

## MODELO DE PARKINSON POR LESÃO UNILATERAL INDUZIDA PELA 6-HIDROXIDOPAMINA: ANÁLISES COMPORTAMENTAIS E IMUNO-HISTOQUÍMICAS

### PARKINSON MODEL FOR UNILATERAL INJURY INDUCED BY 6-HYDROXIDOPAMINE: BEHAVIORAL AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY ANALYSIS

### MODELO DE PARKINSON POR LESIÓN UNILATERAL INDUZIDA POR 6-HIDROXIDOPAMINA: ANÁLISIS COMPORTAMENTALES E INMUNO-HISTOQUÍMICAS

Carolina Sabadoto Brienze\*, Ana Carolina Marin Comini \*, Juliana Chaves Garcia\*, Maria Clara Artiaga\*, Mariana Penitenti Oliveira\*, Melina Mizusaki Iyomasa-Pilon\*\*, Helena Ribeiro Souza\*\*\*, Lucas Ribeiro de Azevedo\*\*\*\*, Ana Paula Girol\*\*\*\*\*

#### Resumo

**Introdução:** A doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa crônica complexa que afeta o sistema dopaminérgico e atinge cerca de 3% da população mundial acima de 50 anos. Clinicamente, a doença de Parkinson não é diagnosticada antes da manifestação dessas dificuldades locomotoras, o que contribuiu para o diagnóstico tardio da doença e a dominância de modelos animais de estudos baseados nessas características. Embora o uso de modelos animais seja limitado em diversos aspectos, devido às diferenças genéticas, anatômicas e funcionais entre murinos e humanos, muito do nosso conhecimento a respeito da patofisiologia da doença é devido ao uso destas ferramentas. **Objetivos:** Estabelecer modelo de estudo da doença de Parkinson, reproduzível e validado por testes comportamentais e imuno-histoquímicos. **Método:** O modelo murino de lesão unilateral induzida pela 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) foi realizado por meio de cirurgia estereotáxica para administração intracraniana, no feixe medial do encéfalo anterior (MFB). A toxina foi infundida a uma taxa de 1µL/min, e a cânula foi deixada no lugar por 3 min antes da retirada. Para limitar os danos nos neurônios noradrenérgicos, cloridrato de desipramina (10 mg/kg, i.p) foram administrados 30 min antes da injeção de 6-OHDA. Os animais controles foram submetidos ao mesmo procedimento estereotáxico, mas com solução salina. A validação do modelo foi feita por meio de testes comportamentais, sensoriomotores, sensíveis às diferenças sutis da função dos gânglios basais. Os testes comportamentais foram complementados pela análise imuno-histoquímica de tirosina hidroxilase, a enzima responsável síntese de dopamina. **Resultados:** Os testes comportamentais mostraram comportamento letárgico para os ratos do grupo 6-OHDA em relação ao grupo controle e a quantificação dos neurônios reativos a tirosina hidroxilase confirmou o modelo de Parkinson proposto devido a menor quantidade de neurônios no núcleo da substância negra do hemisfério cerebral lesionado em comparação ao núcleo não lesado do outro hemisfério. **Conclusão:** O estabelecimento de um modelo de Parkinson nos nossos laboratórios permitirá o desenvolvimento futuro de diversos estudos sobre essa condição clínica.

**Palavras-chave:** Doença de Parkinson. Doença crônica. Testes laboratoriais.

#### Abstract

**Introduction:** Parkinson's disease is a complex chronic neurodegenerative disease, damaging the dopaminergic system and affecting about 3% of the world population over 50 years. Clinically, Parkinson's disease is not diagnosed prior to the manifestation of these locomotor difficulties, thus contributing to the late disease diagnosis and to the dominance of animal models of studies based on these characteristics. Although the use of animal models is limited in several aspects due to genetic, anatomical and functional differences between murine and human, much of our knowledge about the pathophysiology of the disease is due to the use of these tools. **Objectives:** To establish Parkinson's disease study models, reproducible and validated by behavioral and immunohistochemical tests. **Method:** The murine model of unilateral lesion induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA) was performed by stereotaxic surgery for intracranial administration in the medial bundle of the forebrain (MFB). The toxin was infused at a rate of 1µL/min, and the cannula was left in place for 3 min prior to withdrawal. To limit damage to noradrenergic neurons, desipramine hydrochloride (10 mg/kg, i.p) was given 30 min prior to 6-OHDA injection. Control animals were submitted to the same stereotaxic procedure, but with saline solution. Model validation was made through behavioral, sensorimotor tests, sensitive to subtle differences of basal ganglia function. Behavioral tests were complemented by immunohistochemical analysis of tyrosine hydroxylase, the enzyme responsible for dopamine synthesis. **Results:** The behavioral tests showed lethargic behavior for the 6-OHDA group rats in relation to the control group, and the quantification of tyrosine hydroxylase reactive neurons confirmed the Parkinson's proposed model due to the smaller number of neurons in the black substance nucleus of the injured cerebral hemisphere in comparison to the uninjured nucleus of the other hemisphere. **Conclusion:** The establishment of a Parkinson's model in our laboratories will allow the future development of several studies on this clinical condition.

**Keywords:** Parkinson disease. Chronic disease. Laboratory test.

#### Resumen

**Introducción:** La enfermedad de Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa crónica compleja que afecta al sistema dopaminérgico y alcanza cerca del 3% de la población mundial por encima de 50 años. Clínicamente, la enfermedad de Parkinson no se diagnostica antes de la manifestación de esas dificultades locomotoras, lo que contribuyó al diagnóstico tardío de la enfermedad y la dominación de modelos animales de estudios basados en esas características. Aunque el uso de modelos animales es limitado en diversos aspectos, debido a las

\* Acadêmicas do curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA) de Catanduva-SP.

\*\*Bióloga e técnica dos Laboratórios de Histopatologia e Imuno-histoquímica e Multidisciplinar das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA) de Catanduva-SP.

\*\*\*Bióloga, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Genética, área de concentração Biologia Celular e Molecular, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), de São José do Rio Preto-SP.

\*\*\*\*Biólogo, mestre em Ciências da Saúde pela USP de Ribeirão Preto e doutorando em Genética pela UNESP de São José do Rio Preto.

\*\*\*\*\*Bióloga, mestre em Morfologia pela UNIFESP, doutora em Genética, área de concentração Biologia Celular e Molecular e pós-doutora em Imunomorfologia pela UNESP de São José do Rio Preto-SP. Coordenadora do curso de Biomedicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA). Professora (nível I) das disciplinas de Biologia Celular, Histologia e Embriologia das FIPA e docente da Pós-Graduação em Genética, UNESP de São José do Rio Preto-SP. Contato: anapaulagirol@hotmail.com

Trabalho desenvolvido nos laboratórios de Histopatologia, Imuno-histoquímica e Multidisciplinar das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP.

diferencias genéticas, anatómicas y funcionales entre murinos y humanos, mucho de nuestro conocimiento acerca de la patofisiología de la enfermedad es debido al uso de estas herramientas. Objetivos: Establecer modelos de estudio de la enfermedad de Parkinson, reproducibles y validados por pruebas conductuales e imuno-histoquímicas. Método: El modelo murino de lesión unilateral inducida por la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) fue realizado por medio de cirugía estereotáxica para administración intracraneal, en el haz medial del encéfalo anterior (MFB). La toxina fue infundida a una tasa de 1 $\mu$ L/min, y la cánula fue dejada en el lugar por 3 min antes de la retirada. Para limitar los daños en las neuronas noradrenérgicas, el clorhidrato de desipramina (10 mg / kg, i.p) se administró 30 minutos antes de la inyección de 6-OHDA. Los animales controles fueron sometidos al mismo procedimiento estereotáxico, pero con solución salina. La validación del modelo fue hecha por medio de pruebas conductuales, sensoriomotores, sensibles a las diferencias sutiles de la función de los ganglios basales. Las pruebas de comportamiento se complementaron con el análisis imuno-histoquímico de tirosina hidroxilasa, la enzima responsable de síntesis de dopamina. Resultados: Las pruebas comportamentales mostraron comportamiento letárgico para las ratas del grupo 6-OHDA en relación al grupo control y la cuantificación de las neuronas reactivas a la tirosina hidroxilasa confirmó el modelo de Parkinson propuesto debido a la menor cantidad de neuronas en el núcleo de la sustancia negra del hemisferio cerebral lesionado en comparación con el núcleo no dañado del otro hemisferio. Conclusión: El establecimiento de un modelo de Parkinson en nuestros laboratorios permitirá el desarrollo futuro de diversos estudios sobre esa condición clínica.

**Palabras clave:** Enfermedad de Parkinson. Enfermedad crónica. Prueba de laboratorio.

## INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa crônica complexa que afeta o sistema dopaminérgico e atinge cerca de 3% da população mundial acima de 50 anos<sup>1</sup>. A condição incapacitante é associada principalmente à perda progressiva de neurônios dopaminérgicos na substância negra e o desenvolvimento de inclusões neuronais, denominadas corpos de Lewy, em áreas corticais e subcorticais do encéfalo<sup>2</sup>. Suas principais manifestações físicas são a bradicinesia (lentidão anormal dos movimentos), rigidez, instabilidade postural e tremores. Clinicamente, a DP não é diagnosticada antes da manifestação dessas dificuldades locomotoras, o que contribuiu para o diagnóstico tardio da doença e a dominância de modelos animais de estudos baseados nessas características. Entretanto, a DP inclui outras manifestações não motoras como insônia e outras anormalidades do sono (que afetam 60-98% dos pacientes), distúrbios gastrointestinais (70% dos pacientes), ansiedade e depressão (40% dos pacientes), apatia, anedonia e demência, que impactam profundamente a qualidade de vida dos pacientes<sup>3,4</sup>.

O modelo murino de lesão unilateral induzida pela 6-hidroxidopamina (6-OHDA) recebe particular interesse. Devido a sua similaridade estrutural com a dopamina, a 6-OHDA é captada pelos transportadores ativos de dopamina (DAT) e desempenha atividade neurotóxica altamente específica sobre os neurônios dopaminérgicos<sup>5</sup>. Porém, uma vez que o composto não atravessa a barreira hemato-encefálica, a execução da cirurgia estereotáxica é necessária para administração intracraniana da 6-OHDA no feixe medial do encéfalo anterior (MFB)<sup>6</sup>. O dano tóxico promovido pelo composto promove o desequilíbrio na

transmissão de dopamina entre os hemisférios cerebrais, afetando as vias mesoestriatal, com função motora, e mesocorticolímbica, de função cognitiva<sup>4</sup>.

Enquanto nosso conhecimento da DP ainda é rudimentar, o desenvolvimento de modelos de estudo animal, utilizando abordagens genética e o uso de toxinas específicas, possibilitaram nosso conhecimento dos mecanismos patofisiológicos da doença e permitem o teste de novas terapias<sup>4</sup>. Considerando que fatores ambientais e a suscetibilidade genética atuam no surgimento e desenvolvimento da doença, possivelmente os modelos de resultado futuro mais promissor sejam os que combinam modelos que consideram estas duas abordagens<sup>7</sup>.

Embora o uso de modelos animais seja limitado em diversos aspectos, devido às diferenças genéticas, anatómicas e funcionais entre murinos e humanos, muito do nosso conhecimento a respeito da patofisiologia da DP é devido a estas ferramentas. O aprimoramento dos modelos de estudo, atualmente, busca incorporar estas características na avaliação dos animais, visando o desenvolvimento de regimes terapêuticos mais eficientes.

## MATERIAL E MÉTODO

### Animais

Ratos *Wistar* obtidos na Unidade Didática de Pesquisas Experimentais (UDPE-FIPA), pesando entre 250 e 300g, foram mantidos em gaiolas com água e ração *ad libitum*, em sala com temperatura controlada (24  $\pm$  1  $^{\circ}$ C). Após a cirurgia os animais permaneceram em gaiolas individuais. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Experimentação (CEUA) das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA) (Protocolo nº. 16.08.23-03).

**Cirurgia de estereotaxia**

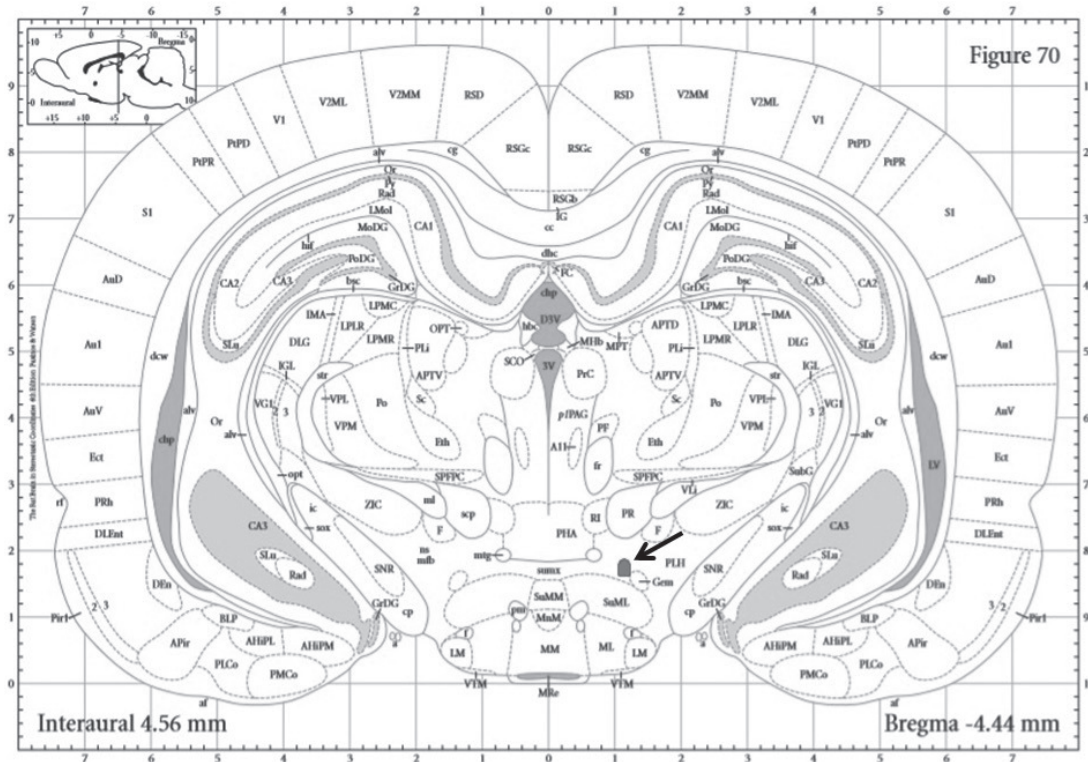
Para a realização das cirurgias estereotáxicas os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 0,2 ml/100g de ketamina e 0,05 ml/100g de xilasina. Também, 30 minutos previamente às cirurgias, os animais receberam injeção intraperitoneal de 10 mg/kg de desipramina, droga utilizada para limitar os danos nos neurônios noradrenérgicos.

Para indução do MP, foi realizada uma microinjeção, através de uma agulha dental presa à guia do aparelho estereotáxico, de 8 µg 6-OHDA diluído em 4 µL de 0,1% de ácido ascórbico<sup>8</sup>, seguindo as coordenadas: -4,4 mm ântero-posterior a partir do bregma, +1,2 mm lateral e -8,2 mm dorso-ventral a partir da pia-máter<sup>9</sup>, visando atingir o MFB (Figura 1). Para as microinjeções

foi utilizada uma seringa *Hamilton* de 10 µL conectada a uma cânula PE-10 na agulha dental de injeção (16 mm) A microinjeções foram feitas em um período de 2 minutos utilizando-se uma bomba de microinjeção (*Insight*, Modelo: EFF 311, Brasil), sendo a agulha removida do encéfalo do animal 1 minuto após o término da injeção para evitar o refluxo do líquido perfundido. Ao final das intervenções cirúrgicas os animais foram tratados com 0,1 ml/100g de Banamine (analgésico, antitérmico e anti-inflamatório) e 0,05 ml/100g de Flotril (antibiótico).

Foram utilizados cinco animais para indução do MP (grupo 6-OHDA) e mais cinco animais para o grupo controle, sendo que este recebeu na cirurgia de esterotaxia microinjeção de 0,1% de ácido ascórbico (grupo Veículo).

**Figura 1** - Coordenadas estereotáxicas da cirurgia de indução do MP: Imagem do “plate 70”, seta indica local próximo das coordenadas -4,4 mm ântero-posterior a partir do bregma, +1,2 mm lateral e -8,2 mm dorso-ventral a partir da pia-máter<sup>10</sup>



**Testes comportamentais**

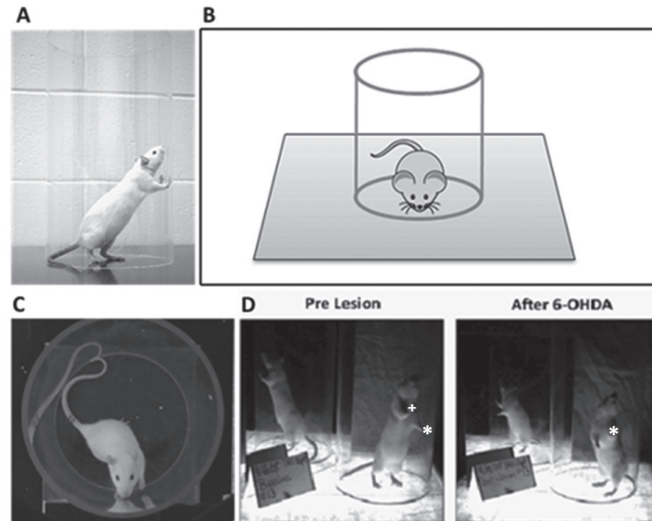
Diversas medidas comportamentais (independente do estímulo por drogas específicas) permitem o estudo da eficácia da indução dos modelos murinos<sup>2</sup>. O teste escolhido foi o “Teste do cilindro de Schallert”. O teste do cilindro é utilizado para avaliar o uso espontâneo dos membros dianteiros durante o comportamento exploratório e possibilita a detecção de assimetrias do suporte postural enquanto o animal está levantado sobre as patas traseiras

(Figura 2A)<sup>11</sup>. Para isso, uma semana após a cirurgia de indução do MP, o animal em teste foi posicionado dentro de um cilindro transparente de 20 cm de diâmetro e 30 cm de altura (Figura 2B) que encoraja a exploração vertical. A duração da análise do comportamento do animal dentro do cilindro foi de 30 minutos ou até que se atingissem 20 levantamentos. A proporção de contatos com a parede do cilindro realizados com os membros dianteiros foi anotada e determinada pela análise do percentual de uso do

membro afetado (Tabela 1). Segundo a literatura, durante a exploração de superfícies verticais, um animal intacto tipicamente se apoia igualmente sobre os dois membros dianteiros. Entretanto, após a lesão unilateral, os animais

passam a depender mais fortemente do membro dianteiro intacto/ileso<sup>12</sup>. Foram realizados quatro testes em cada animal, sendo um por semana.

**Figura 2** - Teste do cilindro de Schallert. **A)** Animal levantado sobre as patas traseiras com ambos membros dianteiros apoiados na parede do cilindro<sup>12</sup>; **B)** Ilustração esquemática do teste (Disponível em <http://sbfnl.stanford.edu/images/cylinder.gif>); **C)** Vista superior do animal evidenciando apoio da cauda (Disponível em <http://blog.globalhealthportal.northwestern.edu/wp-content/uploads/2012/08/Screen-Shot-2012-07-05-at-11.17.58-PM-300x275.png>); **D)** Animal pré-lesionado apoiado em ambas as patas (\*= pata não lesionada, + = pata lesionada) e lesionado pela indução com 6-OHDA, apoiado somente na pata contralateral<sup>13</sup>



**Tabela 1** - Modelo de tabela utilizado para anotação do uso dos membros no teste do cilindro de Schallert

TESTE DO CILINDRO		
Data do teste:		
Período do teste:		
Grupo experimental:		
ANIMAL ____	CONTATOS IPSILATERAIS	CONTATOS CONTRALATERAIS (ambos os membros)
Levantamento 1		
Levantamento 2		
Levantamento 3		
Levantamento 4		
Levantamento 5		
Levantamento 6		
Levantamento 7		
Levantamento 8		
Levantamento 9		
Levantamento 10		
Levantamento 11		
Levantamento 12		
Levantamento 13		
Levantamento 14		
Levantamento 15		
Levantamento 16		
Levantamento 17		
Levantamento 18		
Levantamento 19		
Levantamento 20		
<b>SOMA:</b>		
<b>CONTATOS BILATERAIS:</b>		<b>TOTAL</b>
Tempo avaliado:		

**Perfusão e coleta do encéfalo**

Após realizadas as cirurgias e os testes comportamentais, os animais foram novamente anestesiados intraperitonealmente com 0,2 ml/100g de ketamina e 0,05 ml/100g de xilasina e, após a confirmação da anestesia profunda, foram perfundidos transcárdicamente com solução tampão fosfato salina, 0,01M (PBS, pH 7.4) para lavagem do cérebro seguida por solução de paraformaldeído 4% (PFA) em 0,2 M de PB para fixação do tecido. Os cérebros foram removidos, pós-fixados em formol a 10% e processados para inclusão em parafina e microtomia.

**Análises imuno-histoquímicas**

Os estudos imuno-histoquímicos foram realizados em secções de 5 µm das amostras dos grupos. Para confirmação do MP, foi realizada reação de imuno-histoquímica para tirosina-hidroxilase (TH) (Merck, USA) diluído na proporção 1:1.000 em solução tampão de fosfato (BSA) a 1%. Os cortes foram preparados em lâminas gelatinizadas e após a recuperação antigênica e o bloqueio



foram incubados em 2 horas com o anticorpo primário em câmara úmida em temperatura ambiente. Feito isso, os cortes foram novamente lavados e incubados com o anticorpo secundário biotilado (*kit Zymed Invitrogen*) e, a seguir, em substrato diaminobenzidina (DAB) (*kit Zymed Invitrogen*) para revelação, contracolorados com Hematoxilina e montados. Procedemos à análise quantificando os neurônios reativos para TH no núcleo da substância negra.

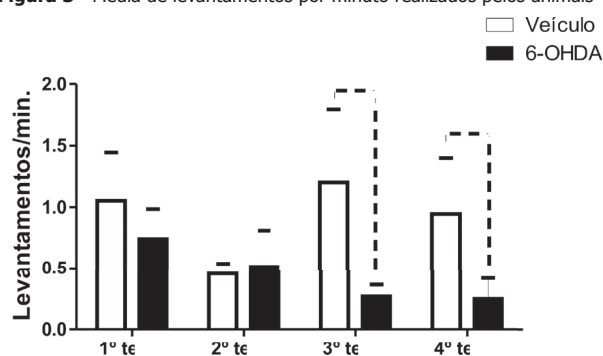
### Análise dos dados

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Alterações na ventilação foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas seguida pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativamente diferentes.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises comportamentais que consideraram os levantamentos com cada um dos membros no "Teste do cilindro de Schallert" evidenciaram comportamento letárgico para os ratos do grupo 6-OHDA em relação ao grupo Veículo (Figura 3). Embora não tenha sido observada diferença estatística significativa, o que se deve a maior variação encontrada nos animais 6-OHDA, nossos resultados estão de acordo com os encontrados na literatura<sup>12,13</sup>.

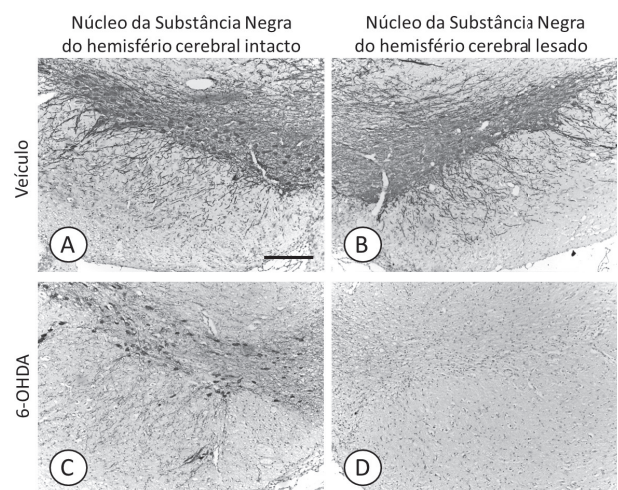
**Figura 3** - Média de levantamentos por minuto realizados pelos animais



Na sequência dos nossos estudos e para validação dos resultados, os testes de comportamento foram

complementados pela análise imuno-histoquímica da TH, a enzima responsável síntese de dopamina. A ausência de imunomarcção nos neurônios reativos a TH confirmou o MP evidenciando a morte dos neurônios no núcleo da substância negra do hemisfério cerebral lesionado (Figura 4D) em comparação ao núcleo não lesionado do outro hemisfério (Figura 4C) e aos núcleos dos hemisférios cerebrais lesados (Figura 4B) ou não (Figura 4A) dos animais do grupo veículo. A injeção de 6-OHDA provoca a ausência praticamente completa de corpos celulares ao redor do local de administração no cérebro dos animais<sup>14</sup>. A ausência de células TH positivas nas regiões cerebrais A9 e A10 é indicativa de degeneração acentuada, uma vez que estas regiões são profundamente afetadas na DP.<sup>4</sup>

**Figura 4** - Imuno-histoquímica para TH. Grupo controle (veículo), (A) núcleo da substância negra intacta e (B) lesada com reatividade para TH. Grupo 6-OHDA, (C) núcleo da substância negra intacta com reatividade para TH e (D) lesada sem reatividade para TH



### CONCLUSÃO

Nossos resultados confirmam a indução do MP, por meio de alterações comportamentais e imuno-histoquímicas importantes. A validação do modelo de Parkinson abre possibilidades interessantes para novas pesquisas que busquem o melhor entendimento da doença, na busca por alternativas terapêuticas.

### REFERÊNCIAS

- Yuan H, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. Histological, behavioural and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson's disease. *J Neurosci Methods*. 2005 May 15;144(1):35-45.
- Fleming SM, Ekhaton OR, Ghisays V. Assessment of sensorimotor function in mouse models of Parkinson's disease. *J Vis Exp*. 2013; (76):50303.
- Taylor TN, Greene JG, Miller GW. Behavioral phenotyping of mouse models of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*. 2010; 211(1):1-10.
- Carvalho MM, Campos FL, Coimbra B, Pêgo JM, Rodrigues C, Lima R, Salgado AJ. (2013). Behavioral characterization of the 6-hydroxidopamine model of Parkinson's disease and pharmacological rescuing of non-motor deficits. *Molecular Neurodegeneration*. 2013; 8:14.

5. Torres EM, Dunnett SB. 6-OHDA lesion models of parkinson's disease in the rat. *Animal Models Of Movement Disorders*. 2012; 61:267-79.
6. Grealish S1, Mattsson B, Draxler P, Björklund A. Characterisation of behavioural and neurodegenerative changes induced by intranigral 6-hydroxydopamine lesions in a mouse model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*. 2010; 31(12):2266-78.
7. Potashkin JA, Blume SR, Runkle NK. Limitations of animal models of Parkinson's disease. *Parkinson's disease*. 2010; 2011: 658083.
8. Tseng KY, Caballero A, Dec A, Cass DJK, Simak N, Sunu S, et al. Inhibition of striatal soluble guanylyl cyclase-cGMP signaling reverses basal ganglia dysfunction and akinesia in experimental parkinsonism. *PLoS One*. 2011; 6(11):e27187.
9. Padovan-Neto FE1, Echeverry MB, Tumas V, Del-Bel EA. Nitric oxide synthase inhibition attenuates L-DOPA-induced dyskinesias in a rodent model of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2009; 159(3):927-35.
10. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6ª ed. San Diego, CA: Academic; 2007.
11. Schallert T, Fleming SM, Leasure JI, Tillerson JL, Bland ST. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology*. 2000; 39(5):777-87.
12. Livingston-Thomas JM, Tasker RA. Animal models of post-ischemic forced use rehabilitation: methods, considerations, and limitations. *Exp Transl Stroke Med*. 2013; 5: 2.
13. Spieles-Engemann AL, Steece-Collier K, Behbehani MM, Collier TJ, Wohlgenant SL, Kemp CJ, et al. Subthalamic nucleus stimulation increases brain derived neurotrophic factor in the nigrostriatal system and primary motor cortex. *J Parkinsons Dis*. 2011;1(1):123-36.
14. Lezcano LB, Pedre LDCL, Verdecia CIF, Sánchez TS, Fuentes NP, Turner LF. Convenience of the traversal beam test modified to evaluate the model of Parkinson's disease in Rat lesioned in SNPC. *J Cell Anim Biol*. 2009; 3(9):145-51.

Recebido em: 15/04/2017

Aceito em: 21/09/2017