



Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Avaliação dos Efeitos do Milnaciprano sobre a Ansiedade e
Memória em Ratos *Wistar*.

Autora: Vânia Kátia Menegalli Moojen

Orientador: Dr. João L. Quevedo

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PORTO ALEGRE, 2005

Catálogo-na-Publicação

M817 Moojen, Vânia Kátia Menegalli
Avaliação dos efeitos do Milnaciprano sobre a
ansiedade e memória em ratos Wistar / Vânia Kátia
Menegalli Moojen ; orient. João L. Quevedo - 2005.
81 f.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação
em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto
Alegre, 2005.

1. Transtornos da ansiedade 2. Psicofármacos
3. Modelos animais 4. Memória I. Moojen, Vânia Kátia
Menegalli II. Título

CDD 616.8918
NLM QV 77

(Bibliotecária responsável: Caroline C. Borba)



FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**Avaliação dos Efeitos do Milnaciprano sobre a Ansiedade e
Memória em Ratos *Wistar*.**

Vânia Kátia Menegalli Moojen

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Medicina: Ciências
Médicas, da Universidade
Federal do Rio Grande do
Sul, para obtenção do título
de Mestre em Ciências
Médicas.**

Dissertação de Mestrado

2005

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Doutor João Quevedo, que oportunizou essa possibilidade de aprimoramento e crescimento profissional.

Ao professor Doutor Flávio Kapczinski, do Laboratório de Psiquiatria Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por ter oportunizado minha entrada no Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

À professora Keila Maria Ceresér, pela dedicação em todos os momentos da realização deste trabalho.

Ao professor Doutor Felipe Dal-Pizzol, pela contribuição.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, e Epidemiologia, que nos indicaram novos horizontes.

Aos bolsistas Adalisa Reinke, Fabiano Rosa Agostinho, Gustavo Feier e Márcio Rodrigo Martins do Laboratório de Neurociências da Universidade do Extremo Sul Catarinense pela dedicação.

Ao departamento de Psicologia, da Universidade do Extremo Sul Catarinense, pelo apoio.

À estagiária do curso de Psicologia, da Universidade do Extremo Sul Catarinense Lucinéia Peres da Luz, pela persistente contribuição.

Ao meu esposo, pelo companheirismo e cumplicidade de todos esses anos, que me fornecem estímulo e incentivo para todos os empreendimentos.

Aos meus pais, familiares e amigos, que sempre me apoiaram a buscar os melhores caminhos.

Aos colegas, com os quais aprendemos constantemente.

A Deus, fonte de todas as conquistas.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	5
2. OBJETIVOS.....	15
1.1 Geral.....	15
1.2 Específicos.....	15
2. MATERIAIS E MÉTODOS	16
2.1 Delineamento	16
2.2 Local	16
2.3 Experimentos	16
2.4 Aspectos éticos	19
2.5 Análise dos dados	20
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
4. ARTIGO EM INGLÊS	30
5. ARTIGO TRADUZIDO	55
6. CONCLUSÕES	80
7. PERSPECTIVAS	81

INTRODUÇÃO

A ansiedade ocorre normalmente em situações de percepção de ameaça ou perigo, tratando-se de uma resposta adaptativa; começa a se tornar anormal quando ocorre sem motivos suficientes, com grande duração ou intensidade elevada. O termo ansiedade generalizada apareceu pela primeira vez na terceira edição do *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-III), quando a ansiedade psiconeurótica, um distúrbio descrito no DSM-II, foi desmembrado em transtorno de ansiedade generalizada e transtorno do pânico (RICKELS AND RINN, 2002). Segundo o DSM-IV, os principais critérios diagnósticos característicos são ansiedade excessiva, ou irritação, seguida de vários eventos durante muitos dias por um período de ao menos seis meses: agitação, fadiga, irritabilidade, dificuldade de concentração, tensão muscular, distúrbios do sono (CONNOR AND DAVIDSON, 1998; RESSLER *et al.*, 2000; WALL AND MESSIER, 2001; RICKELS AND RINN., 2002).

A prevalência pontual e ao longo da vida do Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG) é respectivamente 1,6 % e 5,1%, ocorrendo comorbidades psiquiátricas, como depressão ou outras formas de ansiedade, em aproximadamente 90% dos pacientes, e a sua sintomatologia resulta em prejuízo social e diminuição da qualidade de vida do paciente (BALLENGER, 2001; SRAMEK *et al.*, 2002).

Há um grande número de dados na literatura sobre as bases biológicas da ansiedade, o que levou ao desenvolvimento de diversas hipóteses ou modelos neuroanatômicos. Fatores biológicos e psicossociais parecem contribuir para o desenvolvimento do TAG. O modelo mais conhecido foi proposto por Gray em

1983, em que concebe a ansiedade como um estado provocado pela ativação do sistema comportamental inibitório (SCI), que modula as respostas ao estresse em modelos animais e potencialmente regula estados persistentes de ansiedade em humanos. Estes estudos pressupõem que o efeito ansiolítico dos fármacos resulta da redução de sua atividade e inclui áreas septohipocampais e as estruturas aferentes noradrenérgicas e serotoninérgicas, núcleos da rafe e *locus ceruleus*. Além disso, o córtex pré-frontal parece modular esse sistema (GRAY, 1983; TOMAZ *et al.*, 1993; BALLENGER., 2001).

A importância do modelo desenvolvido por Gray (1983) se deve à extensa literatura pré-clínica que corrobora seus achados. A semelhança entre os efeitos comportamentais dos ansiolíticos e o efeito de lesões das áreas septais e do hipocampo em modelos animais sugere que estas estruturas desempenham um papel fundamental na mediação da ansiedade. Os fármacos ansiolíticos parecem exercer seu efeito através da redução de serotonina e norepinefrina na área septohipocampal. Sob condições de estresse agudo há uma amplificação na atividade de norepinefrina e serotonina nas áreas citadas anteriormente. Os benzodiazepínicos teoricamente reduzem a função desse sistema agindo nos receptores pré sinápticos GABA_A, do núcleo da rafe e do *locus ceruleus* e nos pós-sinápticos no hipocampo (GONZALEZ *et al.*, 1998).

O estudo da neuroquímica e da neuroanatomia dos transtornos de ansiedade tem sugerido que a sua fisiopatologia é complexa e está associada a alterações em diversos sistemas de neurotransmissores (BRAWMAN-MINTZER AND LYDIARD, 1997). O ácido gama-aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central (SNC) e está amplamente

distribuído em todas as regiões cerebrais (SIEGHART AND SPERK, 2002). Os receptores benzodiazepínicos também estão amplamente distribuídos pelo SNC, principalmente no córtex cerebral, cerebelo e amígdala. O sítio de ligação dos benzodiazepínicos e do GABA fazem parte de um mesmo complexo macromolecular, chamado receptor GABA_A, funcionando de uma maneira alostérica. Os benzodiazepínicos são agentes ansiolíticos efetivos que aumentam a transmissão GABAérgica. Estudos em animais e humanos demonstraram um significativo papel desse sistema na patofisiologia do TAG (FERNANDES *et al.*, 1999).

Em modelos animais de indução de estresse crônico, foi demonstrada uma diminuição da ligação a receptores benzodiazepínicos no córtex frontal, hipocampo e hipotálamo, regiões associadas ao circuito do medo e da ansiedade. Estudos evidenciaram uma redução do conjunto de sinapses dos receptores GABA_A em ratos heterozigotos para a subunidade δ_2 , principalmente no córtex cerebral e no hipocampo, sugerindo que uma disfunção no receptor GABA_A possa representar uma predisposição aos transtornos de ansiedade (CONNOR AND DAVIDSON, 1998). Além disso, diversos experimentos em humanos também suportam essa hipótese. Os benzodiazepínicos são efetivos no tratamento dos pacientes com TAG, sendo que pessoas não ansiosas experimentam intensa reação de ansiedade quando expostas à β -carbolina, agonista inverso benzodiazepínico. Posteriormente, os receptores benzodiazepínicos centrais foram estudados através da medida da velocidade dos movimentos oculares

rápidos, controlados em parte pelos receptores benzodiazepínicos presentes na ponte e no colículo superior (FERNANDES *et al.*, 1999).

Os dados provenientes de estudos pré-clínicos e clínicos sugerem o envolvimento de diversas regiões neuroanatômicas na reação de ansiedade e medo (SANDFORD *et al.*, 2000; LYDIARD, 2003). Em um estudo utilizando tomografia com emissão de pósitrons (PET) em dezoito pacientes com TAG e em quinze controles se observou o metabolismo cerebral antes e após três semanas de tratamento com benzodiazepínicos ou placebo. Antes do tratamento pacientes com TAG apresentaram redução significativa nas taxas de metabolismo nos gânglios da base (média entre caudado, putâmen, e globo pálido), no lobo temporal superior e no cíngulo. As taxas metabólicas também estavam reduzidas na amígdala e no hipocampo, mas a diferença não foi significativa. O tratamento com benzodiazepínicos resultou em um decréscimo significativo no metabolismo da glicose na superfície cortical, especialmente o córtex occipital, sistema límbico e gânglios da base; mas isto não estava associado com a normalização dos padrões de glicose em cada região descritos por Wu *et al.* em 1991.

O sistema noradrenérgico origina-se na ponte e no bulbo. O *locus ceruleus* é o principal núcleo que contém norepinefrina (NE) e fornece inervações para o córtex cerebral, o cerebelo, o sistema límbico, o tronco cerebral e a medula espinhal. Os efeitos da NE são mediados por receptores α e β . Os receptores α_1 são confinados à membrana pós-sináptica, enquanto os α_2 podem ser pré ou pós-

sinápticos. Tanto os receptores β_1 quanto os β_2 foram encontrados no cérebro (SANDFORD *et al*, 2000; BRUNELLO *et al.*, 2003).

Inicialmente, diversos investigadores, como Sevy *et al* (1989), encontraram aumento da concentração das catecolaminas plasmáticas e dos metabólitos urinários em pacientes com TAG. O aumento da atividade da NE nesses pacientes levantou a hipótese de que os níveis elevados de catecolaminas causariam uma diminuição dos receptores α_2 -adrenérgicos pré-sinápticos, porém estudos posteriores não acharam diferenças entre os pacientes com TAG e os controles. Os autores concluíram que os achados iniciais estavam relacionados ao estresse da punção venosa. Não foram demonstradas diferenças significativas nos níveis de catecol-O-metiltransferase, dopamina β -hidroxilase e monoaminoxidase entre indivíduos com TAG e controles normais (MATHEW *et al*, 1980). Em contraste, estudos utilizando métodos de desafio para examinar aspectos dinâmicos ou funcionais do sistema noradrenérgico evidenciaram diversas diferenças entre os indivíduos com TAG e os controles (CAMERON *et al*, 1990; ABELSON *et al*, 1991).

O papel da NE no TAG ainda não é claro, pois os dados dos estudos são controversos. Apesar dos níveis de catecolaminas estarem normais em situações basais, os achados de uma provável redução da sensibilidade dos receptores adrenérgicos mostraram a necessidade de novos estudos para avaliação da função da NE diretamente no SNC. Os corpos celulares das principais vias serotoninérgicas originam-se nos núcleos da rafe. Eles inervam o hipotálamo, tálamo, gânglios basais e sistema límbico. Eison (1990) concluiu que a ansiedade patológica representaria uma atividade excessiva da serotonina (5-HT) nessas

áreas cerebrais. Lesões ou bloqueio desse sistema teriam efeito ansiolítico em modelos animais. Em animais, situações ameaçadoras aumentam os níveis pré-sinápticos de 5-HT e as regiões límbicas e corticais utilizam essas informações para analisar e reagir à situação. Além disso, os subtipos de receptores 5-HT_{1A}, e 5-HT₃ foram associados ao comportamento do medo (RESSLER AND NEMEROFF, 2000).

Camundongos sem os receptores 5-HT_{1A} (*5-HT_{1A} knockout mice*) apresentam diminuição da capacidade exploratória e aumento do medo em ambientes aversivos, sugerindo um aumento da ansiedade. Agonistas 5-HT_{1A} como a buspirona, que seletivamente reduz a descarga dos neurônios 5-HT em modelos animais, demonstraram auxiliar no tratamento do TAG, assim como o bloqueador 5-HT₂, nefazodona (FABRE *et al.*, 2000). As evidências do envolvimento da 5-HT no TAG são baseadas nos achados de diversos estudos. Iny *et al.* (1994) encontraram redução da ligação da paroxetina às plaquetas em pacientes com TAG. Foram relatados níveis urinários elevados da enzima lisossomal N-acetil-β-glicosaminidase, marcador da atividade da 5-HT, nos indivíduos com TAG (Fabre *et al.*, 2000; Sandford *et al.*, 2000). Além disso, diminuição dos níveis de 5-HT no líquido cefalorraquidiano (LCR) em pacientes com este transtorno também foi descrita. Entretanto, estudos demonstraram que o inibidor da síntese da 5-HT, paraclorofenilalanina (PCPA), tem atividade ansiogênica em humanos, relacionando a redução dos níveis de 5-HT à ansiedade. (INY *et al.*, 1994).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC, sendo também importante na plasticidade neuronal. Modelos animais de depressão

relacionados ao estresse demonstraram um aumento na expressão gênica da subunidade NR₁ do N-metil-d-aspartato (NMDA) na área tegmentar ventral e aumentos seletivos regionais na ligação ou função do NMDA. A administração crônica de antagonistas NMDA e agonistas parciais da glicina-B reduz os *deficits* comportamentais em modelos de depressão e ansiedade, assim como os antagonistas NMDA previnem o condicionamento e têm atividade ansiolítica direta. O estresse parece estimular a liberação do glutamato no hipocampo, em parte pelos efeitos dos glicocorticóides. A lamotrigina, um fármaco que reduz a liberação do glutamato em humanos, atenua os efeitos dissociativos da cetamina. Entretanto, a eficácia dos antagonistas NMDA no tratamento da ansiedade humana ainda não foi explorada (CHOJNACKA-WOJCIK *et al*, 2001).

Há três grupos principais de psicofármacos que têm sido usados no tratamento da TAG: os benzodiazepínicos, as azapironas e os antidepressivos (DAVIDSON, 2001; GORMAN, 2002; GORMAN, 2003). Um número elevado de benzodiazepínicos tem sido aprovado para o tratamento de transtornos de ansiedade, assim como para tratamento a curto prazo de sintomas ansiosos. No entanto o TAG freqüentemente apresenta curso crônico e um tratamento a longo prazo pode ser necessário. Estudos têm apontado para a maior eficácia dos benzodiazepínicos em sintomas específicos do TAG, particularmente sintomas somáticos e autonômicos. Por outro lado, os resultados são pobres em relação aos sintomas psíquicos, incluindo preocupação excessiva e irritabilidade. Ainda que os benzodiazepínicos sejam largamente usados, há poucos estudos controlados que embasem os benefícios deste tratamento ao longo prazo. É importante ressaltar que apesar de setenta por cento dos pacientes com TAG

responderem adequadamente aos benzodiazepínicos, menos de dois terços atinge remissão completa dos sintomas (GORMAN, 2002; KAPCZINSKI *et al*, 2004).

Há alguns anos o grupo das azapironas, representado pela buspirona, foi introduzido para o tratamento de sintomas de ansiedade como os encontrados no TAG. A buspirona é um agonista parcial pré e pós-sináptico do receptor 5HT_{1A} e foi o primeiro fármaco aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA), após os benzodiazepínicos, para o tratamento do TAG (BALLENGER, 2001). Estudos demonstraram a sua eficácia no TAG, que foi semelhante a dos benzodiazepínicos. No entanto foi menos efetiva que os benzodiazepínicos nos sintomas somáticos e autonômicos e parece não ter muito sucesso quando estes sintomas são proeminentes; tem particular utilidade quando são identificados problemas relacionados ao abuso ou abstinência de fármacos. Alguns estudos, demonstraram a eficácia semelhante ao placebo (DAVIDSON, 2001; GORMAN, 2002).

Considerando as evidências do envolvimento da serotonina e norepinefrina no TAG, faz sentido considerar o tratamento com antidepressivos que atuem nesses sistemas. A venlafaxina XR tornou-se o primeiro fármaco aprovado no tratamento simultâneo do humor na depressão e da ansiedade no TAG, que tem mecanismo de ação que envolve os dois sistemas (SILVERSTONE AND SALINAS, 2001; KAPCZINSKI *et al*, 2004).

Embora o tratamento com antidepressivos esteja bem estabelecido para os diversos transtornos de ansiedade, como por exemplo transtorno do pânico, fobia social, transtorno obsessivo-compulsivo e transtorno do estresse pós- traumático, seu papel no TAG ainda não é claro (SILVERSTONE AND SALINAS, 2001).

Tradicionalmente, a depressão e a ansiedade têm sido vistas como transtornos distintos; porém vários estudos demonstram haver uma grande sobreposição entre eles (ANDREATINI E BACELLAR, 1999). Pouca atenção tem sido dada a diversos estudos que têm apontado a eficácia do tratamento com antidepressivos no TAG, possivelmente devido a obstáculos como a mudança nos critérios diagnósticos e a alta resposta ao placebo. As evidências mais atuais apontam para o uso de antidepressivos como primeira escolha, incluindo os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (paroxetina é aprovada pelo *Food and Drug Administration*—FDA- para o tratamento do TAG) e os de ação serotoninérgica e noradrenérgica, como venlafaxina e milnaciprano (RICKELS AND RYNN, 2002).

O cloridrato de milnaciprano é um composto derivado do ciclopropano, desenvolvido com a finalidade de tratar transtornos depressivos. Esse fármaco é um inibidor seletivo da recaptação de norepinefrina e serotonina (VIAZZO *et al.*, 1996; PEREZ *et al.*, 1998; MOCHIZUKI *et al.*, 2002; VAISHNAVI *et al.*, 2004). Essa capacidade inibitória do milnaciprano é semelhante à de outros antidepressivos, como a imipramina *in vivo* e *in vitro* (NELIAT *et al.*, 1996; VAN AMERONGEN *et al.*, 2001). Porém, os efeitos anticolinérgicos, sedativos e cardiovasculares são menores quando comparado aos antidepressivos tricíclicos. Estudos *in vitro*, demonstraram que o milnaciprano se liga ao transportador de serotonina e tem pouca afinidade aos receptores pós-sinápticos α_1 e α_2 -adrenérgico, β -adrenérgico, muscarínico, histamínico H_1 , dopaminérgico D_2 , 5-HT1, 5-HT2 e benzodiazepínicos. Em ratos, não foram evidenciados efeitos sobre os receptores

β -adrenérgicos, serotoninérgicos 5-HT₂, 5-HT₁, α_1 e α_2 -adrenérgico e benzodiazepínicos (SPENCER AND WILDE, 1998; KAZUTA *et al.*, 2002). Estudos em modelo animal demonstraram que o milnaciprano reduz, agudamente, a atividade dos neurônios noradrenérgicos do *Locus ceruleus*. Entretanto, com aplicação crônica, após uma ou duas semanas, esses neurônios tendem a recuperar os níveis basais de atividade (MONGEAU *et al.*, 1998).

O milnaciprano apresenta, além da ação antidepressiva, efeitos ansiolíticos (MOCHIZUKI *et al.*, 2002). Muitos estudos têm sugerido que os estados de ansiedade humana e animal diferem, respectivamente, quanto a fatores cognitivos e comportamentais (SHEKHAR *et al.*, 2001), esta idéia é baseada na premissa de que a ansiedade é entendida como um estado afetivo (emocional) em humanos (CLEMENT AND CHAPOUTHIER, 1998). Trabalhos recentes envolvendo modelos animais têm contribuído extensivamente para a compreensão e caracterização da ansiedade animal como um comportamento de defesa (WALL AND MESSIER, 2001). A norepinefrina, serotonina, e o glutamato são neurotransmissores diretamente envolvidos nos parâmetros comportamentais como depressão, ansiedade e memória. O efeito antidepressivo do cloridrato de milnaciprano está constatado na literatura; no entanto, seus efeitos sobre ansiedade e memória requerem maiores estudos (MOCHIZUKI *et al.*, 2002).

1. OBJETIVOS

1.1 Geral

- Avaliar os efeitos comportamentais do tratamento agudo e crônico do cloridrato de milnaciprano em ratos Wistar.

1.2 Específicos

- Avaliar os efeitos na memória induzidos pelo uso do cloridrato de milnaciprano em ratos, nos aparatos de esquiva inibitória e habituação em campo aberto.
- Avaliar o efeito ansiolítico do cloridrato de milnaciprano em ratos submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Delineamento

Estudo experimental.

2.2 Local

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Neurociências da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, na cidade de Criciúma -SC.

2.3 Experimentos

Para a avaliação dos parâmetros de ansiedade e memória em modelo animal, utilizou-se dois protocolos de administração do fármaco, um agudo e outro crônico. Em ambos, após a administração, os animais foram submetidos aos testes de labirinto em cruz elevado (*plus-maze*), habituação ao campo aberto (*open field*) e esQUIVA inibitória (*inhibitory avoidance*). Este estudo foi controlado por placebo. Foram utilizados ratos machos *Wistar*, com idades entre 70 a 90 dias (250 a 300 g), alojados em caixas de plástico (40 X 30 x 15 cm), cinco por caixa, sob um ciclo de 12 horas luz/escuro (as luzes ligam às 07:00 am.), temperatura constante ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$), comida e água *ad libitum*. A distribuição dos grupos farmacológicos foi realizada por tabela de randomização.

Os animais foram submetidos a tarefas experimentais de comportamento em esQUIVA inibitória (*inhibitory avoidance*), habituação ao campo aberto (*open field*) e labirinto em cruz elevado (*plus-maze*). Nos dois primeiros testes foram estudados aprendizado e memória e no terceiro a ansiedade. Neste estudo foram feitos dois protocolos; um agudo e um crônico. No protocolo crônico os animais foram divididos em 4 grupos. Em três deles, foram administradas diferentes doses

de milnaciprano: 12,50; 25,00 e 50,00 mg/kg intraperitoneal (i.p.). Outro grupo recebeu solução salina. Os ratos receberam uma injeção por dia durante 28 dias e foram testados 23 horas após a última aplicação. No protocolo agudo foram formados, também, 4 grupos, que receberam as mesmas doses que os grupos crônicos; porém, os ratos receberam somente uma aplicação e foram treinados após 1 hora. Em ambos os protocolos cada grupo foi destinado a um único aparelho, sendo utilizado, também, um grupo controle para cada equipamento.

2.3.1 Esquiva inibitória (*Inhibitory avoidance*)

A esquiva inibitória em roedores é um modelo animal de aprendizado e memória amplamente usado. O aparelho de esquiva inibitória é descrito extensivamente na literatura (IZQUIERDO *et al.*, 1997; ROESLER *et al.*, 1999). As medidas da caixa de esquiva inibitória são 50 cm de comprimento, 25 cm de largura e 25 cm de altura, composta de acrílico, sendo que a parte anterior é transparente. O piso do aparelho consiste em uma grade de barras de alumínio (1 mm de diâmetro) paralelas com espaços de 1 cm entre elas. Uma plataforma de 7 cm de comprimento com 2,5 cm de altura é colocada no piso, na lateral direita da caixa. A caixa é conectada a um aparelho que permite regular a voltagem desejada e um interruptor para liberar as descargas elétricas na grade do piso.

O protocolo experimental consiste de duas sessões: treino e teste. No treino, é cronometrado o tempo que o animal leva para descer da plataforma (latência). Imediatamente após o animal descer com as quatro patas na grade recebe um choque de 0,4 mA por um período de 2s. Após 24 horas, é realizada a sessão de teste, onde não é necessário fazer a administração de novo choque nas patas. Nesta sessão é novamente cronometrado o tempo de latência, sendo que

o período máximo de permanência na plataforma é de 180 segundos. A sessão de treino, propõe-se à aquisição da memória da tarefa e a sessão de teste propõe-se à avaliação da retenção da memória da tarefa .

2.3.2 Habituação ao campo aberto (*Open field*)

O *aparato de habituação ao campo aberto* é uma caixa com medidas de 60 X 50 cm e 40 cm de altura. O piso possui fundo vermelho, dividido com linhas negras de modo a formar 12 quadrados de tamanhos iguais. A parede anterior do aparelho é transparente de modo que o observador possa se posicionar a uma distância que não atraia a atenção do animal a fim de analisar o seu comportamento. A habituação ao campo aberto (*open field*) é realizada em duas sessões (treino e teste) com um período de 24 horas de intervalo. O animal é colocado, em ambas as sessões, no quadrado posterior esquerdo, ficando livre para explorar o ambiente por 5 min. São registrados os números de cruzamentos e de comportamentos exploratórios (*rearing*) (VIANNA *et al*, 2000).

2.3.3 Labirinto em cruz elevado (*elevated plus-maze*)

O aparato de labirinto em cruz elevado consiste em dois braços abertos de 50 cm de comprimento por 10 cm de largura, e dois braços fechados de 50 cm de comprimento, 10 cm de largura e 40 cm de altura com abertura superior (ANDREATINI E LEITE, 1994; CANTO-DE-SOUZA *et al*, 2002; KORTE AND DE BOER , 2003). Os braços são arranjados de uma maneira com que cada um fique disposto um oposto ao outro e um espaço central, livre de obstáculos, onde o rato deverá ser colocado inicialmente. O aparato é elevado aproximadamente 50 cm do chão. O período de permanência em cada braço, bem como numero de cruzamentos entre os braços, é registrado por um observador que permanece na mesma sala

de uma forma que o animal não se incomode com a presença do mesmo (CANTO-DE-SOUZA *et al*, 2002). Fármacos ansiolíticos aumentam o número de entradas nos braços abertos, enquanto que substâncias ansiogênicas têm efeito oposto (CRUZ, FREI E GRAEFF, 1994).

O labirinto em cruz elevado foi validado farmacologicamente, fisiologicamente e comportamentalmente para identificação de efeitos ansiolíticos e ansiogênicos de fármacos em ratos e camundongos por Pellow *et al* em 1985. É um dos modelos animais mais utilizados para estudar ansiedade e o efeito de antidepressivos sobre o comportamento ansioso, apresentando uma grande contribuição para a descoberta de ansiolíticos ou para o entendimento das bases fisiológicas e psicológicas na ansiedade ; contudo as suas maiores vantagens são sem dúvida a simplicidade, baixo custo e a agilidade da análise (DAWSON AND TRICKLEBANK, 1995; RODGERS *et al*, 1996; CRUZ-MORALES, BORSINI *et al*, 2002; SANTOS E BRANDÃO, 2002). Podem ocorrer falsos positivos e falsos negativos, particularmente quando o fármaco em questão altera atividade locomotora (DAWSON AND TRICKLEBANK, 1995; WEISS *et al*, 1998). O cloridrato de milnaciprano não altera a atividade locomotora (SPENCER AND WILDE, 1998). Sabe-se que fármacos que aumentam a atividade exploratória sem aumentar a ação locomotora apresentam um efeito ansiolítico (WEISS *et al*, 1998)

2.4 Aspectos éticos

O presente estudo foi executado após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

2.5 Análise dos dados

Os dados foram armazenados e analisados em um banco de dados do SPSS 10.0. Os dados relativos ao labirinto em cruz elevado e habituação ao campo aberto foram descritos como média \pm erro padrão da média e foram analisados por ANOVA *one-way* seguido por teste de Duncan. Na habituação ao campo aberto as diferenças entre as sessões de treino e teste foram avaliadas pelo teste t de Student. As análises obtidas do teste para esquiva inibitória foram não-paramétricas porque este procedimento envolve um ponto de corte. Os dados são descritos como medianas (escalas interquartis) e foram descritos pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Mann-Whitney quando necessário. As diferenças treino-teste foram avaliadas pelo teste de Wilcoxon. Os valores de p inferiores a 0,05 foram considerados como estatisticamente significativos.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABELSON J.L., GLITZ D., CAMERON O.G., Lee M.A., Bronzo M., Curtis G.C. Blunted growth hormone response to clonidine in patients with generalized anxiety disorder. *Archives of General Psychiatry*, 25: 141-52, 1991.
2. ANDREATINI R., BACELLAR L.F.S. The relationship between anxiety and depression in animal models: a study using the forced swimming test and elevated plus-maze. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32: 1121-26, 1999.
3. ANDREATINI R., LEITE J.R. The effect of corticosterone in rats submitted to the elevated plus-maze and to pentylenetetrazol-induced convulsions. *Prog. Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 18, 1333-47, 1994.
4. BALLENGER J.C. Overview of different pharmacotherapies for attaining remission in generalized anxiety disorder. *Journal of Clinical Psychiatry*, 62(suppl. 19): 11-19, 2001.
5. BORSINI F., PODHORNA J., MARAZZITI D. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? *Psychopharmacology*, 163: 121-41, 2002.
6. BRAWMAN-MINTZER O., LYDIARD R.B. Biological basis of generalized anxiety disorder. *Journal of Clinical Psychiatry*, 58:16-25, 1997.
7. BRUNELLO N., BLIER P., JUDD L.L., MENDLEWICZ J., NELSON C.J., SOUERY D., ZOHAR J., RACAGNI G. Noradrenaline in mood and anxiety disorders: basic and clinical studies. *Int Clin Psychopharmacol*, 18(4): 191-202, 2003.

8. CAMERON O.G., SMITH C.B., LEE M.A., HOLLINGSWORTH P.J., HILL E.M., CURTIS G.C. Adrenergic status in anxiety disorders: platelet alpha2-adrenergic receptor binding, blood pressure, pulse, and plasma catecholamines in panic and generalized anxiety disorder patients and in normal subjects. *Biological Psychiatry*, 28: 3-20, 1990.
9. CANTO-DE-SOUZA A., NUNES-DE-SOUZA R.L., RODGERS R.J. Anxiolytic-like effect of way-100635 microinfusions into the median (but not dorsal) raphe nucleus in mice exposed to the plus-maze: influence of prior test experience. *Brain Research*, 928: 50-9, 2002.
10. CHOJNACKA-WOJCIK E., KLODZINSKA A., PILC A. Glutamate receptor ligands as anxiolytics. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 2(8): 1112-9, 2001.
11. CLEMENT Y., CHAPOUTHIER G. Biological bases of anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 22(5): 623-33, 1998.
12. CONNOR K.M., DAVIDSON J.R.T. Generalized anxiety disorder: neurobiological and pharmacotherapeutic perspectives. *Biological Psychiatry*, 44:1286-94, 1998.
13. CRUZ A .P.M., FREI F., GRAEFF F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 49(1): 171-76, 1994.
14. CRUZ-MORALES S.E., SANTOS N.R., BRANDÃO M.L. One-trial tolerance to midazolam is due to enhancement of fear and reduction of anxiolytic-sensitive behaviors in the elevated plus-maze retest in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 72: 973-78, 2002.

15. DAVIDSON J.R.T. Pharmacotherapy of generalized anxiety disorder. *Journal of Clinical Psychiatry*, 62(suppl 11): 46-50, 2001.
16. DAWSON G.R., TRICKLEBANK M.D. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends in Pharmacological Sciences*, 16:33-6, 1995.
17. EISON M.S. Serotonin: a common neurobiologic substrate in anxiety and depression. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 10:26-30, 1990.
18. FABRE V., BEAUFOUR C., EVRARD A., RIOUX A., HANOUN N., LESCH K.P., MURPHY D.L., LANFUMEY L., HAMON M., MARTRES M.P. Altered expression and functions of serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in knock-out mice lacking the 5-HT transporter. *European Journal of Neuroscience*, 12(7): 2299-310, 2000.
19. FERNANDES C., ARNOT M.I., IRVINE E.E., BATESON A.N., MARTIN I.L., FILE S.E. The effect of treatment regimen on the development of tolerance to the sedative and anxiolytic effects of diazepam. *Psychopharmacology*, 145(3): 251-9, 1999.
20. GONZALEZ L.E., OUAGAZZAL A.M., FILE S.E. Stimulation of benzodiazepine receptors in the dorsal hippocampus and median raphe reveals differential GABAergic control in two animal tests of anxiety. *European Journal of Neuroscience*, 10(12): 3673-80, 1998.
21. GORMAN J.M. Treatment of generalized anxiety disorder. *Journal of Clinical Psychiatry*, 63(suppl 8): 17-23, 2002.
22. GORMAN J.M. Treating of generalized anxiety disorder. *Journal of Clinical Psychiatry*, 64(suppl 2): 24-9, 2003.

23. GRAY J. A. A theory of anxiety: the role of the limbic system. *L'Encéphale*, 9(4 Suppl 2):161B-166B,1983.
24. HOEHN-SARIC R., McLEOD D.R., ZIMMERLI W.D. Somatic manifestations in women with generalized anxiety disorder. *Archives of General Psychiatry*, 46:1113-19, 1989.
25. INY L.J., PECKNOLD J., SURANYI-CADOTTE B.E., BERNIER B., LUTHE L., NAIR N.P., MEANEY M.J. Studies of a neurochemical link between depression, anxiety, and stress from [3H]imipramine and [3H]paroxetine binding on human platelets. *Biological Psychiatry*, 36(5): 281-91,1994.
26. IZQUIERDO I., QUILLFELDT J.A., ZANATTA M.S., QUEVEDO J., SCHAEFFER E., SCHMITZ P.K., MEDINA J.H. Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *European Journal of Neurosciences*, 9(4):786-93, 1997.
27. JETTY P.V., CHARNEY D.S., GODDARD A.W. Neurobiology of generalized anxiety disorder. *The Psychiatric Clinics of North America*, 24:75-97, 2001.
28. JOHNSON M.R., LYDIARD R.B. The neurobiology of anxiety disorders. *The Psychiatric Clinics of North America*, 18:681-725, 1995.
29. KAPCZINSKI F., LIMA M.S., SOUZA J.S., CUNHA A., SCHMITT R. Antidepressants for generalized anxiety disorder. *The Cochrane Library*, Issue 4, 2004.
30. KAZUTA Y., TSUJITA R., OGAWA K., HOKONOHARA T., YAMASHITA K., MORINO K., MATSUDA A. AND SHUTO S. Synthesis of (1S,2R)-1-phenyl-2-[(S)-1-aminopropyl]-N, N-diethylcyclopropanecarboxamide (PPDC) derivatives

modified at the carbamoyl moiety as a new class of NMDA receptor antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10:1777-91, 2002.

31. KOOB G.F. Corticotropin-releasing factor, norepinephrine and stress. *Biological Psychiatry*, 46:1167-80, 1999.
32. KORTE S.M., De BOER S.F. A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. *European Journal of Pharmacology*, 463: 163-75, 2003.
33. LYDIARD R.B. The role of GABA in anxiety disorders. *Journal of Clinical Psychiatry*, 64 Suppl 3:21-7, 2003.
34. MATHEW R.J., HO B.T., KRALIK P., TAYLOR D., SEMCHUK K., WEINMAN M., CLAGHORN L. Catechol-O-methyltransferase and catecholamines in anxiety and relaxation. *Psychiatry Research*, 3: 85-91, 1980.
35. MOCHIZUKI D., TSUJITA R., YAMADA S., KAWASAKI K., OTSUKA Y., HASHIMOTO S., HATTORI T., KITAMURA Y., MIKI N. Neurochemical and behavioural characterization of milnacipran, a serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor in rats. *Psychopharmacology*, 162:323-32, 2002.
36. MOLDIN S.O. Neurobiology of anxiety and fear: challenges for genomic science of the new millennium. *Biological Psychiatry*, 48:1144-46, 2000.
37. MONGEAU R., WEISS M., MONTIGNY C., BLIER P. Effect of acute, short- and long-term milnacipran administration on rat locus coeruleus noradrenergic and dorsal raphe serotonergic neurons. *Neuropharmacology*, 37: 905-18, 1998.
38. NELIAT G., BODINIER M.C., PANCIONI E. AND BRILEY N. Lack of effect of repeated administration of milnacipran, a double noradrenaline and

- serotonin reuptake inhibitor, on the β -adrenoceptor-linked adenilate cyclase system in the rat cerabral cortex. *Neuropharmacology*, 35(5): 589-93, 1996.
39. PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 14: 149-167, 1985.
40. PEREZ N., PAUWELS P.J., PALLARD-SIGOGNEAU I., FOURRIER C., CHOPIN P., PALMIER C., COLOVRAY V., HALAZY S. Design and synthesis of new potent, silent 5-HT_{1A} antagonists by covalent coupling of aminopropanol derivatives with selective serotonin reuptake inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 8: 3423-3428, 1998.
41. PRASAD A., MIYOSHI H. , PRASAD C. Heterogeneity in the performance of outubred sprague-dawley rats in an elevated-plus maze test: a possible animal model for anxiety disorder. *Life Sciences*, 59(18): 1499-1506, 1996.
42. RESSLER K.J. AND NEMEROFF C.B. Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. *Depress Anxiety*, 12 Suppl 1:2-19, 2000.
43. RICKELS K., RYNN M. Pharmacotherapy of generalized anxiety disorder. *Journal of Clinical Psychiatry*, 63 Suppl 14:9-16, 2002.
44. RODGERS R.J., JOHNSON N.J.T., COLE J.C., DEWAR C.V., KIDD G.R., KIMPSON P.H. Plus-maze retest profile in mice: Importance of initial stages of trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockade. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 54(1): 41-50, 1996.

45. ROESLER R., WALZ R., QUEVEDO J., DE-PARIS F., ZANATA S.M., GRANER E., IZQUIERDO I., MARTINS .VR., BRENTANI R.R. Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP(C). *Molecular Brain Research*; 71(2): 349-53, 1999.
46. SANDFORD J.J, ARGYROPOULOS V.S., NUTT D.J. The psychobiology of anxiolytic drugs. Part 1: basic neurobiology. *Pharmacology & Therapeutics*, 88: 197-212, 2000.
47. SEVY S., PAPADIMITRIOU G.N., SURMONT D.W., GOLDMAN S., MENDLEWICZ J. Noradrenergic function in generalized anxiety disorder, major depressive disorder, and health subjects. *Biological Psychiatry*, 25: 141-52, 1989.
48. SHEKHAR A., McCANN U.D., MEANEY M.J., BLANCHARD D.C., DAVIS M., FREY K.A., LIBERZON I., OVERALL K.L., SHEAR M.K., TECOTT L.H., WINSKY L. Summary of a National Institute of Mental Health workshop: developing animal models of anxiety disorders. *Psychopharmacology (Berl)*, 157(4): 327-39, 2001.
49. SIEGHART W., SPERK G. Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem.*, 2(8):795-816, 2002.
50. SILVERSTONE P.H., SALINAS E. Efficacy of venlafaxine extended release in patients with major depressive disorder and comorbid generalized anxiety disorder. *Journal of Clinical Psychiatry*, 62(7): 523-9,2001.
51. SPENCER C.M., WILDE M.I. Milnacipran: a review of its use in depression. *Drugs*, 56(3): 405-27, 1998.

52. SRAMEK J.J., ZAROTSKY, V.; CUTLER, N.R. Generalised anxiety disorder – Treatment options. *Drugs*, 62(11): 1635-48, 2002.
53. TOMAZ C., DICKINSON-ANSON H., MCGAUGH J.L., SOUZA-SILVA M.A., VIANA M.B., GRAEFF F.G. Localization in the amygdala of the amnestic action of diazepam on emotional memory. *Behavioral and Brain Research*, 58(1-2): 99-105, 1993.
54. VAISHNAVI S.N., NEMEROFF C.B., PLOTT S.J., RAO S.G., KRANZLER J., OWENS M.J. Milnacipran: a comparative analysis of human monoamine uptake and transporter binding affinity. *Biological Psychiatry*, 55: 320-22, 2004.
55. VAN AMERONGEN A.P., FERREY G., TOURNOUX A. A randomised, double-blind comparison of milnacipran and imipramine in the treatment of depression. *Journal of Affective Disorders*, 72(1): 21-31, 2001.
56. VIANNA M.R., ALONSO M., VIOLA H., QUEVEDO J., DE PARIS F., FURMAN M., DE STEIN M.L., MEDINA J.H., IZQUIERDO I. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem.* 7: 333-340, 2000.
57. VIAZZO P., ALPHAND V., FURSTOSS R. Microbiological Transformations 34: Enantioselectiv hydrolysis of a key-lactone involved in the synthesis of the antidepressant milnacipran. *Tetrahedron Letters*, 37(26): 4519-22, 1996.
58. WALL P.M., MESSIER C. Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25:275-86, 2001.

59. WEISS S.M., WADSWORTH A.F., DOURISH C.T. Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23:265-71, 1998.
60. WU J.C., HERSHEY T.G., HARZLETT E., SICOTTE N., JOHNSON J.C. PET in generalized anxiety disorder. *Biological Psychiatry*, 29(12): 1181-99, 1991.

4. ARTIGO EM INGLÊS

Effects of acute and chronic milnacipran administration in animal models of anxiety and memory

Vânia K. M. Moojen¹, Márcio Rodrigo Martins¹, Adalisa Reinke¹, Gustavo Feier¹,
Fabiano R. Agostinho¹, Édson M. Cechin² and João Quevedo¹

¹Laboratório de Neurociências, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil.

²Grupo de Neurociências, Faculdade de Medicina, Universidade de Passo Fundo, 99100-000, Passo Fundo, RS, Brazil.

Prof. João Quevedo, M.D., Ph.D. – Laboratório de Neurociências, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brasil.

Fax: # 55 48 443 4817. E-mail: quevedo1@terra.com.br

Abstract

Serotonin (5-HT) and noradrenaline (NA) are involved in both the pathogenesis and recovery from depression and anxiety. We examined the effects of acute and chronic treatment with milnacipran, a serotonin/noradrenaline reuptake inhibitors (SNRI) antidepressant, on anxiety and memory retention in rats. Male Wistar rats received acute or chronic administration of milnacipran (12.5, 25 or 50 mg/kg) or saline (control group). The animals were separately submitted to elevated plus-maze, inhibitory avoidance and open-field tasks 1 h after injection, in the acute group, or 23 h after last injection, in the chronic group. Our results showed an anxiolytic-like effect after chronic administration of milnacipran at doses of 25 and 50 mg/kg. The treatment does not interfere in memory retention and habituation to a novel environment at any doses studied. These findings support that milnacipran, an established SNRI antidepressant, can also be useful in the treatment of anxiety disorders.

Key words

Milnacipran, SNRIs, anxiety, memory, rat

Introduction

When treating anxiety disorders, the use of antidepressant (ADs) may be an effective alternative to benzodiazepines, which are known to have a high potential for dependency and sedative effects. The selective serotonin (5-HT) reuptake inhibitors (SSRI) have been reported to be effective for the treatment of generalized anxiety disorder (GAD) (Rocca et al., 1997; Ballenger, 2001; Rickels and Rynn, 2002; Gorman, 2003). Although clinical research has revealed promising results concerning the effects of ADs on anxiety, results obtained from animal models of anxiety (File, 1985; Chopin and Briley, 1987; Linnoila et al., 1987; Hascoet et al. 2000, Mochizuki et al., 2002; Miyamoto et al., 2004) have remained variable, and thus, controversial. Acute administration of established ADs in animals has been reported to produce anxiogenic-like effects in some studies (Linnoila et al., 1987; Mochizuki et al., 2002) and no specific effect in others (Chopin and Briley, 1987; File, 1985). However various authors have shown that ADs may even elicit anxiolytic-like responses (Handley and McBlane, 1992; Bourin et al., 1996; Nowakowska et al., 1996; Miyamoto et al., 2004).

Serotonin (5-HT) and noradrenaline (NA) are involved in both the pathogenesis and recovery from depression and anxiety (Blier et al., 1990; Caldecott Hazard et al., 1991; Delgado et al., 1991,1993; Ballenger, 2001; Rickels and Rynn, 2002; Gorman, 2003). The combination of SSRIs and NA reuptake inhibitors (SNRIs) was thus shown to increase the antidepressant efficacy and to switch refractory depressed patients to responder (Weilburg et al., 1989; Seth et al., 1992) or to reduce the usual 3-4 week long delay before the onset of the

therapeutic effects on mood and behavior (Nelson et al., 1991). At the same time, a new class of antidepressant was developed, called the serotonin/noradrenaline reuptake inhibitors (SNRI). These drugs, such as milnacipran and venlafaxine (Artigas, 1995) are at least as effective as SSRI and Tricyclic-antidepressants (TCA) in major depression (Ansseau et al., 1989; Marcher et al., 1989; Schweizer et al., 1991).

A serotonin/noradrenalin reuptake inhibitor (SNRI) venlafaxine, was the first drug approved for the treatment of GAD and has also been to be effective in treating depression (Sheehan 1999; Thase et al., 2001). However, there are few studies evaluating the effects of milnacipran, an established SNRI antidepressant, on anxiety (Mochizuki et al., 2002) and other cognitive parameters such as associative memory and habituation to a novel environment.

In the present study, we evaluated the effects of acute and chronic milnacipran administration on anxiety, associative memory and habituation to a novel environment.

Methods and Materials

Animals

Male Wistar rats (250-300 g) were obtained from our breeding colony. They were housed five to a cage with food and water available ad libitum, and were maintained on a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 AM). Behavioral procedures were conducted between 13:00 and 16:00 h. All experimental procedures involving animals were performed in accordance with National Institutes of Health guidelines

and with the approval of the ethics committee of Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Experimental design

The animals were submitted to acute (one injection) or chronic (28 injections daily) milnacipran treatment. In both treatments, the rats received saline or milnacipran (12.5, 25 or 50 mg/kg) intraperitoneally in a volume of 1 ml/kg. The animals were separately submitted to behavioral tasks 1 h after injection, in the acute treatment, or 23 h after last injection, in the chronic treatment.

Behavioral Tasks

The elevated plus-maze task used in animal models of anxiety is described in detail elsewhere (Rickels and Schweizer, 1987; Pellow et al., 1985). Briefly, the apparatus consisted of two open arms (50 x 10 cm) and two enclosed arms (50 x 10 x 40 cm) arranged in such a way that the two arms of each type were opposite to each other, and separated by a central platform (5 x 5 cm). The maze's height was 50 cm and the tests were conducted under dim red light. Animals were allowed a 5-min exposure to red light in their own home cages before the testing procedure. Next, they were placed individually on the central platform of the plus-maze facing an open arm. During a 5-min test period, two observers recorded the following measurements: the number of entries and the time spent in the open and closed arms and the total number of arm entries.

The step-down inhibitory avoidance apparatus and procedures have been described in previous reports (Quevedo et al, 1999). Briefly, the training apparatus

was a 50 x 25 x 25 cm acrylic box (Albarsch, Porto Alegre, Brazil) whose floor consisted of parallel caliber stainless steel bars (1 mm diameter) spaced 1 cm apart. A 7-cm-wide, 2.5-cm-high platform was placed on the floor of the box against the left wall. In the training trial, animals were placed on the platform and their latency to step down on the grid with all four paws was measured with an automatic device. Immediately after stepping down on the grid, animals received a 0.4 mA, 2.0 s foot shock and returned to the home cage. A retention test trial was performed 24 h after training. The retention test trial was procedurally identical to training, except that no foot shock was presented. Retention test step-down latency (maximum 180 s) was used as a measure of inhibitory avoidance retention.

Habituation to an open-field was carried out in a 40 x 60 cm open field surrounded by 50 cm high walls made of brown plywood with a frontal glass wall. The floor of the open field was divided into 12 equal rectangles by black lines. Animals were gently placed on the left rear quadrant, and left to explore the arena for 5 min (training session). Immediately following this, the animals were taken back to their home cage, and 24 h later submitted again to a similar open-field session (test session). Crossings of the black lines and rearings performed in both sessions were counted. The decrease in the number of crossings and rearings between the two sessions was taken as a measure of the retention of habituation (Vianna et al., 2000).

Statistical Analysis

The data from the elevated plus-maze and open-field are reported as means \pm SEM and were analyzed by one-way ANOVA followed by the Duncan test. In the open field, the differences between training and test sessions were analyzed by the Student t-test. The analysis of the data obtained in the step-down inhibitory avoidance task was nonparametric because this procedure involved a cutoff score. The data are reported as medians (interquartile ranges) and were analyzed by the Kruskal-Wallis test followed by the Mann-Whitney test when necessary. Training-test differences were evaluated by the Wilcoxon test. P values less than 0.05 were considered to be statistically significant.

Results

Elevated Plus-maze Task

In the chronic treatment, we observed a significant increase in the number of entries in the open arms at doses of 25 and 50 mg/kg ($p < 0,001$) and a significant decrease in the number of entries in the closed arms at the dose of 50 mg/kg ($p < 0,05$) of milnacipran (figure 1.C). In addition, a significant increase in the time spent in the open arms ($p < 0,05$) and a decrease in the time spent in the closed arms ($p < 0,05$) were observed in rats treated with 25 and 50 mg/kg of milnacipran (figure 1.D).

In the acute treatment, no significant difference was observed among groups in the parameters evaluated (figure 1.A and 1.B).

Inhibitory Avoidance Task

All groups showed significant difference in the latency to step-down the platform from training and test session ($p < 0,005$), but no significant difference in the training and test latencies was observed among groups ($p > 0,12$) in either the acute (figure 2.A) and chronic (figure 2.B) treatment.

Open-Field Behavior

All groups showed significant difference in the number of crossings and rearings between the training and test sessions ($p < 0,05$). However, no significant difference was observed in the number of crossings and rearings in the training and test sessions among groups ($p > 0,19$) in both acute (figure 3.A) and chronic (figure 3.B) treatment.

Discussion

In the present study, we showed an anxiolytic-like effect of milnacipran in the chronic treatment. We observed an increase in the number of entries in the open arms in the animals chronically treated with 25 and 50 mg/kg of milnacipran. At the same time, we observed a decrease in the number of entries in the closed arms in the group chronically treated with 50 mg/kg. No significant difference was detected in the total number of entries among groups, indicating that there was no difference in motor activity among groups. In the acute treatment, no significant difference was observed in the anxiety parameters among groups.

Neuropharmacological findings to date support the notion that 5-HT may be a neurobiological substrate in anxiety and depression (Eison, 1990; Ballenger, 2001). Pharmacological manipulation of the serotonergic system in animal models

indicate that different mechanism (presumably due to 5-HT receptor specificities) (Lucki, 1996) are involved in the development of anxiety (Handley, 1995; Griebel, 1995). The 5-HT_{1A}-receptor subtype, in particular, has been shown to be instrumental in the genesis of anxious behavior in animal models (Cao and Rodgers, 1998; Collinson and Dawson, 1997).

Although the serotonergic system is considered one of the main neurophathways involved in anxiety, 5-HT also has modulatory effects on the noradrenergic system (Eison, 1990; Ninan, 1999; Ballenger, 2001). The interaction between 5-HT and noradrenaline is reciprocal and therefore may play an important role in the etiology of depressive and anxiety disorder and their treatment (Eison, 1990; Ninan, 1999; Ballenger, 2001).

NA facilitates the sympathetic response, i.e., physiological and behavioral adaptations to stress, alarm, and threat. Consequently, noradrenergic dysfunction leads to altered states of fear and arousal (Gray, 1988). Several studies have associated α_2 -adrenergic receptor hyposensitivity (Abelson et al., 1991) or a reduction in the density of α_2 -adrenergic receptor binding sites (Cameron et al., 1990) to the genesis of GAD.

Due to the neurobiological evidences involving serotonin and noradrenaline system in the genesis of anxiety (Ressler and Nemeroff, 2000; Ballenger, 2001; Rickels and Rynn, 2002; Gorman, 2003), it has been hypothesized that medications modulating this system would be an effective treatment far this disorder. A serotonin/noradrenalin reuptake inhibitor venlafaxine, was the first drug approved for the treatment of GAD and has also been effective in treating depression (Thase et al., 2001; Sheehan 1999). However, the anxiolytic effect of

venlafaxine is only reached after some weeks of treatment (Davidson et al., 1999; Gelenberg et al., 2000; Rickels et al., 2000; Kelsey, 2000; Katz et al., 2002). Tricyclic antidepressants (TCAs) also modulate 5-HT and/or NA, having varying effects for these neurotransmitters. Imipramine in particular has been used as an antidepressant/anxiolytic agent (Lydiard et al., 1996).

In our results, milnacipran showed anxiolytic-like effects in the chronic treatment probably due to functional interaction between the serotonergic and noradrenergic neuronal systems induced by milnacipran (Rénéric et al., 2001, 2002; Tachibana et al., 2004). In addition, milnacipran has been also recognized as a non-competitive NMDA receptor antagonist (Shuto et al., 1995; Kazuta et al., 2002). Although the binding affinity of milnacipran for the NMDA receptor is not very high, the compound has the advantage of sufficiently penetrating into the brain without serious side effects (Ansseau et al., 1994; Artigas, 1995; Kazuta et al., 2002), making it a useful to treat depression and anxiety.

We have also evaluated other cognitive parameters, such as learning, memory and habituation to a novel environment, after acute and chronic milnacipran treatment. In the open-field task, no significant difference in the numbers of crossings and rearings was observed among groups, either in the acute or in the chronic treatment with milnacipran when compared to control, indicating that milnacipran did not alter contextual memory of the animals. All groups showed training-test significant difference, demonstrating no interference of milnacipran in the habituation to a novel environment.

In the Inhibitory Avoidance Task was observed significant difference between training-test latencies in all groups. In addition, there were no significant

difference in the training and test latencies among groups, showing that acute and chronic milnacipran administration did not affect memory retention in rats.

Taken together, our findings indicate an anxiolytic-like effect of milnacipran after chronic treatment without other cognitive alterations, differentially of imipramine that, in previous reports, showed to induce an anxiolytic effect (Lydiard et al., 1996) but produced impairment on memory retention in animal models (Zarrindast et al., 2003, 2004). In addition, the possible effect of milnacipran in NMDA receptors can also contribute to its anxiolytic-like effects and do not interfere in memory retention and habituation to a novel environment. These results suggest that milnacipran can also be an effective treatment for anxiety.

Acknowledgements

This research was supported by grants from CNPq, FUNCITEC and UNESC (Brazil).

References

- Abelson J L, Glitz D, Cameron O G, Lee M A, Bronzo M, Curtis G C (1991) Blunted growth hormone response to clonidine in patients with generalized anxiety disorder. *Arch Gen Psychiatry* 48:157-62.
- Anseau M, Papart P, Troisfontaines B, Bartholome F, Bataille M, Charles G, Schittecatte M, Darimont P, Devoitille J M, De Wilde J, et al. (1994) Controlled comparison of milnacipran and fluoxetine in major depression. *Psychopharmacology (Berl)* 114: 131-7.
- Anseau M, von Frenckell R, Mertens C, de Wilde J, Botte L, Devoitille J M, Evrard J L, De Nayer A, Darimont P, Dejaiffe G, et al. (1989). Controlled comparison of two doses of milnacipran (F 2207) and amitriptyline in major depressive inpatients. *Psychopharmacology (Berl)* 98: 163-8.
- Artigas F (1995) Selective serotonin noradrenaline reuptake inhibitors (SNRIs): pharmacology and therapeutic potential in the treatment of depressive disorders. *CNS drugs* 4: 79-89.
- Ballanger JC (2001) Overview of different pharmacotherapies for attaining remission in generalized anxiety disorder. *J Clin Psychiatry* 62: 11-19.
- Blier P, de Montigny C, Chaput Y (1990) A role for the serotonin system in the mechanism of action of antidepressant treatments: preclinical evidence. *J Clin Psychiatry* 51: 14-20; discussion 21.
- Bourin M, Redrobe J P, Hascoet M, Baker G B, Colombel M C (1996) A schematic representation of the psychopharmacological profile of antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 20: 1389-402.

- Caldecott-Hazard S, Morgan D G, DeLeon-Jones F, Overstreet D H, Janowsky D (1991) Clinical and biochemical aspects of depressive disorders: II. Transmitter/receptor theories. *Synapse* 9: 251-301.
- Cameron O G, Smith C B, Lee M A, Hollingsworth P J, Hill E M, Curtis G C (1990) Adrenergic status in anxiety disorders: platelet alpha 2-adrenergic receptor binding, blood pressure, pulse, and plasma catecholamines in panic and generalized anxiety disorder patients and in normal subjects. *Biol Psychiatry* 28: 3-20.
- Cao B J, Rodgers R J (1998) Comparative effects of novel 5-HT_{1A} receptor ligands, LY293284, LY315712 and LY297996, on plus-maze anxiety in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 139: 185-94.
- Chopin P, Briley M (1987) Animal models of anxiety: The effects of compounds that modify 5-HT neurotransmission. *Trens Pharmacol Sci* 8: 383-389.
- Collinson N, Dawson G R (1997) On the elevated plus-maze the anxiolytic-like effects of the 5-HT(1A) agonist, 8-OH-DPAT, but not the anxiogenic-like effects of the 5-HT(1A) partial agonist, buspirone, are blocked by the 5-HT_{1A} antagonist, WAY 100635. *Psychopharmacology (Berl)* 132: 35-43.
- Davidson J R, DuPont R L, Hedges D, Haskins J T (1999) Efficacy, safety, and tolerability of venlafaxine extended release and buspirone in outpatients with generalized anxiety disorder. *J Clin Psychiatry* 60: 528-35.
- Delgado P L, Miller H L, Salomon R M, Licinio J, Heninger G R, Gelenberg A J, Charney D S (1993) Monoamines and the mechanism of antidepressant action: effects of catecholamine depletion on mood of patients treated with antidepressants. *Psychopharmacol Bull* 29: 389-96.

- Delgado P L, Price L H, Miller H L, Salomon R M, Licinio J, Krystal J H, Heninger G R, Charney D S (1991) Rapid serotonin depletion as a provocative challenge test for patients with major depression: relevance to antidepressant action and the neurobiology of depression. *Psychopharmacol Bul* 27: 321-30.
- Eison M S (1990) Serotonin: a common neurobiologic substrate in anxiety and depression. *J Clin Psychopharmacol* 10: 26S-30S.
- File S E (1985) Animal models for predicting clinical efficacy of anxiolytic drugs: social behaviour. *Neuropsychobiology* 13: 55-62.
- Gelenberg A J, Lydiard R B, Rudolph R L, Aguiar L, Haskins J T, Salinas E (2000) Efficacy of venlafaxine extended-release capsules in nondepressed outpatients with generalized anxiety disorder: A 6-month randomized controlled trial. *JAMA* 283: 3082-8.
- Gorman JM (2003) Treating generalized anxiety disorder. *J Clin Psychiatry* 64: 24-29.
- Gray J A (1988) The neuropsychological basis of anxiety. In Last C G, Hersen M, (eds), *Handbook of anxiety disorders*. 1st ed. New York, NY: Pergamon Press.
- Griebel G (1995) 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. *Pharmacol Ther* 65: 319-95.
- Handley S L (1995) 5-Hydroxytryptamine pathways in anxiety and its treatment. *Pharmacol Ther* 66: 103-48.
- Handley S L, McBlane J W (1992) Opposite effects of fluoxetine in two animal models of anxiety. *Br J Pharmacol* 107: 466.

- Hascoet M, Bourin M, Colombel M C, Fiocco A J, Baker G B (2000) Anxiolytic-like effects of antidepressants after acute administration in a four-plate test in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 65: 339-44.
- Katz I R, Reynolds C F 3rd, Alexopoulos G S, Hackett D (2002) Venlafaxine ER as a treatment for generalized anxiety disorder in older adults: pooled analysis of five randomized placebo-controlled clinical trials. *J Am Geriatr Soc* 50: 18-25.
- Kazuta Y, Tsujita R, Ogawa K, Hokonohara T, Yamashita K, Morino K, Matsuda A, Shuto S (2002) Synthesis of (1S,2R)-1-phenyl-2-[(S)-1-aminopropyl]-N,N-diethylcyclopropanecarboxamide (PPDC) derivatives modified at the carbamoyl moiety as a new class of NMDA receptor antagonists. *Bioorg Med Chem* 10:1777-91.
- Kelsey J E (2000) Efficacy, safety, and tolerability of venlafaxine XR in generalized anxiety disorder. *Depress Anxiety* 12: 81-4.
- Linnoila M, Eckardt M, Durcan M, Lister R, Martin P (1987) Interactions of serotonin with ethanol: clinical and animal studies. *Psychopharmacol Bull* 23: 452-7.
- Lucki I (1996) Serotonin receptor specificity in anxiety disorders. *J Clin Psychiatry* 57: 5-10.
- Lydiard R B, Brawman-Mintzer O, Ballenger J C (1996) Recent developments in the psychopharmacology of anxiety disorders. *J Consult Clin Psychol* 64: 660-8.
- Macher J P, Sichel J P, Serre C, Von Frenckell R, Huck J C, Demarez J P (1989) Double-blind placebo-controlled study of milnacipran in hospitalized patients with major depressive disorders. *Neuropsychobiology* 22: 77-82.

- Miyamoto J, Tsuji M, Takeda H, Ohzeki M, Nawa H, Matsumiya T (2004) Characterization of the anxiolytic-like effects of fluvoxamine, milnacipran and risperidone in mice using the conditioned fear stress paradigm. *Eur J Pharmacol* 504: 97-103.
- Mochizuki D, Tsujita R, Yamada S, Kawasaki K, Otsuka Y, Hashimoto S, Hattori T, Kitamura Y, Miki N (2002) Neurochemical and behavioural characterization of milnacipran, a serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 162: 323-32.
- Nelson J C, Mazure C M, Bowers M B Jr, Jatlow P I (1991) A preliminary, open study of the combination of fluoxetine and desipramine for rapid treatment of major depression. *Arch Gen Psychiatry* 48: 303-7.
- Ninan P T (1999) The functional anatomy, neurochemistry, and pharmacology of anxiety. *J Clin Psychiatry* 60: 12-7.
- Nowakowska E, Chodera A, Kus K (1996) Anxiolytic and memory improving activity of fluoxetine. *Pol J Pharmacol* 48: 255-60.
- Pellow S, Chopin P, File S E, Briley M (1985). Validation of open/closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 14: 149-176.
- Quevedo J, Vianna M R, Roesler R, de-Paris F, Izquierdo I, Rose S P (1999) Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learn Mem* 6: 600-607.
- Reneric J P, Bouvard M, Stinus L (2001) Idazoxan and 8-OH-DPAT modify the behavioral effects induced by either NA, or 5-HT, or dual NA/5-HT reuptake

inhibition in the rat forced swimming test. *Neuropsychopharmacology* 24: 379-90.

Reneric J P, Bouvard M, Stinus L (2002) In the rat forced swimming test, NA-system mediated interactions may prevent the 5-HT properties of some subacute antidepressant treatments being expressed. *Eur Neuropsychopharmacol* 12: 159-71.

Ressler K J, Nemeroff C B (2000) Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. *Depress Anxiety* 12: 2-19.

Rickels K, Pollack M H, Sheehan D V, Haskins J T (2000) Efficacy of extended-release venlafaxine in nondepressed outpatients with generalized anxiety disorder. *Am J Psychiatry* 157: 968-74.

Rickels K, Rynn (2002) Pharmacotherapy of generalized anxiety disorders. *J Clin Psychiatry* 63: 9-16.

Rickels K, Schweizer E E (1987) Current pharmacotherapy in anxiety and panic. In: Meltzer HY (Editor), *Psychopharmacology: The Third Generation of Progress*. Raven Press, New York, NY, USA, 1193-1203.

Rocca P, Fonzo V, Scotta M, Zanalda E, Ravizza L (1997) Paroxetine efficacy in the treatment of generalized anxiety disorder. *Acta Psychiatr Scand* 95: 444-50.

Schweizer E, Weise C, Clary C, Fox I, Rickels K (1991) Placebo-controlled trial of venlafaxine for the treatment of major depression. *J Clin Psychopharmacol* 11: 233-6.

- Seth R, Jennings A L, Bindman J, Phillips J, Bergmann K (1992) Combination treatment with noradrenalin and serotonin reuptake inhibitors in resistant depression. *Br J Psychiatry* 161: 562-5.
- Sheehan D V (1999) Venlafaxine extended release (XR) in the treatment of generalized anxiety disorder. *J Clin Psychiatry* 60: 23-8.
- Shuto S, Takada H, Mochizuki D, Tsujita R, Hase Y, Ono S, Shibuya N, Matsuda A (1995) (+/-)-(Z)-2-(aminomethyl)-1-phenylcyclopropanecarboxamide derivatives as a new prototype of NMDA receptor antagonists. *J Med Chem* 38: 2964-8.
- Tachibana K, Matsumoto M, Togashi H, Kojima T, Morimoto Y, Kemmotsu O, Yoshioka M (2004) Milnacipran, a serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor, suppresses long-term potentiation in the rat hippocampal CA1 field via 5-HT_{1A} receptors and alpha 1-adrenoceptors. *Neurosci Lett* 357: 91-4.
- Thase M E, Entsuah A R, Rudolph R L (2001) Remission rates during treatment with venlafaxine or selective serotonin reuptake inhibitors. *Br J Psychiatry* 178: 234-41.
- Vianna M R, Alonso M, Viola H, Quevedo J, de Paris F, Furman M, de Stein M L, Medina J H, Izquierdo I (2000) Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem.* 7: 333-340.
- Weilburg J B, Rosenbaum J F, Biederman J, Sachs G S, Pollack M H, Kelly K (1989) Fluoxetine added to non-MAOI antidepressants converts nonresponders to responders: a preliminary report. *J Clin Psychiatry* 50: 447-9.

Zarrindast M R, Ghiasvand M, Homayoun H, Rostami P, Shafaghi B, Khavandgar S (2003) Adrenoceptor mechanisms underlying imipramine-induced memory deficits in rats. *J Psychopharmacol* 17: 83-8.

Zarrindast M R, Shamsi T, Azarmina P, Rostami P, Shafaghi B (2004) GABAergic system and imipramine-induced impairment of memory retention in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 14: 59-64.

Legend of figures

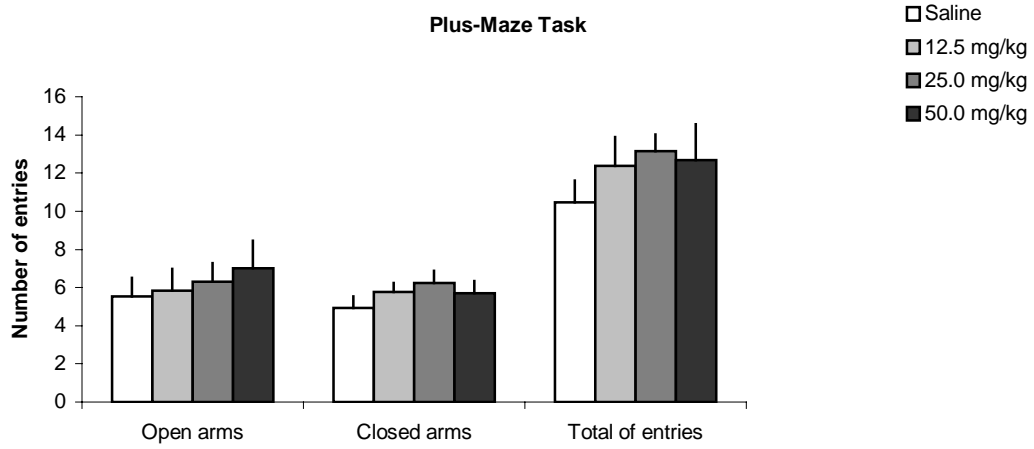
Figure 1. Elevated plus-maze. Data are expressed as mean \pm SEM. **Acute treatment:** no significant difference was observed in the number of entries (**A**) and time spent in the arms (**B**). **Chronic treatment:** the number of entries in the open arms was increased at doses of 25 and 50 mg/kg ($p < 0,001$), the number of entries in the closed arms was decreased at dose of 50 mg/kg ($p < 0,05$) of milnacipran and no significant difference was observed in the total number of entries (**C**). The time spent in the open arms was increased and decreased in the closed arms at doses of 25 and 50 mg/kg ($p < 0,05$) (**D**).

Figure 2. Inhibitory avoidance task. Data are expressed as median (interquartile ranges) training and test session latencies, in seconds. All groups ($n=13-15$), showed significant training-test differences (Wilcoxon test, $p < 0.01$) in the acute (**A**) and chronic (**B**) treatment.

Figure 3. Open-field task. Data are expressed as mean \pm SEM of number of crossings and rearings in the training and test session. All groups ($n=13-15$) showed training-test difference (Student-*t* test, $p < 0.0001$) and no significant difference was observed in the number of crossings and rearings in the training and test sessions among groups in the acute (**A**) and chronic (**B**) treatment. In the figures, C and R mean crossings and rearings, respectively.

Figure 1

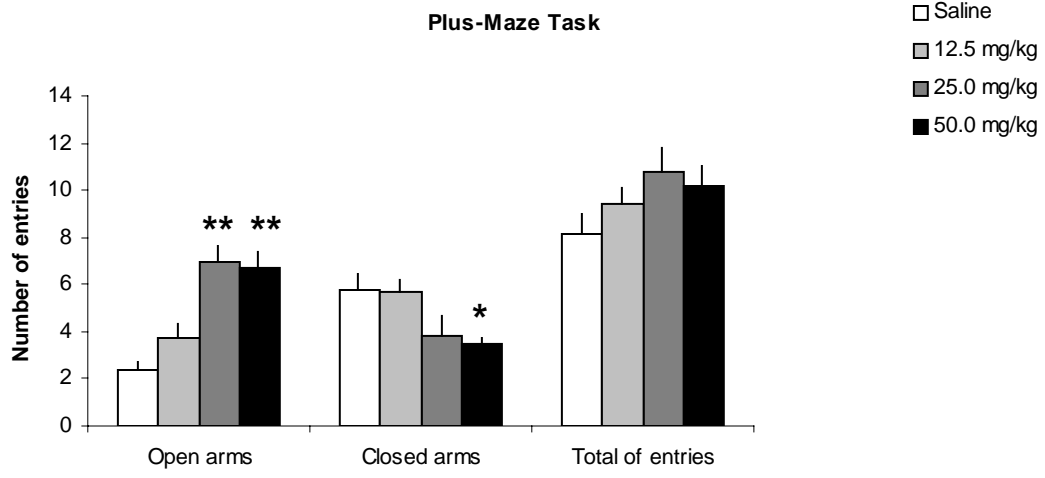
A



B



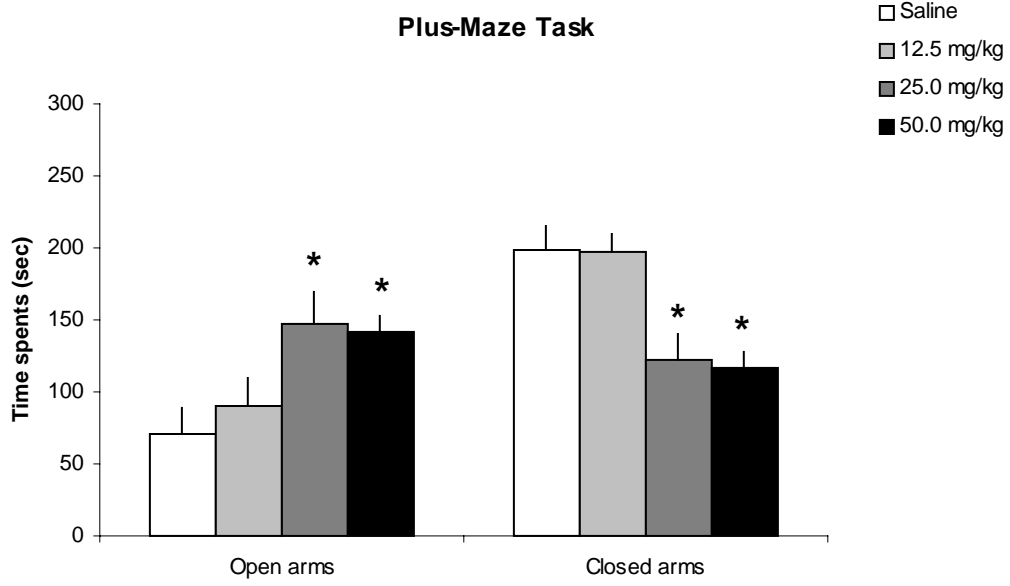
C



* $p < 0.05$

** $p < 0.001$

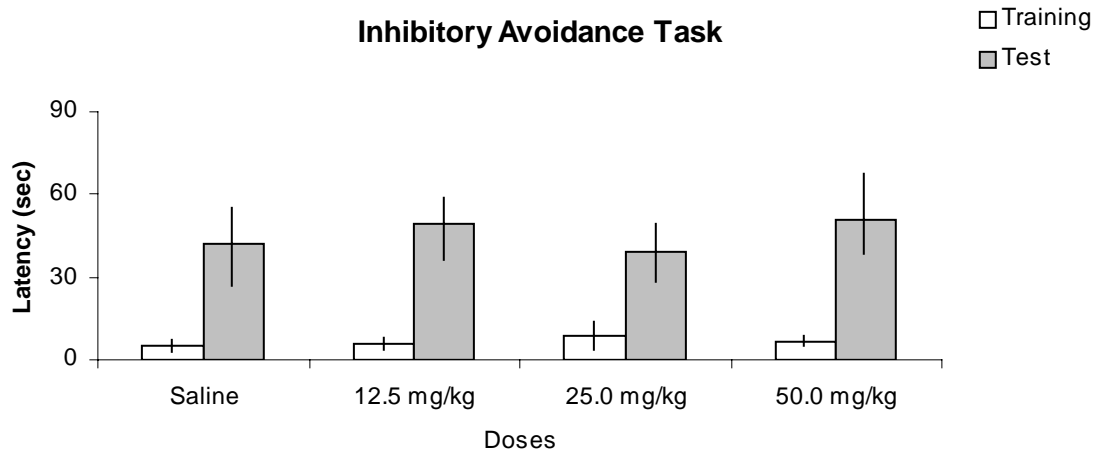
D



*p < 0.05

Figure 2

A



B

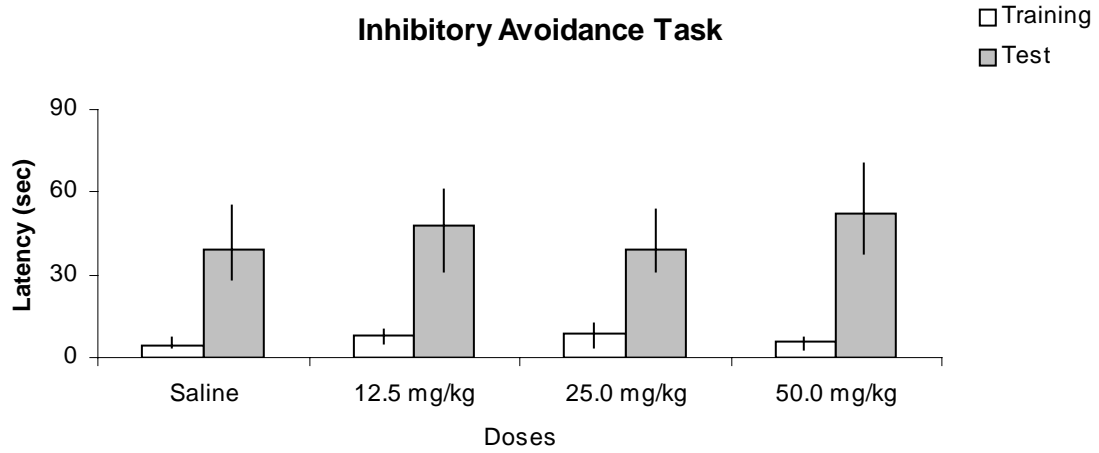
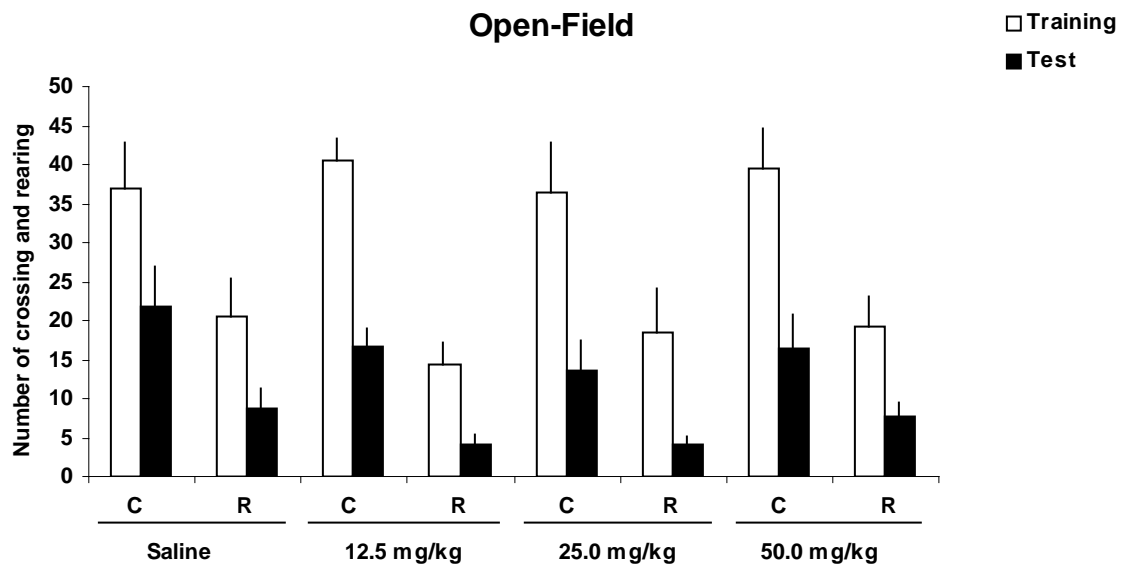
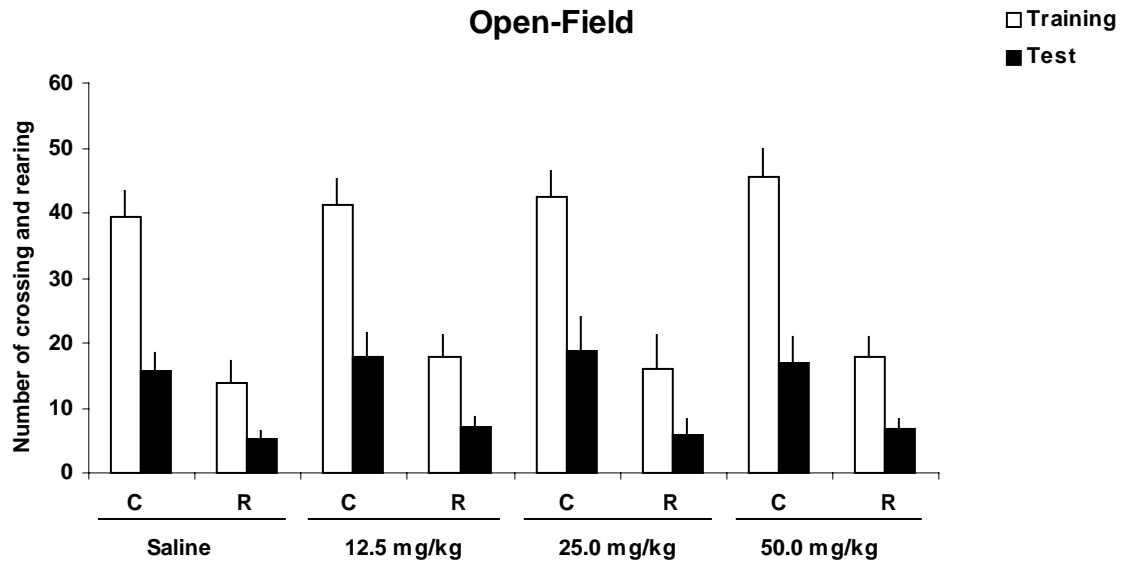


Figure 3

A



B



5. ARTIGO TRADUZIDO

Efeitos da administração aguda e crônica de milnaciprano em modelo animal de ansiedade e memória

Vânia K. M. Moojen¹, Márcio Rodrigo Martins¹, Adalisa Reinke¹, Gustavo Feier¹, Fabiano R. Agostinho¹, Édson M. Cechin² e João Quevedo¹

¹Laboratório de Neurociências, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brasil.

²Grupo de Neurociências, Faculdade de Medicina, Universidade de Passo Fundo, 99100-000, Passo Fundo, RS, Brasil.

Prof. João Quevedo, M.D., Ph.D. – Laboratório de Neurociências, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brasil.

Fax: # 55 48 443 4817. E-mail: quevedo1@terra.com.br

Resumo

Serotonina (5-HT) e norepinefrina (NE) estão envolvidas na patogênese e recuperação da depressão e ansiedade. Nós analisamos os efeitos dos tratamentos agudo e crônico com milnaciprano, um antidepressivo inibidor da recaptação da serotonina e norepinefrina (IRSNE) sobre a ansiedade e a retenção de memória em ratos. Ratos Wistar machos receberam doses agudas ou crônicas de milnaciprano (12.5, 25 ou 50 mg/kg) ou salina (grupo controle). Os animais foram separadamente submetidos ao labirinto em cruz elevado, esQUIVA INIBITÓRIA e habituação ao campo-aberto 1 h após a injeção, no grupo agudo, ou 23 h após a última injeção, no grupo crônico. Nossos resultados mostraram um efeito ansiolítico após administração crônica de milnaciprano nas doses de 25 e 50 mg/kg. O tratamento não interferiu na retenção de memória e adaptação a um novo ambiente nas doses estudadas. Estes achados suportam que o milnaciprano, um estabelecido antidepressivo IRSNE, pode também ser usado no tratamento de transtornos de ansiedade.

Introdução

No tratamento dos transtornos de ansiedade, o uso de antidepressivos (AD) pode ser uma alternativa eficaz comparado aos benzodiazepínicos, que são conhecidos por terem um elevado potencial para dependência e efeitos sedativos. Os inibidores seletivos da recaptação da serotonina-5HT- (ISRS) têm sido descritos como tratamento eficaz para transtorno de ansiedade generalizada (TAG) (Rocca et al., 1997; Ballenger, 2001; Rickels and Rynn, 2002; Gorman, 2003).

Apesar de ensaios clínicos terem demonstrado resultados promissores no que diz respeito aos efeitos dos AD sobre a ansiedade, resultados obtidos em modelos animais de ansiedade (File, 1985; Chopin and Briley, 1987; Linnoila et al., 1987; Hascoet et al. 2000, Mochizuki et al., 2002; Miyamoto et al., 2004) têm permanecido variáveis e controversos. A administração aguda de AD estabelecidos, em animais, tem sido descrita como causadora de efeitos ansiogênicos em alguns estudos (Linnoila et al., 1987; Mochizuki et al., 2002) e efeitos inespecíficos em outros (Chopin and Briley, 1987; File, 1985). Contudo, vários autores têm demonstrado que AD devem elicitar respostas ansiolíticas (Handley and McBlane, 1992; Bourin et al., 1996; Nowakowska et al., 1996; Miyamoto et al., 2004).

Serotonina (5-HT) e norepinefrina (NE) estão envolvidas na patogênese e recuperação da depressão e ansiedade (Blier et al., 1990; Caldecott Hazard et al., 1991; Delgado et al., 1991,1993; Ballenger, 2001; Rickels and Rynn, 2002; Gorman, 2003). A combinação de ISRS e de inibidores seletivos da recaptação de

norepinefrina (ISRNE) têm demonstrado aumentar a eficácia antidepressiva e a melhora da depressão refratária (Weilburg et al., 1989; Seth et al., 1992) ou reduzir a duração de 3-4 semanas até início dos efeitos terapêuticos sobre o humor e comportamento (Nelson et al., 1991). Ao mesmo tempo, foi desenvolvida uma nova classe de medicamentos antidepressivos, chamados de inibidores da recaptação da serotonina/norepinefrina (IRSN). Estes fármacos, como o milnaciprano e a venlafaxina (Artigas, 1995) são ao menos tão eficazes quanto os ISRS e os antidepressivos tricíclicos (ADT) na depressão maior (Ansseau et al., 1989; Marcher et al., 1989; Schweizer et al., 1991).

O inibidor seletivo da recaptação da serotonina/norepinefrina venlafaxina foi o primeiro fármaco aprovado para o tratamento do TAG e também tem sido demonstrado como eficaz no tratamento da depressão (Sheehan 1999; Thase et al., 2001). Contudo, existem poucos trabalhos referidos avaliando os efeitos do milnaciprano. Na literatura existem raras publicações avaliando os efeitos do milnaciprano; porém há poucos trabalhos avaliando os efeitos do milnaciprano, um ISRSNE estabelecido como antidepressivo, sobre a ansiedade (Mochizuki et al., 2002) e outros parâmetros, como memória e adaptação a um novo ambiente.

Neste artigo, nós avaliamos os efeitos do milnaciprano sobre a ansiedade, memória e adaptação a um novo ambiente.

Materiais e Métodos

Animais

Ratos Wistar machos (250-300 g) foram obtidos de nossa colônia. Eles ficavam em grupos de cinco, em uma caixa, com alimentação e água disponíveis ad libitum, sendo mantidos em um ciclo luz/escuro de doze horas (luzes ligam às 7:00 AM). Os procedimentos comportamentais foram concluídos entre 13:00 e 16:00 h. Todos os procedimentos envolvendo animais foram feitos conforme o *National Institutes of Health Guidelines* e foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Delineamento Experimental

Os animais foram submetidos ao tratamento agudo (uma injeção) ou crônico (injeções durante 28 dias) com milnaciprano. Em ambos os tratamentos, os ratos receberam intraperitonealmente solução salina ou milnaciprano (12.5, 25 or 50 mg/kg) em um volume de 1ml/kg. Os animais foram separadamente submetidos a tarefas comportamentais 1 h após a injeção, no tratamento agudo, ou 23 h após a última injeção, no tratamento crônico.

Tarefas Comportamentais

O labirinto em cruz elevado (*plus-maze*), usado em modelos animais de ansiedade, é descrito em detalhes na literatura (Rickels and Schweizer, 1987; Pellow et al., 1985).

Brevemente, o aparato consiste de dois braços abertos (50 x 10 cm) e dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm) arranjados de modo que dois braços estejam opostos de cada lado, e uma plataforma central (5 x 5 cm). A altura é de 50 cm e os testes foram conduzidos sobre luz vermelha. Os animais foram expostos à luz vermelha durante 5 minutos em suas caixas antes do procedimento. Após, foram colocados individualmente no centro da plataforma do labirinto em cruz elevado. Durante os 5 minutos posteriores, as seguintes medidas foram efetuadas por dois observadores: o número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos e fechados e o número total de entradas nos braços.

O aparato e o procedimento para esquiva inibitória foram descritos previamente (Quevedo et al, 1999). Descrevendo brevemente, o aparato consiste de uma caixa em acrílico, medindo 50 x 25 x 25 cm (Albarsch, Porto Alegre, Brasil) com o piso consistindo em grade de barras paralelas de alumínio (1 mm de diâmetro) com espaços de 1 cm entre si. Uma plataforma com 7 cm de comprimento e 2,5 cm de altura é colocada no piso, na lateral direita da caixa. No experimento, os animais foram colocados sobre a plataforma e a latência (tempo) para o animal descer da plataforma foi medida com um cronômetro automático. Imediatamente após a descida, os animais receberam um choque de 0.4 mA por 2.0 s nas patas e retornaram à caixa. Após 24 horas, foi repetido o procedimento para verificar retenção. Este procedimento foi idêntico ao anterior, exceto que não houve aplicação de choque. O tempo de latência (máximo de 180 s) foi usado como medida para retenção de esquiva inibitória.

Habituação ao campo aberto (*open-field*) foi realizada em um campo aberto de 40 x 60 cm cercado por paredes altas de 50 cm feitas de madeira compensada

marrom, com uma parede frontal de vidro. O piso foi dividido em 12 retângulos iguais por linhas pretas. Os animais foram cuidadosamente colocados no quadrante esquerdo e deixados para explorarem a arena por 5 minutos (sessão de treinamento). Imediatamente após, os animais foram levados às suas caixas, e 24 h após, submetidos novamente à sessão similar de habituação ao campo aberto (sessão teste). Os cruzamentos através das linhas pretas e os *rearings* (cada vez que o rato se levantou para explorar) feitos nas duas sessões foram contados. O decréscimo no número de cruzamentos e *rearings* entre as duas sessões foi usado como medida da retenção de habituação (Vianna et al., 2000).

Análise Estatística

Os dados relativos ao labirinto em cruz elevado e habituação ao campo aberto foram descritos como média \pm erro padrão da média e foram analisados por ANOVA *one-way* seguido por teste de Duncan. Na habituação ao campo aberto as diferenças entre as sessões de treino e teste foram avaliadas pelo teste t de Student. As análises obtidas do teste para esquiva inibitória foram não-paramétricas porque este procedimento envolve um ponto de corte. Os dados são descritos como medianas (escalas interquartis) e foram descritos pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Mann-Whitney quando necessário. As diferenças treino-teste foram avaliadas pelo teste de Wilcoxon. Os valores de p inferiores a 0,05 foram considerados como estatisticamente significativos.

Resultados

Labirinto em cruz elevado

No tratamento crônico, nós observamos um aumento significativo no número de entradas nos braços abertos nas doses de 25 e 50 mg/kg ($p < 0,001$) e uma redução significativa no número de entradas nos braços fechados na dose de 50 mg/kg ($p < 0,05$) de milnaciprano (figure 1.C). Além disso, nós observamos um aumento significativo no tempo gasto nos braços abertos ($p < 0,05$) e diminuição no tempo gasto nos braços fechados ($p < 0,05$) nas doses de 25 e 50 mg/kg de milnaciprano (figura 1.D).

No tratamento agudo, não foram observadas diferenças significativas entre grupos nos parâmetros avaliados (figure 1.A e 1.B).

Esquiva inibitória

Todos os grupos mostraram uma diferença significativa na latência de permanência na plataforma entre sessão treino e teste ($p < 0,005$), mas não houve diferença significativa entre as latências do treino e teste entre grupos ($p > 0,12$) no tratamento agudo (figure 2.A) e crônico (figure 2.B).

Campo aberto

Todos os grupos mostraram uma diferença significativa no número de cruzamentos e *rearings* entre sessões treino e teste ($p < 0,05$). Contudo, não houve diferença significativa no número de cruzamentos e *rearings* nas sessões treino e teste entre os grupos ($p > 0,19$) nos tratamentos agudo (figure 3.A) e crônico (figure 3.B).

Discussão

Neste trabalho, nós demonstramos um efeito ansiolítico do milnaciprano no tratamento crônico. Nós observamos um aumento no número de entradas nos braços abertos nos animais cronicamente tratados com 25 e 50 mg/kg de milnaciprano. Ao mesmo tempo, observamos uma diminuição no número de entradas nos braços fechados no grupo cronicamente tratado com 50 mg/kg. Não foi detectada diferença estatisticamente significativa no número total de entradas entre grupos, demonstrando ausência de diferença na atividade motora entre os grupos estudados. No tratamento agudo, não foi observada diferença estatisticamente significativa nos parâmetros para ansiedade entre grupos.

Achados neurofarmacológicos dos dados suportam a noção de que a 5-HT possa ser um substrato neurobiológico na ansiedade e depressão (Eison, 1990; Ballenger, 2001). Manipulações farmacológicas do sistema serotoninérgico em modelos animais indicam que mecanismos diferentes (provavelmente especificidade aos receptores 5-HT) (Lucki, 1996) estão envolvidos no desenvolvimento da ansiedade (Handley, 1995; Griebel, 1995). O subtipo 5-HT_{1A} de receptor, em particular, tem demonstrado ser fundamental na gênese do comportamento ansioso em modelos animais (Cao and Rodgers, 1998; Collinson and Dawson, 1997).

Apesar do sistema serotoninérgico ser considerado uma das principais rotas envolvidas na ansiedade, 5-HT também tem efeitos modulatórios sobre o sistema noradrenérgico (Eison, 1990; Ninan, 1999; Ballenger, 2001). A interação entre 5-HT e norepinefrina é recíproca e então pode desempenhar um importante

papel na etiologia e tratamento da depressão e ansiedade (Eison, 1990; Ninan, 1999; Ballenger, 2001).

A norepinefrina facilita a resposta simpática, isto é., adaptações fisiológicas e comportamentais ao estresse e situações de alarme. Conseqüentemente, disfunções noradrenérgicas conduzem a alterações nos estados de medo e estímulos (Gray, 1988). Vários estudos têm sido associados à hipersensibilidade do receptor alfa-2-adrenérgico (Abelson et al., 1991) ou a uma redução na densidade dos sítios de ligação dos receptores alfa-2-adrenérgicos (Cameron et al., 1990) sobre a gênese do TAG, mas isto ainda não está totalmente esclarecido.

Devido a estas evidências neurobiológicas envolvendo os sistemas serotoninérgico e noradrenérgico sobre a gênese da ansiedade (Ressler and Nemeroff, 2000; Ballenger, 2001; Rickels and Rynn, 2002; Gorman, 2003), tem sido feita a hipótese de que medicações que modulam este sistema possam ser eficazes no tratamento deste distúrbio. A venlafaxina, um inibidor seletivo da recaptação da serotonina e da norepinefrina, foi o primeiro fármaco aprovado para o tratamento do TAG e tem demonstrado eficácia no tratamento da depressão (Thase et al., 2001; Sheehan 1999). Contudo, o efeito ansiolítico da venlafaxina é obtido após algumas semanas de tratamento (Davidson et al., 1999; Gelenberg et al., 2000; Rickels et al., 2000; Kelsey, 2000; Katz et al., 2002). Antidepressivos tricíclicos (ADT) podem também modular 5-HT e/ou NE, havendo variações para estes neurotransmissores. Particularmente a imipramina tem sido usada como um agente antidepressivo/ansiolítico (Lydiard et al., 1996).

Em nossos resultados, o milnaciprano mostrou efeito ansiolítico no tratamento crônico provavelmente devido à interação funcional entre os sistemas

serotoninérgico e noradrenérgico induzidos pelo milnaciprano (Rénéric et al., 2001, 2002; Tachibana et al., 2004). Além disso, milnaciprano tem sido reconhecido como um antagonista não-competitivo do receptor NMDA (Shuto et al., 1995; Kazuta et al., 2002). Apesar da afinidade da ligação do milnaciprano ao receptor NMDA não ser muito alta, o composto tem a vantagem de penetrar suficientemente no cérebro, sem efeitos adversos graves (Ansseau et al., 1994; Artigas, 1995; Kazuta et al., 2002), tornando-o útil para o tratamento da depressão e da ansiedade.

Nós também avaliamos outros parâmetros cognitivos, como aprendizado, memória e adaptação a um novo comportamento, após tratamento agudo e crônico com milnaciprano. Na habituação ao campo aberto não houve diferenças significativas no número de cruzamentos e *rearings* entre os grupos, nos tratamentos agudo e crônico com milnaciprano, em comparação com controles, indicando que o milnaciprano não altera a memória contextual dos animais. Em todos os grupos foi observada diferença significativa entre o treino e o teste, demonstrando ausência de interferência do milnaciprano na adaptação a um novo ambiente.

No teste de esQUIVA inibitória foi observada diferença significativa entre latências teste-treino em todos os grupos. Além disso, não há diferença estatisticamente significativa entre latências treino e teste em todos os grupos, mostrando que a administração aguda e crônica de milnaciprano não afeta a retenção da memória em ratos.

Juntamente, nós demonstramos neste artigo o efeito ansiolítico do milnaciprano após tratamento crônico sem outras alterações cognitivas, diferente

da imipramina que, em trabalhos prévios, mostrou um efeito ansiolítico (Lydiard et al., 1996) mas produziu prejuízo na retenção de memória em modelos animais (Zarrindast et al., 2003, 2004). Além disso, o possível efeito do milnaciprano sobre os receptores NMDA também pode contribuir para seus efeitos ansiolíticos e não interfere na retenção de memória e adaptação a um novo ambiente. Estes resultados sugerem que o milnaciprano possa ser eficaz no tratamento da ansiedade.

Agradecimentos

Deram suporte a este trabalho CNPq, FUNCITEC e UNESC (Brasil).

Referências

- Abelson J L, Glitz D, Cameron O G, Lee M A, Bronzo M, Curtis G C (1991) Blunted growth hormone response to clonidine in patients with generalized anxiety disorder. *Arch Gen Psychiatry* 48:157-62.
- Anseau M, Papart P, Troisfontaines B, Bartholome F, Bataille M, Charles G, Schittecatte M, Darimont P, Devoitille J M, De Wilde J, et al. (1994) Controlled comparison of milnacipran and fluoxetine in major depression. *Psychopharmacology (Berl)* 114: 131-7.
- Anseau M, von Frenckell R, Mertens C, de Wilde J, Botte L, Devoitille J M, Evrard J L, De Nayer A, Darimont P, Dejaille G, et al. (1989) Controlled comparison of two doses of milnacipran (F 2207) and amitriptyline in major depressive inpatients. *Psychopharmacology (Berl)* 98: 163-8.
- Artigas F (1995) Selective serotonin noradrenaline reuptake inhibitors (SNRIs): pharmacology and therapeutic potential in the treatment of depressive disorders. *CNS drugs* 4: 79-89.
- Ballanger JC (2001) Overview of different pharmacotherapies for attaining remission in generalized anxiety disorder. *J Clin Psychiatry* 62: 11-19.
- Blier P, de Montigny C, Chaput Y (1990) A role for the serotonin system in the mechanism of action of antidepressant treatments: preclinical evidence. *J Clin Psychiatry* 51: 14-20; discussion 21.
- Bourin M, Redrobe J P, Hascoet M, Baker G B, Colombel M C (1996) A schematic representation of the psychopharmacological profile of antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 20: 1389-402.

- Caldecott-Hazard S, Morgan D G, DeLeon-Jones F, Overstreet D H, Janowsky D (1991) Clinical and biochemical aspects of depressive disorders: II. Transmitter/receptor theories. *Synapse* 9: 251-301.
- Cameron O G, Smith C B, Lee M A, Hollingsworth P J, Hill E M, Curtis G C (1990) Adrenergic status in anxiety disorders: platelet alpha 2-adrenergic receptor binding, blood pressure, pulse, and plasma catecholamines in panic and generalized anxiety disorder patients and in normal subjects. *Biol Psychiatry* 28: 3-20.
- Cao B J, Rodgers R J (1998) Comparative effects of novel 5-HT_{1A} receptor ligands, LY293284, LY315712 and LY297996, on plus-maze anxiety in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 139: 185-94.
- Chopin P, Briley M (1987) Animal models of anxiety: The effects of compounds that modify 5-HT neurotransmission. *Trends Pharmacol Sci* 8: 383-389.
- Collinson N, Dawson G R (1997) On the elevated plus-maze the anxiolytic-like effects of the 5-HT(1A) agonist, 8-OH-DPAT, but not the anxiogenic-like effects of the 5-HT(1A) partial agonist, buspirone, are blocked by the 5-HT_{1A} antagonist, WAY 100635. *Psychopharmacology (Berl)* 132: 35-43.
- Davidson J R, DuPont R L, Hedges D, Haskins J T (1999) Efficacy, safety, and tolerability of venlafaxine extended release and buspirone in outpatients with generalized anxiety disorder. *J Clin Psychiatry* 60: 528-35.
- Delgado P L, Miller H L, Salomon R M, Licinio J, Heninger G R, Gelenberg A J, Charney D S (1993) Monoamines and the mechanism of antidepressant action: effects of catecholamine depletion on mood of patients treated with antidepressants. *Psychopharmacol Bull* 29: 389-96.

- Delgado P L, Price L H, Miller H L, Salomon R M, Licinio J, Krystal J H, Heninger G R, Charney D S (1991) Rapid serotonin depletion as a provocative challenge test for patients with major depression: relevance to antidepressant action and the neurobiology of depression. *Psychopharmacol Bul* 27: 321-30.
- Eison M S (1990) Serotonin: a common neurobiologic substrate in anxiety and depression. *J Clin Psychopharmacol* 10: 26S-30S.
- File S E (1985) Animal models for predicting clinical efficacy of anxiolytic drugs: social behaviour. *Neuropsychobiology* 13: 55-62.
- Gelenberg A J, Lydiard R B, Rudolph R L, Aguiar L, Haskins J T, Salinas E (2000) Efficacy of venlafaxine extended-release capsules in nondepressed outpatients with generalized anxiety disorder: A 6-month randomized controlled trial. *JAMA* 283: 3082-8.
- Gorman JM (2003) Treating generalized anxiety disorder. *J Clin Psychiatry* 64: 24-29.
- Gray J A (1988) The neuropsychological basis of anxiety. In Last C G, Hersen M, (eds), *Handbook of anxiety disorders*. 1st ed. New York, NY: Pergamon Press.
- Griebel G (1995) 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. *Pharmacol Ther* 65: 319-95.
- Handley S L (1995) 5-Hydroxytryptamine pathways in anxiety and its treatment. *Pharmacol Ther* 66: 103-48.
- Handley S L, McBlane J W (1992) Opposite effects of fluoxetine in two animal models of anxiety. *Br J Pharmacol* 107: 466.

- Hascoet M, Bourin M, Colombel M C, Fiocco A J, Baker G B (2000) Anxiolytic-like effects of antidepressants after acute administration in a four-plate test in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 65: 339-44.
- Katz I R, Reynolds C F 3rd, Alexopoulos G S, Hackett D (2002) Venlafaxine ER as a treatment for generalized anxiety disorder in older adults: pooled analysis of five randomized placebo-controlled clinical trials. *J Am Geriatr Soc* 50: 18-25.
- Kazuta Y, Tsujita R, Ogawa K, Hokonohara T, Yamashita K, Morino K, Matsuda A, Shuto S (2002) Synthesis of (1S,2R)-1-phenyl-2-[(S)-1-aminopropyl]-N,N-diethylcyclopropanecarboxamide (PPDC) derivatives modified at the carbamoyl moiety as a new class of NMDA receptor antagonists. *Bioorg Med Chem* 10:1777-91.
- Kelsey J E (2000) Efficacy, safety, and tolerability of venlafaxine XR in generalized anxiety disorder. *Depress Anxiety* 12: 81-4.
- Linnoila M, Eckardt M, Durcan M, Lister R, Martin P (1987) Interactions of serotonin with ethanol: clinical and animal studies. *Psychopharmacol Bull* 23: 452-7.
- Lucki I (1996) Serotonin receptor specificity in anxiety disorders. *J Clin Psychiatry* 57: 5-10.
- Lydiard R B, Brawman-Mintzer O, Ballenger J C (1996) Recent developments in the psychopharmacology of anxiety disorders. *J Consult Clin Psychol* 64: 660-8.
- Macher J P, Sichel J P, Serre C, Von Frenckell R, Huck J C, Demarez J P (1989) Double-blind placebo-controlled study of milnacipran in hospitalized patients with major depressive disorders. *Neuropsychobiology* 22: 77-82.

- Miyamoto J, Tsuji M, Takeda H, Ohzeki M, Nawa H, Matsumiya T (2004) Characterization of the anxiolytic-like effects of fluvoxamine, milnacipran and risperidone in mice using the conditioned fear stress paradigm. *Eur J Pharmacol* 504: 97-103.
- Mochizuki D, Tsujita R, Yamada S, Kawasaki K, Otsuka Y, Hashimoto S, Hattori T, Kitamura Y, Miki N (2002) Neurochemical and behavioural characterization of milnacipran, a serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 162: 323-32.
- Nelson J C, Mazure C M, Bowers M B Jr, Jatlow P I (1991) A preliminary, open study of the combination of fluoxetine and desipramine for rapid treatment of major depression. *Arch Gen Psychiatry* 48: 303-7.
- Ninan P T (1999) The functional anatomy, neurochemistry, and pharmacology of anxiety. *J Clin Psychiatry* 60: 12-7.
- Nowakowska E, Chodera A, Kus K (1996) Anxiolytic and memory improving activity of fluoxetine. *Pol J Pharmacol* 48: 255-60.
- Pellow S, Chopin P, File S E, Briley M (1985). Validation of open/closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 14: 149-176.
- Quevedo J, Vianna M R, Roesler R, de-Paris F, Izquierdo I, Rose S P (1999) Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learn Mem* 6: 600-607.
- Reneric J P, Bouvard M, Stinus L (2001) Idazoxan and 8-OH-DPAT modify the behavioral effects induced by either NA, or 5-HT, or dual NA/5-HT reuptake

inhibition in the rat forced swimming test. *Neuropsychopharmacology* 24: 379-90.

Reneric J P, Bouvard M, Stinus L (2002) In the rat forced swimming test, NA-system mediated interactions may prevent the 5-HT properties of some subacute antidepressant treatments being expressed. *Eur Neuropsychopharmacol* 12: 159-71.

Ressler K J, Nemeroff C B (2000) Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. *Depress Anxiety* 12: 2-19.

Rickels K, Pollack M H, Sheehan D V, Haskins J T (2000) Efficacy of extended-release venlafaxine in nondepressed outpatients with generalized anxiety disorder. *Am J Psychiatry* 157: 968-74.

Rickels K, Rynn (2002) Pharmacotherapy of generalized anxiety disorders. *J Clin Psychiatry* 63: 9-16.

Rickels K, Schweizer E E (1987) Current pharmacotherapy in anxiety and panic. In: Meltzer HY (Editor), *Psychopharmacology: The Third Generation of Progress*. Raven Press, New York, NY, USA, 1193-1203.

Rocca P, Fonzo V, Scotta M, Zanalda E, Ravizza L (1997) Paroxetine efficacy in the treatment of generalized anxiety disorder. *Acta Psychiatr Scand* 95: 444-50.

Schweizer E, Weise C, Clary C, Fox I, Rickels K (1991) Placebo-controlled trial of venlafaxine for the treatment of major depression. *J Clin Psychopharmacol* 11: 233-6.

- Seth R, Jennings A L, Bindman J, Phillips J, Bergmann K (1992) Combination treatment with noradrenalin and serotonin reuptake inhibitors in resistant depression. *Br J Psychiatry* 161: 562-5.
- Sheehan D V (1999) Venlafaxine extended release (XR) in the treatment of generalized anxiety disorder. *J Clin Psychiatry* 60: 23-8.
- Shuto S, Takada H, Mochizuki D, Tsujita R, Hase Y, Ono S, Shibuya N, Matsuda A (1995) (+/-)-(Z)-2-(aminomethyl)-1-phenylcyclopropanecarboxamide derivatives as a new prototype of NMDA receptor antagonists. *J Med Chem* 38: 2964-8.
- Tachibana K, Matsumoto M, Togashi H, Kojima T, Morimoto Y, Kemmotsu O, Yoshioka M (2004) Milnacipran, a serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor, suppresses long-term potentiation in the rat hippocampal CA1 field via 5-HT_{1A} receptors and alpha 1-adrenoceptors. *Neurosci Lett* 357: 91-4.
- Thase M E, Entsuah A R, Rudolph R L (2001) Remission rates during treatment with venlafaxine or selective serotonin reuptake inhibitors. *Br J Psychiatry* 178: 234-41.
- Vianna M R, Alonso M, Viola H, Quevedo J, de Paris F, Furman M, de Stein M L, Medina J H, Izquierdo I (2000) Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem.* 7: 333-340.
- Weilburg J B, Rosenbaum J F, Biederman J, Sachs G S, Pollack M H, Kelly K (1989) Fluoxetine added to non-MAOI antidepressants converts nonresponders to responders: a preliminary report. *J Clin Psychiatry* 50: 447-9.

Zarrindast M R, Ghiasvand M, Homayoun H, Rostami P, Shafaghi B, Khavandgar S (2003) Adrenoceptor mechanisms underlying imipramine-induced memory deficits in rats. *J Psychopharmacol* 17: 83-8.

Zarrindast M R, Shamsi T, Azarmina P, Rostami P, Shafaghi B (2004) GABAergic system and imipramine-induced impairment of memory retention in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 14: 59-64.

Legendas das figuras

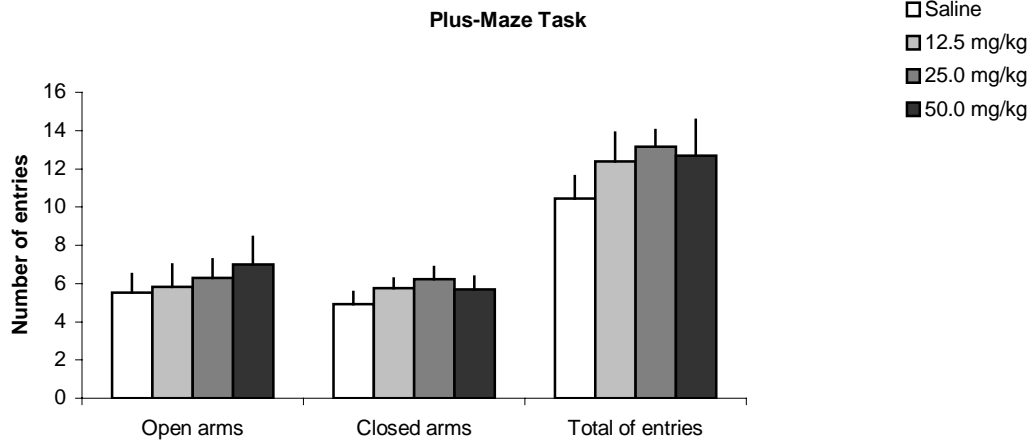
Figura 1. Labirinto em cruz elevado. Dados são expressos como média \pm erro padrão médio. **Tratamento agudo:** não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o número de entradas (**A**) e tempo gasto nos braços (**B**). **Tratamento crônico:** o número de entradas nos braços abertos foi aumentado nas doses de 25 e 50 mg/kg (** $p < 0,001$), o número de entradas nos braços fechados diminuiu na dose de 50 mg/kg (* $p < 0,05$) de milnaciprano e não foi observada diferença significativa no número total de entradas (**C**). O tempo gasto nos braços abertos estava aumentado e diminuído nos braços fechados nas doses de 25 e 50 mg/kg (* $p < 0,05$) (**D**).

Figura 2. Esquiva inibitória. Dados são expressos como médios (faixas interquartis) latência, em segundos, nas sessões teste e treino. Todos os grupos ($n=13-15$), mostraram diferenças treino-teste significativas (teste de Wilcoxon, $p < 0.01$) nos tratamentos agudo (**A**) e crônico (**B**).

Figura 3. Habituação ao campo aberto. Dados são expressos como média \pm erro padrão médio do número de cruzamentos e *rearings* nas sessões treino e teste. Todos os grupos ($n=13-15$) mostraram diferenças entre o treino e teste (teste t-Student-, $p < 0.0001$) e não foi observada diferença estatisticamente significativa no número de cruzamentos e *rearings* nas sessões treino e teste entre grupos sob tratamento agudo (**A**) e crônico (**B**). Nas figuras, C e R significam cruzamentos e *rearings*, respectivamente.

Figura 1

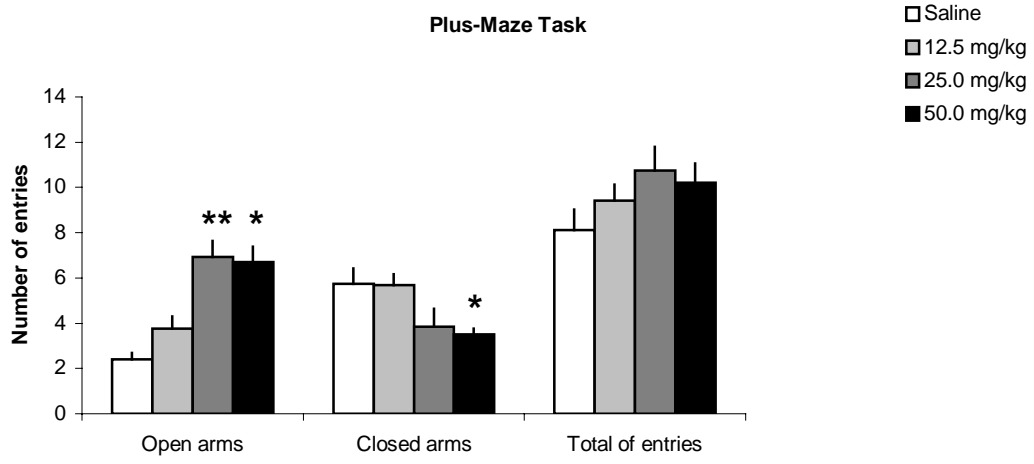
A



B



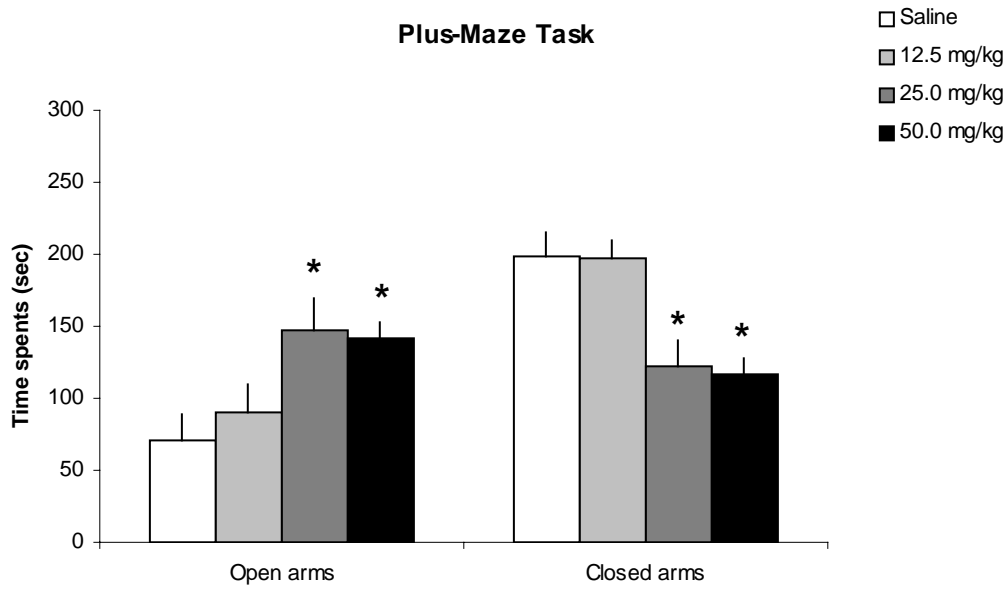
C



* $p < 0,05$

** $p < 0,001$

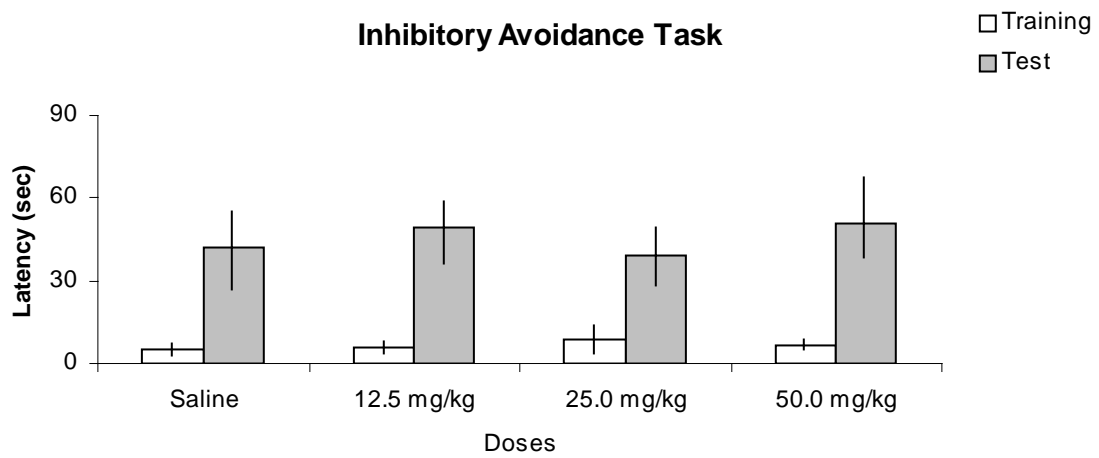
D



* $p < 0,05$

Figura 2

A



B

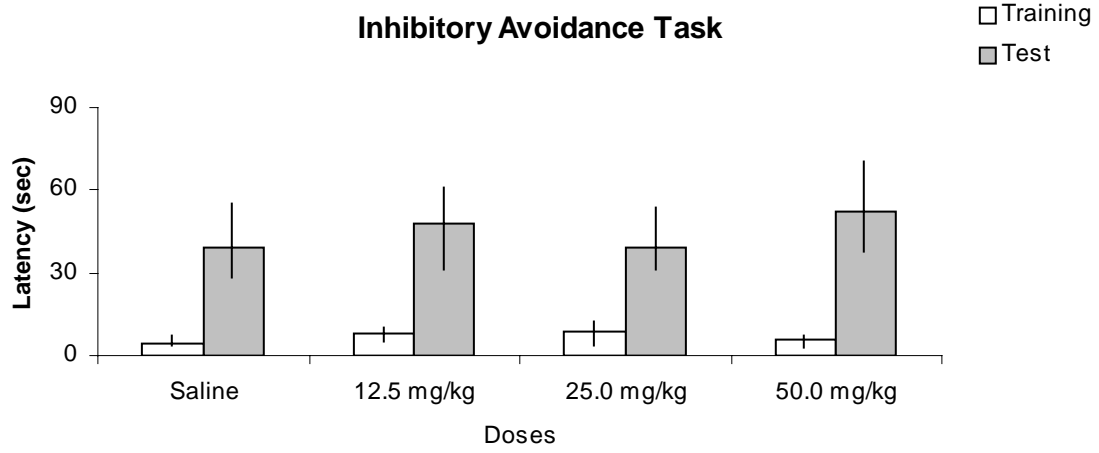
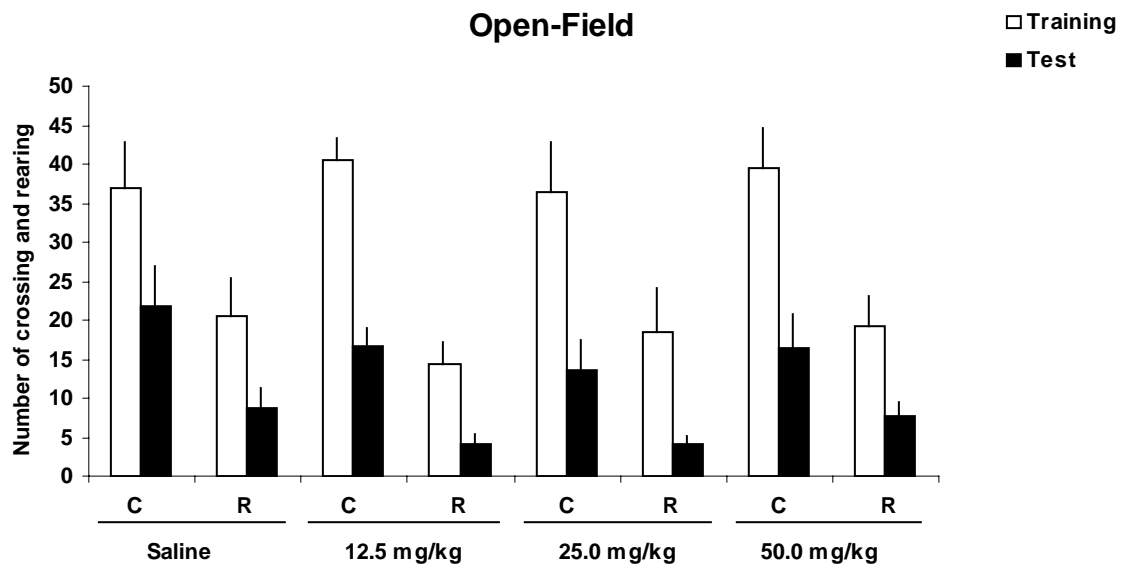
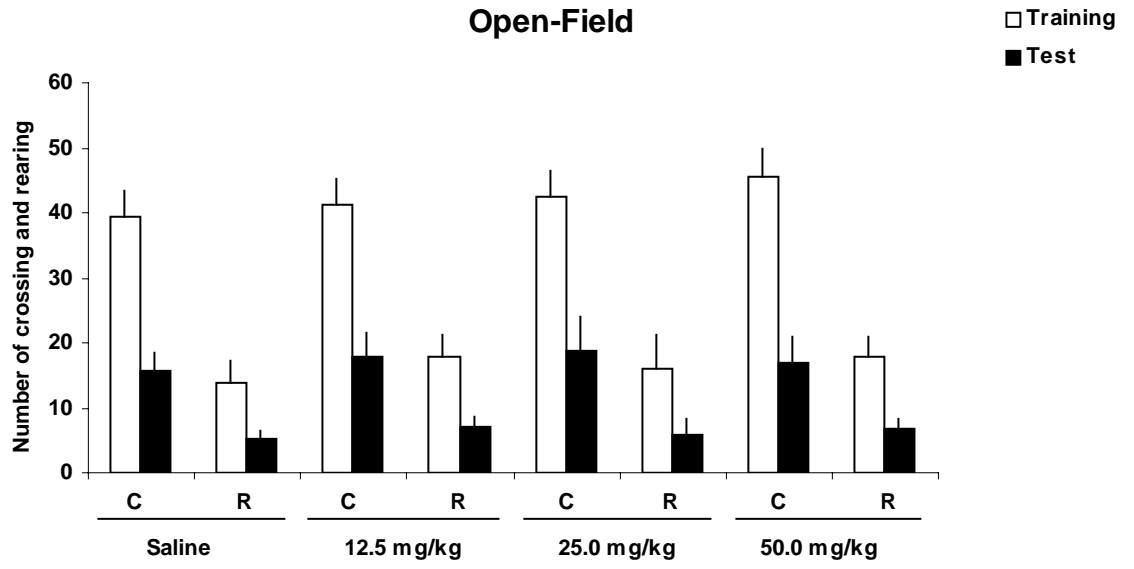


Figura 3

A



B



6. CONCLUSÕES

O milnaciprano:

- apresenta efeito ansiolítico no tratamento crônico;
- não altera a memória contextual em animais;
- não afeta a retenção da memória em ratos.

7. PERSPECTIVAS

O conhecimento sobre a neurobiologia do TAG está cada vez mais consistente. São necessários mais estudos e ensaios clínicos para verificação da ação ansiolítica do milnaciprano.