



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP**

Dissertação de Mestrado

**ENVOLVIMENTO DO CÓRTEX INSULAR POSTERIOR NA RESPOSTA ANSIOGÊNICA AO
ESTRESSE EMOCIONAL EM RATOS: TOPOGRAFIA FUNCIONAL AO LONGO DO EIXO
ROSTROCAUDAL**

Alex Da Silva Vitorio

Araraquara – SP

2022

Alex da Silva Vitorio

ENVOLVIMENTO DO CÓRTEX INSULAR POSTERIOR NA RESPOSTA ANSIOGÊNICA AO ESTRESSE EMOCIONAL EM RATOS: TOPOGRAFIA FUNCIONAL AO LONGO DO EIXO ROSTROCAUDAL

Dissertação a ser apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas

Orientador: Prof Dr. Carlos Cesar Crestani

Araraquara – SP

2022

V845e

Vitorio, Alex da Silva.

Envolvimento do córtex insular posterior na resposta ansiogênica ao estresse emocional em ratos: topografia funcional ao longo do eixo rostrocaudal / Alex da Silva Vitorio. – Araraquara: [S.n.], 2022.

35 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Associação Ampla UFSCar/UNESP. Área Ciências Fisiológicas.

Orientador: Carlos Cesar Crestani.

1. Ansiedade. 2. Córtex pré-frontal. 3. Ínsula. 4. Estresse de restrição. 5. Topografia. I. Crestani, Carlos Cesar, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33001014037P4

Esta ficha não pode ser modificada



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Envolvimento do córtex insular posterior na resposta ansiogênica ao estresse emocional em ratos: topografia funcional ao longo do eixo rostrocaudal

AUTOR: ALEX DA SILVA VITORIO
ORIENTADOR: CARLOS CESAR CRESTANI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI (Participação Virtual)

Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
UNESP

Prof. Dr. MARCELO TADEU MARIN (Participação Virtual)

Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara -
UNESP

Prof. Dr. FERNANDO HENRIQUE FERRARI ALVES (Participação Virtual) Faculdade de Medicina /
Universidade Federal de Lavras

Araraquara, 16 de dezembro de 2022

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Ivani e Itamar, por me apoiarem e me ajudarem durante estes anos; aos meus irmãos Carolina e Anderson, pelo amor e carinho; e à minha parceira Larissa Felix, pelo amor, paciência e atenção em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Quero primeiro agradecer a **Deus**, pela oportunidade, saúde e força na realização deste trabalho.

À **minha família**, pelo amor, apoio, compreensão e dedicação por toda a minha vida, obrigado por sempre acreditarem em mim.

À **Larissa Felix**, pelo amor, companheirismo, atenção e incentivo durante a realização desta pesquisa. Por estar sempre ao meu lado, me ouvindo e aconselhando nos momentos mais difíceis.

Ao professor **Carlos Cesar Crestani**, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, por acreditar e confiar no meu trabalho e contribuir com seus ensinamentos que ajudaram no meu amadurecimento profissional, intelectual e pessoal.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFar/UNESP)** pelo espaço físico e equipamentos oferecidos para o desenvolvimento do projeto e ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF-UFSCar/UNESP) pela a oportunidade.

As agências de fomento **Capes** pela concessão de bolsa, além da **FAPESP** e **CNPq**, pelo suporte financeiro ao projeto.

A todos integrantes do laboratório neuropsicofarmacologia, em especial **Lilian Reis Silva, Lucas Barretto de Souza e Lucas Gomes** por participar da execução do projeto e também pelos ensinamentos e contribuições com dedicação e paciência, e a **Gabriela Arruda, Vinícius Pelarin, Cristiane Busnardo, Luana, Adrielly e Bianca**, pela convivência, ajudas e momentos de descontração.

Agradeço a secretária do departamento **Tirene Pavanelli**, aos secretários do PIPGCF **Alexandre Chiva** (UFSCar) e **Cláudia Molina** (UNESP).

E por fim, mas não com menor importância, aos examinadores de qualificação, **Dra. Azair liane Matos do Canto de Souza, Dr. Marcelo Tadeu Marin e Dra. Cristiane Busnardo Santiago** e os de defesa, **Dr. Marcelo Tadeu Marin e Fernando Henrique Ferrari Alves** pelas pertinentes contribuições para a elaboração desta pesquisa e dissertação.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram com a minha formação e amadurecimento profissional para que eu pudesse me manter firme nesta jornada, para se encerrar mais uma fase da minha vida e ter início a uma nova, o meu muito obrigado.

EPÍGRAFE

“Saber muito não lhe torna inteligente. A inteligência se traduz na forma que você recolhe, julga, maneja e, sobretudo, onde e como aplica a informação.”

Carl Sagan

RESUMO

O córtex insular (IC) está envolvido em respostas comportamentais e fisiológicas ao estresse emocional. O controle das funções fisiológicas e das respostas comportamentais ocorre de maneira sítio-específica ao longo do eixo rostrocaudal do IC. No entanto, uma topografia funcional da regulação das respostas comportamentais causadas pelo estresse nunca foi avaliada. Portanto, investigamos o papel de sub-regiões específicas ao longo do eixo rostrocaudal do IC posterior no efeito ansiogênico causado pela exposição ao estresse de restrição agudo em ratos. Para isso, os ratos receberam microinjeção bilateral do inibidor sináptico não-seletivo CoCl_2 ou veículo nas porções rostral, intermediária ou caudal do IC posterior antes de uma sessão de estresse de restrição agudo. Em seguida, o comportamento no labirinto em cruz elevado (LCE) foi avaliado imediatamente após o estresse de restrição. O comportamento no LCE de animais não-estressados também foi investigado. Observamos que o estresse de restrição agudo diminuiu a exploração dos braços abertos do LCE em animais tratados com veículo em todas as regiões do IC posterior quando comparados com os animais não-estressados, o que indica um efeito comportamental do tipo ansiogênico. A evitação dos braços abertos do LCE foi completamente inibida em animais que receberam a microinjeção de CoCl_2 no IC posterior intermediário. No entanto, o mesmo tratamento farmacológico nas sub-regiões rostral ou caudal do IC posterior não afetou as mudanças comportamentais evocadas pela restrição no LCE. Em conjunto, esses resultados sugerem uma regulação sítio-específica do efeito ansiogênico ao estresse emocional ao longo do eixo rostrocaudal do IC posterior, indicando um papel proeminente da porção intermediária nessa resposta.

Palavras-chave: ansiedade; córtex pré-frontal; ínsula; estresse de restrição; topografia.

ABSTRACT

The insular cortex (IC) is engaged in behavioral and physiological responses to emotional stress. The control of physiological functions and behavioral responses has been reported to occur in a site-specific manner along the rostrocaudal axis of the IC. However, a functional topography of the IC in regulation of anxiogenic responses caused by stress has never been evaluated. Therefore, we investigated the role of rostrocaudal subregions of the posterior IC in anxiogenic-like effect caused by exposure to acute restraint stress in male rats. For this, rats received bilateral microinjection of the non-selective synaptic inhibitor CoCl_2 or vehicle into either the rostral, intermediate or caudal portions of the posterior IC before an acute session of restraint stress. Then, behavior in the elevated plus maze (EPM) was evaluated immediately after restraint stress. The behavior of non-stressed animals in the EPM was also investigated. We observed that acute restraint stress decreased the exploration of the EPM open arms in animals treated with vehicle in all regions of the posterior IC, thus indicating an anxiogenic effect. The avoidance of the EPM open arms was completely inhibited in animals subjected to microinjection of CoCl_2 into the intermediate posterior IC. Nevertheless, the same pharmacological treatment in either the rostral or caudal subregions of the posterior IC did not affect the restraint-evoked behavioral changes in the EPM. Taken together, these results suggest a site-specific regulation of anxiogenic effect to emotional stress along the rostrocaudal axis of the posterior IC, indicating a prominent role of the intermediate portion in this response.

Keywords: anxiety; prefrontal cortex; insula; restraint stress; topography.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Objetivo geral	16
2.2. Objetivo específico	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Animais	17
3.2. Cirurgia de estereotaxia	17
3.3. Estresse de restrição.....	18
3.4. Teste comportamental no labirinto em cruz elevado (LCE).....	18
3.5. Microinjeção intracerebral de drogas	19
3.6. Medicamentos e soluções	19
3.7. Determinação histológica dos locais de microinjeção intracerebral	19
3.8. Análise estatística	20
4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	21
5. RESULTADOS	22
5.1. Efeito da inibição sináptica não-seletiva na porção rostral do IC posterior no efeito ansiogênico causado pelo estresse de restrição agudo	24
5.2. Efeito da inibição sináptica não seletiva na sub-região intermediária do IC posterior no efeito ansiogênico causado por estresse de restrição agudo	25
5.3. Efeito da inibição sináptica não-seletiva na sub-região caudal do IC posterior no efeito ansiogênico causado por estresse de restrição agudo.....	26
6. DISCUSSÃO	27
7. CONCLUSÃO	30
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	31

1. INTRODUÇÃO

A palavra estresse está associada à definição proposta por Hans Selye de uma resposta a uma ameaça, ou seja, uma resposta aguda e adaptativa a um estímulo (MCEWEN; AKIL, 2020^a). Todo organismo mantém um equilíbrio dinâmico complexo, que é constantemente desafiado por estímulos internos ou externos, denominados estressores. Os estressores compreendem uma lista de fatores potencialmente adversos, que podem ser emocionais ou físicos (CHROUSOS, 2009). Nesse sentido, a homeostase é mantida através de respostas fisiológicas e comportamentais coordenadas, incluindo ativações do sistema nervoso autônomo simpático e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenocortical (HPA). Na ativação do eixo HPA, neurônios localizados no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) liberam o hormônio liberador de corticotropina (CRH), além da vasopressina, na eminência mediana; e esses neuropeptídeos então estimulam a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) a partir da hipófise anterior que, por sua vez, estimula a síntese e liberação de glicocorticóides no córtex adrenal (cortisol em humanos e corticosterona em roedores) (BORNSTEIN; BÖTTNER; CHROUSOS, 1999; HERMAN et al., 2016; MCEWEN; AKIL, 2020a). Essa resposta requer a integração de vários sistemas, que envolvem os principais circuitos límbico-neuroendócrinos. Os glicocorticóides promovem a mobilização de energia para todo o organismo e são críticos para a sobrevivência. Além disso, os glicocorticóides têm efeitos profundos na fisiologia sináptica, na regulação do circuito de resposta ao estresse e no comportamento (HERMAN et al., 2016).

Além das respostas fisiológicas, o conjunto de alterações adaptativas observadas durante situações aversivas também contempla respostas comportamentais. De fato, estudos clínicos e pré-clínicos demonstraram respostas ansiogênicas após exposição a estresse emocional ((BUYNITSKY; MOSTOFSKY, 2009; RAJCANI et al., 2020). Esse quadro de ansiedade aumenta o estado de alerta, cognição e melhora o processamento sensorial e as funções executivas, que constituem respostas adaptativas proeminentes a

ameaças aversivas em curto prazo (DAVIU et al., 2019; MCEWEN et al., 2012; MORRIS et al., 2020).

Os transtornos de ansiedade em humanos são conceituados como transtornos de resposta mal-adaptativa à uma ameaça aguda (medo) e ameaça potencial (ansiedade). Desta maneira, a ansiedade patológica pode ser definida como um estado fisiológico e comportamental semelhante ao medo que persiste em um ambiente não ameaçador (EYSENCK; CALVO, 1992; ROSEN; SCHULKIN, 1998). A ansiedade patológica é a principal característica nos transtornos de ansiedade (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014), que incluem, transtorno de ansiedade generalizada (TAG), transtorno de ansiedade social (TAS), transtorno do pânico e transtorno de estresse pós traumático (TEPT).

O Relatório Mundial de Saúde Mental de 2022, divulgado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), traz dados que indicam aumento de transtornos mentais em todo o mundo, com aumento superior a 25% de novos casos de ansiedade. Além disso, segundo a OMS, no primeiro ano da pandemia da COVID-19 cerca de 76 milhões de pessoas desenvolveram ansiedade (OMS,2022). Estresse e ansiedade entrelaçam bases comportamentais e neurais, e essas semelhanças são críticas para a compreensão de cada estado, bem como suas interações mútuas. Desse modo, compreender os mecanismos subjacentes a essa relação bidirecional pode ter grandes implicações clínicas para o gerenciamento de uma ampla gama de psicopatologias (DAVIU et al., 2019). Apesar da relevância do efeito ansiogênico durante eventos estressantes, os mecanismos neurobiológicos envolvidos não são completamente compreendidos.

As respostas ao estresse são mediadas por redes límbicas cerebrais (LAMOTTE; SHOUMAN; BENARROCH, 2021; MCEWEN et al., 2012). Nesse sentido, a ativação do córtex insular (IC) durante situações estressantes foi relatada em humanos e roedores (CULLINAN et al., 1995; TOMEO et al., 2022), e essa estrutura cortical vem sendo implicada na integração e processamento de informações límbicas (AUGUSTINE, 1996; GOGOLLA, 2017; LAMOTTE; SHOUMAN; BENARROCH, 2021; SCHAEUBLE; MYERS, 2022). O IC em humanos foi descrito pela primeira vez como uma “ilha” do córtex por Johann-Christian Reil em 1796 (*insula* em latim para ilha); e em

1994 Antonio Damásio formulou a hipótese do IC como “marcador somático” de que o pensamento racional é inseparável das emoções e sentimentos representados no cérebro como estados corporais (DAMASIO, 1994; NAMKUNG; KIM; SAWA, 2017a). Desde então estudos de neuroimagem humana indicam uma relação do IC em diversos distúrbios relacionados a alterações cerebrais (DOWNAR; BLUMBERGER; DASKALAKIS, 2016; GOODKIND et al., 2015). Em 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. Em roedores, o IC encontra-se exposto na superfície lateral dos hemisférios, e localiza-se acima da metade rostral do sulco rinal. Apesar da diferença na localização neuroanatômica, existe vasta homologia na citoarquitetura, conexões e funções do IC em humanos e roedores (GOGOLLA, 2017; NAMKUNG; KIM; SAWA, 2017b; STEHBERG et al., 2012). Nesse sentido, IC é macroscopicamente dividido em porções anterior e posterior em humanos e roedores, e subdividido em três sub-áreas: granular, desgranular e agranular.

Especificamente em relação às respostas do tipo ansiogênica desencadeadas pelo estresse, estudos anteriores identificaram um envolvimento do IC na modulação da interação social diminuída evocada pelo choque na cauda (CHRISTIANSON et al., 2008, 2011). Um papel do IC na ansiedade causada por dor crônica ou coabitação com um coespecífico com dor crônica também foi relatado (BENASSI-CEZAR et al., 2021; ZHUO, 2019). Além disso, a inibição optogenética do IC posterior preveniu a resposta ansiogênica no labirinto em cruz elevado (LCE) causada por choques nas patas (GEHRLACH et al., 2019). Essas evidências demonstram claramente um papel do IC na resposta ansiogênica provocada pelo estresse. No entanto, todos esses dados foram obtidos por meio de modelos de estresse relacionados a estímulos dolorosos, de modo que nunca foi relatado um envolvimento do IC em alterações comportamentais causadas por estressores isentos de dor.

Um controle sítio-específico de respostas fisiológicas e comportamentais ao longo do eixo rostrocaudal do IC foi relatado em humanos e roedores. Por exemplo, evidências obtidas em indivíduos e roedores não-estressados indicaram diferenças no controle de parâmetros fisiológicos, como função

cardiovascular e estímulos nocivos e sensoriais por diferentes locais ao longo do eixo rostrocaudal do IC (CRAIG et al., 2000; OPPENHEIMER; CECHETTO, 2016). Um controle sítio-específico das respostas ao estresse pelo IC posterior também foi relatado. Por exemplo, documentamos recentemente que, embora o estresse de restrição agudo cause alterações na ativação neuronal em regiões ao longo de todo o eixo rostrocaudal do IC, apenas os sítios do IC posterior estavam envolvidos nas respostas cardiovasculares a esse estressor, 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 et al., 2020). Em conjunto, esses dados indicaram que os sítios ao longo do eixo rostrocaudal do IC regulam de maneira diferente as respostas ao estresse. No entanto, até onde sabemos, um controle específico do local da resposta ansiogênica a estímulos estressantes incondicionados pelo IC nunca foi documentado. A hipótese de que o efeito ansiogênico evocado pelo estresse é diferentemente modulado por diferentes sítios ao longo do eixo rostrocaudal da sub-região posterior do IC é apoiada por recentes evidências de uma regulação sítio-específica no IC posterior na ansiedade em animais não-estressados (MÉNDEZ-RUETTE et al., 2019; SHI et al., 2020). Portanto, neste estudo investigamos os papéis específicos de sítios ao longo do eixo rostrocaudal do IC posterior na resposta ansiogênica causada pela exposição a uma sessão aguda de estresse de restrição em ratos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo foi investigar a participação do IC posterior no controle da resposta ansiogênica desencadeada pelo estresse de restrição em ratos.

2.2. Objetivo específico

Avaliar diferenças entre as sub-regiões ao longo do eixo rostracaudal do IC posterior na resposta ansiogênica induzida por uma sessão de estresse de restrição agudo em ratos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Oitenta e cinco ratos Wistar com peso corporal entre 230-250g (60 dias) fornecidos pelo Biotério Central da UNESP (Botucatu, SP) foram utilizados no presente estudo. Os animais tiveram livre acesso a água e ração durante todo o experimento (exceto durante os breves períodos de teste) e foram mantidos em salas climatizadas (temperatura $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade $50 \pm 5\%$) com luzes acesas entre 7:00 e 19:00h. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCFAR-UNESP (aprovação nº 10/2021).

3.2. Cirurgia de estereotaxia

Os animais foram submetidos à anestesia inalatória com isoflurano (5% para indução e 1,8% para manutenção) utilizando sistema de anestesia de baixo fluxo (Bonther, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). Em seguida, sob anestesia, a cabeça foi raspada e imobilizada em aparelho estereotático (Stoelting, Wood Dale, Illinois, EUA), e 0,3 ml de solução de lidocaína com vasoconstritor (lidocaína 2% + fenilefrina 3%, Harvey Química Farmacêutica Ind. e Comércio Ltda, Catanduva, São Paulo, Brasil) foi injetada por via subcutânea, para anestesia local e redução do sangramento. O crânio foi exposto através de uma incisão na pele e a região foi limpa com solução salina e peróxido de hidrogênio a 10%. Todas as coordenadas foram referenciadas pelos parâmetros obtidos no (G. PAXINOS, 1997a).

Parametros	IC Posterior rostral	IC Posterior intermediário	IC Posterior Caudal
Antero-posterior	+0,7 mm	+0,8mm	-1,8mm
Lateral	+5 mm	+6mm	+6,2mm
Vertical	-5,5mm	-6,5mm	-6,5 mm
Incisivo	-3,2 mm		

Tabela 1 - Coordenadas para introdução das cânulas guia.

Após o posicionamento das cânulas de aço inoxidável (26 G, 12 mm), foram feitos orifícios no crânio com o auxílio de uma broca odontológica, onde as cânulas foram introduzidas bilateralmente. As cânulas foram fixadas ao crânio com resina acrílica autopolimerizável (Simplex, DFL, Ind. Com., Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil), e pequenos parafusos foram previamente implantados no crânio para fixação da resina. Um mandril de 0,2mm de diâmetro foi introduzido na cânula, evitando sua obstrução durante o período de recuperação. Como medida profilática, ao final da cirurgia o animal recebeu 0,2mL de pentabiótico veterinário (Fontoura-Wyeth, São Paulo, Brasil) por via intramuscular e 0,3mL do anti-inflamatório não esteroide flunixinina meglumina (Banamine®, Schering Plow, Brasil) por via subcutânea. Os animais foram mantidos em recuperação por pelo menos quatro dias após o procedimento cirúrgico.

3.3. Estresse de restrição

Para o estresse de restrição, os animais foram introduzidos em um tubo plástico cilíndrico (diâmetro = 6,5 cm, comprimento = 15 cm, ventilado por orifícios de 1/2 polegada que preenchem aproximadamente 20% do tubo). Os animais foram mantidos por um período de 60 min no tubo de restrição (BARRETTO-DE-SOUZA et al., 2022; GOMES-DE-SOUZA et al., 2021; GOUVEIA et al., 2016), e cada animal foi submetido a apenas uma sessão de restrição para evitar habituação (BARRETTO-DE-SOUZA et al., 2022; BENINI et al., 2019; PADOVAN; GUIMARÃES, 2000; SANTOS; BENINI; CRESTANI, 2020).

3.4. Teste comportamental no labirinto em cruz elevado (LCE)

O teste de LCE foi usado para avaliar os efeitos do estresse de restrição na expressão de comportamentos relacionados à ansiedade (BARRETTO-DE-SOUZA et al., 2022; PADOVAN; GUIMARÃES, 2000). O aparato utilizado para o teste consistiu em dois braços abertos e dois braços fechados, com 50 cm de comprimento e 10 cm de largura cada, unidos perpendicularmente e elevados 50 cm acima do solo. Os braços fechados tinham paredes de 40 cm de altura que os cercavam, e os braços abertos tinham uma borda lateral de acrílico de 1

cm para evitar que os animais caíssem. No intervalo entre cada animal, o labirinto foi limpo com álcool 20%.

O comportamento no LCE foi registrado por uma câmera de vídeo por um período de 5 min. Os roedores naturalmente evitam os braços abertos do LCE e drogas ansiolíticas aumentam a exploração desses braços sem alterar a frequência de entradas nos braços fechados (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Portanto, foram calculadas a frequência de entradas nos braços fechados e a porcentagem de entradas e do tempo gasto nos braços abertos do LCE. O comportamento foi analisado automaticamente usando o software Anymaze (Stoelting, Wood Dale, IL, EUA).

3.5. Microinjeção intracerebral de drogas

As agulhas (33 G, Small Parts, Miami Lakes, Flórida, EUA) usadas para microinjeção intracerebral de drogas eram 1 mm mais longa do que as cânulas guias, e foram conectadas a uma seringa de 2 µl (7002-KH, Hamilton Co., Reno, NV, EUA) através de um tubo de polietileno (PE-10) (Clay Adams, Parsippany, NJ, EUA). As microinjeções intra-IC foram realizadas em um período de 5 s, e a agulha foi deixada na cânula guia por 60 s após a microinjeção antes de ser removida. As drogas foram injetadas em um volume de 100 nL/lado (ALVES et al., 2013; ALVES; CRESTANI; CORRÊA, 2010; MARINS et al., 2016; TOMEIO et al., 2022).

3.6. Medicamentos e soluções

O CoCl_2 (inibidor sináptico não-seletivo) (cat. # 232696; Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, Estados Unidos) e a uretana (cat. # U2500, Sigma-Aldrich) foram dissolvidos em solução salina (0,9% NaCl). O antibiótico (Pentabiotico, Fort-Dodge, Campinas, SP, Brasil), o isoflurano (Isoforine®, Cristrália, Itapira, São Paulo, Brasil) e o anti-inflamatório não-esteroidal flunixinina meglumina (Banamine, Schering Plough, Cotia, SP, Brasil) foram utilizados conforme fornecidos pelos fabricantes.

3.7. Determinação histológica dos locais de microinjeção intracerebral

Ao final de cada experimento os animais foram anestesiados com uretana (250 mg/ml/200 g de peso corporal, i.p.) e 100 nL do corante azul de

Evan a 1% foi microinjetado no cérebro para determinar os locais de injeção. Os ratos foram, então, perfundidos e o cérebro foi removido, pós-fixado em formaldeído a 10% por pelo menos 48 h a 4 °C e, em seguida, seccionado em seções frontais de 40 µm de espessura usando um criostato (CM1900, Leica, Wetzlar, Alemanha). A localização dos sítios de microinjeção foi determinada em um microscópio de luz de acordo com o atlas do cérebro de ratos de Paxinos & Watson (1997).

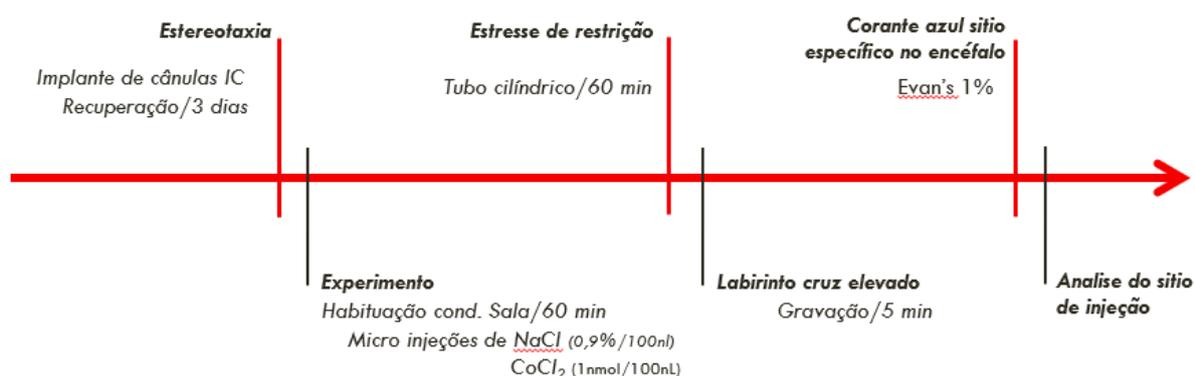
3.8. Análise estatística

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

4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

A Figura 1 apresenta o protocolo experimental completo usado no presente estudo. Nesse sentido, para estudar o papel do IC no efeito ansiogênico induzido pelo estresse de restrição agudo, os animais foram inicialmente submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guias bilaterais direcionadas às sub-regiões rostral, intermediária ou caudal do IC posterior, e foram deixados em recuperação por pelo menos quatro dias. As definições das sub-regiões rostrocaudais do IC foram baseadas em estudos anteriores (GEHLACH et al., 2020; OPPENHEIMER; CECHETTO, 2016; SAPER, 1982; TOMEO et al., 2022). No dia do teste, todos os ratos foram levados para a sala de experimentação pelo menos 60 minutos antes do início do experimento para habituação às condições da sala. A sala de ensaio foi climatizada (24°C) e isolada das demais salas. Um conjunto independente de animais recebeu microinjeções bilaterais de veículo (NaCl 0,9%, 100nL) ou CoCl₂ (inibidor sináptico não-seletivo, 1mM/100nL) na sub-região rostral, intermediária ou caudal do IC posterior. A dose de CoCl₂ foi baseada em estudos anteriores do nosso grupo (ALVES et al., 2013; ALVES; CRESTANI; CORRÊA, 2010; TOMEO et al., 2022). Dez minutos após o tratamento do IC, os animais foram submetidos a uma sessão de 60 minutos de estresse de restrição. Imediatamente após o término da sessão de estresse (GOMES-DE-SOUZA et al., 2021; MECHIEL KORTE; DE BOER, 2003), cada animal foi colocado individualmente no LCE por um período de 5 minutos para avaliar comportamentos relacionados à ansiedade. O efeito ansiogênico causado pelo estresse de restrição agudo foi avaliado comparando o comportamento dos animais estressados com os de animais não-estressados (naive) (BARRETTO-DE-SOUZA et al., 2022; GOUVEIA et al., 2016).

Figura 1 – Linha temporal do protocolo experimental.



5. RESULTADOS

Representações esquemáticas de secções coronais do cérebro de ratos (G. PAXINOS, 1997b) mostrando os sítios de microinjeção nas sub-regiões rostral, intermediária e caudal do IC posterior de todos os animais usados no presente estudo são apresentados na Figura 2. A Figura 2 também mostra fotomicrografias de secções coronais do cérebro de animais representativos mostrando os sítios de microinjeção em cada sub-região do IC posterior explorada no presente estudo.

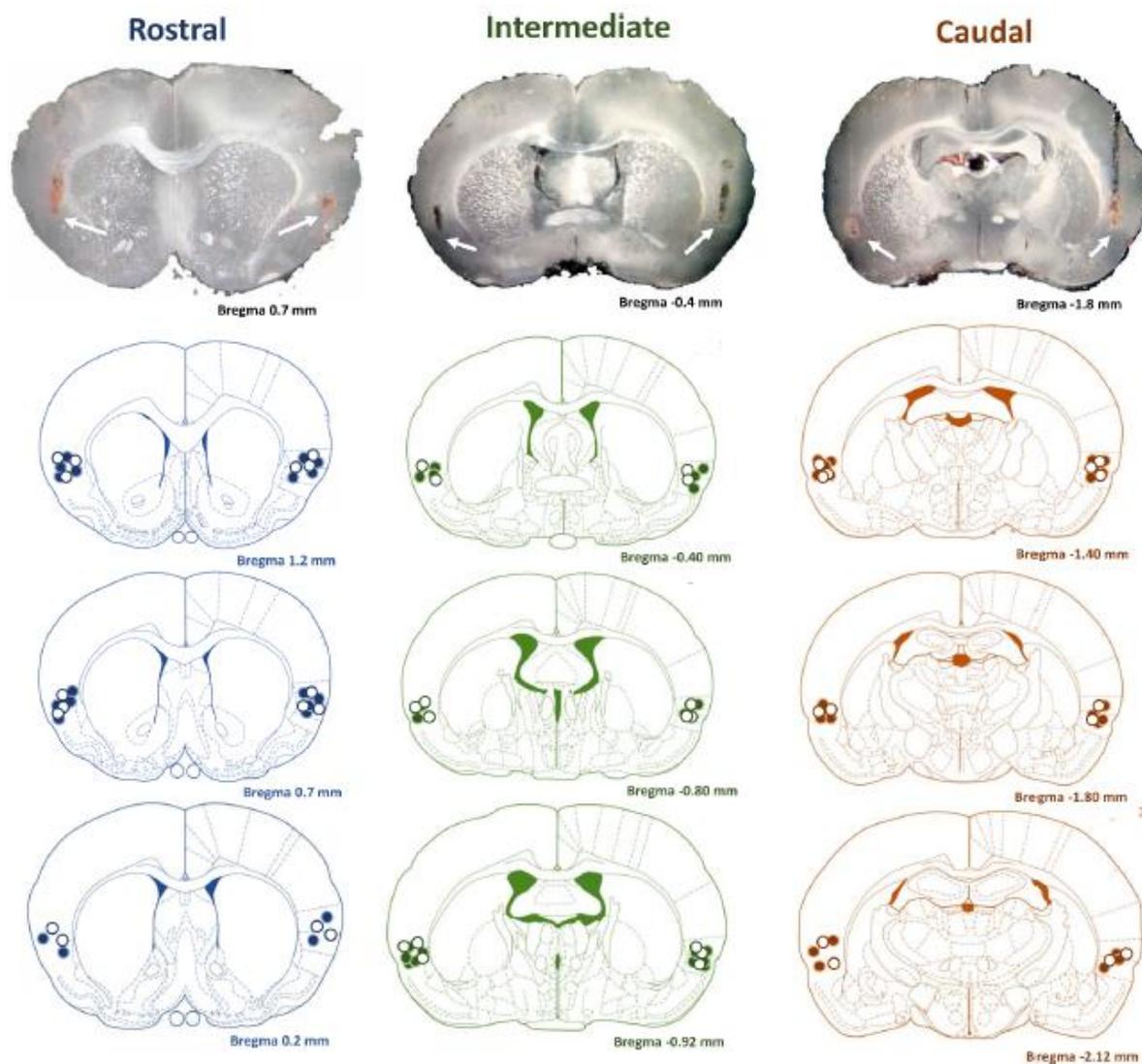


Figura 2 – Sítios de microinjeções ao longo do eixo rostrocaudal do IC posterior. **(Superior)** Fotomicrografia de secções coronais do cérebro mostrando os sítios de microinjeção de animais representativos nas sub-regiões rostral, intermediária e caudal do IC posterior. As setas indicam o local da microinjeção. **(Inferior)** Representações diagramáticas modificadas do atlas de cérebro de rato de Paxinos e Watson, indicando os sítios de microinjeção nas sub-regiões rostral (imagem azul) (círculos brancos: solução salina; círculos azuis: CoCl_2), intermediária (imagem verde) (círculos brancos: salina; círculos verdes: CoCl_2) e caudal (imagem vermelha) (círculos brancos: solução salina; círculos vermelhos: CoCl_2) do IC posterior de todos os animais utilizados no presente estudo. Os números indicam a distância em relação ao bregma.

5.1. Efeito da inibição sináptica não-seletiva na porção rostral do IC posterior no efeito ansiogênico causado pelo estresse de restrição agudo

A análise da porcentagem de entradas ($F_{(2,25)}=6,93$, $P=0,0034$) e tempo gasto ($F_{(2,25)}=7,18$, $P=0,0040$) nos braços abertos do LCE indicou diferenças entre os grupos experimentais (Fig. 3). A análise *post-hoc* revelou que o estresse de restrição diminuiu as entradas (veículo: $P=0,0004$; CoCl_2 : $P=0,0112$) e o tempo (veículo: $P=0,0035$; CoCl_2 : $P=0,0349$) nos braços abertos do LCE em animais que receberam microinjeção de veículo (100nL, $n=8$) ou do inibidor sináptico não-seletivo CoCl_2 (1 mM/100 nl, $n=10$) no IC posterior rostral, quando comparado com animais naive ($n=10$) (Fig. 3).

A análise também indicou diferenças entre os grupos experimentais no número de entradas nos braços fechados do LCE ($F_{(2,25)}=3,45$, $P=0,0459$) (Fig. 3). A análise *post-hoc* revelou uma diferença entre os animais submetidos ao estresse de restrição agudo que receberam veículo e CoCl_2 ($P = 0,0364$) (Fig. 3).

IC Posterior Rostral

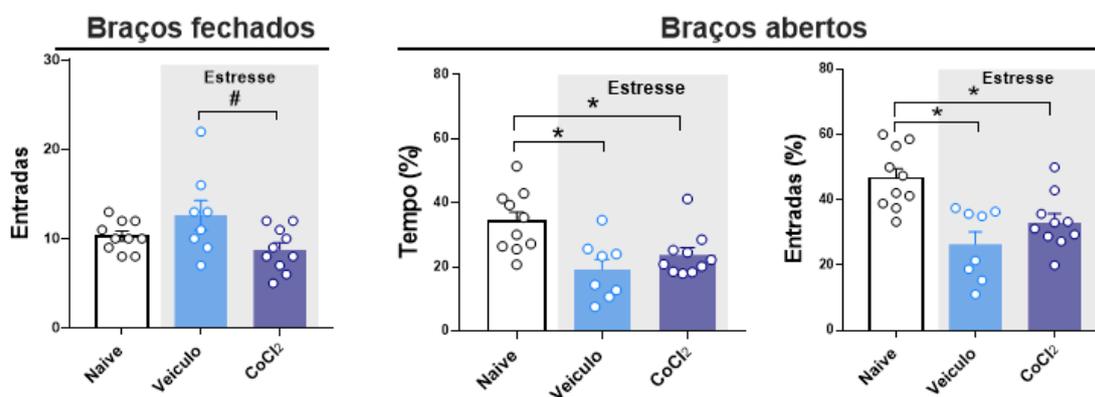


Figura 3 – Comportamento no LCE - IC posterior rostral. Efeito da microinjeção bilateral de veículo ($n=8$) ou do inibidor sináptico não-seletivo CoCl_2 ($n=10$) na sub-região posterior rostral do córtex insular (IC) sobre o comportamento no LCE após uma sessão de estresse de restrição agudo. Animais que não foram expostos ao estresse de restrição (naive, $n=10$) no dia do teste foram usados como controle para os efeitos do estresse de restrição agudo. O tratamento do IC foi realizado 10 minutos antes do início da restrição. As colunas representam a média \pm EPM. * $P<0,05$ em relação ao grupo naive, # $P<0,05$ em relação ao grupo veículo. ANOVA monofatorial seguida de pós-teste de Bonferroni.

5.2. Efeito da inibição sináptica não seletiva na sub-região intermediária do IC posterior no efeito ansiogênico causado por estresse de restrição agudo

A análise da porcentagem de entradas ($F_{(2,25)}=12,57$, $P=0,0002$) e do tempo gasto ($F_{(2,25)}=16,16$, $P<0,0001$) nos braços abertos do LCE indicou diferenças entre os grupos experimentais (Fig. 4). A análise *post-hoc* revelou que o estresse de restrição diminuiu as entradas ($P=0,0014$) e o tempo ($P=0,0002$) nos braços abertos do LCE em animais tratados com veículo (100nL, $n=8$) no IC posterior intermediário em relação aos animais naive ($n=10$) (Fig. 4). O efeito do estresse de restrição agudo na porcentagem de entradas ($P=0,7088$) e de tempo ($P>0,9999$) nos braços abertos do LCE não foi identificado em animais que receberam o inibidor sináptico não-seletivo CoCl_2 (1 mM/100 nl, $n=10$) no IC posterior intermediário antes da sessão de estresse de restrição (Fig. 4). Além disso, os valores de entradas ($P=0,0002$) e tempo gasto ($P<0,0001$) nos braços abertos nos animais tratados com CoCl_2 foram maiores do que aqueles dos animais submetidos ao estresse de restrição e que receberam microinjeção de veículo no IC posterior intermediário (Fig. 4). A análise não indicou diferenças entre os grupos experimentais no número de entradas nos braços fechados do LCE ($F_{(2,25)}=0,65$, $P=0,5301$) (Fig. 4).

IC Posterior Intermediario

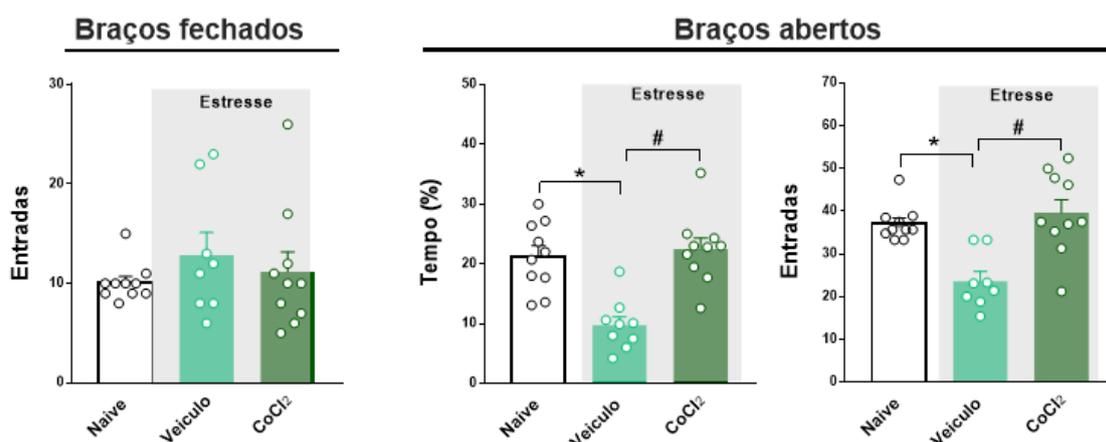


Figura 4 – Comportamento no LCE - IC posterior intermediário. Efeito da microinjeção bilateral de veículo ($n=8$) ou do inibidor sináptico não-seletivo CoCl_2 ($n=10$) na sub-região posterior intermediária do córtex insular (IC) sobre o comportamento no LCE após uma sessão de estresse de restrição agudo. Animais que não foram expostos ao estresse de restrição (naive, $n=10$) no dia do teste foram usados como controle para os efeitos do estresse de restrição agudo. O tratamento do IC foi realizado 10 minutos antes do início da restrição. As colunas representam a média \pm EPM. * $P<0,05$ em relação ao grupo naive, # $P<0,05$ em relação ao grupo veículo. ANOVA monofatorial seguida do pós-teste de Bonferroni.

5.3. Efeito da inibição sináptica não-seletiva na sub-região caudal do IC posterior no efeito ansiogênico causado por estresse de restrição agudo

A análise da porcentagem de tempo gasto ($F_{(2,26)}=7,1$, $P=0,0030$) nos braços abertos do LCE indicou diferenças entre os grupos experimentais (Fig. 5). A análise *post-hoc* revelou que o estresse de restrição diminuiu o tempo (veículo: $P=0,0063$; CoCl_2 : $P=0,0163$) nos braços abertos do LCE em animais tratados com veículo (100nL, $n=7$) ou com o inibidor sináptico não-seletivo CoCl_2 (1 mM/100 nl, $n=12$) no IC posterior caudal, quando comparados com os animais naive ($n=10$) (Fig. 5). A análise não indicou diferenças entre os grupos experimentais no número de entradas nos braços fechados ($F_{(2,26)}=0,30$, $P=0,7422$) e na porcentagem de entradas nos braços abertos ($F_{(2,26)}=2,4$, $P=0,1090$) do LCE (Fig. 5).

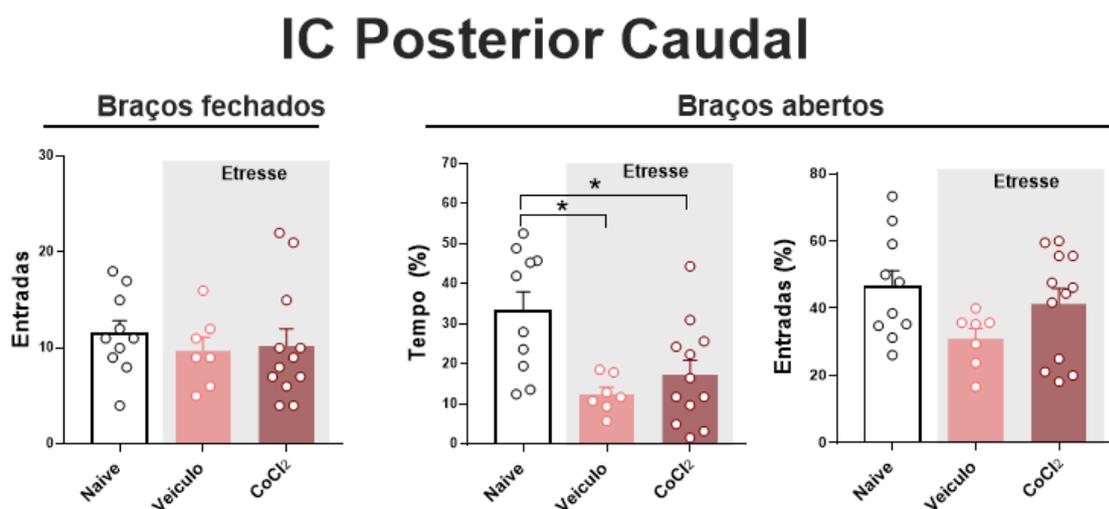


Figura 5 – Comportamento no LCE - IC posterior caudal. Efeito da microinjeção bilateral de veículo ($n=7$) ou do inibidor sináptico não-seletivo CoCl_2 ($n=12$) na sub-região posterior caudal do córtex insular (IC) sobre o comportamento no LCE após uma sessão de estresse de restrição agudo. Animais que não foram expostos ao estresse de restrição (naive, $n=10$) no dia do teste foram usados como controle para os efeitos do estresse de restrição agudo. O tratamento do IC foi realizado 10 minutos antes do início da restrição. As colunas representam a média \pm SEM. * $P<0,05$ em relação ao grupo naive, # $P<0,05$ em relação ao grupo veículo. ANOVA monofatorial seguida do pós-teste de Bonferroni.

6. DISCUSSÃO

Este estudo fornece o primeiro relato de uma topografia funcional ao longo do eixo rostrocaudal do IC na regulação da resposta ansiogênica evocada pelo estresse emocional. De fato, nós observamos que a inibição sináptica não-seletiva causada pela microinjeção local de CoCl_2 no IC posterior intermediário inibiu completamente a resposta ansiogênica no LCE causada pela exposição a uma sessão aguda de estresse de restrição. Por outro lado, a inibição sináptica não-seletiva nas sub-regiões rostral ou caudal do IC posterior não afetou a evitação dos braços abertos do LCE causada pelo estresse de restrição agudo nos ratos.

O LCE é um teste amplamente utilizado para avaliar a ansiedade em roedores (CALHOON; TYE, 2015; CAMPOS et al., 2013; CRYAN; HOLMES, 2005). Nesse sentido, a abordagem envolvendo a análise comportamental no LCE após a exposição a um estressor agudo, como o estresse de restrição, tem sido relatada como uma ferramenta eficaz para investigar o efeito ansiogênico causado por estímulos estressantes (BALI; JAGGI, 2015; BUYNITSKY; MOSTOFISKY, 2009; CAMPOS et al., 2013; MECHIEL KORTE; DE BOER, 2003). Assim, a diminuição da exploração dos braços abertos do LCE identificada no presente estudo após a exposição ao estresse de restrição foi consistentemente relatada em roedores por nós e outros grupos (BARRETTO-DE-SOUZA et al., 2022; BIRMANN et al., 2021; GOUVEIA et al., 2016; SCOPINHO et al., 2013).

Os dados relatados aqui fornecem evidências de um papel proeminente de sítios no IC em -0,40 a -0,92 mm em relação ao bregma (ou seja, IC posterior intermediário) na resposta ansiogênica ao estresse de restrição agudo. Nossos resultados de alguma forma contrastam com evidências anteriores de que o antagonismo do receptor glutamatérgico não-NMDA no IC a -0,5 mm do bregma não afetou a exploração dos braços abertos de LCE em animais naive (ou seja, não-estressados) (MÉNDEZ-RUETTE et al., 2019). Em conjunto com esses resultados anteriores, os achados relatados aqui indicam que o recrutamento de circuitos da sub-região intermediária do IC posterior para o controle de comportamentos relacionados à ansiedade depende da situação. Nesse sentido, essa região IC parece ser relevante no controle e expressão da resposta ansiogênica causada pela exposição ao estresse, mas

sem papel na ansiedade inata observada em situações de ausência de estresse.

Em relação a potenciais redes neurais relacionadas ao envolvimento do IC posterior intermediário na resposta ansiogênica ao estresse de restrição, a amígdala e o córtex pré-frontal medial (CPFm) são densamente inervados por todas as regiões do IC posterior, incluindo a sub-região posterior intermediária (GEHRLACH et al., 2019, 2020; ZHANG et al., 2022). Assim, núcleos da amígdala e o CPFm têm sido implicados no efeito ansiogênico causado pelo estresse de restrição agudo (CICCOCIOPO et al., 2014; VILA-VERDE et al., 2016). Estudos anteriores também identificaram que a ativação quimiogênica de neurônios que se projetam para o núcleo do leito da estria terminal (NLET) localizados em uma região entre o IC posterior rostral e intermediário (~ 0 mm do bregma) aumentou o tempo gasto no lado escuro da caixa claro-escuro, indicando, assim, um envolvimento da via IC→BNST no processamento de comportamentos relacionados à ansiedade (LUCHSINGER et al., 2021). Portanto, considerando que o NLET tem sido implicado na resposta ansiogênica evocada pelo estresse de restrição agudo (GOMES-DE-SOUZA et al., 2021; GOUVEIA et al., 2016), essa estrutura límbica também pode fazer parte da via neural relacionada ao controle da resposta ansiogênica ao estresse de restrição pelo IC posterior intermediário. As projeções do IC para o hipocampo são originadas principalmente do IC posterior rostral (GEHRLACH et al., 2020). A ideia de que o hipocampo não está envolvido no controle de comportamentos relacionados à ansiedade pelo IC posterior intermediário é ainda apoiada por evidências de que a inibição do hipocampo não afetou as mudanças comportamentais no LCE evocadas pelo estresse de restrição (SCOPINHO et al., 2013).

Os resultados relatados no presente estudo que indicam que as sub-regiões rostral e caudal do IC posterior não estão envolvidas na resposta ansiogênica ao estresse de restrição são inconsistentes com estudos anteriores que avaliaram a ansiedade em animais não-estressados. De fato, estudos explorando o controle sítio-específico ao longo do eixo rostrocaudal do IC identificaram que lesões eletrolíticas ou o antagonismo do receptor glutamatérgico não-NMDA centrado em sítios identificados no presente estudo como IC posterior rostral aumentaram a exploração dos braços abertos do LCE

em animais naive, o que indica um papel ansiolítico desta região do IC (MÉNDEZ-RUETTE et al., 2019; SHI et al., 2020). Por outro lado, o antagonismo do receptor glutamatérgico não-NMDA no IC posterior caudal diminuiu as entradas nos braços abertos do LCE, o que sugere uma influência dessa região do IC na expressão de comportamentos relacionados à ansiedade no LCE (MÉNDEZ-RUETTE et al., 2019). No entanto, nossos achados estão de acordo com a evidência de que a lesão eletrolítica no IC posterior caudal não teve efeito no comportamento no LCE em ratos não-estressados (SHI et al., 2020). Os dados anteriores que indicam um papel das sub-regiões rostral e caudal do IC posterior no comportamento do tipo-ansioso são consistentes com evidências de projeções proeminentes dessas sub-regiões do IC para estruturas límbicas, como a amígdala (GEHRLACH et al., 2019, 2020; LUCHSINGER et al., 2021; SHI et al., 2020). Portanto, assim como afirmado acima para a sub-região intermediária, parece que o recrutamento de circuitos do IC posterior rostral e caudal para o controle de comportamentos relacionadas à ansiedade também é dependente da situação. Nesse sentido, contrário ao observado em relação ao IC posterior intermediário, as sub-regiões rostral e caudal do IC posterior parecem ser relevantes no controle e expressão da ansiedade inata, mas sem um papel na resposta ansiogênica causada pela exposição ao estresse.

Embora não relacionado ao efeito ansiogênico, o IC posterior rostral e caudal está envolvido na expressão de outros efeitos comportamentais e respostas fisiológicas evocadas pelo estresse de restrição. De fato, a lesão eletrolítica de sítios no IC (+1,21 a +0,62mm do bregma) identificados no presente estudo como IC posterior rostral diminuiu o enterramento do restritor em camundongos submetidos ao estresse de restrição, um comportamento interpretado como uma resposta de medo (PARK; CHO; HUH, 2022). Portanto, além de um controle dependente da situação, o IC posterior rostral também pode estar engajado de maneira diferente na regulação de respostas de medo e ansiedade a eventos estressantes. O IC posterior rostral também foi proposto estar envolvido no comportamento de luta e aumento da pressão arterial observado durante o estresse de restrição agudo (LUCHSINGER et al., 2021; TOMEO et al., 2022), enquanto o IC posterior caudal está relacionado ao

aumento da frequência cardíaca provocada pelo estresse de restrição (TOMEIO et al., 2022).

7. CONCLUSÃO

Os resultados relatados no presente estudo indicam um controle sítio-específico da resposta ansiogênica ao estresse emocional ao longo do eixo rostrocaudal do IC posterior. Nossos dados indicam um envolvimento da sub-região intermediária do IC posterior no efeito ansiogênico identificado no LCE provocado pelo estresse de restrição agudo. No entanto, as áreas rostral e caudal parecem não estarem envolvidos nesta resposta comportamental.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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, May 2010.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais [recurso eletrônico]: DSM-5**. Tradução de Maria Inês Corrêa Nascimento et al. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. ISBN-978-8582710883.

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.

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

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

BENASSI-CEZAR, G. et al. Differential modulation of the anterior cingulate and insular cortices on anxiogenic-like responses induced by empathy for pain. **Neuropharmacology**, v. 192, p. 108413, Jul. 2021.

BENINI, R. et al. Habituation of the cardiovascular responses to restraint stress in male rats: influence of length, frequency and number of aversive sessions. **Stress**, v. 22, n. 1, p. 151–161, 2 Jan. 2019.

BIRMANN, P. T. et al. A pyrazole-containing selenium compound modulates neuroendocrine, oxidative stress, and behavioral responses to acute restraint stress in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 396, p. 112874, Jan. 2021.

BORNSTEIN, S. R.; BÖTTNER, A.; CHROUSOS, G. P. Knocking out the stress response. **Molecular Psychiatry**, v. 4, n. 5, p. 403–407, 1 Sept. 1999.

BUYNITSKY, T.; MOSTOFISKY, D. I. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 33, n. 7, p. 1089–1098, Jul. 2009.

CALHOON, G. G.; TYE, K. M. Resolving the neural circuits of anxiety. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 1394–1404, 25 out. 2015.

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.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1193–1205, Jan. 2005.

CHRISTIANSON, J. P. et al. The Sensory Insular Cortex Mediates the Stress-Buffering Effects of Safety Signals But Not Behavioral Control. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 50, p. 13703–13711, 10 Dec. 2008.

CHRISTIANSON, J. P. et al. Safety Signals Mitigate the Consequences of Uncontrollable Stress Via a Circuit Involving the Sensory Insular Cortex and Bed Nucleus of the Stria Terminalis. **Biological Psychiatry**, v. 70, n. 5, p. 458–464, Sept. 2011.

CHROUSOS, G. P. Stress and disorders of the stress system. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 5, n. 7, p. 374–381, 2 Jul. 2009.

CICCOCIOPPO, R. et al. Restraint Stress Alters Nociceptin/Orphanin FQ and CRF Systems in the Rat Central Amygdala: Significance for Anxiety-Like Behaviors. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 2, p. 363–372, 8 Jan. 2014.

CRAIG, A. D. et al. Thermosensory activation of insular cortex. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 2, p. 184–190, Feb. 2000.

CRESTANI, C. C. Emotional stress and cardiovascular complications in animal models: A review of the influence of stress type. **Frontiers in Physiology**, v. 7, 251, 24 Jun 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00251>.

CRYAN, J. F.; HOLMES, A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 9, p. 775–790, 1 Sept. 2005.

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.

DAMASIO, A. R. PUTNAM. Descartes' Error: Emotion, Reason, and the Human Brain. New York, NY: G. P. Putnam's Sons, 1994. Disponível em: https://ahandfulofleaves.files.wordpress.com/2013/07/descartes-error_antonio-damasio.pdf.

DAVIU, N. et al. Neurobiological links between stress and anxiety. **Neurobiology of Stress**, v. 11, p. 100191, Nov. 2019.

DE PAIVA, J. P. Q. et al. The posterior insular cortex is necessary for the consolidation of tone fear conditioning. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 179, p. 107402, March. 2021.

DOWNAR, J.; BLUMBERGER, D. M.; DASKALAKIS, Z. J. The Neural Crossroads of Psychiatric Illness: An Emerging Target for Brain Stimulation. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 20, n. 2, p. 107–120, Feb. 2016.

EYSENCK, M. W.; CALVO, M. G. Anxiety and Performance: The Processing Efficiency Theory. **Cognition & Emotion**, v. 6, n. 6, p. 409–434, Nov. 1992.

PAXINOS, George; WATSON, Charles. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. 3rd. ed. San Diego: Academic Press, 1996. ISBN: 0-12-547623-X. disponível em: <http://mikrokirurgi.se/wp-content/uploads/2013/10/Paxinos-The-rat-brain-in-stereotaxic-coordinates.pdf>.

GEHRLACH, D. A. et al. Aversive state processing in the posterior insular cortex. **Nature Neuroscience**, v. 22, n. 9, p. 1424–1437, 27 Sept. 2019.

GEHRLACH, D. A. et al. A whole-brain connectivity map of mouse insular cortex. **eLife**, v. 9, 17 Sept. 2020.

GOGOLLA, N. The insular cortex. **Current Biology**, v. 27, n. 12, p. R580–R586, Jun. 2017.

GOMES-DE-SOUZA, L. et al. CB1 and CB2 receptors in the bed nucleus of the stria terminalis differently modulate anxiety-like behaviors in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 110, p. 110284, Aug. 2021.

GOODKIND, M. et al. Identification of a Common Neurobiological Substrate for Mental Illness. **JAMA Psychiatry**, v. 72, n. 4, p. 305, 1 Apr. 2015.

GOUVEIA, M. K. et al. Dissociation in control of physiological and behavioral responses to emotional stress by cholinergic neurotransmission in the bed nucleus of the stria terminalis in rats. **Neuropharmacology**, v. 101, p. 379–388, Feb. 2016.

HERMAN, J. P. et al. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. Em: **Comprehensive Physiology**. Wiley, 2016. p. 603–621.

LAMOTTE, G.; SHOUMAN, K.; BENARROCH, E. E. Stress and central autonomic network. **Autonomic Neuroscience**, v. 235, p. 102870, Nov. 2021.

LUCHSINGER, J. R. et al. Delineation of an insula-BNST circuit engaged by struggling behavior that regulates avoidance in mice. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 3561, 11 Dec. 2021.

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

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

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. 2020a.

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. 2020b.

MECHIEL KORTE, S.; DE BOER, S. F. A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 163–175, Feb. 2003.

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

MORRIS, L. S. et al. The role of the locus coeruleus in the generation of pathological anxiety. **Brain and Neuroscience Advances**, v. 4, p. 239821282093032, 21 Jan. 2020.

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, Apr. 2017a.

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, Apr. 2017b.

OPPENHEIMER, S.; CECETTO, D. The Insular Cortex and the Regulation of Cardiac Function. Em: **Comprehensive Physiology**. Wiley, 2016. p. 1081–1133.

PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Restraint-induced hypoactivity in an elevated plus-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 1, p. 79–83, Jan. 2000.

PARK, S.; CHO, J.; HUH, Y. Role of the anterior insular cortex in restraint-stress induced fear behaviors. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 6504, 20 Dec. 2022.

RAJCANI, J. et al. Neuroendocrine responses to a psychosocial stress test for larger groups of participants: comparison of two test exposures. **Endocrine Regulations**, v. 54, n. 4, p. 255–259, 1 Oct. 2020.

ROSEN, J. B.; SCHULKIN, J. From normal fear to pathological anxiety. **Psychological Review**, v. 105, n. 2, p. 325–350, 1998.

SANTOS, C. E.; BENINI, R.; CRESTANI, C. C. Spontaneous recovery, time course, and circadian influence on habituation of the cardiovascular responses to repeated restraint stress in rats. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 472, n. 10, p. 1495–1506, 22 Oct. 2020.

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 Sept. 1982.

SCHAEUBLE, D.; MYERS, B. Cortical–Hypothalamic Integration of Autonomic and Endocrine Stress Responses. **Frontiers in Physiology**, v. 13, 11 Feb. 2022.

SCOPINHO, A. A. et al. Dorsal and Ventral Hippocampus Modulate Autonomic Responses but Not Behavioral Consequences Associated to Acute Restraint Stress in Rats. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e77750, 17 Oct. 2013.

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, Feb. 2020.

STEHBERG, J. et al. Release of gliotransmitters through astroglial connexin 43 hemichannels is necessary for fear memory consolidation in the basolateral amygdala. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 9, p. 3649–3657, 4 Sept. 2012.

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

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 May 2022.

VILA-VERDE, C. et al. Nitric oxide in the prelimbic medial prefrontal cortex is involved in the anxiogenic-like effect induced by acute restraint stress in rats. **Neuroscience**, v. 320, p. 30–42, Apr. 2016.

ZHANG, M.-M. et al. Glutamatergic synapses from the insular cortex to the basolateral amygdala encode observational pain. **Neuron**, v. 110, n. 12, p. 1993- 2008.e6, Jun. 2022.

ZHUO, M. Long-term cortical synaptic changes contribute to chronic pain and emotional disorders. **Neuroscience Letters**, v. 702, p. 66–70, May 2019.