



LUCAS ABRAHÃO DAHER PACHECO

**PAPEL DO CÓRTEX INSULAR NA MODULAÇÃO DA
ANSIEDADE**

**LAVRAS – MG
2023**

LUCAS ABRAHÃO DAHER PACHECO

PAPÉL DO CÓRTEX INSULAR NA MODULAÇÃO DA ANSIEDADE

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Ciências da Saúde, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Fernando Henrique Ferrari Alves
Orientador

LAVRAS-MG
2023

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Pacheco, Lucas Abrahão Daher.

Papel do Córtex Insular no controle da ansiedade / Lucas
Abrahão Daher Pacheco. - 2022.

54 p. : il.

Orientador(a): Fernando Henrique Ferrari Alves.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Ansiedade. 2. Cortex Insular. 3. NMDA. I. Alves, Fernando
Henrique Ferrari. II. Título.

LUCAS ABRAHÃO DAHER PACHECO

PAPEL DO CÓRTEX INSULAR NA MODULAÇÃO DA ANSIEDADE

INSULAR CORTEX'S ROLE ON ANXIETY MODULATION

Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Ciências da Saúde, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30/11/2022

Profa. Dra. Cristiane Busnardo Santiago – UNESP-SP

Profa. Dr. Gislaine Garcia Pelosi Gomes – UEL-PR

Prof. Dr. Fernando Henrique Ferrari Alves (Orientador) – UFLA-MG



Prof. Dr. Fernando Henrique Ferrari Alves

Orientador

**LAVRAS – MG
2023**

*Dedicado aos meus avós, Neide e Wannir, in
memoriam, que sempre me incentivaram, me
educaram e, acima de tudo, me amaram.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente o dom da vida, provido por Deus.

Aos animais, que possibilitaram este estudo.

À CAPES, pelo financiamento desta pesquisa e pela bolsa de estudos a mim concedida.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Fernando Henrique Ferrari Alves, por todas as portas abertas, conhecimento e incentivo, além do esforço a mim dedicado ao longo destes 2 anos.

Ao departamento de farmacologia da UNESP Araraquara, em especial a Dra. Cristiane Busnardo que, além de uma amiga, é também uma mentora e a Luana Giatti, que fez a análise das filmagens dos testes. Vocês foram fundamentais.

À equipe de laboratório e ao Prof. Morgan, na USP Ribeirão Preto, que mantiveram as portas abertas e me ofereceram uma oportunidade única de aprendizagem.

Ao Prof. Bruno Del Bianco Borges que muito me engrandeceu nesta pesquisa, além de sua disponibilidade e prontidão.

À Prof. Joziana Barçante, por sempre me incentivar e por acreditar em minha capacidade, bem como pelas oportunidades a mim concedidas.

Agradeço também ao meu primo Luís Henrique Maciel, que além de ser um exemplo, foi um mentor para os primeiros passos rumo ao mestrado.

À Ana Caroline Ventris Godoy, que muito me auxiliou neste processo.

À Faculdade de Ciências da Saúde, ao Departamento de Medicina e a pró-reitoria de pós graduação da UFLA, pela competência e pela mentalidade com que desenvolvem seus respectivos trabalhos.

Não poderia deixar de agradecer a cada professor que dedicou seu conhecimento em cada uma das disciplinas que cursei durante este processo. Minha eterna gratidão.

Agradeço minha mãe Neide, por ser o gatilho desta etapa em minha vida, além do

suporte que tive para que tudo transcorresse bem. Sem você, este projeto não seria possível.

Ao meu sogro, Roberval Freire, por me incentivar e me dar suporte durante este período. Você é um pilar em nossas vidas.

Ao tio Romilson, por ser um grande parceiro em momentos de dificuldade.

Aos meus irmãos Anne, Júlia, Sthephaninne e Túlio, pela torcida e pelo incentivo.

Ao meu amigo, que considero um irmão, Fernando Araújo, por ser uma pessoa inigualável, além de um grande incentivador e um porto seguro aos momentos de dificuldade. Afinal, nesta data são 33 anos de amizade.

Agradeço, em especial à minha filha, Maria Fernanda, que é minha fonte de inspiração e busca por crescimento, além de ser também minha treinadora para as apresentações. Te amo filha.

Agradeço infinitamente ao amor de minha esposa Rafaela, que me incentivou, criticou, batalhou, apoiou, questionou e me engrandeceu, não só neste mestrado, mas durante toda a vida. Sem você e Maria, nada faria sentido, nem teria propósito.

Por fim, agradeço a todos que torceram por mim!

Vocês contribuíram para o meu crescimento intelectual e pessoal.

Obrigado, de coração.

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

*“O conhecimento é a única riqueza que,
quando dividida, se multiplica”.*

Aristóteles

RESUMO

O córtex insular (CI) é uma estrutura que interliga várias regiões do encéfalo. Tem sido reportado como importante modulador das emoções por suas ligações com estruturas límbicas e foi associado à modulação do comportamento ansioso. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central e sua associação com o óxido nítrico (NO) e a enzima guanilato ciclase solúvel (sGC) está bem descrita na literatura. Dentre os receptores para o glutamato, destaca-se, neste estudo, o receptor N-methyl D-aspartato (NMDA) pois está relacionado com o influxo de cálcio e com a via de sinalização óxido nítrico – guanosina monofosfato cíclico (NO/GMPc). O antagonismo do receptor NMDA e de sua via de sinalização pode demonstrar o envolvimento do CI na neuromodulação da ansiedade. Assim, o objetivo deste projeto é o estudo deste mecanismo afim de estabelecer relação entre o comportamento modulado pelo CI e a ação glutamatérgica. As desordens de ansiedade (DA) são a segunda maior causa de incapacidade trabalhista apresentando alta incidência e prevalência à nível mundial, além de não haver diagnósticos diferenciais e exames laboratoriais para os diferentes tipos de desordem, sendo assim um ponto alarmante para as ciências da saúde atualmente. Foram utilizados ratos da espécie Wistar, machos, submetidos à estereotaxia para canulação do córtex insular, onde as drogas foram administradas diretamente, e em seguida foi realizado o teste do labirinto em cruz elevado (LCE) e o teste de campo aberto (CA), ambos testes consagrados para avaliação do comportamento dos ratos. O registro de imagens e a contagem de entradas e saídas do LCE contou com o auxílio de um software de gravação (AnyMaze). Os animais foram divididos em grupos onde cada um recebeu um tipo de droga, além do grupo naive e do controle. Após o experimento foi realizada a retirada do cérebro que foram cortados num criostato e analisados quanto ao sítio de injeção das drogas. A análise estatística (Kruskall-Wallis) demonstrou não haver diferença estatística significativa no número de entradas e saídas do labirinto, bem como no tempo de permanência do animal no centro ou nas periferias do teste de CA. Entretanto, análises descritivas mostraram alguns pontos interessante. Problemas foram encontrados no percurso dos experimentos, influenciando negativamente os resultados. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

PALAVRAS-CHAVE: Ansiedade, córtex insular, NMDA, Óxido Nítrico, GMPc.

ABSTRACT

The insular cortex (IC) is a structure that connects many regions of the brain. It has been reported as an important modulator of emotions due to its links with limbic structures and has been associated with the modulation of anxiety-like behavior. Glutamate is the main excitatory neurotransmitter in the central nervous system and its association with nitric oxide (NO) and the enzyme soluble guanylate cyclase (sGC) is well described in the literature. Among the receptors for glutamate, the N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor stands out in this study because it's linked to the calcium influx and to the nitric oxide – cyclic guanosine monophosphate (NO/cGMP) signaling pathway. The antagonism of the NMDA receptor and its signaling pathway may demonstrate the involvement of IC in the neuromodulation of anxiety. Thus, the objective of this project is to study this mechanism, in order to establish a relationship between the behavior modulated by IC and the glutamatergic action. Anxiety disorders are the second leading cause of work disability, with a high incidence and prevalence worldwide, in addition to the lack of differential diagnoses and laboratory tests for the different types of disorder, thus being an alarming point for the health sciences. currently. Male Wistar rats was used in these experiments which is based on stereotaxis surgery for cannulation of the insular cortex, where the drugs were administered directly, and then submitted to the elevated plus maze test and the open field test, for evaluation of the rat's behavior. The recording of images and counting of inputs and outputs of the LCE was supported by a recording software (AnyMaze). The animals were divided into groups where each received a type of drug, in addition to the naive and control groups. After the experiment, the brain was removed, cut in a cryostat and analyzed for the determination of the drug injection site. Statistical analysis (Kruskall-Wallis) showed no statistically significant difference in the number of entries and exits of the maze, as well as in the length of animal staying in the center or in the periphery of the open field. However, some descriptive analyses showed some interesting points. Some problems were found in the course of the experiments, negatively influencing the results also. The experimental protocol was approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of the Federal University of Lavras (UFLA).

KEYWORDS: Anxiety, insular cortex, NMDA, Nitric Oxide, cGMP

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração da via de ativação de receptores NMDA e cascata de reações NO/GC.....	22
Figura 2 – Cronologia dos protocolos experimentais	32
Figura 3 – Fotomicrografia representativa de uma secção coronal do cérebro de rato demonstrando o sítio da microinjeção na região do córtex insular	34
Figura 4A – Representação gráfica do número de entradas nos braços abertos do LCE.....	35
Figura 4B – Representação gráfica do tempo de permanências nos braços abertos do LCE	35
Figura 4C – Representação gráfica do número de cruzamentos no centro do LCE.....	35
Figura 4D – Representação gráfica do tempo de permanências no centro do LCE.....	35
Figura 5A – Representação gráfica do tempo de permanências na periferia do CA	36
Figura 5B – Representação gráfica do tempo de permanências no centro do CA	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aCSF	Líquido cefalorraquidiano artificial
AK	Kainato
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxozolpropiónico
Ca ²⁺	Cálcio
Carboxi-PTIO	Sequestrador de óxido nítrico
CEUA	Comitê de Ética em Uso Animal
CI	Córtex insular
CPTIO	Carboxi-PTIO
DA	Desordens de ansiedade
EPM	Erro padrão da média
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GC	Guanilato ciclase
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IC	Intervalo de Confiança
LY235959	Inibidor seletivo de receptores n-metil d-aspartato
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
mGluR	Receptor metabotrópico de glutamato
NMDA	N-metil-d-Aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintases
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
nNOS	Óxido nítrico sintase induzível
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NPLA	N-propil-L-arginina, inibidor seletivo da nNOS
ODQ	Inibidor da GC
SEM	Erro padrão da média
sGC	Guanilato ciclase solúvel
SL	Sistema límbico
SNC	Sistema nervoso central

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Ansiedade	15
2.2	Sistema límbico	17
2.3	Córtex Insular	18
2.4	Neurotransmissão glutamatérgica e sistema nitrérgico	20
2.5	Modelos de experimentação animal	23
3	OBJETIVOS	25
3.1	Objetivo geral	25
3.2	Objetivos específicos	25
4	HIPÓTESE	25
5	JUSTIFICATIVA	25
6	MATERIAL E MÉTODOS	27
6.1	Animais	27
6.2	Detalhamento dos grupos amostrais	28
6.3	Técnica de implante de cânula guia no CI	28
6.4	Descrição dos fármacos utilizados	29
6,5	Aplicação dos testes	29
6.5.1	Labirinto em cruz elevado	29
6.5.2	Campo aberto	29
6.6	Microinjeção de drogas no córtex insular	30
6.7	Determinação anatômica dos sítios de injeção de droga no córtex insular	30
6.8	Análise estatística	30
7	DESCRIÇÃO DOS PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	32
7.1	Estudo da participação do CI nas respostas comportamentais ao LCE e ao CA	32

7.1.1	Efeito do tratamento do CI com LY235959, um antagonista de receptor NMDA, sobre as respostas comportamentais durante a exposição ao LCE e ao CA.....	32
7.1.2	Efeito do tratamento do CI com NBQX, um antagonista de receptor não-NMDA, sobre as respostas comportamentais durante a exposição ao LCE e ao CA.....	32
7.1.3	Efeito do tratamento do CI com NPLA, um inibidor seletivo da nNOS, sobre as respostas comportamentais durante a exposição ao LCE e ao CA.....	32
7.1.4	Efeito do tratamento do CI com Carboxi-PTIO, um sequestrador de NO, sobre as respostas comportamentais durante a exposição ao LCE e ao CA ..	33
7.1.5	Efeito do tratamento do CI com ODQ, um inibidor específico da formação da guanilato ciclase, sobre as respostas comportamentais durante a exposição ao LCE e ao CA	33
7.1.6	Efeito do tratamento do CI com líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF) e com dimetilsulfóxido (DMSO), sobre as respostas comportamentais durante a exposição ao LCE e ao CA.....	33
7.1.7	Efeito do não - tratamento do CI. sobre as respostas comportamentais durante a exposição ao LCE e ao CA.....	33
8	RESULTADOS.....	34
8.1	Determinação dos sítios de injeção das drogas.....	34
8.2	Apresentação dos resultados estatísticos.....	35
9	DISCUSSÃO.....	40
10	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

Ansiedade é uma resposta comportamental que se caracteriza pela aversão ao desconhecido (CRASKE *et al.*, 2009). Há uma reação desproporcional à iminência de uma ameaça, na ausência de perigo real, diferenciando-se do medo, por assim dizer (SHIN; LIBERZON, 2010; SYLVERS; LILIENFELD; LAPRAIRIE, 2011). Esta resposta comportamental desencadeia reações autonômicas e hormonais como elevação da pressão arterial e frequência cardíaca, aumento da liberação do cortisol e da adrenalina, além de reações defensivas e variações cognitivas (MILAD; ROSENBAUM; SIMON, 2014).

O sistema límbico (SL) é um conjunto de estruturas relacionadas com a gênese das emoções (CATANI; DELL'ACQUA; THIEBAUT DE SCHOTTEN, 2013). Suas interconexões com o córtex insular (CI) foram demonstradas nos estudos de Paul Yakovlev, na década de 40 e vem sendo estudadas para melhor compreensão de sua interação (CHOW *et al.*, 2018; ROLLS, 2019).

O CI é uma estrutura cortical que atua como uma multiestação, integrando diversas regiões encefálicas (BENARROCH, 2019), onde o principal neurotransmissor excitatório é o glutamato, que age nos receptores ionotrópicos e metabotrópicos (DORI *et al.*, 1992; RAMÍREZ-LUGO *et al.*, 2015). O receptor glutamatérgico ionotrópico do tipo N-Metil D-Aspartato (NMDA), localizado no terminal pós sináptico, se liga ao glutamato e essa ligação neurotransmissor/receptor, resulta no influxo de cálcio que, por sua vez, se liga à uma proteína celular receptora, a calmodulina, ativando a enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) que converte a L-arginina em óxido nítrico (NO), no sistema nervoso central (SNC) (CHACHLAKI; PREVOT, 2019; GARTHWAITE; CHARLES; CHESS-WILLIAMS, 1988). Uma vez produzido sob demanda, o gás NO se ligará à guanilato ciclase solúvel (sGC) que converterá a guanosina trifosfato (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), ativando o sistema de proteína quinases, atuando como segundos mensageiros (ESPLUGUES, 2002; GARRY *et al.*, 2015). Parte deste NO agirá de forma retrógrada, voltando pela fenda sináptica e aumentando a liberação de glutamato na fenda (GARTHWAITE, 2019).

A interação entre a neurotransmissão glutamatérgica e nitrérgica, em diversas regiões encefálicas, inclusive no CI (MÉNDEZ-RUETTE *et al.*, 2019) é alvo de estudos comportamentais (LISBOA *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2011).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ansiedade

Ansiedade pode ser definida como um estado de aversão ao desconhecido, onde nota-se intensificação do medo na ausência de perigo real (SHIN; LIBERZON, 2010), que induz respostas emocionais a ameaças potencialmente não-identificadas (MÉNDEZ-RUETTE *et al.*, 2019a), desencadeando reações comportamentais, hormonais e autonômicas (ANDERSON; ADOLPHS, 2014; DAVIS *et al.*, 2010; DAVIS; WHALEN, 2001; LEDOUX, 2000, 2014). É um estado de antecipação sobre a percepção de ameaças futuras, sendo essa antecipação desproporcional ao risco ou perigo representado.

Diversos autores demonstraram que, apesar das semelhanças, medo e ansiedade são emoções diferentes (SHIN; LIBERZON, 2010; SYLVERS; LILIENFELD; LAPRAIRIE, 2011) entretanto ambos provocam respostas comportamentais defensivas que evoluíram para permitir que o organismo evite ou reduza danos e assim sobreviva (TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015). O medo é resultante da percepção de um perigo iminente, proveniente de um estímulo real e reconhecido (CRASKE *et al.*, 2009).

Padrões comportamentais relacionados a medo e ansiedade podem ser observados em muitas espécies animais, o que reflete sua importância como fator de sobrevivência, pois gera adaptações que protegem o animal de um ambiente potencialmente nocivo (TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015). Já foi demonstrado que, em humanos, a ansiedade crônica tem uma alta prevalência (BAXTER *et al.*, 2013; CRASKE *et al.*, 2017; TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015), portanto desenvolver novas estratégias e testes laboratoriais para diferenciar quimicamente os tipos de distúrbios do SNC faz-se necessário, além de novos estudos que fundamentem o medo e a ansiedade em modelos animais, para melhor compreensão dos eventos ali envolvidos, contribuindo para novas diretrizes terapêuticas (TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015).

Na vida adulta, medo transitório e ansiedade podem emergir de períodos de vida estressantes, mas para serem diagnosticados como distúrbios de ansiedade (DA), devem persistir por um período longo de tempo, por exemplo, nos últimos seis meses (CRASKE *et al.*, 2017; CRASKE; STEIN, 2016; THIBAUT, 2015).

Distúrbios de ansiedade (DA) são as condições de doenças mentais de maior prevalência global (KESSLER *et al.*, 2005). Estima-se que 69,1 milhões de pessoas sejam afetadas por algum tipo de DA, num período de 1 ano, considerando todas as faixas etárias (CHARLSON *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2020; WITTCHEN *et al.*, 2011), sendo comumente observadas na

adolescência (SILVA *et al.*, 2020). As DA são o sexto principal fator de risco para incapacidade trabalhista, tanto em países de alta quanto de baixa renda per capita (KESSLER *et al.*, 2009), sendo que a ansiedade está associada a altos custos pessoais e sociais relacionados à assistência primária de saúde, déficit no trabalho e prejuízos no relacionamento social, chegando a custar mais de 40 bilhões de dólares, ao longo da década de 90, nos Estados Unidos (KESSLER *et al.*, 2009). DA possuem forte hereditariedade e estima-se uma herdabilidade entre 30% e 50%, baseando-se em dados de estudos investigando gêmeos (SHIMADA-SUGIMOTO; OTOWA; HETTEMA, 2015). Estima-se que 1 em cada 14 pessoas atenda aos critérios de diagnóstico de algum tipo de DA (BAXTER *et al.*, 2013).

O quadro sintomatológico característico das DA geralmente se manifesta na infância, adolescência ou início da vida adulta (KESSLER *et al.*, 2009) e embora menos frequente, podem se manifestar tardiamente, na vida adulta (CRASKE *et al.*, 2017) e o início do quadro pode variar de acordo com o tipo de DA (CRASKE *et al.*, 2017).

As características essenciais das DA são: medo excessivo e duradouro, aversão e ansiedade a ameaças perceptíveis e ataques de pânico (CRASKE; STEIN, 2016), sendo que podemos distinguir medo específico de ansiedade específica baseando-nos na iminência da ameaça real, das quais o gatilho do medo é a resposta de luta ou fuga até que a ameaça em si seja removida (CRASKE *et al.*, 2017; PERKINS; KEMP; CORR, 2007). Em contraste, as respostas de ansiedade específica são devidas a ameaças distantes, incertas e interpessoais, tendendo a serem bem mais duradouras (CRASKE *et al.*, 2017), observando-se intensificação das respostas fisiológicas de medo e aversão, mesmo na ausência de um perigo real (SHIN; LIBERZON, 2010).

De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico das Doenças Mentais, quinta edição (DSM-V), atualmente são consideradas DA os quadros de: ansiedade de separação, mutismo seletivo, fobias específicas, síndrome de ansiedade, síndrome do pânico, agorafobia, síndrome de ansiedade generalizada, transtorno obsessivo compulsivo, ansiedade induzida por uso de substâncias e medicamentos e ansiedade inerente às condições médicas (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013), podendo estar associadas também a quadros de depressão (CRASKE; STEIN, 2016; GOODWIN, 2015). Há evidências de que exista uma sobreposição dos circuitos neurais da depressão, ansiedade e transtorno obsessivo compulsivo demonstrando que quadros de ansiedade e depressão podem estar associados e que o tratamento tem efeito positivo em ambas (GOODWIN, 2015).

Ansiedade aguda é fisiológica e necessária, uma vez que premedita situações de perigo (GRAEFF, 2007). Entretanto pode ocorrer de forma crônica e desmedida, gerando respostas

adaptativas inadequadas e até transtornos psiquiátricos, se tornando patológica (GRAEFF, 2007).

Indivíduos diagnosticados com DA, como transtorno pós-traumático, síndrome do pânico, agorafobia ou desordem de ansiedade social, ao serem expostos ao estímulo de medo, apresentaram “comportamentos de segurança”, os quais resultaram no impedimento do cessamento dos mecanismos neurais do medo (LOVIBOND *et al.*, 2007).

Estudos com roedores demonstram que o medo condicionado (DUITS *et al.*, 2015; DUNSMOOR; PAZ, 2015) e déficit no controle da proporção deste medo são, em hipótese, contribuintes para o desenvolvimento de ansiedade (MILAD; ROSENBAUM; SIMON, 2014). Agregando-se os estudos por imagem, que sugerem grande semelhança entre os circuitos de extinção do medo em humanos e roedores (DELGADO *et al.*, 2008), há a possibilidade de um modelo comparativo comportamental entre as espécies.

2.2 Sistema límbico

Emoções emergem de atividades coordenadas das regiões cerebrais interligadas pelo sistema límbico (CATANI; DELL’ACQUA; THIEBAUT DE SCHOTTEN, 2013), onde a base comportamental e adaptativa para as respostas emocionais vem dos substratos fornecidos pelos circuitos córtico-límbicos (KOVNER; OLER; KALIN, 2019).

Por definição, o sistema límbico (SL) pode ser considerado um conjunto de estruturas corticais e subcorticais, interligadas morfológicamente e funcionalmente, correlacionando-se com a memória e as emoções (CATANI; DELL’ACQUA; THIEBAUT DE SCHOTTEN, 2013).

Inicialmente o termo “límbico” (do latim, fronteira) foi designado por Thomas Willis, em 1664, para descrever uma borda cortical circular localizada acima do tronco cerebral (ROLLS, 2015). Paul Broca, em 1878, defendia que a grande área límbica era uma estrutura comum aos cérebros de todos os mamíferos e sua principal função estava relacionada ao olfato, embora também desempenhasse outras funções (CATANI; DELL’ACQUA; THIEBAUT DE SCHOTTEN, 2013). Após os relatos de Broca, diversos estudos foram conduzidos associando as estruturas límbicas a aspectos comportamentais e emocionais (ROLLS, 2015; WALTER B CANNON, 1927). Estudos posteriores contribuíram para a formulação do primeiro modelo unificado que ligava ação e percepção às emoções, o chamado “circuito de Papez”, proposto por James Papez em 1937, propunha que as emoções emergiam tanto de atividades cognitivas, entrando no circuito através do hipocampo, quanto da percepção visceral e somática, adentrando o circuito através do hipotálamo (PAPEZ, 1937). Estruturalmente o circuito incluía

o hipotálamo, hipocampo, o núcleo anterior do tálamo, o fórnix, os corpos mamilares, o giro cingulado anterior e suas interconexões, entretanto, não incluía a amígdala (PAPEZ, 1937). Hipotetizou-se na época e posteriormente foram comprovados por novos estudos, inúmeras conexões e participações de circuitos e regiões cerebrais, nos processos envolvidos pelo comportamento emocional (PESSOA; HOF, 2015) inclusive a participação da amígdala, lobo temporal anterior, córtex orbito frontal e córtex insular (CI) como parte da rede que delimita as emoções e a motivação (YAKOVLEV, 1948). O córtex pré-frontal, o córtex cingulado, o córtex entorrinal, o hipocampo, a substância cinzenta periaquedutal, a amígdala e o hipotálamo tem sido reportados como parte do sistema límbico, por alguns autores (CHOW *et al.*, 2018; ROLLS, 2019).

Assim, uma complexa rede de estruturas subcorticais e corticais interligadas, responsável por conectar sensações viscerais e emoções a reações comportamentais e cognitivas, compõe o sistema límbico (MESULAM, 2000).

Há uma tendência atual em se classificar o SL funcionalmente propondo que diferentes áreas e diferentes conexões deste sistema estejam associadas na modulação das emoções e da memória episódica, diferenciando-se em sistema límbico emocional (SLe), onde as principais conexões giram em torno do córtex cingulado anterior e sistema límbico de memória (SLm), onde as principais interconexões giram em torno do hipocampo (ROLLS, 2019).

2.3 Córtex insular

A região que corresponde à maior parte do córtex cerebral é denominada córtex pré-frontal. Evolucionalmente, é a parte do cérebro que mais se desenvolveu em seres humanos (SMAERS *et al.*, 2011). Possui interligações com todo sistema límbico, gânglios da base, tálamo, amígdala e tronco cerebral (ÖNGÜR; PRICE, 2000). Seu papel é fundamental na modulação dos estímulos comportamentais, ações cognitivas, áreas da fala e linguística, além de exercer regulação sobre funções autonômicas e neuroendócrinas (BENARROCH, 2019).

Anatomicamente, podemos dividir o córtex pré-frontal em três regiões: medial, ventral (ou orbital) e lateral, sendo que a porção lateral do córtex pré-frontal é também chamado de córtex insular (CI) (GOGOLLA, 2017). O córtex insular (CI) é uma estação anatômica que integra regiões corticais e subcorticais através de uma extensa rede conectiva, funcionando como um centro cortical envolvido na interocepção, processamento sensorial multimodal, controle autônomo, autoconsciência perceptual e orientação emocional do comportamento social (BENARROCH, 2019). É responsável pela modulação de reações comportamentais como medo, ansiedade e depressão, bem como respostas a agentes estressores externos sendo

uma área diretamente envolvida em processos sensitivos, cognitivos, motivacionais e emocionais (GOGOLLA, 2017).

Em camundongos e ratos, se localiza logo acima da fissura rinal, lateralmente aos hemisférios (RANJBAR; HATAM; NASIMI, 2015; SAPER, 1982). Já em humanos, está profundamente situado entre os sulcos cerebrais laterais (UDDIN *et al.*, 2017) e é delimitado pelas opérculas frontal, parietal e temporal, pelo sulco peri-insular e dividido em lobos anterior e posterior pelo sulco insular central, podendo ter variações quanto às marcações anatômicas dos giros (UDDIN *et al.*, 2017; WYSIADECKI *et al.*, 2018). Subdivisões cito-arquitetônicas (composição celular) podem ser morfológicamente observadas, evidenciando três áreas distintas: Área granular, situada mais posteriormente, relacionada com a percepção do status corporal geral, como temperatura, dor e sensação visceral. Área disgranular, situada medialmente, responsável por integrar interocepção e propriocepção conectando, assim, ação e emoção. Área agranular, anteriormente, relacionada com controle cognitivo e emocional, bem como com o controle autonômico (BENARROCH, 2019).

Estudos recentes mostram que o CI de roedores, apesar da diferença anatômica com o dos primatas não humanos e humanos, tem muitas funções em comum e essas semelhanças podem prover o ponto de partida para se entender suas funções neuronais básicas, bem como seu funcionamento ou mal funcionamento, sendo mais acessível o estudo nestes animais (GOGOLLA, 2017).

O CI funciona como uma interface que interliga aferências periféricas corporais e emoções (BENARROCH, 2019; NIEUWENHUYS, 2012). Em estudos conduzidos por Alves e colaboradores, 2013, observou-se que ao administrar um inibidor sináptico inespecífico no CI de ratos Wistar, cloreto de cobalto (CoCl_2), houve redução do tempo de paralisia, bem como dos valores médios da pressão arterial e da frequência cardíaca, no modelo de medo condicionado ao contexto, demonstrando o envolvimento do CI na modulação comportamental e autonômica (ALVES *et al.*, 2013a).

Tanto em humanos quanto em roedores, o CI é frequentemente reportado por ser superativado em processos de medo (GEHRLACH *et al.*, 2019), ansiedade (MÉNDEZ-RUETTE *et al.*, 2019a) e emoções negativas (CHANG *et al.*, 2015).

Recentemente, demonstrou-se o envolvimento direto do CI de roedores na modulação da ansiedade, ministrando um inibidor seletivo dos receptores AMPA, através microinjeções diretas em distintas regiões do CI (granular, agranular e disgranular) e expondo os roedores ao teste do labirinto em cruz elevado (LCE), observando efeitos ansiolíticos (MÉNDEZ-RUETTE *et al.*, 2019a).

Estudos têm correlacionado o CI com as DA (DAMSA; KOSEL; MOUSSALLY, 2009), onde parece desempenhar papel fundamental em sua patofisiologia e, embora essa correlação esteja estabelecida (DENNIS *et al.*, 2011), a neurotransmissão e o envolvimento do CI no comportamento ainda não estão elucidados (ALVES *et al.*, 2013b), sendo fundamentais os modelos de estudos em animais (MÉNDEZ-RUETTE *et al.*, 2019a).

2.4 Neurotransmissão glutamatérgica e sistema nitrérgico

Os neurotransmissores tornam possível o envio e recebimento de informações, sejam elas centrais ou periféricas, somáticas ou autônomas, aferentes ou eferentes. Para cada neurotransmissor existe um sistema de receptores, mensageiros e eventos em cascata que, de forma direta ou indireta, garante que as ações possam se difundir (KREBS.; WEINBERG.; AKESSON., 2013).

O glutamato, sintetizado a partir da glutamina ou da transaminação do alpha ceto glutarato no ciclo de Krebs, é o principal neurotransmissor excitatório no SNC (FLECK *et al.*, 1993; KHODOROV, 2004). Está relacionado com dois tipos de receptores: os ionotrópicos, subdivididos em Alfa-Amino-3-Hidroxi-Metil-5-4-Isoxozolpropiónico (AMPA), Kainato (AK) e N-Metil D-Aspartato (NMDA), e os metabotrópicos (mGluR), associados à proteína G, subdivididos em 3 tipos: Tipo 1 (mGluR 1 e 5), tipo 2 (mGluR 2 e 3) e tipo 3 (mGluR 4, 6, 7 e 8) (HANSEN *et al.*, 2018; TRAYNELIS *et al.*, 2010).

O óxido nítrico (NO) é obtido pela metabolização da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Há três subtipos de NOS conhecidos na literatura: Óxido nítrico sintase induzível (iNOS), óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) (MICHEL; FERON, 1997; NAKASHIMA *et al.*, 2003; NATHAN, 1997). A nNOS é amplamente encontrada em encéfalos de mamíferos, sendo diretamente relacionada com a neurotransmissão e sinalização nitrérgica cerebral bem como a formação de NO cerebral (GARTHWAITE, 2016).

A descoberta da atividade central do NO é recente. Na década de 70, Garthwaite se junta ao Conselho de Pesquisas Médicas e conduz estudos utilizando células de Purkinje, no cerebelo. A grande expressão de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) nessa estrutura possibilitou que se estudasse a relação da produção desse nucleotídeo com a presença de neurotransmissores. Observando-se um aumento da expressão de GMPc quando há maior presença de neurotransmissores excitatórios e uma redução da expressão na presença de neurotransmissores inibitórios. Teorizou-se, portanto, que a atividade da enzima guanilato

ciclase (GC), que faz a conversão do monofosfato de guanosina em um nucleotídeo cíclico, guardava relação com receptores excitatórios (BIGGIO; GUIDOTTI, 1976).

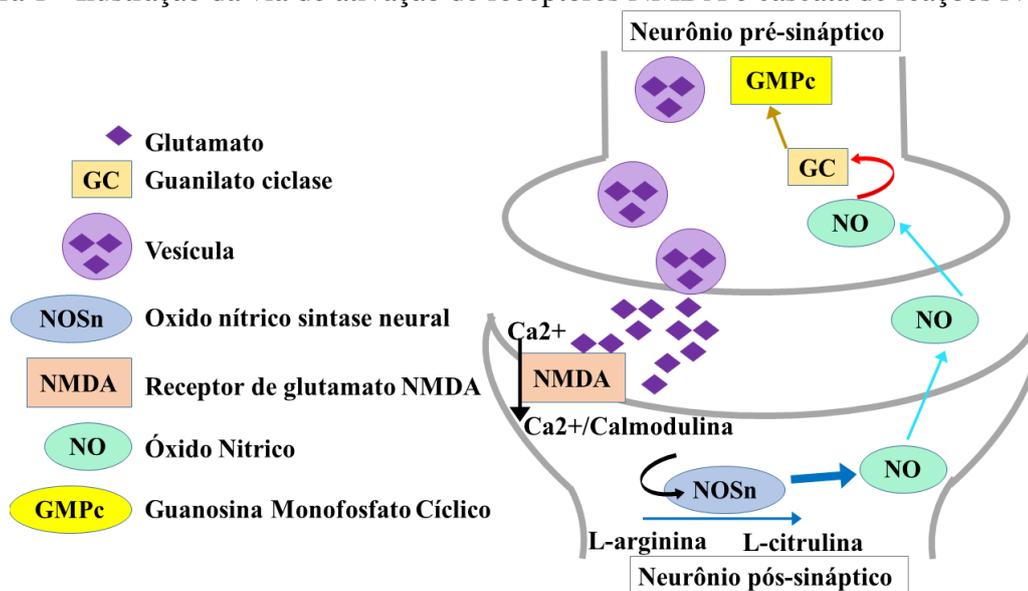
Estudos posteriores, utilizando-se de microinjeções de glutamato administradas *in vitro*, estabeleceram a participação do íon cálcio (Ca^{2+}) nesse processo (FERRENDELLI; CHANG; KINSCHERF, 1974; GARTHWAITE, 2019).

Partindo destes achados, estabelecendo sua conexão excitatória e cálcio-dependente, estudos direcionados aos receptores do tipo NMDA foram conduzidos com intuito de estabelecer sua relação com o NO e com a GMPc. Descobriu-se, após os estudos de Gathwaite, que o receptor NMDA, ao ligar-se ao glutamato e receber o influxo de cálcio, liberava o fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), que foi elucidado nos estudos de Furchgott & Ignarro, como o gás NO (GARTHWAITE, 2019). Também ficou demonstrado que o sistema Ca^{2+} - calmodulina está intimamente relacionado com a nNOS localizada no terminal pós sináptico (BREDT *et al.*, 1991).

O NO formado pela mediação da nNOS age como um sinalizador neuronal e também como um transmissor atípico, responsável por processos de regulação do fluxo sanguíneo do SNC (GARRY *et al.*, 2015). Com a difusão do NO para o terminal pré-sináptico, há ativação da guanilato ciclase solúvel (sGC) (ESPLUGUES, 2002), que catalisa a produção de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) (GARRY *et al.*, 2015) e pode modular a liberação de neurotransmissores e segundos mensageiros (TAQATQEH *et al.*, 2009), entre outras funções.

A neurotransmissão glutamatérgica está diretamente relacionada com o sistema nitrérgico e com a isoforma óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) (CHACHLAKI; PREVOT, 2019; GARTHWAITE, 2016). A ativação dos receptores NMDA culmina no influxo de cálcio (Ca^{2+}) que ativa a nNOS, levando à síntese de óxido nítrico (NO) (CHACHLAKI; PREVOT, 2019; GARTHWAITE; CHARLES; CHESS-WILLIAMS, 1988), conforme ilustrado na Figura 1.

Figura 1 - Ilustração da via de ativação de receptores NMDA e cascata de reações NO/GC.



Legenda: No neurônio pré-sináptico ocorre a despolarização da membrana pré-sináptica, levando a exocitose das vesículas contendo glutamato. Após liberado na fenda sináptica, o glutamato interage com seu receptor do tipo NMDA e leva ao influxo de Ca^{2+} no neurônio pós-sináptico. O complexo Ca^{2+} / Calmodulina ativa a enzima óxido nítrico sintase neural (NOSn), que a partir da biossíntese de L-arginina em L-citrulina, forma o óxido nítrico (NO). Uma vez formado, o NO se difunde pela membrana pós sináptica e atua de forma retrógrada no neurônio pré-sináptico, interagindo com a guanilato ciclase (GC), que através de reações dependentes de GMPc, leva à exocitose de novas vesículas contendo glutamato e assim, o ciclo se repete.

Fonte: Do autor (2022).

Inicialmente acreditava-se que o NO atuava como um segundo mensageiro, pois neurotransmissores centrais geralmente acompanhavam o dogma de estarem armazenados em vesículas, esperando um potencial sináptico. Atualmente sabemos que o NO, assim como o sistema endocanabinóide, é um neurotransmissor atípico produzido sob demanda, que atua em todo o encéfalo como um mensageiro intercelular, iniciando seus variados efeitos fisiológicos ativando receptores acoplados a GC, resultando na formação de GMPc (GARTHWAITE, 2019). Pode agir de forma retrógrada, sendo produzidos a partir do terminal pós sináptico e atuando como marcadores pré-sinápticos a fim de aumentar a liberação de um neurotransmissor específico (GARTHWAITE, 2019). Para GARTHWAITE, 2019, o termo transmissor é mais adequado que o termo neurotransmissor, uma vez que o NO age e é produzido também, fora dos neurônios.

A interação entre os sistemas glutamatérgico e nitrérgico tem se caracterizado como um componente ativo no controle de diversos sistemas regulatórios, tanto autonômicos quanto comportamentais (LISBOA *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2011).

Foi constatada a presença de terminais glutamatérgicos no CI (DORI *et al.*, 1992; RAMÍREZ-LUGO *et al.*, 2015), bem como modulação da atividade barorreflexa pelos

receptores NMDA do CI (ALVES *et al.*, 2009), demonstrando a presença destes receptores nesta região.

Diante do exposto a hipótese desse estudo foi de que a inibição dos receptores glutamatérgicos NMDA e não-NMDA, bem como da via NO/GMPc, no córtex insular de ratos, interfere, de alguma forma, no comportamento observado no teste do labirinto em cruz elevado (LCE) e do campo aberto (CA).

2.5 Modelos de experimentação animal

Modelos animais para ansiedade são baseados em situações de conflito, que podem gerar estados aversivos (CAMPOS *et al.*, 2013). O labirinto em cruz elevado (LCE) é o modelo animal para ansiedade mais utilizado (CAMPOS *et al.*, 2013). É um aparato que fica a cerca de 50 centímetros do solo, com 4 braços e 4 lados que cruzam perpendicularmente entre si, sendo um dos lados fechado e outro aberto. O teste consiste na tendência natural do roedor permanecer nos braços fechados. Assim, se compara o tempo de permanência em nos braços abertos com os braços fechados, além do número de cruzamentos entre os lados (LISTER, 1987). Fatores externos como iluminação, odores, luminosidade, ruídos e experiência prévia do animal podem interferir diretamente nos resultados, sendo ideal a assepsia do aparato antes de cada teste, além de um ambiente tranquilo e uso de animais que não tenham experienciado o teste previamente (CAMPOS *et al.*, 2013). O animal deve ser manejado de forma cuidadosa e colocado ao centro do labirinto, com a face voltada para o lado fechado. Contabiliza-se então o tempo de 5 minutos e é indicado que o animal esteja solitário neste momento, enquanto é monitorado por câmera. Este procedimento foi utilizado com sucesso em estudos que avaliaram drogas ansiolíticas, onde demonstrou-se um maior tempo de permanência do animal no braço aberto (PELLOW; FILE, 1986).

O teste do campo aberto (CA) consiste na avaliação do aumento da atividade locomotora do animal e também de sua capacidade exploratória (PRUT; BELZUNG, 2003). O roedor é colocado no centro de uma caixa quadrada fechada (60 x 60 cm), demarcada por 16 quadrantes de 15 x 15 cm. Fatores externos podem influenciar o comportamento animal, assim como no LCE. Logo, faz necessário os mesmos cuidados como a assepsia antes do uso de cada animal, o manejo cuidadoso, o ambiente calmo e a ausência de pessoas na área de testes. Há uma tendência de roedores permanecerem nas quinas do aparato. Quando um efeito ansiolítico é observado, o animal passa mais tempo no centro, mas quando muito agitados, percorrem o aparato de forma desordenada (PRUT; BELZUNG, 2003), servindo então como um contraponto ao teste do LCE, uma vez que, se o animal permaneceu por muito tempo no braço

aberto e teve um elevado número de cruzamentos entre os braços, o CA faz-se imprescindível para trazer evidências de que este comportamento possa ter ocorrido por mecanismos que levaram uma excitabilidade excessiva do animal e não por mecanismos ansiolíticos, de fato. É contabilizado o tempo de permanência no centro, o número de quadrantes explorados e o tempo de permanência nas quinas do aparato, para efeitos de comparação entre os grupos (PRUT; BELZUNG, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo geral revisar a literatura sobre a participação do córtex insular na modulação da ansiedade (primeira parte) e estudar a inibição da via glutamatérgica e sua interação com a neurotransmissão nitrérgica no CI de ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado e ao campo aberto (segunda parte).

3.2 Objetivos específicos

Foram objetivos específicos desta dissertação:

- a) Realizar, revisão da literatura relacionada ao processo de modulação da ansiedade pelo córtex insular produzidas em português ou inglês entre os anos de 2003 e 2021.
- b) Avaliar a participação da neurotransmissão glutamatérgica no CI, sob o comportamento do animal frente ao LCE e ao CA, através da microinjeção local de antagonistas específicos dos receptores NMDA (LY235959) e não NMDA (NBQX).
- c) Avaliar a participação da neurotransmissão nitrérgica no córtex insular, sob no CI, sob o comportamento do animal frente ao LCE e ao CA, através da microinjeção local de um inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase neural (NPLA), um sequestrador de NO (Carboxi-PTIO) e um inibidor específico da formação de guanilato ciclase (ODQ).

4 HIPÓTESE

A inibição dos receptores glutamatérgicos NMDA e não-NMDA, bem como da via NO/GMPc, no córtex insular de ratos, interfere, de alguma forma, no comportamento deste animal frente ao teste do LCE e do CA.

5 JUSTIFICATIVA

A ansiedade é um estado emocional subjetivo de apreensão, acompanhado por alterações fisiológicas, comportamentais e cognitivas, tais como taquicardia, sudorese, tensão muscular, irritabilidade e inquietação, dificuldade de concentração e perturbações do sono. No início do século XX, os transtornos de ansiedade foram reunidos em um conceito vago de neurose, estabelecido por Sigmund Freud, conceito este usado até meados de 1980, quando foi publicado o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, elaborado pela American Psychiatric Association. Em sua última edição, o DSM-V classifica os transtornos de ansiedade em classes nosológicas distintas de acordo com a sintomatologia, decurso temporal e resposta

terapêutica, como: transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de ansiedade social, fobias específicas, transtorno do pânico, transtorno do estresse pós-traumático, transtorno obsessivo-compulsivo, entre outros, alguns deles podendo levar a incapacitância do indivíduo. Evolutivamente, a ansiedade é importante para a sobrevivência, uma vez que nos adverte do perigo e, apesar do seu desconforto, é claramente um estímulo necessário para um ótimo desempenho em muitas situações. A ansiedade pode ser considerada como uma emoção “normal” e um componente adaptativo de respostas de estresse agudo sob circunstâncias que ameaçam a integridade do indivíduo. Entretanto, se a ansiedade é desproporcional em intensidade ou cronicidade, ou não é associada com algum risco real, pode constituir uma má resposta adaptativa ou mesmo um transtorno psiquiátrico. Dessa forma, o estudo dos mecanismos neurais da resposta comportamental à ansiedade é imprescindível para tentar entender a gênese das patologias psiquiátricas ou físicas desencadeadas por ela, levando ao desenvolvimento de novas drogas para o seu tratamento, uma vez que algumas classes utilizadas atualmente, como a classe dos fármacos benzodiazepínicos pode causar diversos efeitos colaterais extremamente complexos, entre eles, a tolerância, a dependência, entre outros.

Apesar da relação entre o CI e a ansiedade estarem bem estabelecidas, a interação dos sistemas glutamatérgico e nitrérgico com este processo emocional ainda não está claramente descrito na literatura, carecendo de estudos que demonstrem os mecanismos neurais envolvidos no processo.

6 MATERIAL E MÉTODOS

Para a parte experimental do trabalho, utilizamos 7 grupos experimentais, submetidos à administração de fármacos anestésicos, antibióticos e analgésicos como procedimento para cirurgia estereotáxica para canulação do córtex insular, excetuando-se apenas o grupo naive que não foi submetido aos procedimentos cirúrgicos e nem a administração de fármacos preparatórios. 5 dias após, estes animais foram submetidos à microinjeção de drogas diretamente no córtex insular através de microinjeções bilaterais, para estudo do bloqueio dos receptores ionotrópicos e das diferentes etapas da via NMDA/NO/GMPc, no córtex insular, durante o teste do LCE e do CA. Após os testes, o corante azul de Evans a 1% foi utilizado para marcar os sítios ativos de injeção e foi realizada eutanásia e retirada dos cérebros para corte no criostato e a produção de lâminas para microscopia e análise posterior. Todo processo foi detalhado minuciosamente nos tópicos a seguir e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA) de acordo com o protocolo 023/21.

Para a parte de revisão de literatura, trata-se de uma pesquisa descritiva do tipo revisão integrativa da literatura, que buscou responder quais as evidências sobre as funções do córtex insular na modulação da ansiedade. A pesquisa foi realizada através do acesso online nas bases de dados National Library of Medicine (PubMed MEDLINE), Scientific Electronic Library Online (SciELO), Cochrane Database of Systematic Reviews (CDSR), Google Scholar, Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) e EBSCO Information Services. Como critérios de inclusão, foram considerados artigos originais, que abordassem o tema pesquisado e permitissem acesso integral ao conteúdo do estudo, publicados no período de 2003 a 2021, em inglês e português. A estratégia de seleção dos artigos seguiu as seguintes etapas: busca nas bases de dados selecionadas; leitura dos títulos de todos os artigos encontrados e exclusão daqueles que não abordavam o assunto; leitura crítica dos resumos dos artigos e leitura na íntegra dos artigos selecionados nas etapas anteriores.

6.1 Animais

Foram utilizados 63 ratos da espécie Wistar, machos, com peso variando entre 280 e 320 gramas, alimentados com ração granulada e água *ad libitum*, mantidos sob as mesmas condições de ciclo claro e escuro 12 horas por 12 horas (sendo luzes acesas às 7:00 horas e apagadas às 19:00 horas) e ambientação, onde ficaram confinados em caixas plásticas durante todo período de experimentação. O manuseio e higienização foi realizado apenas pelo autor. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Lavras.

6.2 Detalhamento dos grupos amostrais

Os 63 animais foram divididos em 7 grupos de 9 animais onde cada grupo passou pelo mesmo procedimento, inclusive pelos protocolos pré e pós cirúrgicos, com exceção do grupo controle.

GRUPO 1 - Naive, sem cirurgia de estereotaxia.

GRUPO 2 - Controle, diluentes das drogas. Líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF) ou dimetilsulfóxido (DMSO).

GRUPO 3 - LY235959, antagonista de receptor de glutamato NMDA (N-metil-D-aspartato).

GRUPO 4 - NBQX, antagonista de receptor de glutamato não-NMDA (N-metil-D-aspartato).

GRUPO 5 - N-propil-l-arginina (NPLA), inibidor específico da nNOs (óxido nítrico sintase neural).

GRUPO 6 - Carboxi-PTIO, sequestrador de NO (óxido nítrico).

GRUPO 7 - ODQ, inibidor específico da formação da guanilato ciclase.

6.3 Técnica de implante de cânulas guias no córtex insular

Cinco dias antes dos experimentos, os animais foram anestesiados para este procedimento cirúrgico com tribromoetanol na dose de 250 mg/ kg, intraperitoneal (i.p.). Após a realização da tricotomia na cabeça, os animais foram imobilizados em um estereotáxico para animais de pequeno porte (Stoelting, Wood Dale, Illinois, USA) e foi injetado 0,3 ml de lidocaína com vasoconstritor, via subcutânea, na cabeça do animal, para anestesia local. Utilizou-se o antisséptico Povidine[®], para assepsia da cabeça e então a calota craniana foi exposta por meio de uma incisão na pele, de aproximadamente 1,5 cm. O periósteo foi afastado e retirado com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 10%. Foi feita a assepsia local com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e algodão. Todas as coordenadas para implantação das cânulas no CI foram determinadas a partir do Atlas de Paxinos & Watson (PAXINOS; WATSON, 1997): ântero-posterior, +3,2 mm em relação ao bregma; lateral, +3,75 mm a partir do bregma; vertical, -4,5 mm em relação ao bregma, com inclinação lateral de 0° e incisivo = -3,3 mm. A perfuração do crânio (incisura) foi feita com auxílio de uma broca odontológica adaptada à uma microrretífica, para a implantação bilateral das cânulas guia no CI e para inserir um pequeno parafuso fixador na calota craniana. Essas cânulas foram feitas a partir de segmentos de agulha hipodérmica com 13 mm de comprimento e 0,55 mm de diâmetro externo, 24G. As cânulas e o parafuso foram fixados ao crânio com resina acrílica autopolimerizável. Mandris com 0,2 mm de diâmetro externo e 13 mm de comprimento foram introduzidos nas cânulas para prevenir

eventuais obstruções durante o período de recuperação pós-cirúrgico dos animais. Como medida profilática, após a cirurgia, os animais receberam 80.000 UI de Pentabiótico Veterinário (Fort Dodge, São Paulo, Brasil) aplicados em 0,3 mL por via intramuscular (i.m.) e 2,5 mg/Kg de analgésico e anti-inflamatório não esteroide Flunixin Meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brasil), por via subcutânea (s.c) (ALVES *et al.*, 2010).

6.4 Descrição dos fármacos utilizados

Foram utilizados os seguintes compostos: aCSF, DMSO, tribromoetanol (SIGMA, EUA), uretana (SIGMA, EUA), LY235959 (TOCRIS, EUA, antagonista de receptores NMDA de glutamato), NBQX (TOCRIS, EUA, antagonista de receptores não-NMDA de glutamato); N-Propil-L-arginina (N-propil, TOCRIS, EUA, inibidor seletivo da nNOS), Carboxi-PTIO (TOCRIS, EUA, sequestrador de NO); ODQ (inibidor específico da formação da guanilato ciclase); Pentabiótico veterinário (Fort Dodge, Campinas, SP, Brasil) e analgésico não-esteroide flunexina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brasil).

6.5 Aplicação dos testes

6.5.1 Labirinto em cruz elevado

O teste foi realizado em um LCE de madeira, elevado 50 cm do solo e formado por dois braços abertos (50 x 10 x 40 cm) que formam uma cruz com dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm). Dez minutos após administrar a droga, cada animal foi colocado por 5 min no LCE, com a face voltada para um dos braços fechados. Foi realizada apenas uma sessão por animal para evitar habituação. Para análise comportamental, a sessão foi filmada por uma câmera digital e analisada com o auxílio do software AnyMaze (Stoelting, EUA). Foram analisados os seguintes parâmetros: o número de entradas nos braços fechados e a porcentagem de entradas e de tempo gasto nos braços abertos do LCE.

6.5.2 Campo aberto

O teste foi realizado numa caixa quadrada de madeira com 60 cm de altura e 60 cm de profundidade demarcada com 16 quadrantes de 15 x 15 cm. Os animais eram colocados no centro após a assepsia do aparato, logo após serem submetidos ao LCE, e permaneceram lá por 5 minutos, sendo realizada uma sessão por animal, que foi filmada por uma câmera digital e analisada posteriormente com auxílio do software AnyMaze (Stoelting, EUA).

6.6 Microinjeção de drogas no córtex insular

A agulha injetora (12 mm, 33 G, SmallParts, Lagos de Miami, FL, EUA) utilizada para microinjeção das drogas no CI, foi confeccionada um milímetro mais longa em relação à cânula guia fixada ao crânio e foi conectada a uma seringa de 2 µl (7002-KH, Hamilton Co., Reno, NV, EUA) através de um tubo de polietileno (PE-10). Após os 10 minutos do registro cardiovascular basal, ainda em sua home cage, a agulha injetora foi inserida na cânula guia para a injeção da droga ou veículo. As drogas foram injetadas nas duas cânulas (uma por vez) em um volume de 100 nL para cada cânula. Após a injeção, foi aguardado 30 segundos e a agulha foi retirada e inserida na segunda cânula guia para microinjeção no CI contralateral. Após a microinjeção e decorrido mais 10 minutos, o animal foi inserido no LCE por 5 minutos e logo em seguida no CA, por mais 5 minutos (ALVES *et al.*, 2013; HAN *et al.*, 2015; ADAMI *et al.*, 2017; BARRETO-DE-SOUZA *et al.*, 2017; GOMES-DE-SOUZA *et al.*, 2020).

6.7 Determinação anatômica dos sítios de injeção de droga no córtex insular

Ao final de cada experimento, cada animal foi anestesiado com uretana ($1,2 \text{ mg/kg}^{-1}$) por via intraperitoneal. Foi injetado 100 nL do corante azul de Evans (1%) por microinjeção, seguindo a canulação do córtex insular, por onde os fármacos foram injetados. Para o procedimento de perfusão, o coração foi exposto por meio de uma incisão na caixa torácica a fim de bloquear a aorta com uso de uma pinça hemostática. A agulha de perfusão foi então introduzida no ventrículo esquerdo. Uma incisão no átrio direito foi feita para dar vazão ao sangue e ao perfusado. Inicialmente, 20ml de solução fisiológica (NaCl 0,9%) foi injetada e logo em seguida injetou-se a solução tamponada de formalina, 10% no ventrículo esquerdo. Com o animal perfundido, utilizou-se de uma guilhotina para a remoção da cabeça e a calota craniana foi aberta para o cérebro retirado que, por sua vez, foi colocado em solução tamponada de formalina a 10% para conservação e fixação. Após 1 semana, os cérebros foram submetidos a cortes coronais com auxílio de um criostato. Uma análise microscópica utilizando o atlas de Paxinos e Watson (1997) como referencial, foi realizada para averiguação dos sítios de injeção.

6.8 Análise estatística

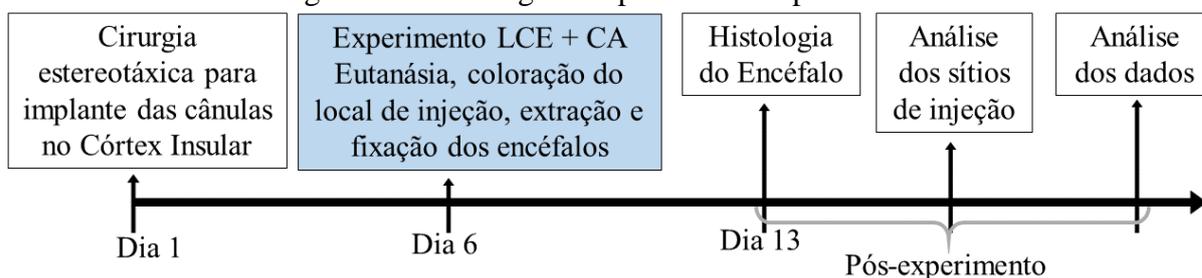
Os dados foram expressos como média \pm EPM. O intervalo de confiança (IC) adotado foi de 95%, o nível de significância (α) foi de 5% e o nível descritivo (p) foi menor ou igual a 0,05. Assim, para a teoria de hipóteses estabelecemos a hipótese nula, de que não há diferenças

estatísticas entre os grupos, se $p > 0,05$ ou a hipótese alternativa, de que há diferenças estatísticas entre os grupos, se $p \leq 0,05$.

Para análise dos dados, utilizou-se o software GraphPad© Prism®. Um conjunto de estatísticas descritivas foi realizado para averiguação dos dados e identificação e exclusão dos outliers. O teste de normalidade de dados Shapiro-Wilk, foi empregado. Como os dados não eram paramétricos, adotou-se o teste H, de Kruskal-Wallis, com post hoc de Dunn, para verificar se houve diferenças entre os animais NAIVE, aCSF e DMSO, uma vez não encontradas diferenças, os animais foram agrupados num único grupo controle para efeito de comparação. O mesmo procedimento foi adotado para comparação entre os grupos (controle vs tratamento farmacológico). Os dados analisados para o LCE foram o número de entradas no braço aberto, tempo de permanência no braço aberto e número de cruzamentos e tempo de permanência no centro. Para o CA foram analisados o tempo de permanência no centro e o tempo de permanência na periferia.

7 DESCRIÇÃO DOS PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Figura 2 - Cronologia dos protocolos experimentais



Legenda – No dia 1, foram realizadas as cirurgias estereotáxicas para implante de cânulas no córtex insular. No sexto dia, ocorreu o experimento de Labirinto em Cruz Elevada seguido Campo Aberto, com a administração das drogas segundo os grupos previamente descritos. Posteriormente ao experimento, os animais foram eutanasiados e os sítios de injeção no córtex insular foram corados e logo em seguida os cérebros foram extraídos, conservados e fixados. Após sete dias foram feitas as lâminas histológicas do encéfalo. Em seguida foram análises dos sítios de injeção no córtex insular.

Fonte: Do Autor (2022).

7.1 Estudo da participação do CI nas respostas comportamentais ao LCE e ao CA

7.1.1 Efeito do tratamento do CI com LY235959, um antagonista de receptor NMDA, sobre as respostas comportamentais durante a exposição ao LCE e ao CA

Estes experimentos tiveram por objetivo verificar o envolvimento de receptores glutamatérgicos no CI na modulação das respostas comportamentais ao LCE e ao CA. Para tanto, foi utilizado o antagonista seletivo de receptores glutamatérgicos NMDA, LY235959 (1nmol/100nL) (FASSINI *et al.*, 2015b; FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2013).

7.1.2 Efeito do tratamento do CI com NBQX, um antagonista de receptor não-NMDA, sobre as respostas comportamentais durante a exposição ao LCE e ao CA

Estes experimentos tiveram por objetivo verificar o envolvimento de receptores glutamatérgicos, no CI, na modulação das respostas comportamentais ao LCE e ao CA. Para tanto, foi utilizado o antagonista seletivo de receptores glutamatérgicos não-NMDA, NBQX (1nmol/100nL) (FASSINI *et al.*, 2015b; FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2013).

7.1.3 Efeito do tratamento do CI com NPLA, um inibidor seletivo da nNOS, sobre as respostas comportamentais durante a exposição ao LCE e ao CA

Estes experimentos tiveram por objetivo verificar o envolvimento da nNOS, no CI, na modulação das respostas comportamentais ao LCE e ao CA. Para tanto, foi utilizado o inibidor

seletivo da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), NPLA (1nmol/100nL) (FASSINI *et al.*, 2015b; FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2013).

7.1.4 Efeito do tratamento do CI com Carboxi-PTIO, um sequestrador de NO, sobre as respostas comportamentais durante a exposição ao LCE e ao CA

Estes experimentos tiveram por objetivo verificar o envolvimento do NO, no CI, na modulação das respostas comportamentais ao LCE e ao CA. Para tanto, foi utilizado o sequestrador de óxido nítrico, Carboxi-PTIO (1nmol/100nL) (FASSINI *et al.*, 2015b; FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2013).

7.1.5 Efeito do tratamento do CI com ODQ, um inibidor específico da formação da guanilato ciclase, sobre as respostas comportamentais durante a exposição ao LCE e ao CA

Estes experimentos tiveram por objetivo verificar o envolvimento da enzima guanilato ciclase, no CI, na modulação das respostas comportamentais ao LCE e ao CA. Para tanto, foi utilizado o inibidor específico da formação desta enzima, ODQ (1nmol/100nL) (FASSINI *et al.*, 2015b; FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2013).

7.1.6 Efeito do tratamento do CI com líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF) e com dimetilsulfóxido (DMSO), sobre as respostas comportamentais durante a exposição ao LCE e ao CA

O aCSF e o DMSO são compostos neutros, conhecido por não interferirem em vias sinápticas importantes para este estudo, utilizados como diluentes para as drogas em questão. Estes experimentos tiveram por objetivo verificar se as respostas comportamentais ao LCE e ao CA sofreram alguma alteração em função do estímulo mecânico da microinjeção, servindo de base comparativa para as drogas em análise (grupo veículo).

7.1.7 Efeito do não - tratamento do CI. sobre as respostas comportamentais durante a exposição ao LCE e ao CA

Estes experimentos tiveram por objetivo delimitar o padrão normal das respostas comportamentais ao LCE e ao CA, pois estes animais não passaram por nenhum procedimento cirúrgico (grupo naive), servindo de base comparativa para as drogas em análise.

A junção do grupo não-tratado (naive) e do grupo veículo (aCFS e DMSO) foi considerada o grupo controle.

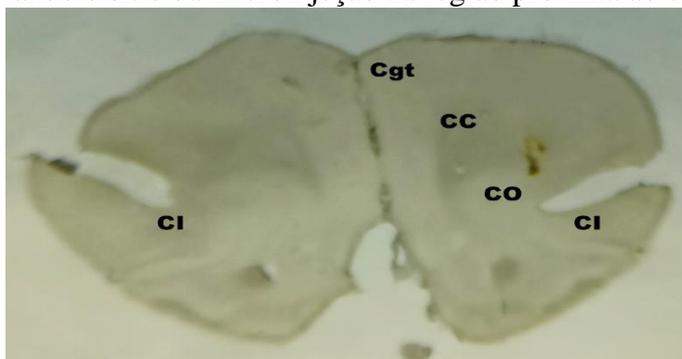
8 RESULTADOS

8.1 Determinação dos sítios de injeção das drogas

Após o corte histológico dos encéfalos foi verificado que as cânulas que foram direcionadas para o CI não estavam posicionadas na área em estudo. Os erros ocorreram tanto na altura das cânulas quanto na porção ântero posterior ao córtex insular, como pode ser observado na fotomicrografia abaixo.

Esses erros podem ocorrer por diversos motivos, entre eles: fixação errônea do animal no estereotáxico; tamanho/peso dos animais; problemas na colocação da cânula guia no mandril do estereotáxico; erros de cálculos para a colocação correta das cânulas no SNC; entre outras. Dessa forma, os resultados descritos abaixo, correspondem aos animais os quais as cânulas direcionadas ao CI estão fora da área. Grande parte dos animais tiveram um erro de aproximadamente entre 1mm e 2mm do CI. Infelizmente não pode se considerar, utilizando-se o volume de injeção de 100nl que a mesma atinja o CI. Dessa forma, como grande parte dos sítios de injeção estavam próximos, entre os animais e levando-se em consideração o volume de espriamento das drogas utilizadas, realizamos uma estatística conjunta de todos os animais as quais as cânulas estavam entre 1 e 2 mm do CI.

Figura 3 – Fotomicrografia representativa de uma secção coronal do cérebro de rato demonstrando o sítio da microinjeção na região próxima ao córtex insular.



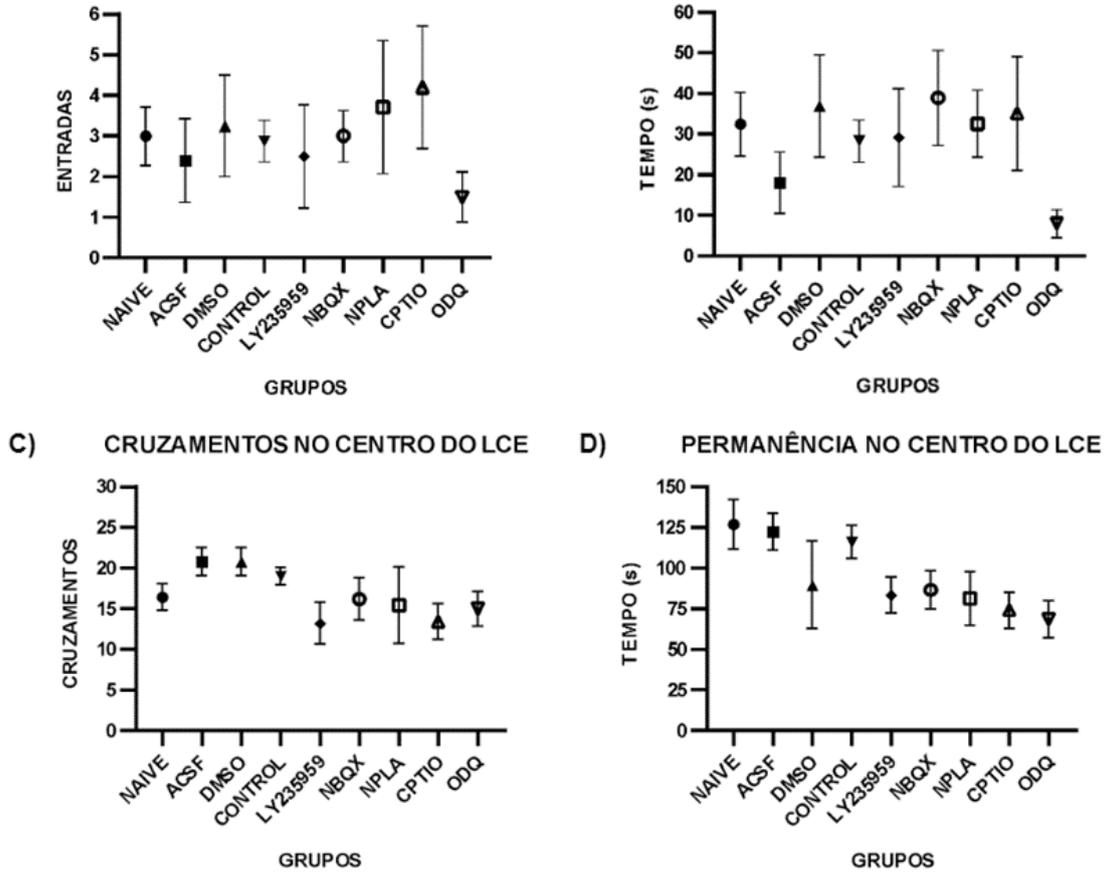
Legenda: córtex cingulado (Cgl), corpo caloso (CC), córtex orbital (CO), córtex insular (CI). Secção coronal representativa da coordenada 4.20 mm em relação ao bregma de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2006).

Fonte: Do autor (2022).

8.2 Apresentação dos resultados estatísticos

Figura 4 – Representação gráfica dos resultados relacionados ao teste do LC

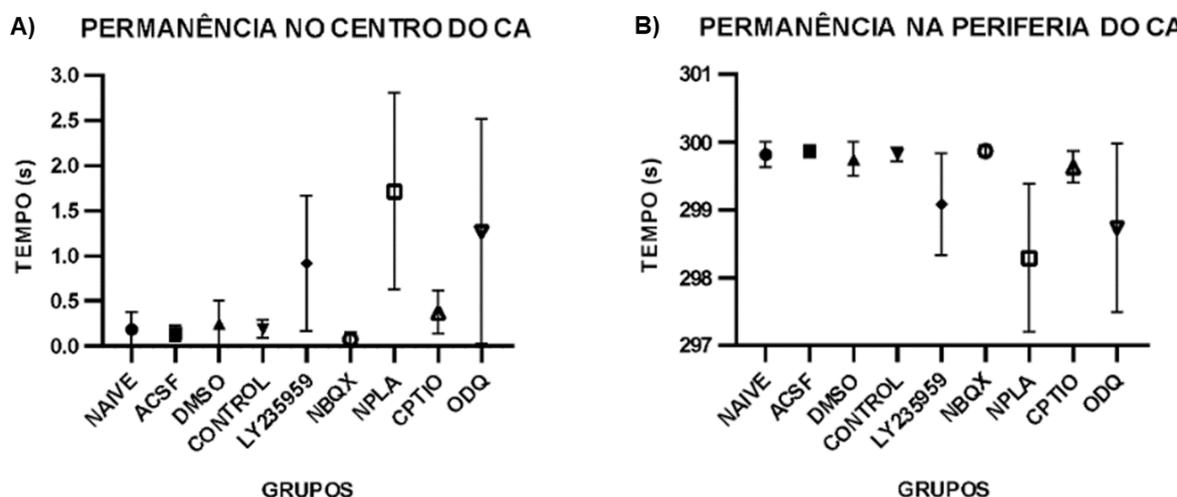
A) ENTRADAS NOS BRAÇOS ABERTOS DO LCE B) PERMANÊNCIA NOS BRAÇOS ABERTOS DO LCE



Legenda: Análise de variância dos dados obtidos no teste do LCE. (A) refere-se ao número de entradas nos braços abertos. (B) refere-se ao tempo de permanência, sem segundos, ainda nos braços abertos do LCE. (C) refere-se ao número completo de cruzamentos pelo centro do LCE. (D) refere-se ao tempo de permanência do animal, em segundos, no centro do labirinto. Dados expressos utilizando-se o erro padrão da média. O tempo total de teste foi de 5 minutos para cada animal.

Fonte: Do autor (2022).

Figura 5 – Representação gráfica dos resultados relacionados ao teste do CA



Legenda: Análise de variância dos dados obtidos no teste do CA. (A) refere-se ao tempo de permanência do animal, em segundos, no centro do aparato. (B), por sua vez, refere-se ao tempo, em segundos, de permanência na região periférica do CA. Dados expressos utilizando-se o erro padrão da média. O tempo total de teste foi de 5 minutos para cada animal.

Fonte: Do autor (2022).

Tabela 1 – Apresentação do comparativo entre os grupos NAIVE, aCSF e DMSO, para formação do grupo controle.

KRUSKAL-WALLIS		
Múltiplas comparações entre os grupos NAIVE, aCSF e DMSO	Valor p	Valor H
Entradas no braço aberto do LCE	0,7012	0,7636
Permanência no braço aberto do LCE	0,3328	2,289
Cruzamentos no centro do LCE	0,1480	3,852
Permanência no centro do LCE	0,4017	0,1923
Permanência na periferia do CA	0,7692	0,4687
Permanência no centro do CA	0,7692	0,4687

Legenda: Análise de variância, de acordo com o teste de Kruskal-Wallis. O objetivo deste teste foi verificar se o procedimento cirúrgico interferiria nos resultados dos testes comportamentais, isolando então a administração de drogas. Nota-se que não houve diferenças estatísticas entre os grupos que fizeram a estereotaxia (aCSF e DMSO) e receberam apenas o veículo de diluição das drogas e o grupo que não realizou procedimento algum (NAIVE).

Fonte: Do autor (2022).

Tabela 2 – Apresentação dos resultados estatísticos do teste de Kruskal-Wallis, para comparativo entre o grupo controle e os grupos tratados.

KRUSKAL-WALLIS		
Múltiplas comparações entre os grupos “controle” e “tratados”	Valor p	Valor H
Entradas no braço aberto do LCE	0,5005	4,348
Permanência no braço aberto do LCE	0,3647	5,439
Cruzamentos no centro do LCE	0,1449	8,212
Permanência no centro do LCE	0,0808	9,809
Permanência na periferia do CA	0,5742	3,83
Permanência no centro do CA	0,5868	3,744

Legenda: Grupo controle: (NAIVE, aCSF e DMSO). Grupo drogas: (LY235959, NBQX, NPLA, CARBOXI-PTIO e ODQ). Análise de variância, de acordo com o teste de Kruskal-Wallis. Para a hipótese de nulidade ser rejeitada, seria necessário um nível descritivo (p) menor ou igual a 0,05, para um intervalo de confiança de 95%. O valor H refere-se à diferença do total das ordenações feitas pelo teste. É um parâmetro a ser considerado quando rejeitamos a hipótese nula.

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificação da normalidade, onde confirmamos que os dados não eram paramétricos. O comparativo entre os grupos NAIVE, aCSF e DMSO, verificado pelo teste de Kruskal-Wallis, também não revelou diferença entre os grupos, em nenhum dos testes, conforme observamos na tabela 1. Logo, consideramos como grupo controle a junção destes três grupos (NAIVE, aCSF e DMSO), uma vez que ambos revelam o comportamento do animal isento de drogas.

A análise da tabela 2 nos permite concluir que, para este intervalo de confiança (IC = 95%), nível de significância ($\alpha = 5\%$) e nível descritivo ($p \leq 0,05$), devemos aceitar a hipótese de nulidade onde concluímos que não há diferença estatística significativa entre os grupos. Mesmo ao utilizarmos o post hoc de Dunn, não encontramos nenhuma diferença entre nenhum dos grupos. Ou seja, não é possível afirmar estatisticamente que as drogas em questão modificaram o comportamento dos animais aos testes do LCE e do CA. Entretanto, ao analisarmos cuidadosamente os gráficos, encontramos valores discrepantes para o grupo ODQ, inibidor seletivo da enzima guanilato-ciclase solúvel, no teste do LCE (figura 4 A e B), bem como para os grupos LY235959 que é um antagonista dos receptores NMDA, NPLA que é inibidor seletivo da iNOS e ODQ inibidor seletivo da guanilato-ciclase solúvel, no teste do CA

(figura 5 A e B), observamos uma discrepância que pode ser atribuída ao uso do erro padrão da média ao invés do uso do desvio padrão.

Tabela 3 – Valores máximos, médios e mínimos referente ao número de entradas no braço aberto do LCE.

Grupos	ENTRADAS NO BRAÇO ABERTO DO LCE							
	NAIVE	ACSF	DMSO	LY235959	NBQX	NPLA	CPTIO	ODQ
Número amostral (n)	7	6	4	10	10	6	10	6
Valor mínimo	1	0	0	0	0	0	0	0
Mediana	3	2	3,5	1	3	2	3,5	1,5
Valor máximo	7	6	6	13	7	12	16	4

Legenda: Observa-se grande discrepância entre valor máximo e mínimo, no mesmo grupo, para os grupos LY235959 (diferença = 13), NPLA (diferença = 12) e carboxi-PTIO (diferença = 16). Observação: Diferença calculada como valor máximo menos o valor mínimo (Dif = Vmax – Vmin).

Fonte: Do autor (2022).

Tabela 4 – Valores máximos, médios e mínimos referente ao tempo de permanência no braço aberto do LCE.

Grupos	TEMPO DE PERMANÊNCIA NO BRAÇO ABERTO DO LCE							
	NAIVE	ACSF	DMSO	LY235959	NBQX	NPLA	CPTIO	ODQ
Número amostral (n)	7	6	4	10	10	6	10	6
Valor mínimo (s)	1,5	0	0	0	0	0	0	0
Mediana (s)	32,2	15,4	45,65	14,55	27,4	38,6	19,9	6,95
Valor máximo (s)	58,6	48,4	56,7	96,6	106,4	53,5	141,7	21,3

Legenda: O tempo foi cronometrado em segundos (s). Nota-se discrepância entre as medianas de todos grupos tratados e não tratados, onde a droga ODQ obteve o valor mais discrepante.

Fonte: Do autor (2022).

Tabela 5 – Valores máximos, médios e mínimos referente ao número de cruzamentos no LCE.

Grupos	NÚMERO DE CRUZAMENTOS NO LCE							
	NAIVE	ACSF	DMSO	LY235959	NBQX	NPLA	CPTIO	ODQ
Número amostral (n)	7	6	4	10	10	6	10	6
Valor mínimo	7	15	15	3	8	1	6	8
Mediana	18	22	22	11	15	10	14	15
Valor máximo	20	25	25	27	33	35	29	23

Legenda: Observa-se grande discrepância entre máximo e mínimo, no mesmo grupo, para os grupos LY235959 (diferença = 24), NBQX (diferença = 25) e NPLA (diferença = 34). Observação: Diferença calculada como valor máximo menos o valor mínimo.

Fonte: Do autor (2022)

Tabela 6 – Valores máximos, médios e mínimos referente ao tempo de permanência no centro do LCE.

TEMPO DE PERMANÊNCIA NO CENTRO DO LCE								
Grupos	NAIVE	ACSF	DMSO	LY235959	NBQX	NPLA	CPTIO	ODQ
Número amostral (n)	7	6	4	10	10	6	10	6
Valor mínimo (s)	41,6	89,4	16,7	50,4	30,7	26,8	43,3	14,4
Mediana	133,5	128,8	105,3	81,1	88,35	82,6	62,85	78,75
Valor máximo (s)	162,8	152,1	131,1	140,2	140,3	152,4	144,2	89,2

Legenda: O tempo foi cronometrado em segundos (s). Nota-se grande discrepância entre as medianas dos grupos tratados em relação aos grupos não tratados, em especial a droga carboxi-PTIO (CPTIO).

Fonte: Do autor (2022).

Tabela 7 – Valores máximos, médios e mínimos referente ao tempo de permanência na periferia do CA.

TEMPO DE PERMANÊNCIA NA PERIFERIA DO CA								
Grupos	NAIVE	ACSF	DMSO	LY235959	NBQX	NPLA	CPTIO	ODQ
Número amostral (n)	7	6	4	10	10	6	10	6
Valor mínimo (s)	298,7	299,6	299	295,4	299,2	292	297,6	292,5
Mediana	300	300	300	300	300	299,6	300	300
Valor máximo (s)	300	300	300	300	300	300	300	300

Legenda: O tempo foi cronometrado em segundos (s). Nota-se valores pouco discrepantes entre máximo e mínimo tempo, no mesmo grupo, para os grupos LY235959, NPLA e ODQ.

Fonte: Do autor (2022).

Tabela 8 – Valores máximos, médios e mínimos referente ao tempo de permanência no centro do CA.

TEMPO DE PERMANÊNCIA NO CENTRO DO CA								
Grupos	NAIVE	ACSF	DMSO	LY235959	NBQX	NPLA	CPTIO	ODQ
Número amostral (n)	7	6	4	10	10	6	10	6
Valor mínimo (s)	0	0	0	0	0	0	0	0
Mediana	0	0	0	0	0	0,4	0	0
Valor máximo (s)	1,3	0,4	1	4,6	0,3	8	2,4	7,5

Legenda: O tempo foi cronometrado em segundos (s). Nota-se valores pouco discrepantes entre máximo e mínimo tempo, no mesmo grupo, para os grupos LY235959, NPLA e ODQ.

Fonte: Do autor (2022).

9 DISCUSSÃO

O presente estudo teve o objetivo de revisar a literatura sobre a participação do córtex insular na modulação da ansiedade, em ratos. Além disso, investigamos o papel da via NMDA/NO/GMPc em regiões próximas ao CI, na modulação da ansiedade.

Alguns modelos animais de ansiedade evocam, pela simples exposição do animal a um novo ambiente ou estímulo, comportamentos defensivos ou de medo, análogos a manifestações ansiosas em indivíduos com transtornos de ansiedade. Por exemplo, animais expostos ao labirinto em cruz elevado apresentam um comportamento denominado de avaliação de risco (“risk assessment”), o que pode ser relacionado à hipervigilância, apresentada por indivíduos ansiosos (BLANCHARD *et al.*, 2001). A avaliação de risco representa uma antecipação de um perigo potencial, sendo um comportamento defensivo de grande valor adaptativo. Ainda assim, indivíduos ansiosos parecem mais frequentemente tentar antecipar tal ameaça, no intuito de lidar melhor com isto, o que acaba por trazer prejuízos para os mesmos.

A descoberta do primeiro benzodiazepínico (clordiazepóxido), que apresentava grande eficácia em termos ansiolíticos, abriu uma nova área na pesquisa da ansiedade. A partir de então, os modelos animais puderam ter uma validação farmacológica mais fidedigna. Estes modelos foram desenvolvidos com dois objetivos principais: primeiro para se avaliar os efeitos ansiolítico ou ansiogênico de determinados compostos e, uma vez discriminadas suas propriedades, identificar seus mecanismos de ação; e para o estudo da neurobiologia da ansiedade (FILE *et al.*, 1993, RODGERS, 1992, RODGERS *et al.*, 1997). Para um teste comportamental ser validado como um modelo animal, é necessário que permita quantificar respostas que variem de maneira previsível, pela ação de drogas com reconhecidas propriedades ansiolítica ou ansiogênica em humanos (RAMOS *et al.*, 1998).

Outro ponto importante abordado por diversos autores (BELZUNG *et al.*, 2001, FILE *et al.*, 1993, RODGERS, 1992, RODGERS *et al.*, 1997, LISTER, 1990), é a distinção entre ansiedade estado (state anxiety) e ansiedade traço (trait anxiety). A ansiedade estado é aquele estado relativo a experiências subjetivas num determinado momento e é aumentado pela presença de um estímulo ansiogênico. Ansiedade traço, por sua vez, não varia de momento a momento, sendo um quadro persistente e durável, refletindo a maneira como o indivíduo interage com o ambiente (LISTER, 1990). A maioria das pesquisas em farmacologia comportamental têm abordado mudanças droga-induzidas na ansiedade estado, onde o animal é confrontado com uma situação ansiogênica e o efeito da droga em questão é examinado (LISTER, 1990).

Os modelos usualmente utilizados na avaliação de propriedades ansiolíticas de drogas incluem tanto os que confrontam roedores com novos ambientes ou os que envolvem o uso de estímulos nocivos como choque elétrico ou drogas ansiogênicas (BELZUNG e LE PAPE, 1994). No entanto, vários dos procedimentos envolvidos nestes modelos podem interferir com o comportamento exibido pelo animal, sem necessariamente refletir uma ação ansiolítica dos compostos (BELZUNG e LE PAPE, 1994). Por exemplo, drogas analgésicas poderiam falsear resultados ansiolíticos em modelos que envolvem choque nas patas. Fato é que parece haver um enfoque e preferência nos testes que se baseiam na exposição do animal a um ambiente novo, o que por sua vez provoca reação de medo e diminuição do comportamento exploratório (BELZUNG e LE PAPE, 1994). Como exemplo destes últimos, podemos citar o Labirinto em Cruz Elevado (LCE); o Campo Aberto (CA) e a Caixa de Movimentação Espontânea (CME). Além disto, em tais situações, compostos ansiolíticos aumentam o comportamento exploratório, o que sugere que a “novidade” possa servir como um estímulo ansiogênico. O Labirinto em Cruz Elevado e o Campo Aberto têm sido considerados modelos experimentais de ansiedade de estado (“state anxiety”), envolvendo respostas defensivas não condicionadas como fuga, congelamento ou esquiva. A caixa de movimentação espontânea, tem sido considerado um modelo experimental que mede atividade locomotora/exploratória.

O LCE é um dos modelos mais largamente utilizados na pesquisa da ansiedade em ratos e camundongos é o labirinto em cruz elevado, que é baseado em respostas incondicionadas a ambientes potencialmente perigosos. Derivou do trabalho de Montgomery (1955) e a premissa básica é que ambientes novos evocam curiosidade e medo, criando desta forma, um típico conflito de aproximação/esquiva. Montgomery constatou ainda que ratos apresentavam alto grau de exploração de espaços fechados em comparação aos abertos e numa chance de escolha como num labirinto em Y, preferiam consistentemente os braços fechados (RODGERS, 1992, RODGERS *et al.*, 1997, RAMOS *et al.*, 1998). Em seu estudo, Montgomery interpretou a aversão aos braços abertos como sendo gerada pela neofobia (“medo da novidade”, que induziria aversão e curiosidade) e pela elevação do braço aberto.

Os estudos iniciais com o LCE foram realizados por Handley e Mithani (HANDLEY e MITHANI, 1984) quando investigavam uma variedade de agonistas e antagonistas alfa-adrenérgicos. O aparelho situava-se 70 cm acima do solo e apresentava dois braços fechados, de face um para o outro, e dois braços abertos, também perpendiculares, cada qual medindo 45x 10 cm. Os braços fechados também apresentavam paredes laterais com 10 cm de altura. Os autores constataram que ansiolíticos como o Diazepam aumentavam a proporção entre entradas nos braços abertos e o total de entradas, ao passo que agentes ansiogênicos como a picrotoxina

diminuíam esta proporção, concluindo, portanto, que o Labirinto em Cruz Elevado seria um modelo válido de comportamento motivado pelo medo (HANDLEY e MITHANI, 1984).

Apesar da premissa inicial associando a aversão dos braços abertos à altura, observou-se posteriormente que a tigmotaxia é um importante fator para a aversão gerada pelos braços abertos no LCE (TREIT *et al.*, 1993). A tigmotaxia refere-se à tendência de roedores de se esquivarem de áreas abertas, desconhecidas e potencialmente perigosas. Acredita-se que pertença a uma categoria de reações ao medo, filogeneticamente determinadas (CHOLERIS *et al.*, 2001)

Posteriormente, Lister (1987) validou o modelo para camundongos. Os índices primários de ansiedade no labirinto em cruz elevado eram a frequência de entradas e o total de tempo gasto nos braços abertos. O número de entradas (total de entradas = número de entradas no aberto + número de entradas no fechado) sendo considerado como índice de atividade locomotora (RODGERS *et al.*, 1995, RODGERS, 1992). Alguns autores propuseram que a sensibilidade, confiabilidade e validade etológica de um teste melhorariam se a atenção do pesquisador fosse voltada para o que os animais fazem de fato no labirinto e não apenas para os itens primários (GOWER *et al.*, 1992, RODGERS, 1991; RODGERS *et al.*, 1992, RODGERS, 1994). Assim, novas medidas foram incorporadas na avaliação comportamental do modelo, a saber (RODGERS *et al.*, 1995, RODGERS *et al.*, 1992): congelamento (freezing), defecação, rearing (comportamento exploratório em que o animal estende acima seu corpo e patas dianteiras, apoiado sobre as traseiras), espreitas (stretched attend postures - postura em que o animal se estende cautelosamente adiante, sem, no entanto, retirar do lugar suas patas traseiras, voltando em seguida, à mesma posição), retornos aos braços fechados, grooming (autolimpeza) e head dippings (movimentos exploratórios de cabeça e ombro abaixo do chão dos braços abertos) (RODGERS *et al.*, 1995, RODGERS, 1992).

O CA, por sua vez, foi desenvolvido por Hall (1934) para o estudo da emocionalidade em ratos. O aparelho original consiste de uma arena circular bem iluminada com aproximadamente 1,2 m de diâmetro, circundada por uma parede circular de 0,45 m de altura. Normalmente o procedimento consiste em confrontar o animal com a novidade do ambiente e observar comportamentos como locomoção (número de linhas cruzadas no chão da arena pelo animal), frequência de rearings, tempo de autolimpeza (grooming), defecação, tempo gasto para deixar a área central. Os roedores parecem preferir a periferia ao centro do aparelho, normalmente ambulando em contato com as paredes, ou seja, apresentam tigmotaxia (RAMOS *et al.*, 1998, LISTER, 1990, PRUT *et al.*, 2003, CAROLA *et al.*, 2002). Portanto, assim como no LCE, a tigmotaxia estaria relacionada com a ansiedade no CA (CHOLERIS *et al.*, 2001).

Inicialmente, Hall propôs que quando expostos a um ambiente novo, os roedores apresentariam um grau alto de defecação causado por ativação do sistema nervoso autônomo (RODGERS *et al.*, 1997, LISTER, 1990, PRUT *et al.*, 2003, RAMOS *et al.*, 1998), sendo que inicialmente se propunha que um baixo grau de ambulação também parecia uma resposta de medo dos animais expostos a um ambiente novo. O termo emocionalidade foi utilizado por Hall para expressar o fato do animal ficar, por exemplo, imóvel quando exposto a um ambiente novo (LISTER, 1990). Nesta linha, vários estudos mostraram uma correlação inversa (negativa) entre ambulação e defecação (CAROLA *et al.*, 2002). Outros autores, entretanto, discordam, já que vários estudos mostraram decréscimo tanto na ambulação quanto na defecação e não uma correlação inversa (RAMOS *et al.*, 1998). Se por outro lado, atividade motora fosse um índice de ansiedade, alta ambulação deveria refletir um baixo grau. Certos benzodiazepínicos, em baixas doses, aumentam a ambulação de animais não familiares com a arena, contudo, da mesma forma como fazem estimulantes motores, que não são ansiolíticos (LISTER, 1990).

Tem sido proposto o emprego deste modelo na avaliação da ansiedade, considerando-se que um aumento na ambulação da animal e maior permanência do mesmo na região central seriam indicativos de uma redução da ansiedade (LISTER, 1990, CHOLERIS *et al.*, 2001). Entretanto, esta proposta tem sido criticada por alguns autores, principalmente pelo fato de as medidas avaliadas poderem ser influenciadas por vários fatores outros além da própria ansiedade, como atividade locomotora e exploração. A novidade de uma primeira exposição pode gerar imobilidade ou extrema locomoção na periferia do aparelho (FILE, 2001, HOLMES *et al.*, 1998).

Estudos envolvendo cirurgia de estereotaxia para canulação de áreas encefálicas requerem extrema destreza, treinamento e assiduidade. Embora essa técnica esteja consolidada no campo da pesquisa, em conjunto com as micro injeções, muitas variáveis interferem diretamente nos resultados destes estudos. Peso do animal, posicionamento no estereotáxico, problemas mecânicos com o aparato cirúrgico, imprevisibilidade da ação do anestésico, entupimento da cânula já colocada no SNC, em si são pontos que dificultam a precisão e a garantia dos resultados. Além disso, certas intercorrências como a confirmação do sítio de injeção, só são obtidos na etapa final da técnica, quando os cortes histológicos já foram feitos e as lâminas microscópicas são analisadas. Estudos envolvendo comportamento carecem de um número amostral maior, uma vez que o animal pode apresentar naturalmente padrões comportamentais variáveis e assim, outliers precisam ser excluídos da amostra em questão.

Assim, ao considerarmos os pressupostos, história, validação e divergências, podemos inferir alguns pontos de observação baseados em análise estatística descritiva.

A tabela 3 nos evidencia uma discrepância de alguns grupos tratados em relação ao número de entradas nos braços abertos. Estes dados sugerem que há uma quebra de padrão no comportamento de alguns animais. O grupo LY235959 apresentou uma diferença entre o número máximo e mínimo de entradas no braço aberto do LCE de 13, ou seja, um animal não entrou nenhuma vez enquanto outro entrou 13 vezes. O mesmo ocorre nos grupos NPLA, e carboxi-PTIO, que apresentaram respectivamente diferenças de 12 e de 16. Ou seja, há animais nestes grupos que se comportaram de forma ansiolítica, mas este fato não pode ser evidenciado como uma diferença estatística uma vez que foram exceções ao grupo. Tal fato pode ser explicado se considerarmos a possibilidade da existência de problemas nos procedimentos experimentais. Talvez problemas com a injetora ou mesmo problemas em relação ao procedimento de canulação tenham gerado dados discrepantes. Fato semelhante ocorre ao observarmos a tabela 5, que considera o número de cruzamentos no LCE onde, para os grupos LY235959, NBQX e NPLA, houve uma diferença de 24, 25 e 34, respectivamente. Ou seja, nos grupos onde os receptores do glutamato foram antagonizados ou a iNOS foi inibida, impedindo a produção de óxido nítrico, alguns animais parecem ter se comportado de forma ansiolítica. Fato corrobora com os achados de Méndez-Ruette e colaboradores, onde antagonizou-se os receptores não-NMDA no CI e observou-se comportamento ansiolítico em ratos (MÉNDEZ-RUETTE *et al.*, 2019b).

Na tabela 4, que trata do tempo de permanência no LCE, ao entendermos que dados não paramétricos tem a mediana como medida de tendência central mais fidedigna, uma vez que a mesma é estabelecida pelo valor central de uma reorganização dos dados em ordem crescente, observamos que o grupo ODQ apresenta uma mediana substancialmente inferior aos demais grupos, sendo o grupo que menos tempo permaneceu nos braços abertos do LCE. Sendo ODQ um inibidor específico para a formação da sGC, que é o receptor do NO, poderíamos inferir que este NO não se ligou ao seu receptor e não liberou a cascata de segundos mensageiros e, por sua vez, se concentrou nas regiões pós-sinápticas ou acabou retornando pelo terminal pré-sináptico, aumentando a liberação de glutamato, conforme mecanismo descrito por Garthwaite (GARTHWAITE, 2019). Fato é sugestivo de que o glutamato aumenta a atividade ansiogênica, fazendo com que os animais deste grupo reduzissem seu tempo de permanência no braço aberto. Infelizmente o número amostral foi pequeno devido a perdas durante o procedimento cirúrgico, além dos problemas já relatados em relação à injetora, tornando a estatística dúbia para este nível de confiança. Algo semelhante é observado na tabela 6, que trata do número de

cruzamentos no LCE, onde há discrepância entre as medianas dos grupos tratados (menores medianas) em relação aos grupos não tratados (maiores medianas). Fato é sugestivo de que os animais que cruzaram o LCE menos vezes, exploraram menos o LCE, ou por permanecerem mais tempo nos braços abertos ou por permanecerem menos tempo nos braços abertos. Assim, ao analisarmos a tabela 4, que verifica o tempo de permanência nos braços abertos, onde observamos que o grupo ODQ possui a menor mediana e o menor valor máximo, sendo discrepante dos demais, sugerindo que ao sequestrarmos a sGC, o animal tende ao braço fechado e tende também a não explorar o LCE, reduzindo seu tempo de permanência no braço aberto e também o número de cruzamentos, corroborando, mais uma vez, com os achados de Garthwaite, uma vez que aumentando a retroalimentação de NO, há maior liberação do glutamato sugerindo que o mesmo pode estar relacionado a ansiogênese.

As tabelas 7 e 8, que se referem respectivamente ao tempo de permanência na periferia e no centro do CA, não demonstraram padrões anormais de comportamento.

Estudos relacionando o CI e a ansiedade ainda são raros. Paulus e colaboradores sugeriram que o CI está associado à interocepção e a sensações de perigo ou ameaça, desempenhando um papel crucial na ansiedade (PAULUS; STEIN, 2006). Num estudo recente de Mendez-Ruette e colaboradores, demonstrou-se que o CI apresenta diferentes comportamentos de acordo com sua região. Na parte agranular rostro-caudal e gustatória, o antagonismo dos receptores AMPA culminou num comportamento ansiolítico. Já as regiões interoceptiva posterior primária e rostral, não apresentaram diferenças comportamentais ao antagonismo do receptor AMPA (MÉNDEZ-RUETTE *et al.*, 2019b). Assim, pode ser que as coordenadas para canulação utilizadas neste estudo tenham afetado áreas mais posteriores do CI, onde efeitos não foram observados de forma estatisticamente significativa.

O presente estudo visou investigar a relação entre a ansiedade e os receptores ionotrópicos do glutamato, bem como da via NO/GMPc, desencadeada pela ativação do receptor NMDA, no CI. Na análise descritiva, encontramos fundamentos sugestivos de que há envolvimento desses receptores na neuromodulação da ansiedade em ratos, entretanto, os testes estatísticos não evidenciaram significância para este envolvimento. Uma recondução deste estudo, com um número amostral maior e diferentes coordenadas para diferentes regiões do CI, faz-se necessário para resultados mais conclusivos.

10 CONCLUSÃO

O córtex insular está envolvido no processamento de dados sensoriais viscerais, motores viscerais, vestibulares, atenção, dor, emoção, informações verbais, motoras, entradas relacionadas à música e alimentação, além de dados gustativos, olfativos, visuais, auditivos e táteis. Dados recentes de neuroimagem, revelaram que o córtex insular estava envolvido em várias doenças neuropsiquiátricas, como transtornos de humor e ansiedade generalizada. Conforme os pesquisadores, a ínsula recebe informações de outras partes do corpo e, acredita-se, ajuda a traduzir esses sinais em impulsos que podem ser sentidos subjetivamente, como a fome, a dor ou a ânsia.

Não há indícios estatísticos de que o antagonismo dos receptores ionotrópicos do glutamato, bem como a inibição da iNOS, o sequestro do NO e a inibição da sGC, em regiões próximas ao córtex insular de ratos submetidos ao teste do LCE e do CA, culmine em diferenças comportamentais significativas, quando comparados ao grupo controle.

REFERÊNCIAS

- ALVES, F. H. F. *et al.* Bed nucleus of the stria terminalis N-methyl-D-aspartate receptors and nitric oxide modulate the baroreflex cardiac component in unanesthetized rats. *Journal of Neuroscience Research*, v. 8. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, n. 7, p. 1703–1711, 2009.
- 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, 2013a.
- 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, 2013b.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. Washington, DC: American Psychiatric Association, 2013.
- ANDERSON, D. J.; ADOLPHS, R. A framework for studying emotions across species. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 187–200, 2014.
- BAXTER, A. J. *et al.* Global prevalence of anxiety disorders: A systematic review and meta-regression. **Psychological Medicine**, v. 43, n. 5, p. 897–910, 2013.
- BELZUNG, C.; GRIEBEL, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. **Behavioural Brain Research**, v. 125, n. 1–2, p. 141–149, nov. 2001.
- BELZUNG, C.; LE PAPE, G. Comparison of different behavioral test situations used in psychopharmacology for measurement of anxiety. **Physiology & Behavior**, v. 56, n. 3, p. 623–628, set. 1994.
- BENARROCH, E. E. Insular cortex: Functional complexity and clinical correlations. **Neurology**, v. 93, n. 21, p. 932–938, 2019.
- BIGGIO, G.; GUIDOTTI, A. Climbing fiber activation and 3',5'-cyclic guanosine monophosphate (GMPc) content in cortex and deep nuclei of cerebellum. **Brain Research**, v. 107, n. 2, p. 365–373, maio 1976a.
- BIGGIO, G.; GUIDOTTI, A. Climbing fiber activation and 3',5'-cyclic guanosine monophosphate (GMPc) content in cortex and deep nuclei of cerebellum. **Brain Research**, v. 107, n. 2, p. 365–373, maio 1976b.
- BLANCHARD, D. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 3, p. 205–218, maio 2001.
- BOERNGEN-LACERDA, R.; SOUZA-FORMIGONI, M. L. O. Does the increase in locomotion induced by ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties? **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 67, n. 2, p. 225–232, out. 2000.
- BREDT, D. S. *et al.* Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. **Nature**, v. 351, n. 6329, p. 714–718, jun. 1991.

CAMPOS, A. C. *et al.* Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, n. SUPPL.2, 2013.

CAROLA, V. *et al.* Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. **Behavioural Brain Research**, v. 134, n. 1–2, p. 49–57, ago. 2002.

CATANI, M.; DELL'ACQUA, F.; THIEBAUT DE SCHOTTEN, M. A revised limbic system model for memory, emotion and behaviour. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 8, p. 1724–1737, 2013.

CHACHLAKI, K.; PREVOT, V. Nitric oxide signalling in the brain and its control of bodily functions. **British Journal of Pharmacology**, n. July, p. 1–22, 2019.

CHANG, L. J. *et al.* A sensitive and specific neural signature for picture-induced negative affect. **PLoS Biology**, v. 13, n. 6, p. 1–28, 2015.

CHARLSON, F. *et al.* New WHO prevalence estimates of mental disorders in conflict settings: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, v. 394, n. 10194, p. 240–248, 2019.

CHOW, Y. K. *et al.* Limbic brain structures and burnout—A systematic review. **Advances in Medical Sciences**, v. 63, n. 1, p. 192–198, 2018.

COLE JC, RODGERS RJ. An ethological analysis of the effects of chlordiazepoxide and bretazenil (Ro 16-6028) in the murine elevated plus-maze. **Behav Pharmacol.** 1993 Dec;4(6):573-580. PMID: 11224226.

CRASKE, M. G. *et al.* What is an anxiety disorder? **Depression and Anxiety**, v. 26, n. 12, p. 1066–1085, 2009.

CRASKE, M. G. *et al.* Anxiety disorders. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. May, 2017.

CRASKE, M. G.; STEIN, M. B. Anxiety. **The Lancet**, v. 388, n. 10063, p. 3048–3059, 2016.

DALVI, A.; RODGERS, R. J. GABAergic influences on plus-maze behaviour in mice. **Psychopharmacology**, v. 128, n. 4, p. 380–397, 6 dez. 1996.

DAMSA, C.; KOSEL, M.; MOUSSALLY, J. Current status of brain imaging in anxiety disorders. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 22, n. 1, p. 96–110, 2009.

DAVIS, M. *et al.* Phasic vs sustained fear in rats and humans: Role of the extended amygdala in fear vs anxiety. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 105–135, 2010.

DAVIS, M.; WHALEN, P. J. The amygdala: Vigilance and emotion. **Molecular Psychiatry**, v. 6, n. 1, p. 13–34, 2001.

DELGADO, M. R. *et al.* Neural Circuitry Underlying the Regulation of Conditioned Fear and Its Relation to Extinction. **Neuron**, v. 59, n. 5, p. 829–838, 2008.

DENNIS, E. L. *et al.* Anxiety Modulates Insula Recruitment in Resting-State Functional Magnetic Resonance Imaging in Youth and Adults. **Brain Connectivity**, v. 1, n. 3, p. 245–254, 2011.

DORI, I. *et al.* Proportion of glutamate- and aspartate-immunoreactive neurons in the efferent pathways of the rat visual cortex varies according to the target. **Journal of Comparative Neurology**, v. 319, n. 2, p. 191–204, 1992.

DUIITS, P. *et al.* Updated meta-analysis of classical fear conditioning in the anxiety disorders. **Depression and Anxiety**, v. 32, n. 4, p. 239–253, 2015.

DUNSMOOR, J. E.; PAZ, R. Fear Generalization and Anxiety: Behavioral and Neural Mechanisms. **Biological Psychiatry**, v. 78, n. 5, p. 336–343, 2015.

ESPLUGUES, J. V. NO as a signalling molecule in the nervous system. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, n. 5, p. 1079–1095, 2002.

FERNANDES, C. *et al.* Factor Analysis Shows That Female Rat Behaviour Is Characterized Primarily by Activity, Male Rats Are Driven by Sex and Anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 64, n. 4, p. 731–736, dez. 1999.

FERNÁNDEZ-GUASTI, A.; LÓPEZ-RUBALCAVA, C. Modification of the Anxiolytic Action of 5-HT_{1A} Compounds by GABA–Benzodiazepine Agents in Rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 60, n. 1, p. 27–32, maio 1998.

FERRENDELLI, J. A.; CHANG, M. M.; KINSCHERF, D. A. ELEVATION OF CYCLIC GMP LEVELS IN CENTRAL NERVOUS SYSTEM BY EXCITATORY AND INHIBITORY AMINO ACIDS. **Journal of Neurochemistry**, v. 22, n. 4, p. 535–540, abr. 1974.

FILE, S. E. *et al.* Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? **Psychopharmacology**, v. 111, n. 4, p. 491–494, jul. 1993.

FILE, S. E. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. **Behavioural Brain Research**, v. 125, n. 1–2, p. 151–157, nov. 2001.

FLECK, M. W. *et al.* Aspartate and glutamate mediate excitatory synaptic transmission in area CA1 of the hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v. 13, n. 9, p. 3944–3955, 1993.

GARRY, P. S. *et al.* The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment - From bench to bedside. **Experimental Neurology**, v. 263, p. 235–243, 2015.

GARTHWAITE, J. From synaptically localized to volume transmission by nitric oxide. **Journal of Physiology**, v. 594, n. 1, p. 9–18, 2016.

GARTHWAITE, J. **NO as a multimodal transmitter in the brain: discovery and current status.** **British Journal of Pharmacology** John Wiley and Sons Inc., , 1 jan. 2019.

GARTHWAITE, J.; CHARLES, S. L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggest role as a intracellular messenger in the brain. **Nature Neuroscience**, 1988.

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

GRIEBEL, G. *et al.* Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. **Psychopharmacology**, v. 148, n. 2, p. 164–170, 4 fev. 2000.

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

GOODWIN, G. M. The overlap between anxiety, depression, and obsessive-compulsive disorder. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 249–260, 2015.

GRAEFF, F. G. Ansiedade, pânico e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29, n. suppl 1, p. s3–s6, 2007.

HANSEN, K. B. *et al.* Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. **Journal of General Physiology**, v. 150, n. 8, p. 1081–1105, 2018.

HANSEN, S. L.; SPERLING, B. B.; SÁNCHEZ, C. Anticonvulsant and antiepileptogenic effects of GABAA receptor ligands in pentylentetrazole-kindled mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 28, n. 1, p. 105–113, 2004.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the Elevated Plus-Maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 21–30, maio 1996.

JUNG, M. E.; LAL, H.; GATCH, M. B. The discriminative stimulus effects of pentylentetrazol as a model of anxiety: recent developments. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 4, p. 429–439, jun. 2002.

KESSLER, R. C. *et al.* Lifetime Prevalence and Age-of-Onset Distributions of. **Arch Gen Psychiatry**, v. 62, n. June, p. 593–602, 2005.

KESSLER, R. C. *et al.* The global burden of mental disorders: An update from the WHO World Mental Health (WMH) surveys. **Epidemiologia e Psichiatria Sociale**, v. 18, n. 1, p. 23–33, 2009.

KHODOROV, B. **Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones**. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, out. 2004
KORPI, E. R.; GRÜNDER, G.; LÜDDENS, H. Drug interactions at GABAA receptors. **Progress in Neurobiology**, v. 67, n. 2, p. 113–159, jun. 2002.

KORPI, E. R.; GRÜNDER, G.; LÜDDENS, H. Drug interactions at GABAA receptors. **Progress in Neurobiology**, v. 67, n. 2, p. 113–159, jun. 2002.

KOVNER, R.; OLER, J. A.; KALIN, N. H. Cortico-limbic interactions mediate adaptive and maladaptive responses relevant to psychopathology. **American Journal of Psychiatry**, v. 176, n. 12, p. 987–999, 2019.

KRALIC, J. E. *et al.* GABAA receptor alpha-1 subunit deletion alters receptor subtype assembly, pharmacological and behavioral responses to benzodiazepines and zolpidem. **Neuropharmacology**, v. 43, n. 4, p. 685–694, set. 2002.

- KREBS., C.; WEINBERG., J.; AKESSON., E. **Neurociências Ilustrada**. Artmed, 2013.
- LAL, H.; EMMETT-OGLESBY, M. W. Behavioral analogues of anxiety animal models. **Neuropharmacology**, v. 22, n. 12, p. 1423–1441, dez. 1983
- LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci*. **Annu Rev Neurosci**, v. 23, p. 155–184, 2000.
- LEDOUX, J. E. Coming to terms with fear. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 8, p. 2871–2878, 2014.
- LISBOA, S. F. *et al.* Increased contextual fear conditioning in inos knockout mice: Additional evidence for the involvement of nitric oxide in stress-related disorders and contribution of the endocannabinoid system. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 8, p. 1–12, 2015.
- LISTER, RICHARDG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, jun. 1987.
- LOVIBOND, P. F. *et al.* Evidence for expectancy as a mediator of avoidance and anxiety in a laboratory model of human avoidance learning. **Quarterly Journal of Experimental Psychology**, v. 61, n. 8, p. 1199–1216, 2007.
- MÉNDEZ-RUETTE, M. *et al.* The role of the rodent insula in anxiety. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. MAR, p. 1–10, 2019a.
- MÉNDEZ-RUETTE, M. *et al.* The role of the rodent insula in anxiety. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. MAR, 2019b.
- MESULAM, M. M. **Principles of Behavioral and Cognitive Neurology**. Second Edi ed. [s.l.] Oxford University Press, 2000.
- MICHEL, T.; FERON, O. Nitric oxide synthases: Which, where, how, and why? **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 9, p. 2146–2152, 1997.
- MILAD, M. R.; ROSENBAUM, B. L.; SIMON, N. M. Neuroscience of fear extinction: Implications for assessment and treatment of fear-based and anxiety related disorders. **Behaviour Research and Therapy**, v. 62, p. 17–23, 2014.
- MISSLIN, R.; CIGRANG, M. Does neophobia necessarily imply fear or anxiety? **Behavioural Processes**, v. 12, n. 1, p. 45–50, jan. 1986.
- NAKASHIMA, M. N. *et al.* Possible role of nitric oxide in anxiety following transient cerebral ischemia in mice. **Journal Pharmacological Sciences**, v. 91, n. 1, p. 47–52, 2003.
- NATHAN, C. Inducible nitric oxide synthase: What difference does it make? **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 10, p. 2417–2423, 1997.
- NIEUWENHUYS, R. **The insular cortex. A review**. 1. ed. Elsevier B.V., 2012. v. 195
- ÖNGÜR, D.; PRICE, J. L. The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. **Cerebral Cortex**, v. 10, n. 3, p. 206–219, 2000.

PAPEZ, J. W. A Proposed of Emotion Mechanism. **Journal of Neuropsychiatry**, v. 7, n. 1, p. 103–112, 1937.

PAULUS, M. P.; STEIN, M. B. **An Insular View of Anxiety**. **Biological Psychiatry**, 15 ago. 2006.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 24, n. 3, p. 525–529, mar. 1986.

PERKINS, A. M.; KEMP, S. E.; CORR, P. J. Fear and anxiety as separable emotions: An investigation of the revised reinforcement sensitivity theory of personality. **Emotion**, v. 7, n. 2, p. 252–261, 2007.

PESSOA, L.; HOF, P. R. From Paul Broca's great limbic lobe to the limbic system. **Journal of Comparative Neurology**, v. 523, n. 17, p. 2495–2500, 2015.

PHAN, K. L. *et al.* Functional neuroanatomy of emotion: A meta-analysis of emotion activation studies in PET and fMRI. **NeuroImage**, v. 16, n. 2, p. 331–348, 2002.

PRUT, L.; BELZUNG, C. **The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review**. **European Journal of Pharmacology** Elsevier, , 28 fev. 2003.

RAMÍREZ-LUGO, L. *et al.* Effects of glutamate and its metabotropic receptors class 1 antagonist in appetitive taste memory formation. **Behavioural Brain Research**, v. 284, p. 213–217, 2015.

RAMOS, A. *et al.* A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. **Behavioural Brain Research**, v. 85, n. 1, p. 57–69, abr. 1997.

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, 2015.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. T. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 52, n. 2, p. 297–303, out. 1995.

RODGERS, R. J. *et al.* Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 3, p. 289–304, mar. 1997.

ROLLS, E. T. Limbic systems for emotion and for memory, but no single limbic system. **Cortex**, v. 62, p. 119–157, 2015.

ROLLS, E. T. The cingulate cortex and limbic systems for emotion, action, and memory. **Brain Structure and Function**, v. 224, n. 9, p. 3001–3018, 2019.

SAPER, C. B. Convergence of Autonomic and Limbic Connections in the Insular Cortex of the Rat. v. 173, 1982.

SHIMADA-SUGIMOTO, M.; OTOWA, T.; HETTEMA, J. M. Genetics of anxiety disorders: Genetic epidemiological and molecular studies in humans. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 69, n. 7, p. 388–401, 2015.

SHIN, L. M.; LIBERZON, I. The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 169–191, 2010.

SILVA, S. A. *et al.* Common mental disorders prevalence in adolescents: A systematic review and metaanalyses. **PLoS ONE**, v. 15, n. 4, p. 1–19, 2020.

SMAERS, J. B. *et al.* Primate prefrontal cortex evolution: Human brains are the extreme of a lateralized ape trend. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 77, n. 2, p. 67–78, 2011.

SYLVERS, P.; LILIENFELD, S. O.; LAPRAIRIE, J. L. Differences between trait fear and trait anxiety: Implications for psychopathology. **Clinical Psychology Review**, v. 31, n. 1, p. 122–137, 2011.

TAQATQEH, F. *et al.* More than a retrograde messenger: Nitric oxide needs two GMPc pathways to induce hippocampal long-term potentiation. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 29, p. 9344–9350, 2009.

THIBAUT, F. Anxiety disorders: a review of current literature. p. 87–88, 2015.

TOVOTE, P.; FADOK, J. P.; LÜTHI, A. Neuronal circuits for fear and anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 317–331, 2015.

TRAYNELIS, S. F. *et al.* Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation, and function. **Pharmacological Reviews**, v. 62, n. 3, p. 405–496, 2010.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 44, n. 2, p. 463–469, fev. 1993.

TRULLAS, R.; SKOLNICK, P. Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains. **Psychopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 323–331, jun. 1993.

UDDIN, L. Q. *et al.* Structure and Function of the Human Insula. **Journal of Clinical Neurophysiology**, v. 34, n. 4, p. 300–306, 2017.

WALL, P. M.; MESSIER, C. Ethological confirmatory factor analysis of anxiety-like behaviour in the murine elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 114, n. 1–2, p. 199–212, set. 2000.

WALTER B CANNON. The James- Lange theory of emotions: A critical examination and an alternative theory. **The American journal of Psychology**, v. 39, n. 1/4, p. 106–124, 1927.

WITTCHEN, H. U. *et al.* The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. **European Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 9, p. 655–679, 2011.

WYSIADECKI, G. *et al.* Anatomical variations of the insular gyri: A morphological study and proposal of unified classification. **Clinical Anatomy**, v. 31, n. 3, p. 347–356, 2018.

YAKOVLEV, P. I. Motility, behavior and the brain: Stereodynamic organization and neural co-ordinates of behavior. **Journal of Nervous and Mental Disease**, 1948.

ZHOU, Q. G. *et al.* Hippocampal neuronal nitric oxide synthase mediates the stress-related depressive behaviors of glucocorticoids by downregulating glucocorticoid receptor. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 21, p. 7579–7590, 2011.