

Efeitos da exposição de ratos adultos ao lipopolissacarídeo (LPS) no comportamento estereotipado e na catatonia experimental*

Effects of lipopolysaccharide (LPS) administration on stereotypy and catatonia of male adult mice

Michelle Sanches Freitas Correia**
Sandra Regina Clemente Fernandes***
Maria Martha Bernardi****

Resumo

Introdução – O lipopolissacarídeo (LPS), um componente da parede celular de bactérias gram-negativas age como um pirógeno exógeno, induzindo os macrófagos a liberar citocinas como o Fator de Necrose Tumoral (TNF), e Interleucinas 1, 6 e 8, entre outras. Dentre as ações das citocinas que alteram diferentes funções do organismo e são mediadas pelo SNC citam-se a febre, as alterações neuroendócrinas, alterações no sono e outras alterações comportamentais (atividades exploratórias, sexuais e sociais). Ainda não há um entendimento definitivo de como os processos sistêmicos ativam o SNC. Algumas evidências indicam que o LPS produz lesão em sistemas dopaminérgicos centrais, envolvendo processos inflamatórios como a etiologia da doença de Parkinson. Desde que esta resulta de lesões em sistemas dopaminérgicos nigroestriais, o presente trabalho investigou os efeitos da administração aguda de LPS em comportamentos ligados ao sistema dopaminérgico central, a estereotipia e a catatonia induzidas por anfetamina e haloperidol, respectivamente, agonistas e antagonistas dopaminérgicos centrais. **Material e Métodos** – Camundongos receberam 100 µg/kg de LPS e foram observados em campo aberto. O comportamento estereotipado induzido por 2 mg/kg de anfetamina e a catatonia induzida pelo haloperidol (4 mg/kg) foram observadas em animais tratados ou não com LPS. **Resultados** – O LPS reduziu a atividade geral e a estereotipia dos de forma significativamente. Por outro lado, observou-se persistência na catatonia induzida pelo haloperidol, resultando em maior intensidade do mesmo. **Conclusões** – Estes dados permitiram sugerir que o processo inflamatório induzido pelo lipopolissacarídeo interfere com sistemas dopaminérgicos nigroestriais, porém estes resultados necessitam ser investigados em estudos mais aprofundados.

Palavras-chave: Lipopolissacarídeos; Catatonia; Comportamento estereotipado; Dopamina

Abstract

Introduction – The lipopolysaccharide (LPS), is a component of the cell wall of gram-negative bacteria acting as an exogenous pyrogen by release from macrophage cytokines as Tumor Necrosis Factor (TNF), and Interleucins 1, 6 and 8 among others. Cytokines affect different functions of the body and that are mediated by SNC is fever, neuroendocrine changes, interference in sleep and other behavioral changes (exploratory activity, sexual and social). Some evidence indicates that the LPS produces damage in central dopaminergic systems, involving inflammatory processes such as the etiology of Parkinson's disease. Since this is the result of injuries in dopaminergic nigrostriatal system, this work investigated the effects of acute administration of LPS in behaviors related to the central dopaminergic system, the stereotypy and catatonia induced by haloperidol and amphetamine, respectively, central dopaminergic agonists and antagonists. **Material and Methods** – Rats received 100 µg/kg LPS and were observed in an open field to determine the time-course effect. The stereotyped behavior induced by 2 mg/kg of amphetamine and catatonia induced by haloperidol (4 mg / kg) were observed in animals treated with LPS or not. **Results** – LPS reduced the overall activity of the animals in the open field and the stereotypy induced by amphetamine significantly. Furthermore, there was persistent in catatonia induced by haloperidol, resulting in greater intensity of it. **Conclusions** – These data suggest that the inflammatory process induced by LPS interferes with nigrostriatal dopaminergic systems.

Key words: Lipopolysaccharides; Catatonia; Stereotyped behavior; Dopamine

* Trabalho baseado na monografia de conclusão do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Paulista (UNIP), aluna Michelle Sanches Freitas Correia.

** Graduada em Ciências Biológicas pela UNIP. E-mail: mi.michelle17@globo.com

*** Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária da UNIP.

**** Bióloga. PhD, Professora Titular de Farmacologia e Toxicologia da UNIP. E-mail: bernarde@usp.br

Introdução

O lipopolissacarídeo (LPS), um componente da parede celular de bactérias gram-negativas age como um pirógeno exógeno⁵. Tal fato é consequência do LPS atuar sobre células dos organismos, principalmente os macrófagos, induzindo-os a liberar citocinas como o Fator de Necrose Tumoral (TNF), e Interleucinas 1, 1, 6 e 8 (IL-1, IL-6 e IL-8) entre outras¹. Embora o LPS seja também diretamente responsável pela liberação das interleucinas, a sua ação direta sobre a liberação de TNF pelos macrófagos é a principal responsável pela liberação de IL-1 e IL-6 através de reação de cascata¹.

Dentre as ações das citocinas que alteram diferentes funções do organismo e são mediadas pelo SNC citam-se a febre, as alterações neuroendócrinas, alterações no sono e outras alterações comportamentais (atividades exploratórias, sexuais e sociais). Ainda não há um entendimento definitivo de como os processos sistêmicos ativam o SNC. Assim, os aferentes nervosos periféricos seriam uma possível via de comunicação. Outra possibilidade seria a entrada de citocinas circulantes no sistema nervoso central, fato só possível de ocorrer em locais do cérebro onde a barreira hemato-encefálica se faz ausente como a área postrema e o *organum vasculosum* da lamina *terminalis*, ou então em injúrias cerebrais, ocorrência, no entanto, tardia¹⁻³.

As citocinas influenciam diversos neurotransmissores centrais, incluindo noradrenalina, serotonina, GABA, acetilcolina e vários neuropeptídeos (opiídeos, substância P, colecistoquinina e outros)^{5,10}. No entanto, as relações entre as citocinas e os neurotransmissores, bem como à função específica das citocinas ainda é desconhecida. Sabe-se também, que as citocinas interferem com vários dos mecanismos intracelulares de segundos mensageiros, não se encontrando ainda uma resposta intracelular específica para as mesmas.

Relações múltiplas já foram estabelecidas entre o sistema nervoso central, o neuroendócrino e o sistema imune. Os efeitos imunomodulatórios na transmissão noradrenérgica e colinérgica estão bem documentados, porém as inter-relações entre o sistema dopaminérgico e o imune necessitam melhor investigação^{1,10-11}. Existem evidências que este sistema possa ser alterado pelo sistema imune, em particular a existência de receptores dopaminérgicos em monócitos e macrófagos, havendo, no entanto apenas evidências indiretas^{8,10}. Nota-se ainda que a dopamina reduz a resposta de anticorpos em hemáceas de carneiro e retarda a resposta de rejeição ao enxerto quando injetada em combinação com outras drogas que agem na função neuroendócrina¹³. Outra série de evidências ainda reforça a interferência da dopamina no sistema imune^{2-3,10,14}.

A doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurológica que afeta aproximadamente 1–3% da população². A patologia primária da DP é uma perda de células dopaminérgicas da substância nigra (SN), a qual promove também redução na dopamina estriatal⁸. Outros sinais patológicos envolvem inflamação crônica, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial ou proteossomal bem como a presença de corpúsculos de Lewys¹⁰. Vá-

rios modelos animais de DP demonstram neurodegeneração em resposta à inflamação e o emprego de anti-inflamatórios a atenua. Foi encontrada alta correlação entre encefalite e a incidência de DP⁸. Além disto, foi descrito um caso de indução de DP por exposição acidental ao lipopolissacarídeo (LPS) de *Salmonella minnesota*¹⁴. Todos estes dados sugerem um papel importante dos processos inflamatórios na etiologia da DP.

É fato conhecido que os sistemas dopaminérgicos estriatais estão envolvidos com a função motora⁴. Os modelos animais mais empregados para avaliação da função estriatal são a catatonia experimental induzida por antagonistas dopaminérgicos e a estereotipia induzida por agonistas.

Neste sentido, este trabalho teve como objetivo testar a hipótese de que alguns distúrbios motores podem ser determinados por uma infecção. Para tanto se empregou o LPS como indutor da inflamação e examinaram-se, em camundongos, os comportamentos de catatonia e estereotipia. Inicialmente foi determinada, a dose e a latência para os efeitos motores em campo aberto para então empregar estes dados nos demais experimentos.

Materiais e Métodos

Animais

Foram utilizados camundongos Balb-c, machos, mantidos em gaiolas de plásticos foscos medindo 17 x 27 x 14 cm. Estas foram colocadas em biotério com luz controlada, de ciclo de 12 horas, e temperatura constante. Água e comida foram fornecidas aos animais à vontade.

Drogas

LPS: lipopolissacarídeo obtido por extração fenólica a partir da *Escherichia coli*, sorotipo 0127:B8 (Sigma). Solução salina: solução estéril de cloreto de sódio a 0,9%.

Procedimentos

Avaliação da atividade geral em campo aberto

O campo aberto empregado foi construído conforme proposto por Broadhurst⁶ (1960) e adaptado ao tamanho dos camundongos. Para as observações foram computadas as freqüências de locomoção e levantar dos animais. Para tanto, um animal de cada grupo foi introduzido individualmente no centro do aparelho e observado por 3 minutos em condições de ausência de estímulos externos. A freqüência de locomoção foi definida como o número de quadrados que o animal penetrou com as 4 patas e a de levantar pelo número de vezes que o animal ergueu a parte frontal do corpo apoiado apenas nas pernas traseiras. Entre a observação de cada animal o campo aberto foi limpo com uma mistura de água e álcool a 5%. Os animais dos grupos controle e experimental foram observados no período da manhã, entre 8:00 e 12:00 horas, intercaladamente para evitar influências circadianas.

Avaliação do comportamento estereotipado

O comportamento estereotipado – CE – consiste em movimentos repetidos sem variações e aparentemente sem objetivo – é um comportamento relacionado com a ativação progressiva de receptores dopaminérgicos da via Nigro estriatal. Pode ser induzido por várias drogas agonistas dopaminérgicas, entre elas, a anfetamina.

Para o registro quantitativo do CE, os camundongos foram observados dentro de suas gaiolas-moradia (gaiolas de arame) na qual permaneceu, um por gaiola, (no mínimo por 1 hora antes do procedimento experimental), no período claro de luz. Com a finalidade de evitar possíveis interferências nas observações, o bebedouro e a ração foram retirados 15 minutos antes das observações. O CE induzido pela anfetamina foi quantificado por meio de uma escala modificada de escores proposta por Setler *et al.*¹⁵ (1976), mostrada na Tabela 1.

Tabela 1. Escores de estereotipia para camundongos

Escore	Comportamento
0	Dormindo ou ativo.
1	Explorando/farejando com presença de locomoção.
2	Explorando/farejando com rigidez corpórea, mas locomoção presente, pelos arrepios, taquipnéia.
3	Animal num só local, presença de rigidez, farejando ou não.
4	Animal num só local, presença de rigidez, girando, farejando ou não, subindo nas grades da gaiola.

A avaliação do CE foi realizada a intervalos de 10 minutos, durante 60 minutos consecutivos após o tratamento com a anfetamina. No final desta hora os escores atribuídos a cada animal foram somados. Com este valor se obteve a mediana das somatórias dos escores de cada grupo. Para a construção da curva tempo-efeito, isto é, intensidade de CE em função do tempo decorrido após a administração de anfetamina, utilizou-se o escore atribuído ao animal naquele determinado momento.

Avaliação da catatonía experimental

A catatonía ou catalepsia – caracterizada tanto pela imobilidade posicional, como pela dificuldade de iniciar movimentos voluntários – foi observada pela colocação de camundongos apoiados apenas sobre trem posterior com as patas anteriores apoiadas em uma barra horizontal (bastão de vidro), após injeção de 4,0 mg/kg de haloperidol, i.p.⁷. O animal foi observado por 30 segundos a cada 10 minutos por 60 minutos e aos 90 minutos. Os animais que permaneceram na barra por 30 segundos eram anotados como catatônicos e os que não permaneciam como não catatônicos.

Delineamento experimental

Experimento 1. Efeitos da administração de 100 µg/kg de LPS na atividade geral de camundongos observados em campo aberto.

Doze camundongos foram divididos em dois grupos iguais: um experimental e outro controle. Os animais do grupo experimental receberam por via i.p. 100 µg/kg de LPS e os do grupo controle o veículo do LPS. A observação da atividade geral foi feita aos 30, 60, 90, 120 e 150 minutos após as administrações.

Experimento 2. Efeitos da administração de 100 µg/kg de LPS no comportamento estereotipado induzido pela anfetamina.

Dez camundongos foram divididos em dois grupos iguais: um experimental e outro controle. Os animais do grupo experimental receberam o LPS como no experimento 1 e os do controle o seu veículo. Noventa minutos após os tratamentos os animais dos dois grupos receberam 2 mg/kg de anfetamina, i.p. A observação do comportamento estereotipado foi feita como descrito em material e métodos.

Experimento 3. Efeitos da administração de 100 µg/kg de LPS na catatonía experimental induzida pelo haloperidol.

Vinte camundongos foram divididos em dois grupos iguais: um controle e um experimental. Os animais do grupo experimental receberam o LPS como no experimento 1 e os do controle o seu veículo. Noventa minutos após os tratamentos os animais dos dois grupos foram injetados i.p. com 4 mg/kg de haloperidol. Observou-se a catatonía como descrito em material e métodos.

Análise estatística

Para a comparação dos dados do campo aberto foi empregada a ANOVA de duas vias tendo como fatores o tratamento e sessões de observação. Como teste *post hoc* foi empregado o teste t. Para a análise do comportamento estereotipado empregou-se o teste U de Mann-Whitney. Para análise e comparação dos dados da catatonía empregou-se o teste do Qui-quadrado. A probabilidade de 5% foi considerada capaz de revelar diferenças significantes entre os grupos.

Resultados

Experimento 1. Efeitos da administração de 100 µg/kg de LPS na atividade geral de camundongos observados em campo aberto.

A Figura 1 ilustra as freqüências de locomoção e levantar de camundongos observados em campo aberto, tratados ou não com LPS. A ANOVA de duas vias indicou para a freqüência de locomoção a existência de diferenças entre os tratamentos ($F(1/50) = 25,90$, $P < 0,0001$) porém as sessões não influíram nas respostas ($F(1/50) = 1,159$, $p = 0,2868$). O teste t indicou haver redução na freqüência de locomoção dos animais do grupo experimental em relação àqueles do grupo controle nas sessões de 120 e 150 minutos.

A ANOVA de duas vias indicou para a freqüência de levantar a existência de diferenças entre os tratamentos ($F(1/50) = 14,14$, $P < 0,0001$) e as sessões ($F(1/50) = 4,894$, $p = 0,0315$). O teste t indicou haver redução na freqüência de levantar dos animais do grupo experi-

mental em relação àqueles do grupo controle nas sessões de 90, 120 e 150 minutos.

Experimento 2. Efeitos da administração de 100 µg/kg de LPS no comportamento estereotipado induzido pela anfetamina.

A Figura 2 ilustra o comportamento estereotipado induzido pela anfetamina de camundongos pré-tratados ou não com LPS. Nota-se, na curva tempo-efeito, que o CE dos animais do grupo experimental foi significativamente menor ($p < 0,05$) que daqueles do grupo controle a partir dos 20 minutos de observação; os escores permaneceram menores durante todas as sessões nestes animais. Verifica-se também que a intensidade de CE apresentou-se reduzida ($p < 0,05$) nos animais tratados com o LPS.

Experimento 3. Efeitos da administração de 100 µg/kg de LPS na catatonia experimental induzida pelo haloperidol

A Figura 3 ilustra os resultados da catatonia experimental induzida pelo haloperidol em camundongos pré-tratados ou não com o LPS. Nota-se que a freqüência de catatonia dos animais pré-tratados com LPS, foram significativamente maiores ($p < 0,05$) que daqueles do grupo controle, particularmente aos 50, 60 e 90 minutos após a administração de haloperidol. A intensidade de catatonia nestes animais foi significativamente maior que daqueles do grupo controle ($p < 0,05$).

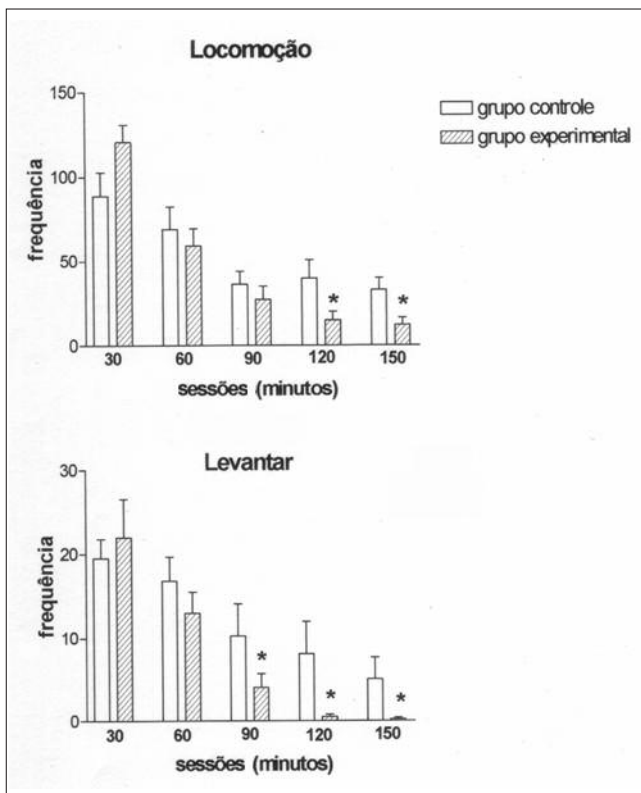


Figura 1. Efeitos da administração de 100 µg/kg de LPS na atividade geral de camundongos observados em campo aberto. Figura superior – freqüência de locomoção, figura inferior – freqüência de levantar. $P < 0,0001$ em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias seguida pelo teste t. $n = 6$ /grupo

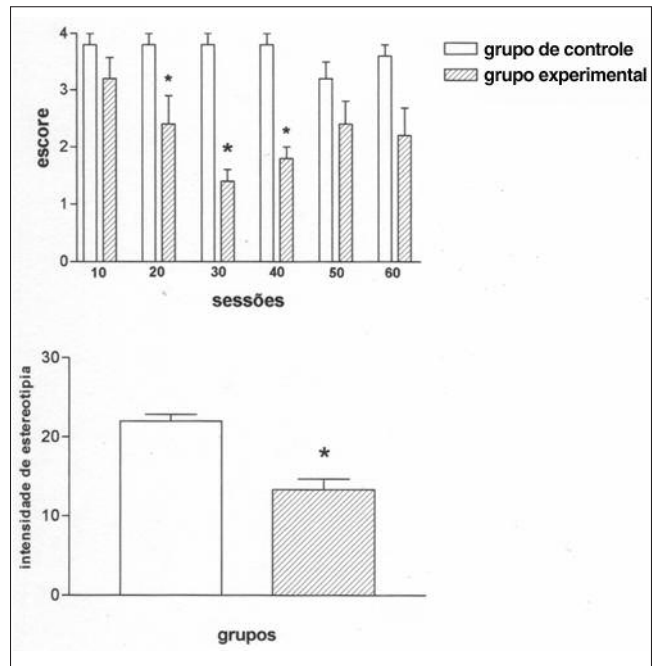


Figura 2. Efeitos da administração de 100 µg/kg de LPS no comportamento estereotipado induzido pela anfetamina em camundongos. Figura superior – curva tempo efeito, figura inferior – intensidade de estereotipia $P < 0,05$ em relação ao grupo controle. Teste U de Mann-Whitney. $n = 5$ /grupo

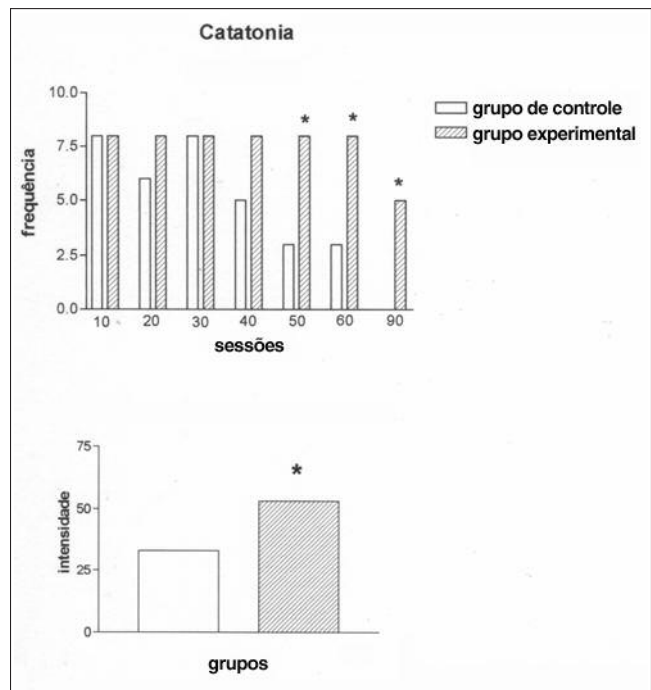


Figura 3. Efeitos da administração de 100 µg/kg de LPS na catatonia experimental induzida pelo haloperidol em camundongos. Figura superior – curva tempo efeito, figura inferior – intensidade de catatonia. $P < 0,05$ em relação ao grupo controle. Teste do qui-quadrado. $n = 10$ /grupo

Discussão

A administração de 100 µg/kg de LPS reduziu a atividade geral em campo aberto bem como o CE; por outro lado verificou-se maior duração da catatonía experimental induzida pelo haloperidol. O teste de campo aberto desde sua introdução por Hall⁹ (1943), vem sendo o instrumento de observação direta mais utilizada no estudo de psicologia animal não somente pela sua simplicidade como aparelho, mas também devido à rápida e fácil medida dos diversos comportamentos que podem ser claramente definidos. Embora originalmente o campo aberto tenha sido usado para a medida de emocionalidade empregando-se apenas um parâmetro, a defecção, como índice de timidez. Hoje se emprega como parâmetro da atividade geral a locomoção, o levantar, o limpar. A locomoção e levantar podem ter características exploratórias e motoras¹³. Neste trabalho empregou-se este modelo não só para verificar os efeitos agudos do LPS no comportamento dos animais, como também para determinar seu pico de efeito. Assim, a administração do lipopolissacarídeo não só reduziu os dois parâmetros medidos em campo aberto, mas o pico de efeito ocorreu 90 minutos após a sua administração.

A administração sistêmica de LPS promove um espectro de comportamentos que definem o denominado comportamento doentio. Estes incluem: redução da atividade motora, exploração, e alimentar¹², os quais podem expressar não só alterações motoras mas também emocionais.

As citocinas e o LPS ativam o eixo hipotálamo-hipófise – adrenal e o sistema noradrenérgico central, sugerindo que a ativação do sistema imune possa influenciar estados emocionais incluindo comportamentos ligados à ansiedade.

Para examinar de forma direta o papel do LPS na atividade motora estudou-se o CE e a catatonía experimental induzidos respectivamente por anfetamina e haloperidol, em animais pré-tratados com LPS. Para estes estudos, optou-se por administrar os agonistas e antagonistas dopaminérgicos 90 minutos após a administração do LPS, pois a curva tempo-efeito ao lipopolissacarídeo no campo aberto indicou início do efeito neste momento.

A intensidade de CE foi reduzida de maneira significativa pela administração de LPS. Observando a curva tempo-efeito verifica-se redução desde os 20 minutos de observação que perduraram até os 40 minutos.

O CE induzido pela anfetamina resulta da ativação progressiva de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal. Por outro lado, diversos trabalhos da literatura evidenciam que a administração de LPS reduz os níveis de dopamina estriatal e seus metabólitos, porém não o fazem com a serotonina. Irvani *et al.*¹⁰ (2002) sugerem que este último fato seja

conseqüência de perda de neurônios nigrais sugerindo uma ação específica do LPS nos neurônios dopaminérgicos.

Desta forma, os presentes dados mostrando redução do CE induzido pela anfetamina em animais pré-tratados com LPS estão de acordo com redução na atividade dopaminérgica central induzida pelo agente inflamatório.

Os dados da catatonía experimental induzida pelo haloperidol confirmam esta hipótese. Assim, inicialmente observou-se o mesmo nível de catatonía tanto em animais do grupo controle como dos experimentais, ou seja, o máximo de catatonía, porém a duração da mesma foi maior nos animais do grupo experimental. Portanto, a administração aguda de LPS reduz a atividade motora dos animais de forma significativa.

Neste sentido, a aplicação de LPS em cultura de células mesencefálicas de roedores pode ser a causa de degeneração dopaminérgica. A vantagem deste modelo é que o LPS não é diretamente neurotóxico aos neurônios, mas na presença de células gliais o LPS é duas vezes mais tóxicos que a 6-hidroxidopamina. A administração nigral *in vivo* de LPS induz a perda de neurônios, que envolve a toxicidade mediada por óxido nítrico, sendo que seus inibidores protegem de forma significativa desta perda¹⁰. No entanto, a inflamação em resultado da administração aguda de LPS não promove lesões persistentes nos neurônios. Portanto, é possível que a administração aguda de LPS tenha lesado indiretamente sistemas dopaminérgicos de forma reversível e por isto reduzido atividade motora dos animais.

O presente estudo é inicial e necessita de investigações mais profundas acerca dos efeitos e da persistência dos efeitos do LPS em estudos de inflamação prolongada por meio não só de dados comportamentais, mas neuroquímicos e neuroanatômicos.

Conclusões

Os presentes resultados permitem concluir que a administração do LPS promoveu:

1. Redução da atividade geral.
2. Redução no CE induzido pela anfetamina.
3. Potenciação da catatonía induzida pelo haloperidol.

Pode-se sugerir que o LPS, direta ou indiretamente, reduz a atividade do sistema dopaminérgico estriatal.

Agradecimentos

Agradeço à Universidade Paulista e ao grupo de Neuroimunomodulação da Universidade de São Paulo. Sou muito grata principalmente à Prof^ª Dr^ª Maria Martha Bernardi por total apoio e ajuda no desenvolvimento deste projeto e também à aluna Sandra Fernandes pelo auxílio nos experimentos.

Referências

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Citocinas. *In*: Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, editors. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Revinter; 2000. p.266-7.
2. Bennett DA, Beckett LA, Murray AM, Shannon KM, Goetz CG, Pilgrim DM *et al*. Prevalence of parkinsonian signs and associated mortality in a community population of older people. *N Engl J Med*. 1996; 334:71-6.
3. Berger CH, Mehrhoff FW, Beier KM, Meinck HM. [Sexual delinquency and Parkinson's disease] *Nervenarzt*. 2003;74(4):370-5.
4. Bernardi MM, Palermo-Neto J. Atividade geral: conceito e medidas. *Psicologia*. 1989;6:43-8.
5. Bluthé RM, Dantzer R, Kelley KW. Effects of interleukin-1 receptor antagonist on the behavioral effects of lipopolysaccharide in rat. *Brain Res*. 1991;573:318-20.
6. Broadhurst PL. Experiments in psychogenetics. *In*: Eisenk, H.J. *Experiments in personality*. London: Routledge & Kegan Paul; 1960. p.31-71.
7. Carlini EA. *Farmacologia prática sem aparelhagem*. São Paulo: Sarvier; 1973. p.167-72.
8. Casals J, Elizan TS, Yahr MD. Postencephalitic parkinsonism – a review. *J Neural Transm*. 1998;105(6-7):645-76.
9. Hull CL. *Principles of behavior: an introduction to behavior theory*. New York: Appleton-Century-Crofts; 1943.
10. Irvani MM, Kashefi K, Mander P, Rose S, Jenner P. Involvement of inducible nitric oxide synthase in inflammation-induced dopaminergic neurodegeneration. *Neuroscience*. 2002;110(1):49-58.
11. Kim WG, Mohny RP, Wilson B, Jeohn GH, Liu B, Hong JS. Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci*. 2002;20(16): 6309-16.
12. McCarthy FD, Hawkins DR, Bergen WG. Dietary energy density and frame size effects on composition of gain in feedlot cattle. *J Anim Sci*. 1985;60(3):781-90.
13. Masur J. A Técnica de campo-aberto como medida da resposta emocional de ratos. *Influência de drogas psicotrópicas* [Tese de Doutorado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 1971.
14. Niehaus DJ, Laurent C, Jordaan E, Koen L, Oosthuizen P, Keyter N *et al*. Suicide attempts in an African schizophrenia population: an assessment of demographic risk factors. *Suicide Life Threat Behav*. 2004; 34(3):320-7.
15. Setler P, Sarau H, McKenzie G. Differential attenuation of some effects of haloperidol given scopolamine. *Eur J Pharmacol*. 1976;39 (1):117-26.

Recebido em 5/10/2007

Aceito em 26/12/2007