais ao estresse. Por exemplo, a microinjecao de muscimol (agonista do receptor GABA_A) no IC reduziu a resposta de diminuico da exploraco social induzida pelo estresse de choque na cauda (CHRISTIANSON *et al.*, 2011). Contudo, o envolvimento de mecanismos GABAérgicos do IC nas respotas cardiovasculares ao estresse nunca foi reportado.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi investigar os mecanismos neuroquímicos locais envolvidos no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrico em diferentes sítios ao longo do eixo rostrocaudal do IC posterior em ratos. Para tanto, os objetivos específicos foram:

1. Os efeitos da microinjeco bilateral de um antagonista de receptores glutamatérgicos nas regies posterior-rostral e posterior-caudal do IC sobre as respostas cardiovasculares ao estresse de restrico agudo.

2. Os efeitos da microinjeco bilateral de um coquetel de antagonistas de receptores GABAérgicos na regio posterior-rostral e posterior-caudal do IC sobre as respostas cardiovasculares ao estresse de restrico agudo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar com peso corporal entre 240-250g (60 dias). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (Botucatu/SP) e transferidos para o Biotério do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP (FCFAr-UNESP) no mínimo sete dias antes do início dos procedimentos experimentais. Os animais tiveram acesso livre a ração granulada e água, e foram mantidos em salas climatizadas (temperatura de 23±2°C e umidade 50±10%) com ciclo claro-escuro 12-12 h (luz 7:00 h–

19:00 h). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCFAR-UNESP (protocolo 06/2022).

4.2 Cirurgia para o implante de cânulas guias direcionadas ao córtex insular

Os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina + xilazina (87mg/kg e 13mg/kg, respectivamente). Após a tricotomia, a cabeça do rato foi imobilizada em um estereotáxico (Stoelting, EUA) e foi realizada assepsia do campo cirúrgico com álcool 70%. Para redução do sangramento durante a cirurgia foi injetado 0,3 ml de solução de lidocaína com vasoconstritor. A calota craniana foi exposta por meio de uma incisão na pele de aproximadamente 1,5 cm, afastando-se completamente o periósteo. A limpeza da região foi feita utilizando-se solução salina e água oxigenada a 10%. Todas as coordenadas tiveram como referência parâmetros obtidos do atlas do encéfalo de ratos de Paxinos & Watson (PAXINOS; WATSON, 1997), e foram como segue:

Parâmetro	IC posterior-rostral	IC posterior-caudal
Ântero-posterior (distância em relação a interaural)	+9,7mm	+7,5
Lateral (distância a partir da sutura média)	+5,0mm	+6,2
Vertical (distância a partir do osso)	-5,0mm	-6,0mm
Incisivo	-3,2mm	

Após o posicionamento da cânula de aço inoxidável, foram feitos pequenos orifícios no crânio com auxílio de uma broca odontológica, por onde foram introduzidas as cânulas (bilateralmente), que foram constituídas por um segmento de agulha hipodérmica (26 x 0,6 mm, gauge) com 12 mm de comprimento. As cânulas foram fixadas ao crânio com uma resina acrílica autopolimerizável (Simples, DFL, Ind. Com., Rio de Janeiro, RJ), e pequenos parafusos de aço inoxidável foram previamente implantados na calota craniana para fixação da resina. Um mandril de 0,2 mm de diâmetro foi introduzido nas cânulas para evitar a obstrução das mesmas durante o período de recuperação. Como medida profilática, ao final da cirurgia os animais receberam 0,2 mL de pentabiótico veterinário (Fountoura-Wyeth, São Paulo, Brasil) por via intramuscular e 0,3 mL do anti-

inflamatório não-esteroidal flunexina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Cotia/SP, Brasil) por via subcutânea.

4.3 Canulação da artéria femoral

Os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina + xilazina (87mg/kg e 13mg/kg, respectivamente), e um cateter foi implantado na artéria femoral para registro dos parâmetros cardiovasculares. O cateter foi constituído por segmento de polietileno PE-10 (4-5cm) soldado a segmento de polietileno PE-50 (12-13 cm) (Clay Adams, Parsippany, EUA), previamente preenchidos por solução salina e anticoagulante (15 U/mL de heparina em solução salina), e obstruídos com pino de metal. Após a implantação do cateter, esse foi exteriorizado na região dorsal do animal e fixados à pele por sutura cirúrgica. Como medida profilática, após a cirurgia os animais receberam 0,3 mL do anti-inflamatório não-esteroidal flunexina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brasil) por via subcutânea. Os animais foram mantidos em caixas individuais 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., EUA) através de um segmento de polietileno PE-50. A pressão arterial pulsátil 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), usando um programa apropriado (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 (BUSNARDO *et al.*, 2019; 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. Para tanto, os registros da temperatura cutânea da cauda foram feitos utilizando um termovisor (IRI4010, Inglaterra). A análise foi feita através de um software para análise termográfica, e a temperatura foi representada como variações de intensidade de cor (BUSNARDO *et al.*, 2019; 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 ácido quinurênico (antagonista não-seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos) (Tocris, EUA) e os coquetéis de SR95531 (antagonista seletivo do receptor GABA_A) (Tocris) + CGP35348 (antagonista seletivo do receptor GABA_B) (Tocris) e de cetamina (Ceva) + xilazina (Syntec) foram dissolvidos em solução salina (NaCl 0,9%). O pentabiótico (Fountora-Wyeth, Brasil) e o anti-inflamatório flunexina meglumina (Banamine ®, Schering Plough, Brasil) foram utilizados como fornecidos pelos fabricantes.

4.7 Microinjeção de drogas no córtex insular

As agulhas injetoras (33 G, Small Parts, USA) que foram utilizadas para as microinjeções intracerebrais foram 1 mm mais longas do que as cânulas guias previamente fixadas ao crânio, e foram conectadas a uma seringa de 2 µL (7002-KH, Hamilton, USA) através de um tubo de polietileno (PE-10). As drogas foram injetadas no volume de 100nL/lado (ALVES *et al.*, 2010, 2014; MARINS *et al.*, 2016; TOMEIO *et al.*, 2022; VITORIO *et al.*, 2023).

4.8 Estresse de restrição

O estresse de restrição é um modelo experimental de estresse amplamente empregado em estudos em roedores (BALI; JAGGI, 2015; BUYNITSKY; MOSTOFSKY, 2009; CAMPOS *et al.*, 2013) devido a sua simplicidade, fácil execução e indolor, não causando debilitação nos animais (BUYNITSKY ; MOSTOFSKY, 2009). Além disso, esse estressor produz respostas fisiológicas e comportamentais que são pronunciadas e facilmente reproduzíveis (BALI ; JAGGI, 2015). Estudos prévios que investigaram o envolvimento do IC nas respostas cardiovasculares induzidas por estímulos aversivos não-condicionados utilizaram esse modelo experimental de estresse (ALVES *et al.*, 2010, 2014; TOMEO *et al.*, 2022; VITORIO *et al.*, 2023). Desse modo, os dados obtidos com o estresse de restrição permitem ampla comparação com dados da literatura.

O estresse de restrição consistiu na introdução dos animais em tubos cilíndricos plásticos (diâmetro = 6,5 cm, comprimento = 15 cm, ventilados por buracos de ½ polegada que preencham aproximadamente 20% do tubo). Os animais foram mantidos por um período de 60 minutos no tubo de restrição (ALVES *et al.*, 2010, 2014; TOMEO *et al.*, 2022; VITORIO *et al.*, 2023), e cada animal foi submetido a apenas uma sessão de restrição para evitar habituação (BENINI *et al.*, 2019).

4.9 Determinação anatômica dos sítios de injeção no córtex insular

Ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg, i.p.) e 100 nL do corante azul de Evans (1%) foi microinjetado bilateralmente para determinação do sítio de injeção. Em seguida, os ratos foram perfundidos e os encéfalos removidos, pós-fixados e posteriormente seccionados em cortes frontais de 40 µm de espessura com auxílio de um 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 (PAXINOS ; WATSON, 1997).

4.10 Análise estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A análise de variância (ANOVA) bifatorial, com tratamento do IC (veículo vs tratamentos farmacológicos) como medida principal e tempo como medida repetida foi usada para comparar as curvas temporais de variação da PAM, FC e temperatura cutânea da cauda durante a sessão aguda de estresse de restrição. A média dos pontos ao longo de três períodos (0-20min, 20-40min e 40-60min do estresse) durante a restrição foi calculado a partir dos dados das curvas temporais, e as diferenças nos valores entre os grupos veículo e tratamento farmacológico foram comparados individualmente em cada período usando o teste *t* de *Student*. Os valores basais (isto é, pré-estresse) de PAM, FC e temperatura cutânea da cauda também foram comparados usando o teste *t* de *Student*. $P < 0,05$ foi assumido como significante em todas as análises.

5. Protocolos Experimentais

A delimitação neuroanatômica da sub-região posterior-rostral do IC foi baseada em definições reportadas previamente (MARINS *et al.*, 2016; OPPENHEIMER; CECHETTO, 2016; YASUI *et al.*, 1991).

5.1 Estudo do envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica na região posterior-rostral do IC no controle das respostas cardiovasculares durante uma sessão aguda de estresse de restrição

Como abordado na Introdução, apesar da identificação de receptores glutamatérgicos e GABAérgicos em diferentes sítios do IC (MARINS *et al.*, 2016; SALEH; CONNELL; CRIBB, 2005), a participação desses mecanismos neuroquímicos no controle das respostas cardiovasculares ao estresse foi pouco investigada. *Desse modo*,

o objetivo desse protocolo foi investigar o efeito da microinjeção bilateral de antagonistas de receptores glutamatérgicos e GABAérgicos na região posterior-rostral do IC no controle das respostas cardiovasculares desencadeadas por uma sessão aguda de estresse por restrição.

Para tanto, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guias bilaterais direcionadas à região posterior-rostral do IC, e mantidos em recuperação por três dias. Vinte quatro horas antes do experimento os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico para implantação de cateter na artéria femoral para registro cardiovascular. No dia do experimento, dez minutos antes do início da sessão de estresse de restrição, grupos independentes de animais receberam microinjeção bi lateral na região posterior-rostral do IC de veículo (salina, 100nL), ácido quinurênico (antagonista não-seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, 16 nmol/100nL) ou coquetel de gabazina (SR95531, antagonista seletivo do receptor GABA_A, 0,01nmol/100nL) + CGP35348 (antagonista seletivo do receptor GABA_B, 10nmol/100nL). As doses dos antagonistas foram baseadas em estudos prévios que realizaram injeção intra-cerebral (GOMES-DE-SOUZA *et al.*, 2019; RESSTEL; CORRÊA, 2006; ZHONG *et al.*, 2008; ZHOU *et al.*, 2014), bem como nos valores de *K_i* dos fármacos (ALEXANDER *et al.*, 2021). Dez minutos após o tratamento do IC, os animais foram submetidos a sessão de 60 minutos de estresse de restrição (ALVES *et al.*, 2014; ALVES; CRESTANI; CORRÊA, 2010; TOMEIO *et al.*, 2022).

O registro cardiovascular iniciou ao menos 20 minutos antes do início do estresse de restrição, e foi realizado durante todo o período de restrição. A vasoconstricção cutânea durante situações aversivas reduz a temperatura cutânea (BUSNARDO *et al.*, 2019; VIANNA; CARRIVE, 2005). Desse modo, a temperatura cutânea da cauda foi mensurada como uma medida indireta da resposta simpática vasomotora em leitos cutâneos aos 10,

5 e 0 minutos antes da restrição; bem como aos 10, 20, 40 e 60 minutos durante a exposição ao estresse por restrição (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

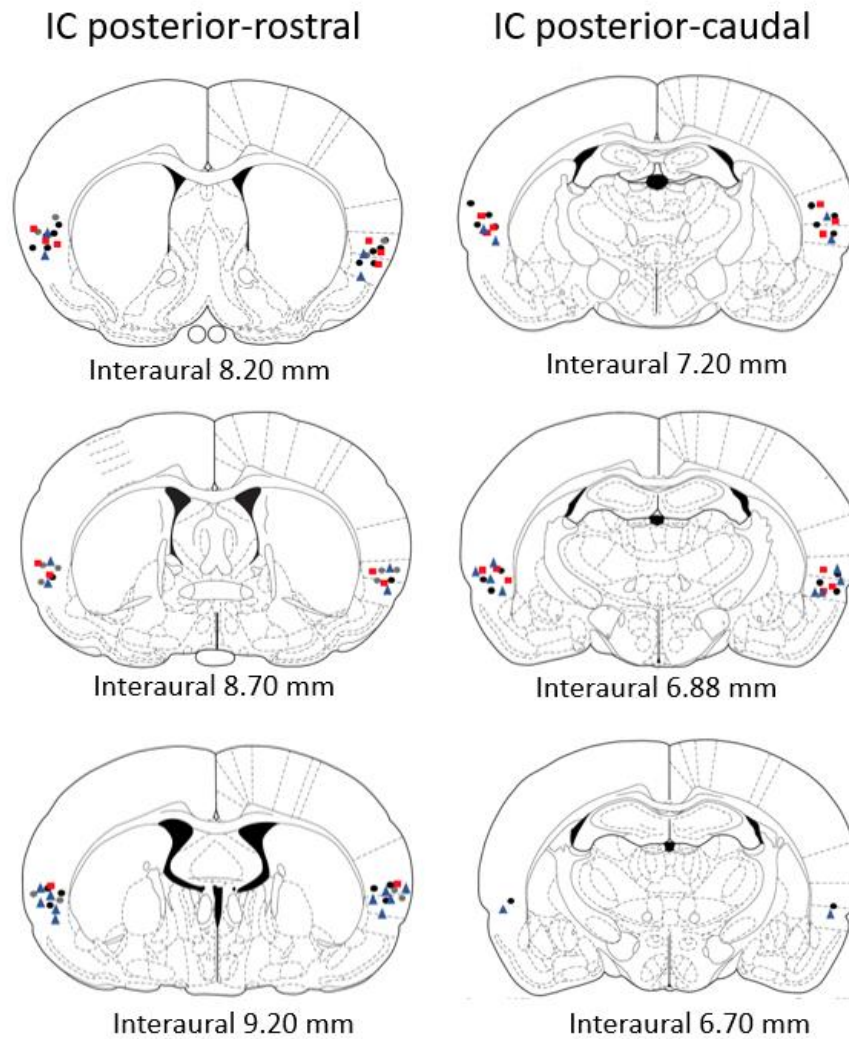
Ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg, i.p.), e 100nL do corante azul de Evan (1%) foi microinjetado bilateralmente para determinação do sítio de injeção no encéfalo. Em seguida, os ratos foram perfundidos e os cérebros removidos, pós-fixados e posteriormente seccionados em cortes frontais de 40µm de espessura para análise dos sítios de injeção.

6. RESULTADOS

6.1 Envolvimento das neurotransmissões glutamatérgica e GABAérgica ao longo do eixo rostrocaudal da porção posterior do IC no controle das respostas cardiovasculares ao estresse por restrição agudo.

A Figura 3 mostra representações diagramáticas baseadas no Atlas de Paxinos & Watson (PAXINOS; WATSON, 1997) indicando os sítios de microinjeção nas regiões posterior-rostral e posterior-caudal do IC de todos os animais utilizados nos protocolos de avaliação do envolvimento das neurotransmissões glutamatérgica e GABAérgica nas respostas cardiovasculares ao estresse de restrição.

Figura 3 - Representação diagramática baseada no atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (1997) indicando os locais de microinjeção de salina (círculos pretos), ácido quinurênico [antagonista não-seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, círculos cinza (16nmol/100nL), triângulo azul (50nmol/100nL)] e SR95531 (antagonista seletivo do receptor GABA_A) + CGP35348 (o antagonista seletivo do receptor GABA_B, quadrado vermelho) no córtex insular posterior-rostral e córtex insular posterior-caudal.



Fonte: autoria própria.

6.1.1 Envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica na região posterior-rostral do IC no controle das respostas cardiovasculares ao estresse por restrição agudo na região posterior-rostral do IC

A microinjeção bilateral de ácido quinurênico (antagonista não-seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, 16 nmol/100nL) na região posterior-rostral do IC não alterou os parâmetros basais de PAM, FC e temperatura cutânea da cauda (Tabela 1).

Tabela 1 - Parâmetros basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda após o tratamento farmacológico da região posterior-rostral do IC com ácido quinurênico (antagonista não-seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, 16 nmol/100nL) ou veículo (salina, 100nL).

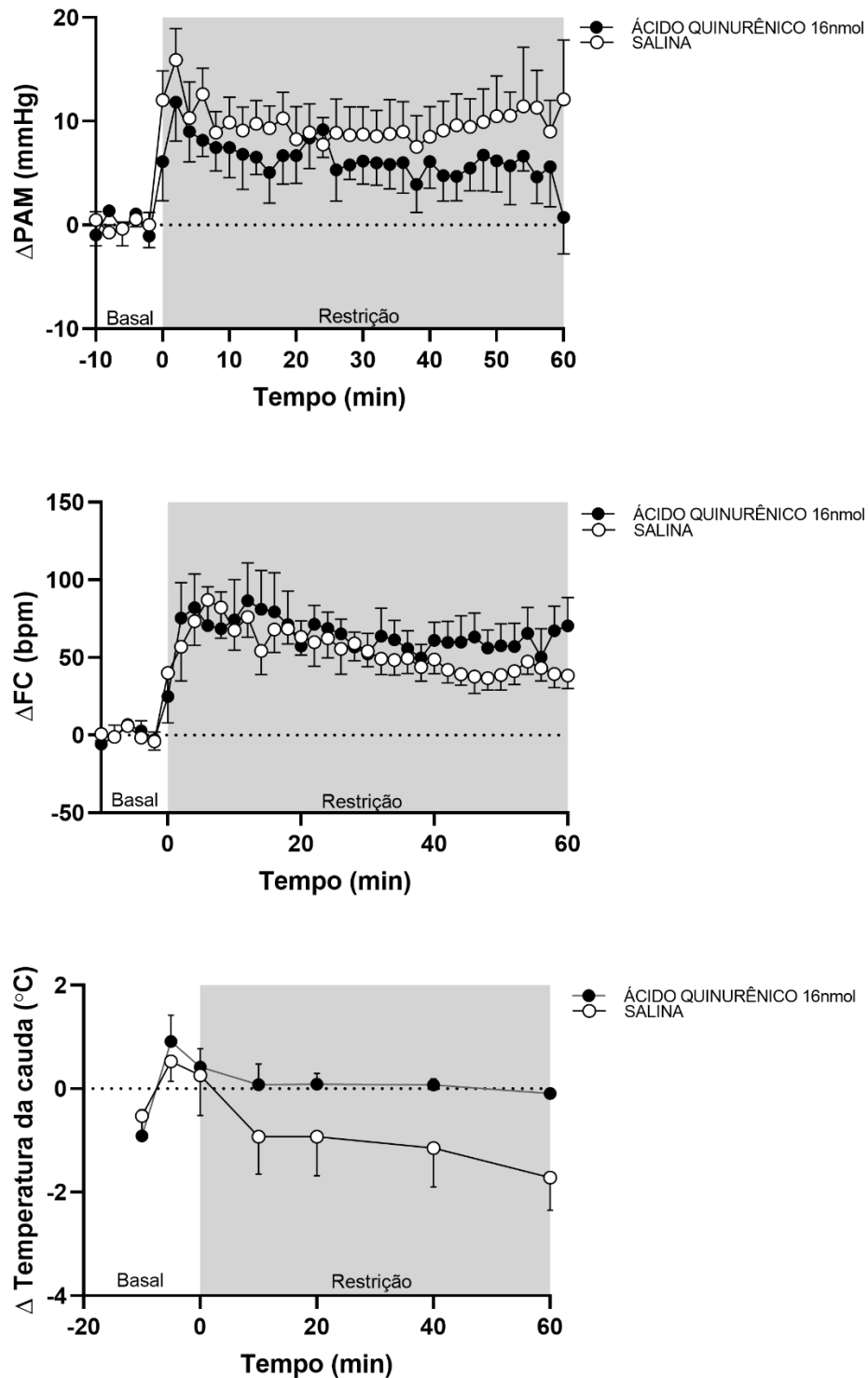
GRUPO	N	PAM (mmHg)	FC (bpm)	Temperatura cutânea da cauda (°C)
Salina	9	101,3±2,71	360,3±6,21	30,5±0,28
Ácido quinurênico	7	101,3±5,37	359,3±17,66	30,3±0,31
		$t=0,003$ $P=0,99$	$t=0,058$ $P=0,95$	$t=0,44$ $P=0,66$

A análise das curvas temporais indicou que o estresse de restrição agudo causou aumento da PAM ($F_{(35,490)}=4,729$, $P<0,0001$) e da FC ($F_{(35,490)}=9,01$, $P<0,0001$), e diminuiu a temperatura cutânea da cauda ($F_{(6,72)}=2,99$, $P<0,01$) (Figura 4). A microinjeção bilateral de ácido quinurênico no IC posterior-rostral não afetou significativamente o aumento da PAM ($F_{(1,14)}=1,11$, $P=0,30$), da FC ($F_{(1,14)}=0,42$, $P=0,52$) e a diminuição da temperatura cutânea da cauda ($F_{(1,12)}=1,14$, $P=0,30$) (Figura 4) durante o estresse de restrição agudo. A Figura 5 mostra fotos representativas da temperatura cutânea da cauda antes (basal) e em diferentes momentos durante o estresse de restrição em animais tratados com veículo ou ácido quinurênico no IC posterior-rostral.

Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa, foi possível observar na curva temporal uma tendência de redução da resposta de aumento PAM nos animais tratados com ácido quinurênico (Figura 4), que aparece mais evidente no período entre 40 e 60 minutos de restrição. Desse modo, para confirmar um eventual efeito no período final da restrição, foram realizadas análises adicionais ao calcular os valores médios de resposta a partir dos dados das curvas temporais nos períodos de 0-10, 20-40 e 40-60 minutos de restrição; e o efeito do tratamento foi analisado individualmente em cada período (Figura 6). No entanto, mesmo a análise individual em cada período temporal não identificou efeito do tratamento da região posterior-rostral com ácido quinurênico nos períodos 0-20 minutos [PAM ($t=1,23$, $P=0,23$) e FC ($t=0,54$, $P=0,59$)], 20-40 minutos [PAM ($t=0,21$, $P=0,83$) e FC ($t=0,77$ $P=0,45$)] e 40-60 min [PAM ($t=1,1$, $P=0,28$) e FC

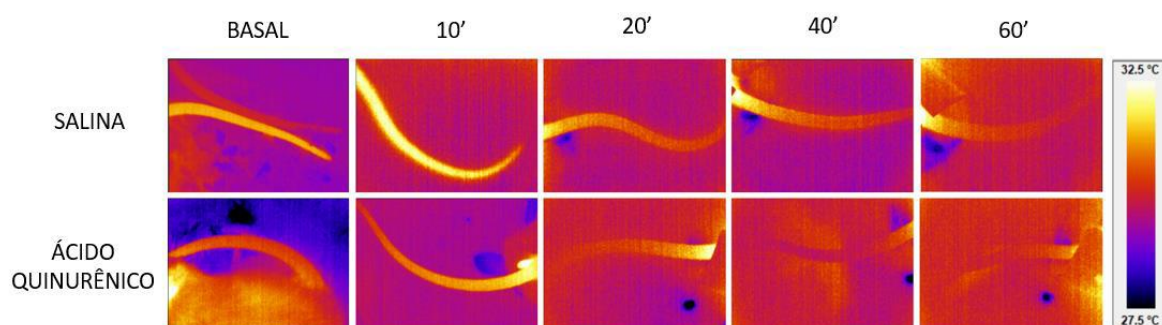
($t=1,15$, $P=0,26$)] (Figura 6). Essa análise não foi possível para os dados de temperatura cutânea da cauda devido ao protocolo de aquisição desses dados (medidas somente nos tempos 10, 20, 40 e 60 minutos de restrição).

Figura 4 - Curvas temporais de variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea da cauda (Δ temperatura da cauda) induzidas pelo estresse de restrição agudo em animais tratados com ácido quinurênico (antagonista não-seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, 16nmol/100nL, n=7) ou veículo (salina, 100nL n=9). A área sombreada indica o período de restrição. Círculos representam a média $\pm$ EPM.



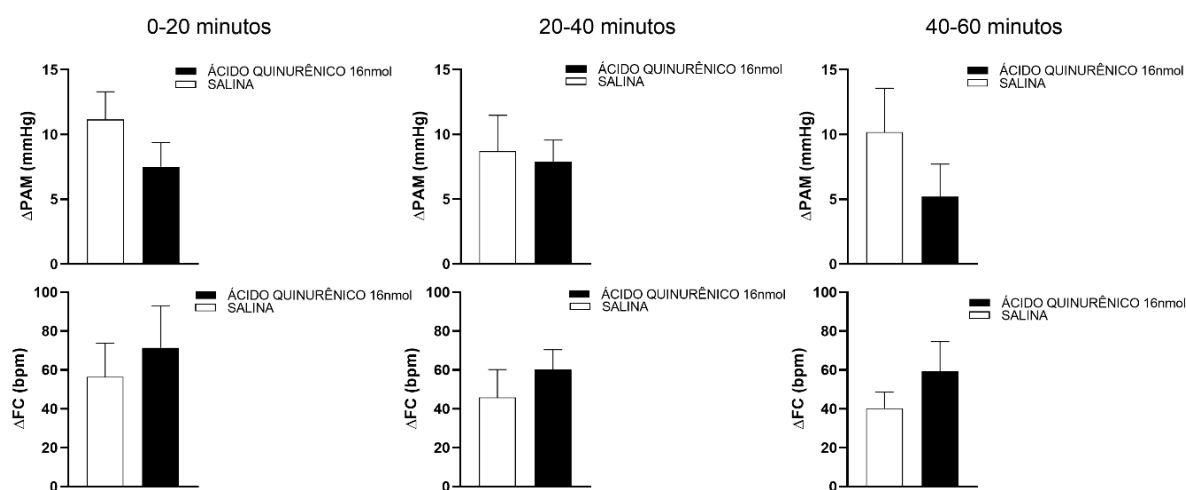
Fonte: autoria própria.

Figura 5 - Fotos de ratos representativos mostrando a temperatura cutânea da cauda nos períodos basal em diferentes momentos durante o estresse de restrição em animais tratados com veículo (salina) ou ácido quinurênico 16nmol no IC posterior-rostral.



Fonte: autoria própria.

Figura 6 - Média das respostas de pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea da cauda (Δ temperatura cauda) nos intervalos 0-20min, 20-40min e 40-60min durante o estresse de restrição em animais submetidos ao tratamento do IC posterior-rostral com veículo (salina, barras brancas, n=9) ou ácido quinurênico (barras pretas, n=7). Colunas representam a média e as barras EPM.



Fonte: autoria própria.

Visando fornecer evidências mais substanciais acerca do papel de mecanismos glutamatérgicos do IC posterior-rostral nas respostas cardiovasculares ao estresse de restrição e considerando a tendência de redução da resposta de aumento de PAM nos animais tratados com ácido quinurênico na dose de 16nmol/100nL sem haver diferença estatística foram realizados experimentos adicionais em relação àqueles apresentados na proposta inicial desse trabalho com intuito de investigar o efeito da microinjeção de uma

dose maior de ácido quinurênico (50nmol/100nL). A seguir são apresentados os resultados desses experimentos adicionais:

A microinjeção bilateral do ácido quinurênico na dose de 50nmol/100nL na região posterior-rostral do IC não alterou os parâmetros basais de FC e temperatura cutânea da cauda (Tabela 2). No entanto, a análise revelou que o tratamento farmacológico reduziu a PAM basal (Tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda após o tratamento farmacológico da região posterior-rostral do IC com ácido quinurênico (antagonista não-seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, 50 nmol/100nL) ou veículo (salina, 100nL).

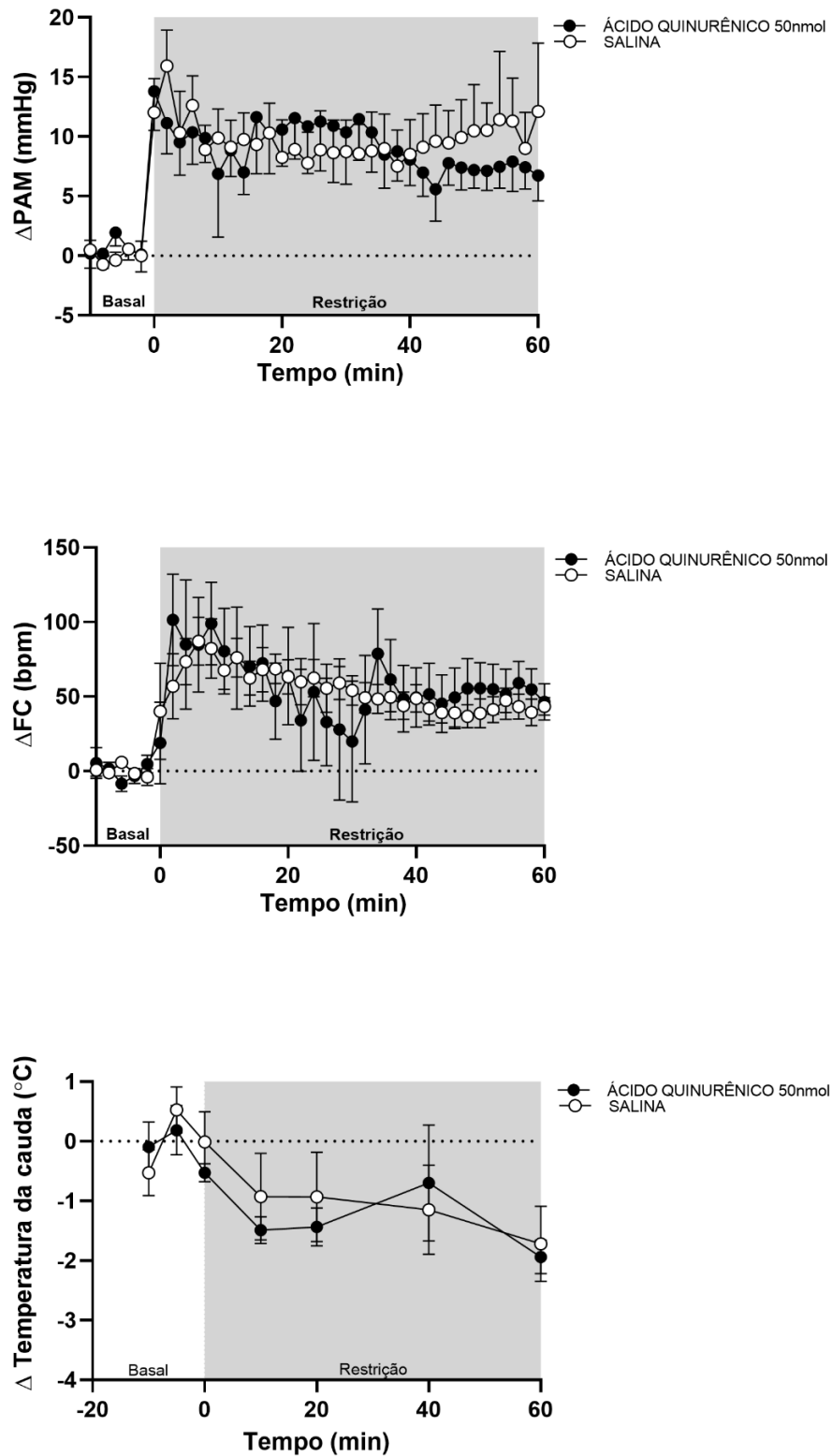
GRUPO	N	PAM (mmHg)	FC (bpm)	Temperatura cutânea da cauda (°C)
Salina	9	101,3±2,71	360,3±6,21	30,5±0,28
Ácido quinurênico	6	90,7±3,60	354,1±11,21	30,1±0,31
		$t=2,38$ $P=0,03$	$t=0,51$ $P=0,61$	$t=1,11$ $P=0,28$

A análise das curvas temporais indicou que o estresse de restrição agudo causou aumento da PAM ($F_{(35,455)}=5,33$, $P<0,0001$) e da FC ($F_{(35,455)}=4,35$, $P<0,0001$), e diminuiu a temperatura cutânea da cauda ($F_{(6,78)}=5,18$, $P=0,0002$) (Figura 7). A microinjeção bilateral de ácido quinurênico na dose de 50nmol/100nL no IC posterior-rostral não afetou significativamente o aumento da PAM ($F_{(1,13)}=0,02$, $P=0,87$) e da FC ($F_{(1,13)}=0,03$, $P=0,86$) e a diminuição da temperatura cutânea da cauda ($F_{(1,13)}=0,09$, $P=0,76$) (Figura 7) durante o estresse de restrição agudo. A Figura 8 mostra fotos representativas da temperatura cutânea da cauda antes (basal) e em diferentes momentos durante o estresse de restrição em animais tratados com veículo ou ácido quinurênico na dose de 50nmol/100nL no IC posterior-rostral.

Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa, foi possível observar na curva temporal uma tendência de redução das respostas de aumento da PAM nos animais tratados com ácido quinurênico na dose de 50nmol/100nL no período de estresse entre 40-60 minutos (Figura 7). Desse modo, para confirmar um eventual efeito em

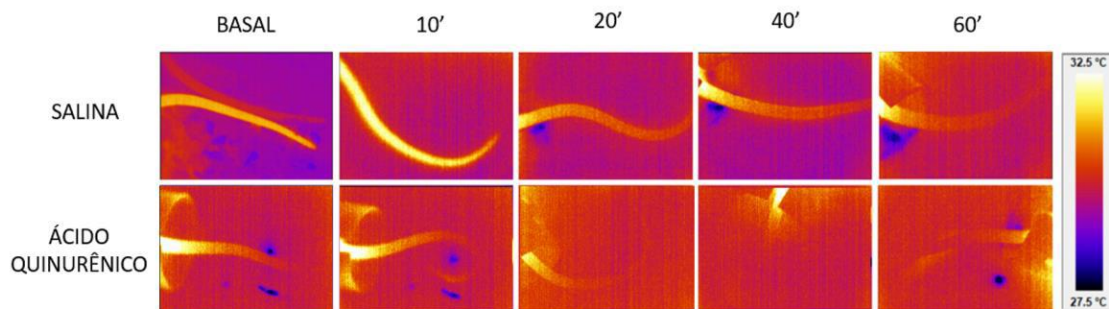
momentos específicos da restrição, foram realizadas análises adicionais ao calcular os valores médios de resposta a partir dos dados das curvas temporais nos períodos de 0-10, 20-40 e 40-60 minutos de restrição; e o efeito do tratamento foi analisado individualmente em cada período (Figura 9). No entanto, mesmo a análise individual em cada período temporal não identificou efeito significativo do tratamento da região posterior-rostral com ácido quinurênico nos períodos 0-20 minutos [PAM ($t=0,39$, $P=0,699$) e FC ($t=0,41$, $P=0,68$)], 20-40 minutos [PAM ($t=0,43$, $P=0,67$) e FC ($t=0,01$, $P=0,98$)] e 40-60 min [PAM ($t=0,64$, $P=0,52$) e FC ($t=0,70$, $P=0,49$)] (Figura 9). Essa análise não foi possível para os dados de temperatura cutânea da cauda devido ao protocolo de aquisição desses dados (medidas somente nos tempos 10, 20, 40 e 60 minutos de restrição).

Figura 7- Curvas temporais de variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea da cauda (Δ temperatura da cauda) induzidas pelo estresse de restrição agudo em animais tratados com ácido quinurênico (antagonista não-seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, 50nmol/100nL, n=6) ou veículo (salina, 100nL n=9). A área sombreada indica o período de restrição. Círculos representam a média $\pm$ EPM.



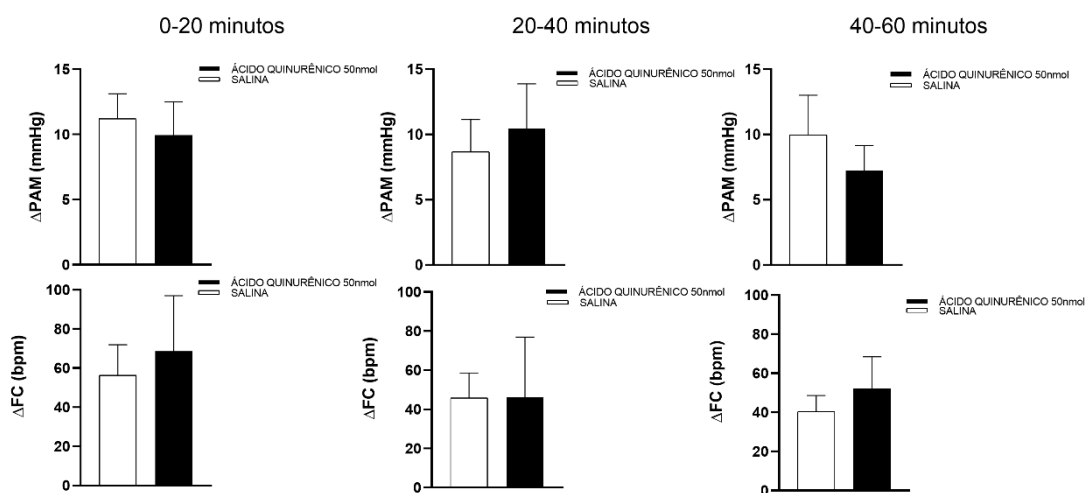
Fonte: autoria própria.

Figura 8 - Fotos de ratos representativos mostrando a temperatura cutânea da cauda nos períodos basal e em diferentes momentos durante o estresse de restrição em animais tratados com veículo (salina) ou ácido quinurênico (50nmol/100nL) no IC posterior-rostral.



Fonte: autoria própria.

Figura 9 - Média das respostas de pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea da cauda (Δ temperatura cauda) nos intervalos 0-20min, 20-40min e 40-60min durante o estresse de restrição em animais submetidos ao tratamento do IC posterior-rostral com veículo (salina, barras brancas, n=9) ou ácido quinurênico (barras pretas, n=6). Colunas representam a média e as barras EPM.



Fonte: autoria própria.

6.1.2 Envolvimento da neurotransmissão GABAérgica no IC posterior-rostral no controle das respostas cardiovasculares ao estresse por restrição agudo

A microinjeção bilateral do coquetel de SR95531 (antagonista seletivo do receptor GABA_A) + CGP35348 (antagonista seletivo do receptor GABA_B) na região posterior-rostral do IC não alterou os parâmetros basais de PAM e FC (Tabela 3).

Tabela 3 - Parâmetros basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda após o tratamento farmacológico da região posterior-rostral do IC com SR95531 (antagonista seletivo do receptor GABA_A) + CGP35348 (antagonista seletivo do receptor GABA_B) ou veículo (salina).

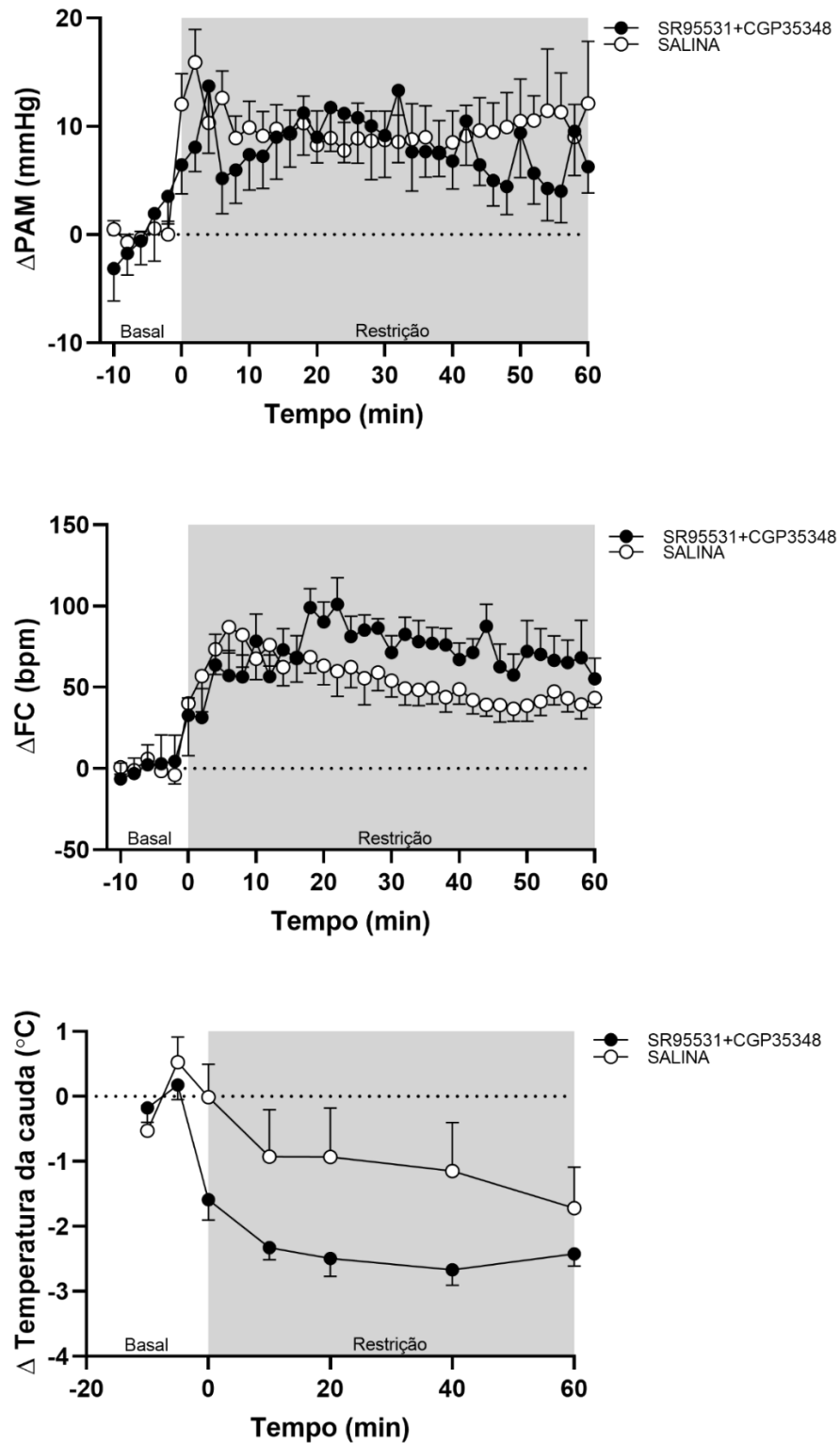
GRUPO	N	PAM (mmHg)	FC (bpm)	Temperatura cutânea da cauda (°C)
Salina	9	101,3±2,71	360,3±6,21	30,5±0,28
SR95531+ CGP35348	9	105,5±3,88	356,2±11,32	29,93±0,20
		$t=0,88$ $P=0,38$	$t=0,31$ $P=0,75$	$t=1,62$ $P=0,12$

A análise das curvas temporais indicou que o estresse de restrição agudo causou aumento da PAM ($F_{(35,560)}=4,00$, $P<0,0001$) e da FC ($F_{(35,560)}=9,88$, $P<0,0001$), e diminuiu a temperatura cutânea da cauda ($F_{(6,96)}=14,09$, $P<0,0001$) (Figura 10). A microinjeção bilateral de SR95531 + CGP35348 no IC posterior-rostral não afetou significativamente o aumento da PAM ($F_{(1,16)}=0,20$ $P=0,65$) e da FC ($F_{(1,16)}=1,76$ $P=0,20$) e a diminuição da temperatura cutânea da cauda ($F_{(1,16)}=4,14$, $P=0,05$) (Figura 10). A Figura 11 mostra fotos representativas da temperatura cutânea da cauda antes (basal) e em diferentes momentos durante o estresse de restrição de animais tratados com veículo ou SR95531 + CGP35348 na região posterior-rostral do IC.

Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa, foi possível observar na curva temporal uma tendência de aumento da resposta taquicárdica nos animais tratados com SR95531 + CGP35348 na região posterior-rostral do IC (Figura 10), e esse efeito aparece mais evidente no período de 20-40 minutos de restrição. Desse modo, para confirmar um eventual efeito no período intermediário da restrição, foram realizadas

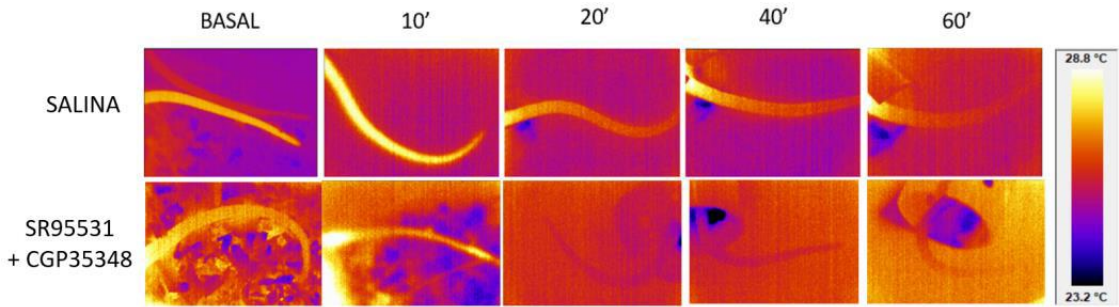
análises adicionais ao calcular os valores médios de resposta a partir dos dados das curvas temporais nos períodos de 0-10, 20-40 e 40-60 minutos de restrição, e o efeito do tratamento foi analisado individualmente em cada período (Figura 12). A análise indicou que no intervalo entre os minutos 20 e 60 da restrição a microinjeção bilateral de SR95531 + CGP35348 IC posterior-rostral facilitou significativamente a resposta de taquicardia causada pelo estresse $FC_{20-40}(t=2,25, P<0,03)$ e $FC_{40-60}(t=2,14, P=0,04)$, porém sem afetar a resposta de $PAM_{20-40}(t=0,25, P=0,80)$ e $PAM_{40-60}(t=0,87, P=0,39)$ (Figura 12). A análise não indicou efeito do tratamento farmacológico nas respostas de PAM e FC no período de 0-20 minutos [$PAM(t=0,60, P=0,55)$; $FC(t=0,25, P=0,80)$] (Figura 12). Como destacado na seção anterior, essa análise não foi possível para os dados de temperatura cutânea da cauda devido ao protocolo de aquisição desses dados (medidas somente nos tempos 10, 20, 40 e 60 minutos de restrição).

Figura 10- Curvas temporais de variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea da cauda (Δ temperatura) induzidas pelo estresse de restrição agudo em animais tratados com SR95531 (antagonista seletivo do receptor GABA_A) + CGP35348 (antagonista seletivo do receptor GABA_B, n=9) ou veículo (salina, 100nL n=9). A área sombreada indica o período de restrição. Círculos representam a média $\pm$ EPM.



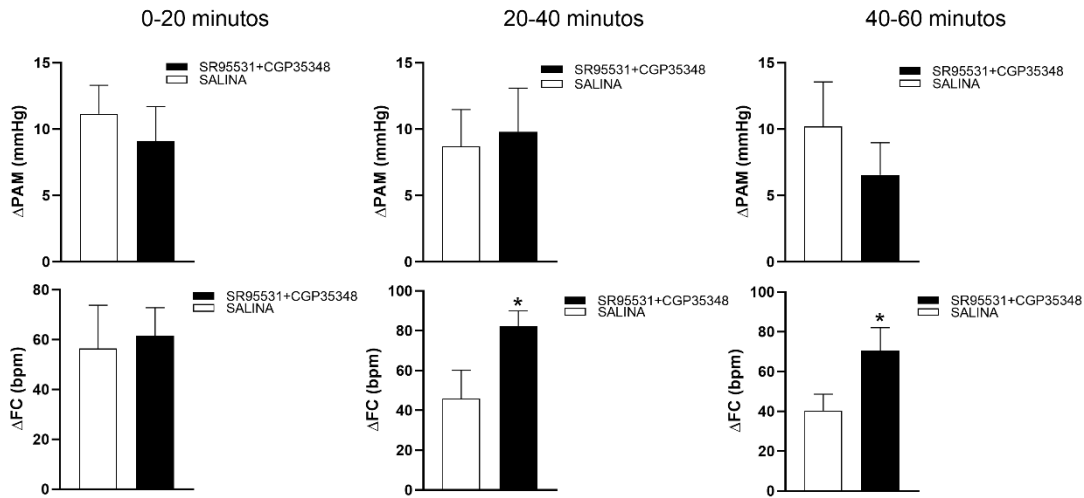
Fonte: autoria própria.

Figura 11 - Fotos da temperatura cutânea da cauda de ratos representativos mostrando a temperatura da pele nos períodos basal e em diferentes momentos do estresse de restrição em animais tratados com veículo ou SR95531+CGP355348 no IC posterior-rostral.



Fonte: autoria própria.

Figura 12 - Média das respostas de pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea da cauda (Δ temperatura cauda) nos intervalos: 0-20min, 20-40min e 40-60min, durante o estresse de restrição em animais submetidos ao tratamento do CI com veículo (barras brancas) ou SR95531 + CGP35348 (barras pretas). Colunas representam a média e as barras EPM. *P < 0,05, teste t de Student.



Fonte: autoria própria.

6.1.3 Envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica no IC posterior-caudal no controle das respostas cardiovasculares ao estresse por restrição agudo

A microinjeção bilateral de ácido quinurênico (antagonista não-seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, 50 nmol/100nL) na região posterior-caudal do IC não alterou os parâmetros basais de PAM, FC e temperatura cutânea da cauda (Tabela 4).

Tabela 4 - Parâmetros basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda após o tratamento farmacológico da região posterior-caudal do IC com ácido quinurênico (antagonista não-seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, 50 nmol/100nL) ou veículo (salina, 100nL).

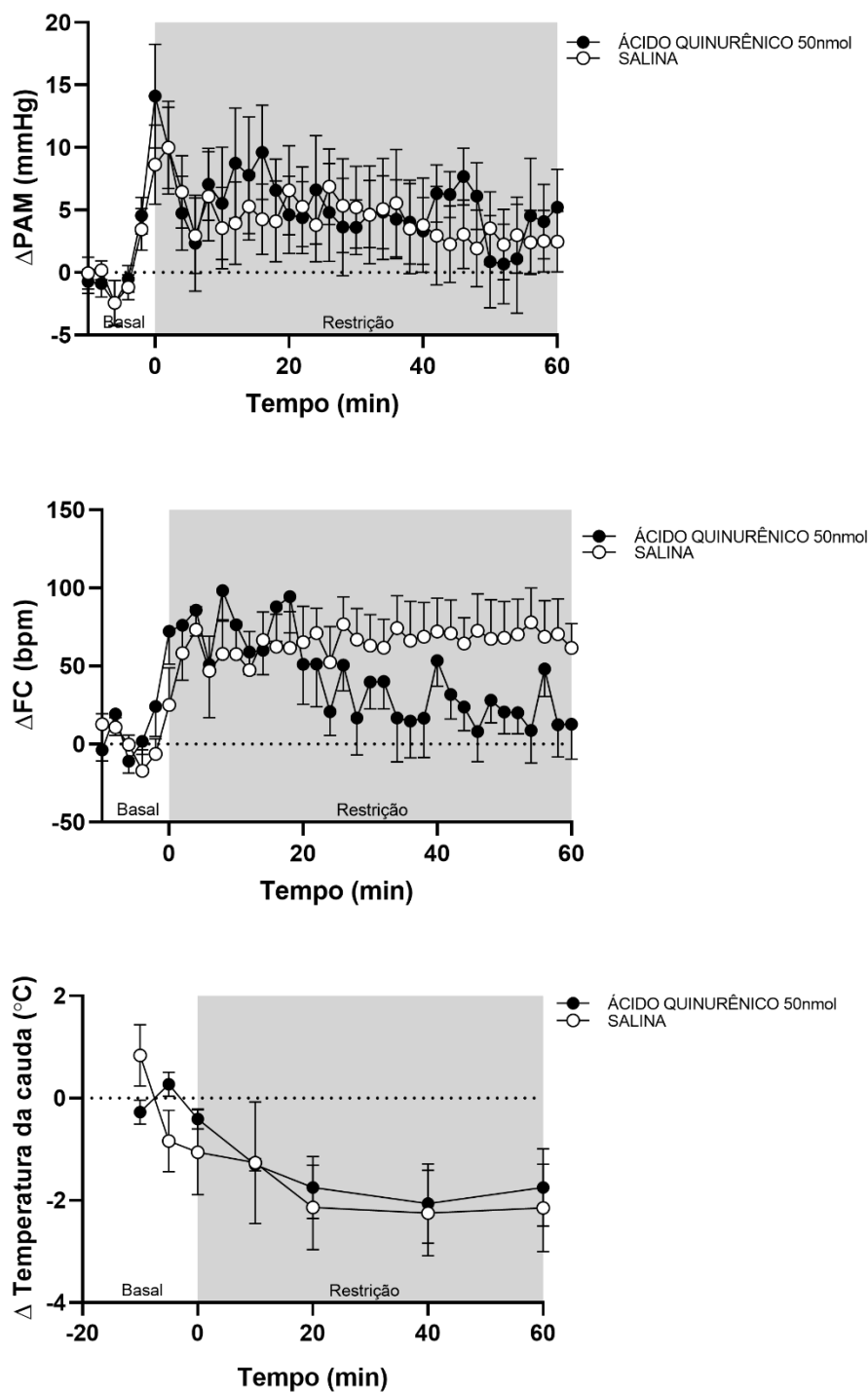
GRUPO	N	PAM (mmHg)	FC (bpm)	Temperatura cutânea da cauda (°C)
Salina	8	111,8±2,92	374,1±15,21	30,5±0,86
Ácido quinurênico	6	113,6±5,65	333,5±7,93	30,3±0,29
		$t=0,304$ $P=0,76$	$t=2,13$ $P=0,05$	$t=0,20$ $P=0,84$

A análise das curvas temporais indicou que o estresse de restrição agudo causou aumento da PAM ($F_{(35,385)}=3,37$, $P<0,0001$) e da FC ($F_{(35,385)}=3,56$, $P<0,0001$), e diminuiu a temperatura cutânea da cauda ($F_{(6,54)}=5,82$, $P<0,0001$) (Figura 13). A microinjeção bilateral de ácido quinurênico no IC posterior-rostral não afetou significativamente o aumento da PAM ($F_{(1,11)}=0,05$, $P=0,81$), da FC ($F_{(1,11)}=0,75$, $P=0,40$) e a diminuição da temperatura cutânea da cauda ($F_{(1,9)}=0,09$, $P=0,76$) (Figura 13) durante o estresse de restrição agudo. A Figura 14 mostra fotos representativas da temperatura cutânea da cauda antes (basal) e em diferentes momentos durante o estresse de restrição em animais tratados com veículo ou ácido quinurênico no IC posterior-rostral.

Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa, foi possível observar na curva temporal uma tendência de redução da resposta de aumento FC nos animais tratados com ácido quinurênico (Figura 13), que aparece mais evidente no período entre 40 e 60 minutos de restrição. Desse modo, para confirmar um eventual efeito no período final da restrição, foram realizadas análises adicionais ao calcular os valores médios de

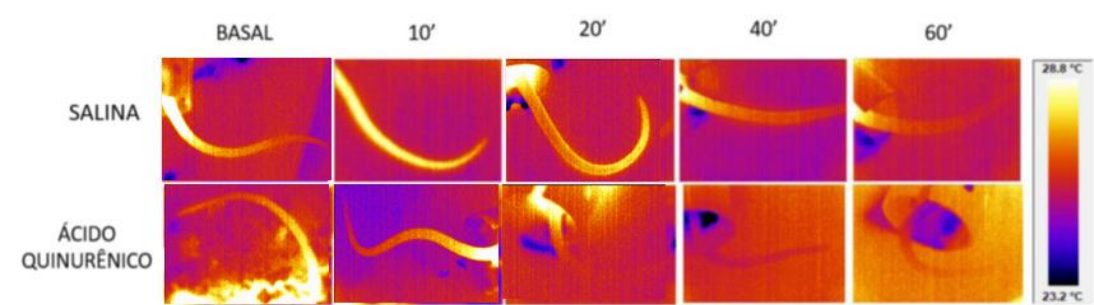
resposta a partir dos dados das curvas temporais nos períodos de 0-10, 20-40 e 40-60 minutos de restrição; e o efeito do tratamento foi analisado individualmente em cada período (Figura 15). No entanto, mesmo a análise individual em cada período temporal não identificou efeito do tratamento da região posterior-caudal com ácido quinurênico nos períodos 0-20 minutos [PAM ($t=0,10$, $P=0,91$) e FC ($t=0,69$, $P=0,49$)], 20-40 minutos [PAM ($t=0,38$, $P=0,70$) e FC ($t=0,66$, $P=0,51$)] e 40-60 min [PAM ($t=0,38$, $P=0,70$) e FC ($t=0,90$, $P=0,38$)] (Figura 15). Essa análise não foi possível para os dados de temperatura cutânea da cauda devido ao protocolo de aquisição desses dados (medidas somente nos tempos 10, 20, 40 e 60 minutos de restrição).

Figura 13 - Curvas temporais de variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea da cauda (Δ temperatura da cauda) induzidas pelo estresse de restrição agudo em animais tratados com ácido quinurênico (antagonista não-seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, 50nmol/100nL, n=6) ou veículo (salina, 100nL n=8). A área sombreada indica o período de restrição. Círculos representam a média $\pm$ EPM



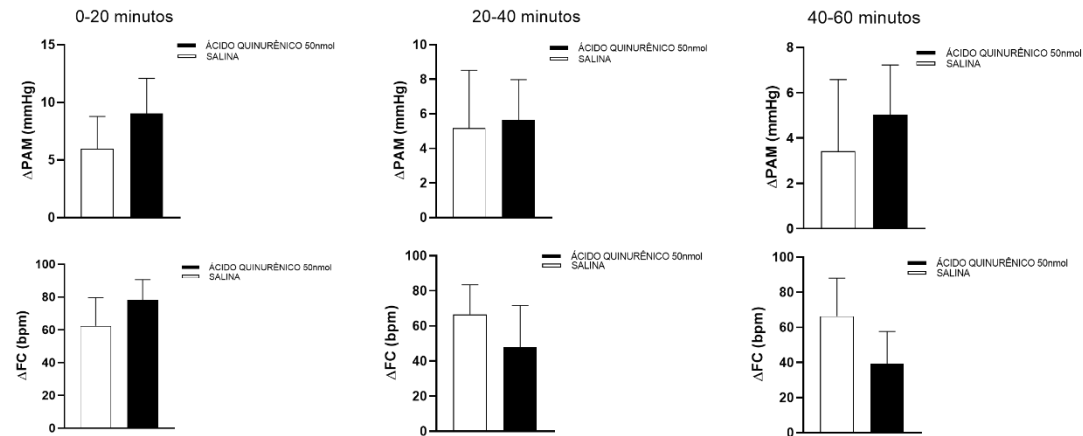
Fonte: autoria própria.

Figura 14 - Fotos de ratos representativos mostrando a temperatura cutânea da cauda nos períodos basal em diferentes momentos durante o estresse de restrição em animais tratados com veículo (salina) ou ácido quinurênico no IC posterior-caudal.



Fonte: autoria própria.

Figura 15 - Média das respostas de pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea da cauda (Δ temperatura cauda) nos intervalos 0-20min, 20-40min e 40-60min durante o estresse de restrição em animais submetidos ao tratamento do IC posterior-caudal com veículo (salina, barras brancas, n=8) ou ácido quinurênico (barras pretas, n=6). Colunas representam a média e as barras EPM.



Fonte: autoria própria.

6.1.4 Envolvimento da neurotransmissão GABAérgica no IC posterior-caudal no controle das respostas cardiovasculares ao estresse por restrição agudo

A microinjeção bilateral do coquetel de SR95531 (antagonista seletivo do receptor GABA_A) + CGP35348 (antagonista seletivo do receptor GABA_B) na região posterior-caudal do IC não alterou os parâmetros basais de PAM e FC (Tabela 5).

Tabela 5 - Parâmetros basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda após o tratamento farmacológico da região posterior-rostral do IC com SR95531 (antagonista seletivo do receptor GABA_A) + CGP35348 (antagonista seletivo do receptor GABA_B) ou veículo (salina).

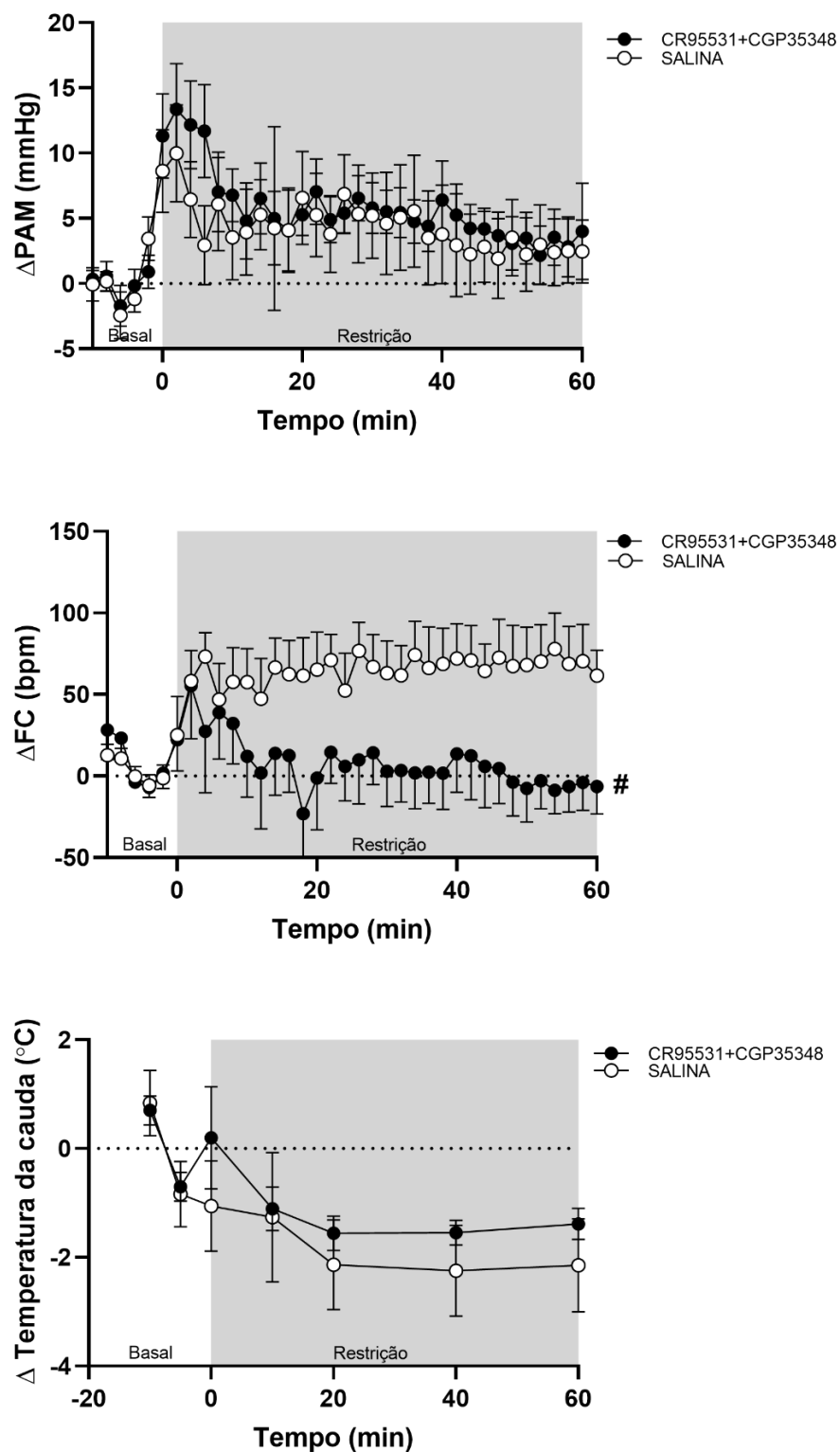
GRUPO	N	PAM (mmHg)	FC (bpm)	Temperatura cutânea da cauda (°C)
Salina	8	111,8±2,92	374,1±15,21	30,5±0,86
SR95531+ CGP35348	7	110,2±3,82	384,3±7,79	32,0±0,23
		<i>t=0,33 P=0,74</i>	<i>t=0,57 P=0,57</i>	<i>t= 1,58 P= 0,13</i>

A análise das curvas temporais indicou que o estresse de restrição agudo causou aumento da PAM ($F_{(35,455)}=4,31$, $P<0,0001$) e da FC ($F_{(35,420)}=1,58$, $P=0,02$), e diminuiu a temperatura cutânea da cauda ($F_{(6,66)}=7,41$, $P<0,0001$) (Figura 16). A análise indicou que a microinjeção bilateral de SR95531 + CGP35348 no IC posterior-rostral reduziu a resposta taquicardia induzida pelo estresse FC ($F_{(1,12)}=4,76$ $P=0,04$) sem afetar significativamente o aumento da PAM ($F_{(1,13)}=0,15$ $P=0,70$) e a diminuição da temperatura cutânea da cauda ($F_{(1,11)}=0,60$, $P=0,45$) (Figura 16). A Figura 17 mostra fotos representativas da temperatura cutânea da cauda antes (basal) e em diferentes momentos durante o estresse de restrição de animais tratados com veículo ou SR95531 + CGP35348 na região posterior-rostral do IC.

A análise individual em cada período temporal identificou que o efeito de redução da resposta taquicardia na região posterior-caudal com SR95531 + CGP35348 ocorreu nos períodos 20-40 minutos FC ($t=2,57$, $P=0,02$) e 20-40 minutos FC ($t=2,32$, $P=0,03$) porém sem afetar a PAM₂₀₋₄₀($t=0,08$, $P=0,93$) e PAM₄₀₋₆₀($t=0,12$, $P=0,90$), não foi

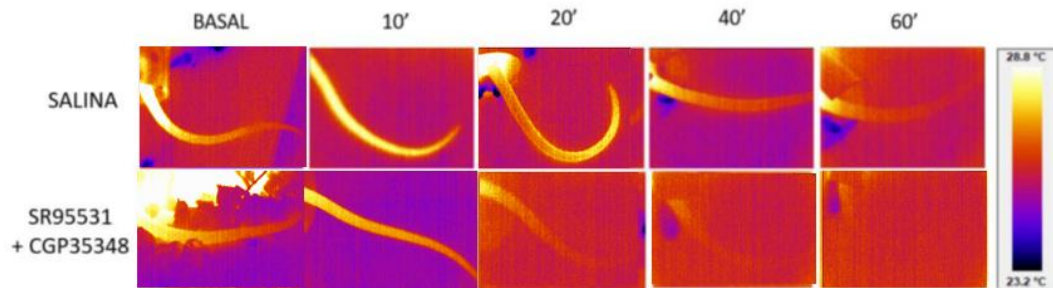
observado efeito no intervalo de 0-20 minutos [PAM ($t=0,58$, $P=0,56$) e FC ($t=0,89$, $P=0,38$)] (Figura 17). Essa análise não foi possível para os dados de temperatura cutânea da cauda devido ao protocolo de aquisição desses dados (medidas somente nos tempos 10, 20, 40 e 60 minutos de restrição).

Figura 16 - Curvas temporais de variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea da cauda (Δ temperatura) induzidas pelo estresse de restrição agudo em animais tratados com SR95531 (antagonista seletivo do receptor GABA_A) + CGP35348 (antagonista seletivo do receptor GABA_B, n=7) ou veículo (salina, 100nL n=8). A área sombreada indica o período de restrição. Círculos representam a média $\pm$ EPM.



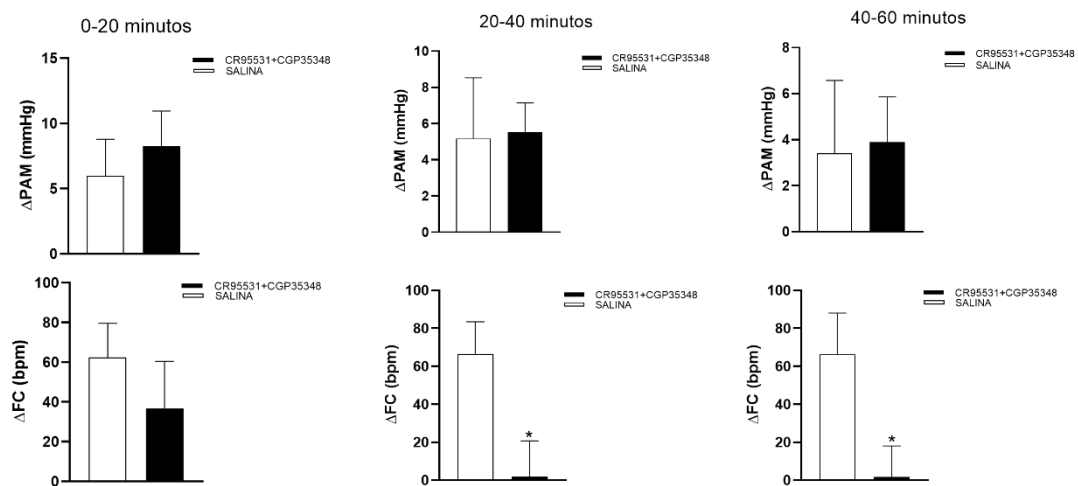
Fonte: autoria própria.

Figura 17 - Fotos da temperatura cutânea da cauda de ratos representativos mostrando a temperatura da pele nos períodos basal e em diferentes momentos do estresse de restrição em animais tratados com veículo ou SR95531+CGP355348 no IC posterior-caudal.



Fonte: autoria própria.

Figura 18 - Média das respostas de pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea da cauda (Δ temperatura cauda) nos intervalos: 0-20min, 20-40min e 40-60min, durante o estresse de restrição em animais submetidos ao tratamento do CI com veículo (barras brancas) ou SR95531 + CGP355348 (barras pretas). Colunas representam a média e as barras EPM. *P < 0,05, teste t de Student.



Fonte: autoria própria.

7. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho são os primeiros a indicarem um envolvimento da neurotransmissão GABAérgica do IC no controle das respostas cardiovasculares durante situações aversivas e que essa resposta parece ocorrer de maneira sítio-específica. De fato, foi evidenciado que a microinjeção bilateral de um coquetel contendo antagonistas dos receptores GABA_A e GABA_B no IC posterior-rostral facilitou a resposta de taquicardia desencadeada pelo estresse de restrição. O tratamento do IC posterior-rostral com um antagonista não-seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos (ácido quinurênico) causou uma tendência de redução na resposta pressora ao estresse de restrição, porém sem indicar efeito nas respostas de aumento da FC e de queda da temperatura cutânea da cauda. Na região posterior-caudal, a microinjeção bilateral de um coquetel contendo antagonistas dos receptores GABA_A e GABA_B pareceu não afetar a resposta pressora e a diminuição da temperatura da cauda induzidas pelo estresse, porém reduziu a resposta taquicardia induzida pelo estresse indicando um envolvimento dessa neurotransmissão na resposta cardiovascular induzida pelo estresse. O tratamento do IC posterior-caudal com um antagonista não-seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos (ácido quinurênico) causou uma tendência de redução na resposta pressora ao estresse de restrição, porém sem indicar efeito nas respostas de aumento da FC e de queda da temperatura cutânea da cauda.

Em estudo recente foi evidenciado o envolvimento das sub-regiões posterior-rostral e posterior-caudal do IC nas respostas cardiovasculares induzidas pelo estresse de restrição agudo (TOMEIO *et al.*, 2022). Também foi identificado que o estresse de restrição causou um aumento na ativação neuronal no IC posterior-rostral, o que suportou nossa hipótese de que o controle da resposta pressora do estresse de restrição por essa

sub-região do IC seja mediado principalmente por mecanismos neuroquímicos excitatórios locais, entre eles a neurotransmissão glutamatérgica.

Especificamente em relação ao IC posterior-rostral, o bloqueio pré-sináptico não-seletivo com CoCl_2 dessa região reduziu exclusivamente a resposta de aumento da PA, sem afetar as respostas de taquicardia e de redução da temperatura cutânea da cauda, nesse sentido, de maneira similar ao identificado previamente após o bloqueio sináptico não-seletivo com CoCl_2 , o antagonismo de receptores glutamatérgicos nessa região do IC causou uma tendência de redução da resposta pressora, o que suporta a nossa hipótese inicial.

Um envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica do IC posterior-rostral é fundamentada por dados prévios obtidos em ratos não-estressados de que a ativação de receptores glutamatérgicos nessa sub-região do IC causou ativação nervosa simpática e aumento da PA (MARINS *et al.*, 2016) e também na respostas comportamental, uma vez que, estudos recentes evidenciaram que o antagonismo do receptor glutamatérgico não-NMDA centrado em sítios do IC posterior rostral aumentaram a exploração dos braços abertos do LCE em animais naïve, indicando um papel ansiolítico desta região do IC (MÉNDEZ-RUETTE *et al.*, 2019; SHI *et al.*, 2020). Considerando que a resposta pressora ao estresse de restrição é mediada por ativação vasomotora simpática (DOS REIS *et al.*, 2014), os dados indicando resposta pressora com ativação glutamatérgica no IC posterior-rostral constitui evidência adicional de que esse mecanismo neuroquímico no IC posterior-rostral pode estar envolvido no controle da resposta pressora ao estresse de restrição.

Apesar das evidências discutidas acima, a ausência de alterações estatisticamente significativas nos animais tratados com ácido quinurênico em duas diferentes doses (16nmol/100nL e 50nmol/100nL) no presente estudo impediu qualquer conclusão de

envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica nas respostas cardiovasculares ao estresse de restrição.

Com relação ao estudo do papel da neurotransmissão GABAérgica do IC posterior-rostral, nós observamos que a microinjeção bilateral local do coquetel de antagonistas seletivos dos receptores GABA_A (SR95531) + GABA_B (CGP35348) facilitou a resposta de taquicardia durante o estresse de restrição agudo, porém sem afetar significativamente as respostas pressora e de queda da temperatura cutânea da cauda. Esses achados contrastam com o estudo prévio do nosso grupo em que a inibição sináptica não-seletiva do IC posterior-rostral por meio da injeção local de CoCl₂ não alterou o aumento da FC causado pelo estresse de restrição (TOMEIO *et al.*, 2022). Nossos achados também diferem de resultados prévios que indicaram um papel da neurotransmissão GABAérgica no IC posterior-rostral na manutenção tônica da função cardiovascular e atividade autonômica (SALEH; CONNELL; CRIBB, 2005), uma vez que esse estudo identificou que o antagonismo do receptor GABA_A local aumentou a PA e a atividade nervosa simpática renal, porém sem afetar a FC (SALEH; CONNELL; CRIBB, 2005). Entretanto, é importante notar que esse último estudo foi conduzido em animais anestesiados, e a anestesia pode afetar o controle da função cardiovascular por mecanismos encefálicos (SHIMOKAWA *et al.*, 1998; SUN *et al.*, 2014), de modo a aparentemente impactar principalmente a responsividade da FC (SUN *et al.*, 2014).

Apesar de aparentemente discrepantes, os achados reportados aqui em conjunto com os dados obtidos previamente com o tratamento do IC posterior-rostral com CoCl₂ sugerem a presença de um mecanismo contra-regulatório (i.e., facilitatório) local em relação ao controle inibitório exercido pela neurotransmissão GABAérgica do IC posterior rostral. A presença de um mecanismo neuroquímico local com ação oposta em relação ao controle GABAérgico explicaria a ausência de efeito com o bloqueio sináptico

não-seletivo pelo CoCl_2 , no qual bloquearia ambos os mecanismos, resultando em ausência de efeito. Esse mecanismo contra-regulatório parece não ser a neurotransmissão glutamatérgica local, desde que o tratamento com ácido quinurênico não afetou a resposta taquicárdica.

Especificamente em relação ao IC posterior-caudal, os resultados recentemente (TOMEIO *et al.*, 2022) evidenciaram que o bloqueio pré-sináptico não-seletivo com CoCl_2 dessa região reduziu exclusivamente a resposta taquicardia, sem afetar as respostas de pressora a de redução da temperatura cutânea da cauda, e esses resultados foram acompanhados por uma diminuição da ativação neuronal local. Nesse trabalho, o antagonismo de receptores glutamatérgicos nessa região do IC causou uma tendência de redução da FC, por outro lado, o antagonismo de receptores GABAérgicos mimetizou os resultados encontrados por Tomeo *et al.* (2022) (TOMEIO *et al.*, 2022) onde a microinjeção bilateral local do coquetel de antagonistas seletivos dos receptores GABA_A (SR95531) + GABA_B (CGP35348) reduziu a resposta de taquicardia durante o estresse de restrição agudo. Em conjunto, esses dados reforçam o papel excitatório da porção posterior-caudal nas respostas cardiovasculares e suportam nossa hipótese inicial do envolvimento de mecanismos inibitórios GABAérgicos do IC no controle das respostas cardiovasculares ao estresse.

O envolvimento da neurotransmissão GABAérgica mediando as respostas cardiovasculares já foram relatadas em estudos anteriores, como é o caso do bulbo ventrolateral rostral (RVLM) (SCHREIHOFFER ; GUYENET, 2002), e do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (DUPONT ; LÉGAT, 2020), o IC mantém conexões recíprocas com essas estruturas e conjuntamente participa do processamento e da regulação da resposta cardiovascular ao estresse (GEHRLACH *et al.*, 2019, 2020), contudo esse é o primeiro estudo a evidenciar um papel proeminente da neurotransmissão

GABAérgica de maneira local nas respostas cardiovasculares induzidas pelo estresse de restrição.

8. CONCLUSÃO

Os resultados reportados no presente trabalho indicam que a neurotransmissão GABAérgica no IC posterior tem uma influência sobre a resposta de taquicardia induzida pelo estresse de restrição agudo. A tendência de efeito sobre a resposta pressora observada nos animais tratados com ácido quinurênico sugere um envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica local no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição pelo IC posterior-rostral, apesar desses achados, mais estudos são necessários para elucidar a população neuronal local envolvida no controle das respostas cardiovasculares ao estresse, principalmente no que diz respeito aos mecanismos glutamatérgicos.

9. REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, S. P. H. *et al.* The concise guide to pharmacology 2021/22: Ion channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 178, n. S1, 16 out. 2021. DOI: 10.1111/bph.15539
- ALLEN, G. V. *et al.* Organization of visceral and limbic connections in the insular cortex of the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 311, n. 1, p. 1–16, 1 set. 1991. DOI: 10.1002/cne.903110102
- ALVES, F. H. F. *et al.* Involvement of the insular cortex in the consolidation and expression of contextual fear conditioning. **European Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 2, p. 2300–2307, jul. 2013. DOI: 10.1111/ejn.12210
- ALVES, F. H. F. *et al.* Both $\alpha 1$ - and $\alpha 2$ -adrenoceptors in the Insular Cortex Are Involved in the Cardiovascular Responses to Acute Restraint Stress in Rats. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e83900, 3 jan. 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0083900
- 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**, v. 1333, p. 57–63, maio 2010. DOI: 10.1016/j.brainres.2010.03.077
- AUGUSTINE, J. Circuitry and functional aspects of the insular lobe in primates including humans. **Brain Research Reviews**, v. 22, n. 3, p. 229–244, out. 1996. DOI: 10.1016/s0165-0173(96)00011-2
- BAK, L. K.; SCHOUSBOE, A.; WAAGEPETERSEN, H. S. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. **Journal of Neurochemistry**, v. 98, n. 3, p. 641–653, ago. 2006. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2006.03913.x
- BALI, A.; JAGGI, A. S. Preclinical experimental stress studies: Protocols, assessment and comparison. **European Journal of Pharmacology**, v. 746, p. 282–292, jan. 2015. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.10.017
- BARRON, B. A.; VAN LOON, G. R. Role of sympathoadrenomedullary system in cardiovascular response to stress in rats. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 28, n. 2, p. 179–187, nov. 1989. DOI: 10.1016/0165-1838(89)90090-8
- 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**, v. 22, n. 1, p. 151–161, 2 jan. 2019. DOI: 10.1080/10253890.2018.1532992
- BLESSING, W. W. Lower brainstem pathways regulating sympathetically mediated changes in cutaneous blood flow. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 23, n. 4/5, p. 527–538, 2003. DOI: 10.1023/a:1025020029037
- BORNSTEIN, S. R.; BÖTTNER, A.; CHROUSOS, G. P. Knocking out the stress response. **Molecular Psychiatry**, v. 4, n. 5, p. 403–407, 1 set. 1999. DOI: 10.1038/sj.mp.4000602

BOWERY, N. G.; SMART, T. G. GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. S1, p. S109–S119, jan. 2006. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706443

BUSNARDO, C. *et al.* Nitrgic neurotransmission in the paraventricular nucleus of the hypothalamus modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 90, p. 16–27, mar. 2019. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2018.11.001

BUSNARDO, C.; TAVARES, R. F.; CORRÊA, F. M. A. Mechanisms involved in the pressor response to noradrenaline microinjection into the supraoptic nucleus of unanesthetized rats. **Autonomic Neuroscience**, v. 145, n. 1–2, p. 63–70, jan. 2009. DOI: 10.1016/j.autneu.2008.11.005

BUTCHER, K. S.; CECETTO, D. F. Autonomic responses of the insular cortex in hypertensive and normotensive rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 268, n. 1, p. R214–R222, 1 jan. 1995. DOI: 10.1152/ajpregu.1995.268.1.R214

BUYNITSKY, T.; MOSTOFSKY, D. I. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 33, n. 7, p. 1089–1098, jul. 2009. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2009.05.004

CAMPOS, A. C. *et al.* Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, n. suppl 2, p. S101–S111, 2013. DOI: 10.1590/1516-4446-2013-1139

CECETTO, D. F. Identification of a cortical site for stress-induced cardiovascular dysfunction. **Integrative Physiological and Behavioral Science**, v. 29, n. 4, p. 362–373, out. 1994. DOI: 10.1007/BF02691356

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**, v. 70, n. 5, p. 458–464, set. 2011. DOI: 10.1016/j.biopsych.2011.04.004

CRESTANI, C. C. Emotional Stress and Cardiovascular Complications in Animal Models: A Review of the Influence of Stress Type. **Frontiers in Physiology**, v. 7, 24 jun. 2016. DOI: 10.3389/fphys.2016.00251

CULLINAN, W. E. *et al.* Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. **Neuroscience**, v. 64, n. 2, p. 477–505, jan. 1995. DOI: 10.1016/0306-4522(94)00355-9

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**, v. 309, n. 5, p. R429–R443, set. 2015. DOI: 10.1152/ajpregu.00051.2015

DAMPNEY, R. A. L.; HORIUCHI, J.; MCDOWALL, L. M. Hypothalamic mechanisms coordinating cardiorespiratory function during exercise and defensive behaviour. **Autonomic Neuroscience**, v. 142, n. 1–2, p. 3–10, nov. 2008. DOI: 10.1016/j.autneu.2008.07.005

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Progress in Neurobiology**, v. 65, n. 1, p. 1–105, set. 2001. DOI: 10.1016/S0301-0082(00)00067-8

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**, v. 179, p. 107402, mar. 2021. DOI: 10.1016/j.nlm.2021.107402

DHABHAR, F. S. The power of positive stress – a complementary commentary. **Stress**, v. 22, n. 5, p. 526–529, 3 set. 2019. DOI: 10.1080/10253890.2019.1634049

DHABHAR, F. S.; MCEWEN, B. S. Acute Stress Enhances while Chronic Stress Suppresses Cell-Mediated Immunity in Vivo: A Potential Role for Leukocyte Trafficking. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 11, n. 4, p. 286–306, dez. 1997. DOI: 10.1006/brbi.1997.0508

DOS REIS, D. G. *et al.* Role of the autonomic nervous system and baroreflex in stress-evoked cardiovascular responses in rats. **Stress**, v. 17, n. 4, p. 362–372, 25 jul. 2014. DOI: 10.3109/10253890.2014.930429

DUARTE, J. O. *et al.* Stress Vulnerability During Adolescence. **Psychosomatic Medicine**, v. 77, n. 2, p. 186–199, fev. 2015. DOI: 10.1097/PSY.0000000000000141

DUPONT, A. G.; LÉGAT, L. GABA is a mediator of brain AT1 and AT2 receptor-mediated blood pressure responses. **Hypertension Research**, v. 43, n. 10, p. 995–1005, 25 out. 2020. DOI: 10.1038/s41440-020-0470-9

FONTES, M. A. P. *et al.* The dorsomedial hypothalamus and the central pathways involved in the cardiovascular response to emotional stress. **Neuroscience**, v. 184, p. 64–74, jun. 2011. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.03.018

GEHRLACH, D. A. *et al.* A whole-brain connectivity map of mouse insular cortex. **eLife**, v. 9, 17 set. 2020. DOI: 10.7554/eLife.55585

GIANAROS, P. J. *et al.* Heightened Functional Neural Activation to Psychological Stress Covaries With Exaggerated Blood Pressure Reactivity. **Hypertension**, v. 49, n. 1, p. 134–140, jan. 2007. DOI: 10.1161/01.HYP.0000250984.14992.64

GOGOLLA, N. The insular cortex. **Current Biology**, v. 27, n. 12, p. R580–R586, jun. 2017. DOI: 10.1016/j.cub.2017.05.010

GOMES-DE-SOUZA, L. *et al.* GABAA but not GABAB receptors in the lateral hypothalamus modulate the tachycardic response to emotional stress in rats. **European Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 5, p. 672–680, maio 2019. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2019.03.001

GORDON, F. J.; SVED, A. F. Neurotransmitters In Central Cardiovascular Regulation: Glutamate And Gaba. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 29, n. 5–6, p. 522–524, maio 2002. DOI: 10.1046/j.1440-1681.2002.03666.x

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**, v. 119, p. 110598, dez. 2022. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2022.110598

HARDY, S. G. P.; HOLMES, D. E. Prefrontal stimulus-produced hypotension in rat. **Experimental Brain Research**, v. 73, n. 2, nov. 1988. DOI: 10.1007/BF00248217

HARDY, S. G. P.; MACK, S. M. Brainstem mediation of prefrontal stimulus-produced hypotension. **Experimental Brain Research**, v. 79, n. 2, p. 393–399, 1990. DOI: 10.1007/BF00608250

HARRIS, R. B. S. Chronic and acute effects of stress on energy balance: are there appropriate animal models? **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 308, n. 4, p. R250–R265, 15 fev. 2015. DOI: 10.1152/ajpregu.00361.2014

HARTMANN, A. *et al.* Role of the endocannabinoid system in the dorsal hippocampus in the cardiovascular changes and delayed anxiety-like effect induced by acute restraint stress in rats. **Journal of Psychopharmacology**, v. 33, n. 5, p. 606–614, 21 maio 2019. DOI: 10.1177/0269881119827799

HERMAN, J. P. The neuroendocrinology of stress: Glucocorticoid signaling mechanisms. **Psychoneuroendocrinology**, v. 137, p. 105641, mar. 2022. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2021.105641

JAGGI, A. S. *et al.* A review on animal models for screening potential anti-stress agents. **Neurological Sciences**, v. 32, n. 6, p. 993–1005, 17 dez. 2011. DOI: 10.1007/s10072-011-0770-6

JOËLS, M.; BARAM, T. Z. The neuro-symphony of stress. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 459–466, 2 jun. 2009. DOI: 10.1038/nrn2632

JORGENSEN, E. M. Gaba. **WormBook: The Online Review of C. elegans Biology [Internet]**, 2005. DOI: 10.1895/wormbook.1.14.1

KIVIMÄKI, M.; STEPTOE, A. Effects of stress on the development and progression of cardiovascular disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 15, n. 4, p. 215–229, 7 abr. 2018. DOI: 10.1038/nrcardio.2017.189

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**, v. 43, n. 4, p. 484–493, abr. 2016. DOI: 10.1111/1440-1681.12542

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**, v. 321, n. 3, p. R513–R521, 1 set. 2021a. DOI: 10.1152/ajpregu.00308.2020

MARINS, F. R. *et al.* Tachycardia evoked from insular stroke in rats is dependent on glutamatergic neurotransmission in the dorsomedial hypothalamus. **European Journal of Neurology**, v. 28, n. 11, p. 3640–3649, 9 nov. 2021b. DOI: 10.1111/ene.14987

MATSUHIRA, F.; KITAMURA, N.; SATOH, E. Effects of acute and chronic psychological stress on platelet aggregation in mice. **Stress**, v. 17, n. 2, p. 186–192, 14 mar. 2014. DOI: 10.3109/10253890.2014.888548

MCEWEN, B. S. Physiology and Neurobiology of Stress and Adaptation: Central Role of the Brain. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 3, p. 873–904, jul. 2007. DOI: 10.1152/physrev.00041.2006

MCEWEN, B. S. Neurobiological and Systemic Effects of Chronic Stress. **Chronic Stress**, v. 1, p. 247054701769232, 10 fev. 2017. DOI: 10.1177/2470547017692328

MCEWEN, B. S.; AKIL, H. Revisiting the Stress Concept: Implications for Affective Disorders. **The Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 1, p. 12–21, 2 jan. 2020. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0733-19.2019

MELDRUM, B. S. Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 4, p. 1007S-1015S, abr. 2000. DOI: 10.1093/jn/130.4.1007S

MÉNDEZ-RUETTE, M. *et al.* The Role of the Rodent Insula in Anxiety. **Frontiers in Physiology**, v. 10, 29 mar. 2019. DOI: 10.3389/fphys.2019.00330

MORAGA-AMARO, R.; STEHBERG, J. The insular cortex and the amygdala: shared functions and interactions. **The amygdala: a discrete multitasking manager**, p. 231-56, 2012.

MYERS, B. Corticolimbic regulation of cardiovascular responses to stress. **Physiology & Behavior**, v. 172, p. 49–59, abr. 2017. DOI: 10.1016/j.physbeh.2016.10.015

MYERS, B.; MCKLVEEN, J. M.; HERMAN, J. P. Glucocorticoid actions on synapses, circuits, and behavior: Implications for the energetics of stress. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 2, p. 180–196, abr. 2014. DOI: 10.1016/j.yfrne.2013.12.003

NAKAMURA, K.; MORRISON, S. F. Central sympathetic network for thermoregulatory responses to psychological stress. **Autonomic Neuroscience**, v. 237, p. 102918, jan. 2022. DOI: 10.1016/j.autneu.2021.102918

NAMKUNG, H.; KIM, S.-H.; SAWA, A. The Insula: An Underestimated Brain Area in Clinical Neuroscience, Psychiatry, and Neurology. **Trends in Neurosciences**, v. 40, n. 4, p. 200–207, abr. 2017. DOI: 10.1016/j.tins.2017.02.002

NIEUWENHUYIS, R. The insular cortex: a review. **Progress in brain research**, v. 195, p. 123-163, 2012. DOI: 10.1016/B978-0-444-53860-4.00007-6

NOMI, J. S. *et al.* Structural Connections of Functionally Defined Human Insular Subdivisions. **Cerebral Cortex**, v. 28, n. 10, p. 3445–3456, 1 out. 2018. DOI: 10.1093/cercor/bhx211

OLIVEIRA, L. A. *et al.* CRF 1 and CRF 2 receptors in the bed nucleus of the stria terminalis modulate the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Pharmacological Research**, v. 95–96, p. 53–62, maio 2015. DOI: 10.1016/j.phrs.2015.03.012

OPPENHEIMER, S.; CECHETTO, D. The Insular Cortex and the Regulation of Cardiac Function. Em: **Comprehensive Physiology**. [s.l.] Wiley, 2016. p. 1081–1133. DOI: 10.1002/cphy.c140076

OSBORNE, M. T. *et al.* Disentangling the Links Between Psychosocial Stress and Cardiovascular Disease. **Circulation: Cardiovascular Imaging**, v. 13, n. 8, ago. 2020. DOI: 10.1161/CIRCIMAGING.120.010931

PAPADOPOULOS, S.; CLEARE, A.J. Hypothalamic–pituitary–adrenal axis dysfunction in chronic fatigue syndrome. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 8, n. 1, p. 22-32, 2012.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. San Diego: Acad. Press. , 1997. v. 3rd ed

PELOSI, G. G. *et al.* Involvement of non-NMDA glutamate receptors of the hypothalamic paraventricular nucleus in the cardiovascular response to the microinjection of noradrenaline into the dorsal periaqueductal gray area of rats. **Brain Research**, v. 1602, p. 96–105, mar. 2015. DOI: 10.1016/j.brainres.2015.01.023

PETROFF, O. A. C. Book Review: GABA and Glutamate in the Human Brain. **The Neuroscientist**, v. 8, n. 6, p. 562–573, 29 dez. 2002. DOI: 10.1177/1073858402238515

PUGLIESI PAJOLLA, G.; GARCIA PELOSI, G.; CORRÊA, F. M. A. Involvement of NMDA receptors in the hypotensive response to the injection of l-glutamate into the lateral hypothalamus of unanesthetized rats. **Brain Research**, v. 1053, n. 1–2, p. 19–26, ago. 2005. DOI: 10.1016/j.brainres.2005.05.056

RANJBAR, A.; HATAM, M.; NASIMI, A. Cardiovascular and single-unit responses to l-glutamate injection into the posterior insular cortex in rat. **Neuroscience**, v. 306, p. 63–73, out. 2015. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.08.025

RESSTEL, L. B. M.; CORRÊA, F. M. A. Medial prefrontal cortex NMDA receptors and nitric oxide modulate the parasympathetic component of the baroreflex. **European Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 2, p. 481–488, 12 jan. 2006. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2005.04566.x

ROM, O.; REZNICK, A. Z. The stress reaction: a historical perspective. **Respiratory Contagion**, p. 1–4, 2016. DOI: 10.1007/5584_2015_195

ROTH, F. C.; DRAGUHN, A. GABA Metabolism and Transport: Effects on Synaptic Efficacy. **Neural Plasticity**, v. 2012, p. 1–12, 2012. DOI: 10.1155/2012/805830

RUGGIERO, D. A. *et al.* A role of insular cortex in cardiovascular function. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 257, n. 2, p. 189–207, 8 mar. 1987. DOI: 10.1002/cne.902570206

SALEH, T. M.; CONNELL, B. J.; CRIBB, A. E. Sympathoexcitatory effects of estrogen in the insular cortex are mediated by GABA. **Brain Research**, v. 1037, n. 1–2, p. 114–122, mar. 2005. DOI: 10.1016/j.brainres.2005.01.010

SAPER, C. B. Convergence of autonomic and limbic connections in the insular cortex of the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 210, n. 2, p. 163–173, 10 set. 1982. DOI: 10.1002/cne.902100207

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions*. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 1, p. 55–89, 1 fev. 2000. DOI: 10.1210/edrv.21.1.0389

SCHAEUBLE, D.; MYERS, B. Cortical–Hypothalamic Integration of Autonomic and Endocrine Stress Responses. **Frontiers in Physiology**, v. 13, 11 fev. 2022. DOI: 10.3389/fphys.2022.820398

SCHREIHOFFER, A. M.; GUYENET, P. G. The Baroreflex And Beyond: Control Of Sympathetic Vasomotor Tone By Gabaergic Neurons In The Ventrolateral Medulla. **Clinical and Experimental**

Pharmacology and Physiology, v. 29, n. 5–6, p. 514–521, maio 2002. DOI: 10.1046/j.1440-1681.2002.03665.x

SELYE, H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 6, n. 2, p. 117–230, fev. 1946.

SGOIFO, A.; CARNEVALI, L.; GRIPPO, A. J. The socially stressed heart. Insights from studies in rodents. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 39, p. 51–60, fev. 2014. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2013.12.005

SHI, C.-J.; CASSELL, M. D. Cortical, thalamic, and amygdaloid connections of the anterior and posterior insular cortices. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 399, n. 4, p. 440–468, 5 out. 1998. DOI: 10.1002/(sici)1096-9861(19981005)399:4<440::aid-cne2>3.0.co;2-1

SHI, T. *et al.* Role of the anterior agranular insular cortex in the modulation of fear and anxiety. **Brain Research Bulletin**, v. 155, p. 174–183, fev. 2020. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2019.12.003

SHIMOKAWA, A. *et al.* Differential effects of anesthetics on sympathetic nerve activity and arterial baroreceptor reflex in chronically instrumented rats. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 72, n. 1, p. 46–54, ago. 1998. DOI: [10.1016/s0165-1838\(98\)00084-8](https://doi.org/10.1016/s0165-1838(98)00084-8)

STERLING, P. Allostasis: A model of predictive regulation. **Physiology & Behavior**, v. 106, n. 1, p. 5–15, abr. 2012. DOI: 10.1016/j.physbeh.2011.06.004

SUN, L. *et al.* Effects of Anesthetics on the Renal Sympathetic Response to Anaphylactic Hypotension in Rats. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e113945, 25 nov. 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0118042

SUN, M.-K. Medullospinal vasomotor neurones mediate hypotension from stimulation of prefrontal cortex. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 38, n. 3, p. 209–217, maio 1992. DOI: 10.1016/0165-1838(92)90032-c

TOMEIO, R. A. *et al.* Site-Specific Regulation of Stress Responses Along the Rostrocaudal Axis of the Insular Cortex in Rats. **Frontiers in Neuroscience**, v. 16, 10 maio 2022. DOI: 10.3389/fnins.2022.878927

UDDIN, L. Q. Salience processing and insular cortical function and dysfunction. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 1, p. 55–61, 19 jan. 2015. DOI: 10.1038/nrn3857

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 397–409, 13 jun. 2009. DOI: 10.1038/nrn2647

VERBERNE, A. J. M.; OWENS, N. C. Cortical Modulation of the Cardiovascular System. **Progress in Neurobiology**, v. 54, n. 2, p. 149–168, fev. 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**, v. 21, n. 9, p. 2505–2512, maio 2005. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2005.04073.x

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 & Behavior**, v. 258, p. 114006, jan. 2023. DOI: 10.1016/j.physbeh.2022.114006

WALLS, A. B. *et al.* The Glutamine–Glutamate/GABA Cycle: Function, Regional Differences in Glutamate and GABA Production and Effects of Interference with GABA Metabolism. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 2, p. 402–409, 8 fev. 2015. DOI: 10.1007/s11064-014-1473-1

WIRTZ, P. H.; VON KÄNEL, R. Psychological Stress, Inflammation, and Coronary Heart Disease. **Current Cardiology Reports**, v. 19, n. 11, p. 111, 20 nov. 2017. DOI: 10.1007/s11886-017-0919-x

YASUI, Y. *et al.* Autonomic responses and efferent pathways from the insular cortex in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 303, n. 3, p. 355–374, 15 jan. 1991. DOI: 10.1002/cne.903030303

YOKOYAMA, C.; SASAKI, K. Regional expressions of Fos-like immunoreactivity in rat cerebral cortex after stress; restraint and intraperitoneal lipopolysaccharide. **Brain Research**, v. 816, n. 2, p. 267–275, jan. 1999. DOI: 10.1016/s0006-8993(98)00927-5

ZEFFERINO, R.; DI GIOIA, S.; CONESE, M. Molecular links between endocrine, nervous and immune system during chronic stress. **Brain and Behavior**, v. 11, n. 2, 8 fev. 2021. DOI: 10.1002/brb3.1960

ZHONG, M.-K. *et al.* Regulation of cardiac sympathetic afferent reflex by GABA_A and GABA_B receptors in paraventricular nucleus in rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 12, p. 3226–3232, jun. 2008. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2008.06261.x

ZHOU, H. *et al.* Cardiac sympathetic afferent reflex response to intermedin microinjection into paraventricular nucleus is mediated by nitric oxide and γ-amino butyric acid in hypertensive rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 239, n. 10, p. 1352–1359, 28 out. 2014. DOI: 10.1177/1535370214533882