

GABRIEL VICTOR GUIMARÃES RAPELLO

**USO DO METILFENIDATO EM RATOS -
ANÁLISE DO PARÊNQUIMA PULMONAR**

Campo Grande

2011

GABRIEL VICTOR GUIMARÃES RAPELLO

**USO DO METILFENIDATO EM RATOS -
ANÁLISE DO PARÊNQUIMA PULMONAR**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Saúde e
Desenvolvimento na Região Centro-Oeste
da Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Andréia Brochado
Antoniolli

Campo Grande
2011

Rapello, Gabriel Victor Guimarães

Uso do Metilfenidato em ratos: Análise do parênquima pulmonar. Campo Grande – MS, 2011.

50p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-oeste. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Uso do Metilfenidato em ratos: Análise do parênquima pulmonar.

1. TDAH 2. Metilfenidato 3. Enfisema pulmonar

FOLHA DE APROVAÇÃO

GABRIEL VICTOR GUIMARÃES RAPELLO

USO DO METILFENIDATO EM RATOS - ANÁLISE DO PARÊNQUIMA PULMONAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Andréia Conceição Brochado Antonioli

Resultado _____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos, **Eduardo, Ana Laura e João Gabriel**, fontes de luz, força, amor e inspiração em minha vida.

A minha querida esposa **Anna Sarah**, com quem compartilho a vida.

Aos meus familiares queridos, em especial a minha mãe **Neuza**, de quem herdei o dom do trabalho e a minha querida irmã **Patrícia**.

Ao meu pai **Walmir Rapello** e a minha avó **Mirtes Rapello**, seres humanos maravilhosos, mestres na arte vida. Saudades eternas! (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a **Deus**, nosso pai todo poderoso, criador do Universo, pelo dom da vida e pela dádiva do conhecimento.

À minha esposa **Anna Sarah**, pela paciência, carinho incentivo e dedicação em se fazer presente a nossa família nos momentos em que eu não pude me dedicar.

A minha orientadora, Professora **Andréia Brochado Antonioli**, pelo incentivo, força e encorajamento e pela forma respeitosa com que me tratou durante todo esse percurso.

Aos meus eternos amigos, irmãos, **Adson Pereira Cabral** e **Gilberto Vieira Júnior**, com quem compartilhei, compartilho e espero compartilhar muitos momentos importantes da minha vida. Obrigado pela amizade de vocês!

Ao Prof. **Baldomero Antônio Kato da Silva**, pelo brilhantismo do tema e pela possibilidade de realização do estudo.

Aos amigos que muito cooperaram para a realização desse sonho, **Prof. Gilberto Facco**, aos veterinários **Ricardo Salomão** e **Débora Garcia**, ao eterno **Prof. Daniel Pereira** e em especial ao Prof. **Rogério Pazetti** do laboratório experimental de cirurgia do tórax da Universidade de São Paulo.

A todos os meus familiares pelo apoio, incluindo minha querida sogra **Vera Lúcia**.

A todos os funcionários do Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-oeste.

**“Tente e não diga que a vitória está perdida,
pois é de batalhas que se vive a vida.
Tente Outra vez”**

Raul Seixas

RESUMO

Rapello, Gabriel Victor Guimarães. **Uso do Metilfenidato em ratos: Análise do parênquima pulmonar.** Campo Grande - MS, Brasil; 2011. [Dissertação – Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Objetivo: Analisar o parênquima pulmonar de ratos submetidos a diferentes doses de Cloridrato de Metilfenidato. **Metodologia:** Dezoito animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos iguais, denominados G1, G2 e G3, sendo expostos respectivamente a Solução Fisiológica a 0,9%, 0,8 mg/Kg/dia de Metilfenidato e 1,2 mg/Kg/dia de Metilfenidato por meio de gavagem orogástrica, durante noventa dias. Após este período, os animais foram submetidos a eutanásia e a retirada dos pulmões, e as peças foram encaminhadas para o processamento histológico. A análise do parênquima pulmonar foi realizada por microscopia óptica através da avaliação do diâmetro alveolar médio (Lm), com auxílio do retículo de Weibel, de modo a quantificar a destruição dos septos alveolares. **Resultados:** A análise microscópica com o retículo de Weibel demonstrou aumento significativo do Lm nos grupos expostos ao Metilfenidato, G2 (47.91 ± 3.13 / $p < 0,01$) e G3 (46.36 ± 4.39 / $p < 0,05$), em relação ao G1 (40.00 ± 3.48), porém, entre G2 e G3 não houve diferença estatística. **Conclusão:** O uso do metilfenidato nas doses estudadas promoveu aumento do diâmetro alveolar médio. Essa alteração é compatível com enfisema pulmonar.

Palavras-chave: TDAH, Metilfenidato, Enfisema pulmonar.

ABSTRACT

Rapello, Gabriel Victor Guimarães. **Methylphenidate administration to rats: Analysis of lung parenchyma.** Campo Grande - MS, Brazil; 2011. [Master's thesis – Graduate Program in Health and Development for the Brazilian Mid-West Region at the Federal University of Mato Grosso do Sul].

Objective: To analyze the spectrum of lung parenchyma in rats exposed to different doses of Methylphenidate Hydrochloride. **Research methodology:** Eighteen rats were divided into three equal groups, denominated G1, G2 and G3. The groups received, respectively, Saline Solution (0.9% sodium chloride) and Methylphenidate in doses of 0.8 mg/Kg/day and 1.2 mg/Kg/day, administered through orogastric feeding tubes during a 90-day period. After this period, the rats were euthanized and their lungs removed for histological processing. We employed optical microscopy to perform analysis of lung parenchyma by measuring median alveolar diameters (Lm), using the Weibel test grid, to quantify the extent of damage to alveolar septa. **Results:** Microscopic analysis, aided by the Weibel test grid, showed there was a significant increase in Lm in those groups exposed to Methylphenidate – G2 (47.91 ± 3.13 / $p < 0.01$) and G3 (46.36 ± 4.39 / $p < 0.05$) – when compared to G1 (40.00 ± 3.48). However, we found no statistically significant difference in the results we obtained for groups G2 and G3. **Conclusion:** The doses of methylphenidate that were administered during the course of this study led to an increase in median alveolar diameters. These alterations are consistent with pulmonary emphysema.

Key works: ADHD, Methylphenidate, Pulmonary emphysema

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Organograma caracterizando a distribuição dos animais por grupos.....	26
Figura 2 – Fotografia do sistema respiratório após ressecção da peça com a traquéia clampeada.....	27
Figura 3 – Fotomicrografia das secções pulmonares coradas em HE, com as retas coerentes (retículo de Weibel) sobrepostas à imagem.	29
Figura 4 – Valores de ‘Lm” expressos em média e desvio padrão - todos os grupos. ..	30
Figura 5 – Fotomicrografias de parênquima pulmonar de rato do Grupo Controle para determinação do diâmetro alveolar médio (Lm) com auxílio de uma ocular composta por retículo de retas e pontos	31
Figura 6 – Fotomicrografias de parênquima pulmonar de rato do Grupo Metilfenidato 0,8 mg/Kg. Destaque para as áreas de alargamento do espaço alveolar (estrela) devido à ruptura dos septos alveolares com formação de “baquetas” (setas). Coloração HE. Aumento de 100X	31
Figura 7 – Fotomicrografias de parênquima pulmonar de rato do Grupo Metilfenidato 1,2 mg/Kg. Destaque para as áreas de alargamento do espaço alveolar (estrela) devido à ruptura dos septos alveolares com formação de “baquetas” (setas). Coloração HE. Aumento de 100X	32
Tabela 1 – Valores de ‘Lm” para G1, G2 e G3. Valores expressos em média e desvio padrão	30

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

DAT – Transportadores de Dopamina

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

DSM-IV – Manual Diagnóstico e Estatístico das Doenças Mentais

Li – Número de interceptos de estruturas alveolares com as retas do retículo

Lm – Diâmetro alveolar médio

Ltot – Comprimento total das retas do campo microscópico

NAc – Núcleo Acumbens

PET e carbono-11 ([¹¹C] metilfenidato

MRI – Imagem de Ressonância Magnética

SF 0,9% - Solução Fisiológica a 0,9% ou solução salina

SNC – Sistema Nervoso Central

TDAH – Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade

SUMÁRIO

RESUMO-----	vi
ABSTRACT-----	vii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS-----	viii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS -----	ix
1 INTRODUÇÃO-----	11
2 REVISÃO DE LITERATURA -----	14
2.1 Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade-----	14
2.1.1 Conceito -----	14
2.1.2 Etiologia-----	14
2.1.3 Fisiopatologia-----	15
2.1.4 Apresentação Clínica -----	16
2.1.5 Tratamento-----	18
2.2 Metilfenidato -----	19
2.2.1 Propriedades Gerais -----	19
2.2.2 Farmacocinética -----	20
2.2.3 Farmacodinâmica -----	21
3 OBJETIVOS-----	24
3.1 Objetivo geral-----	24
3.2 Objetivo específico-----	24
4 MATERIAL E MÉTODO -----	25
4.1 Amostra-----	25
4.2 Procedimentos-----	26
4.2.1 Administração da droga -----	26
4.2.2 Eutanásia e retirada dos pulmões-----	26
4.2.3 Preparo e análise histológica -----	27
4.2.4 Análise histológica - Lm -----	28
4.2.5 Análise estatística-----	29
5 RESULTADOS -----	30
6 DISCUSSÃO -----	33
7 CONCLUSÃO-----	37
8 REFERÊNCIAS -----	38
APÊNDICE -----	47

1 INTRODUÇÃO

O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) encontra-se entre os transtornos psiquiátricos mais comuns da infância, apresentando sintomas como transtornos do humor comórbido, ansiedade e incapacidade de aprendizagem, podendo aparecer desde a idade pré-escolar, acompanhado de comportamento hiperativo seguido de problemas de atenção (KAY; TASMAN, 2002).

Segundo a American Psychiatric Association, esse transtorno acomete 3 a 5% de crianças em idade escolar nos Estados Unidos (BALL, 2001). Na Inglaterra, esse distúrbio neurocomportamental atinge 1% das crianças, implicando freqüentemente na necessidade de educação especial e em problemas de relacionamento familiar associados (BURGESS, 2002).

Um estudo do National Institute of Environmental Health Sciences em conjunto com a University of North Carolina, encontrou 10% de uma amostra de crianças de 17 escolas públicas do ensino elementar da Carolina do Norte com sintomas do TDAH, sendo 93% das crianças diagnosticadas tratadas com drogas psicoestimulantes (KUPERSANIN, 2002).

No Brasil, a taxa de prevalência para esse transtorno varia de 2 a 6,3%, e entre crianças com idade escolar, as do sexo masculino apresentam taxas maiores que as do sexo feminino, condição semelhante encontra-se também na adolescência (KAY; TASMAN, 2002).

Evidências demonstram que crianças cujos parentes biológicos apresentem TDAH constituem população de risco para a doença, e achados em estudos sugerem que tal distúrbio pode ser associado à etiologia genética (THAPAR, 2001).

O tratamento para o TDAH compõe-se de intervenção psicológica e/ou psiquiátrica comportamental associada à prescrição de medicamentos estimulantes. A associação desses dois componentes é clinicamente efetiva e de custo relativamente baixo, devendo haver monitorização freqüente em crianças que recebem medicação psicoestimulante (BURGESS, 2002).

O Metilfenidato (cloridrato de metilfenidato) é a droga mais utilizada no tratamento de TDAH (ISHIMATSU, 2002; FARAONE *et al.*, 2006). Constitui um psicoestimulante cujos efeitos mais importantes são a melhora da atenção, concentração e a totalidade da função cognitiva (JANICAK, 1996).

Manuais para o tratamento da TDAH elaborados nos Estados Unidos e Europa indicam a prescrição e monitoração do Metilfenidato como droga terapêutica de primeira escolha (BALL, 2001), e no Brasil não é diferente, o tratamento é realizado com a referida droga, da classe dos psicoestimulantes, considerado a droga-ouro no tratamento do TDAH e aprovado pelo FDA e ANVISA para uso em crianças a partir de seis anos de idade (MTA COOPERATIVE GROUP 1999; YANG *et al.*, 2006).

A eficácia dessa medicação para o tratamento do TDAH é evidenciada por todos os estudos científicos, encontrando uma redução estatística e clinicamente significativa dos sintomas do transtorno e melhora do funcionamento em vários aspectos (SPENCER *et al.*, 1992).

O Metilfenidato é um estimulante leve do sistema nervoso central, com efeitos mais proeminentes sobre a atividade mental do que sobre a motora. Sofre rápida absorção após administração oral e atinge concentrações máximas no plasma em cerca de duas horas, com meia-vida de 1 a 3 horas (HARDMAN, 1996).

Muitos pesquisadores preocupam-se com os efeitos sistêmicos da medicação, principalmente por ser caracterizada como droga de uso prolongado, e dirigem o foco dos estudos ao comportamento orgânico em diferentes órgãos e sistemas, que não o sistema nervoso central.

Thai *et al.* (1999), estudando a distribuição sistêmica do medicamento, revelaram em amostras colhidas 30 minutos após injeção intra-peritoneal de 37 $\mu\text{mol/kg}$ de metilfenidato em ratos a seguinte ordem de concentração tecidual: rins > pulmões > cérebro > coração = fígado. Decorridos 120 minutos, a concentração da droga ainda era maior nos rins e pulmões que no cérebro das cobaias, demonstrando distribuição e absorção sistêmicas importantes na administração da droga.

Sherman *et al.* (1987) documentaram uma síndrome de esclerose vascular pulmonar em usuários de metilfenidato de forma abusiva (intravenosa), relatando o caso de seis pacientes que apresentaram doença pulmonar obstrutiva (enfisema severo precoce). Todavia, não houve evidências suficientes para afirmar que o metilfenidato seria o agente causador dos distúrbios pulmonares encontrados.

Os distúrbios respiratórios ocasionados pelo enfisema pulmonar, sabidamente são oriundos do tabagismo, entretanto, estudos como o de Bense *et al.* (2002)

descrevem achados indicando que as alterações pulmonares típicas de enfisema podem ser geneticamente determinadas.

Alguns outros estudos demonstraram que o enfisema pode desenvolver-se com inflamação mínima ou inexistente. Ratos expostos a agentes que interferem nos receptores do fator de crescimento endotelial vascular evoluíram com decréscimo nas células endoteliais alveolares e capilares e desenvolveram enfisema. O mecanismo pelo qual isto ocorreu ainda não está bem estabelecido, mas os modelos sugerem que diversos mecanismos homeostáticos são necessários na preservação da estrutura pulmonar normal (HOGG; SENIOR, 2002).

Apesar dos diversos trabalhos abordando o uso do Metilfenidato, a literatura disponível não apresenta dados contundentes entre o uso do metilfenidato e seus efeitos no sistema respiratório e a influência desses sobre alterações arquitetônicas pulmonares.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade

2.1.1 Conceito

O TDAH é caracterizado conceitualmente por uma síndrome neurocomportamental com sintomas classificados em três categorias: desatenção, hiperatividade e impulsividade, com nível inapropriado de atenção em relação ao que se espera para a idade; com ou sem impulsividade e hiperatividade (GOLDMAN *et al.*, 1998; KIRBY *et al.*, 2002; MILLER; CASTELLANOS, 1998; SWANSON *et al.*, 1998).

Estes sintomas aparecem em dois ou mais ambientes distintos (casa e escola, e ou/ casa e trabalho), levando a distúrbios motores, perceptivos cognitivos e comportamentais, que cursam com importante comprometimento funcional social, profissional e afetivo. À medida que o indivíduo cresce, também há aumento das comorbidades, especialmente no aspecto psiquiátrico (MILLER; CASTELLANOS, 1998).

Na infância, entre 4 e 5 anos é aceitável certo grau de hiperatividade, em função do processo neuroevolutivo, haja vista que a região pré-frontal completa sua mielinização durante esta faixa etária, pois o encéfalo possui uma progressão pósterio-anterior, mielinizando primeiro a região da visão e por último as áreas anteriores (MICK *et al.*, 2002).

Epidemiologicamente, o TDAH tem uma prevalência estimada de 5 a 8% (FARAONE *et al.*, 2003; NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2000; ROHDE *et al.*, 1999) na idade escolar (acima de 7 anos) com variações de 3 a 17,8%, diminuindo sua prevalência com o aumento da idade, atingindo aproximadamente 4% dos adultos (FARAONE *et al.*, 2003; SWANSON *et al.*, 1998).

2.1.2 Etiologia

O TDAH possui etiologia multifatorial, as causas exatas ainda são desconhecidas, contudo a influência de fatores genéticos e ambientais já estão bastante fundamentadas na literatura (TANNOCK *et al.*, 1998).

O envolvimento genético é substancial, e acredita-se que vários genes sejam responsáveis pela suscetibilidade genética ao transtorno somado aos agentes ambientais. Os estudos que sugerem a influência genética ao diagnóstico do transtorno, afirmam uma herdabilidade relativamente alta, ultrapassando 70% (THAPAR *et al.*, 1999; TANNOCK, 1998).

O risco de TDAH parece ser de 2 a 8 vezes maior nas crianças cujos pais foram afetados, em relação a população geral (FARAONE, 1998). Um dos genes do sistema dopaminérgico intensamente investigado neste transtorno é o gene do receptor D4 de dopamina. O grande interesse por este gene surgiu a partir da observação de sua associação com a dimensão de personalidade “busca de novidades”, provavelmente relacionada ao TDAH (EBSTEIN, 1996).

Além disso, o produto deste gene concentra-se em áreas do cérebro cujas funções estão prejudicadas na doença (MATSUMOTO, 1995; BARKLEY, 1997).

A associação do TDAH com complicações na gestação ou no parto também são estudadas, porém, com resultados bastante divergentes. Segundo Mick seus colaboradores, situações como toxemia, eclâmpsia, pós-datismo, trabalho de parto muito longo, estresse fetal, baixo peso ao nascer, hemorragias pré-parto e má saúde materna favorecem ao transtorno (MICK *et al.*, 2002).

Além desses, também há associação entre exposição a fumo e álcool durante a gravidez e a presença do TDAH nos filhos. (FARAONE; BIEDERMAN, 2003).

2.1.3 Fisiopatologia

A fisiopatologia do TDAH envolve o circuito regulatório neural, incluindo o córtex pré-frontal e os gânglios basais que são modulados pela função dopaminérgica do mesencéfalo. A teoria proeminente é que no TDAH existe uma disfunção da neurotransmissão dopaminérgica, com conseqüente desregulação desses circuitos, incluindo a área frontal (pré-frontal, frontal motora, giro do cíngulo); regiões subcorticais (estriado, tálamo mediodorsal) e a região límbica cerebral (núcleo acumbens (NAc), amígdala e hipocampo) (CASTELLANOS, 1997; DINN *et al.*, 2001).

Os sintomas relacionados com a hiperatividade e impulsividade nesse transtorno parecem ser controlados pela via dopaminérgica nigroestriatal. A base neurobiológica para o TDAH ainda não está completamente definida. Não ocorre

prejuízo em uma única via ou região cerebral, existem evidências de hipofunção dopaminérgica no lobo frontal e nos gânglios da base. Estudos de neuroimagem e ressonância magnética (MRI) sugerem que existe menos atividade neural na região frontal e nos gânglios da base (ZAMETKIN *et al.*, 1993; BAUMGARDNER *et al.*, 1996; CASTELLANOS *et al.*, 1996; FILIPEK *et al.*, 1997; MATARO *et al.*, 1997), e alterações no córtex cingular anterior em indivíduos que apresentam TDAH (BUSH *et al.*, 1999).

Uma das primeiras teorias anatomofuncionais propostas para explicar a neurobiologia do TDAH descreve disfunções nas áreas frontais e suas conexões subcorticais no sistema límbico.

No princípio, só havia o entendimento do envolvimento do sistema atencional anterior, e o TDAH era entendido como um fraco controle inibitório frontal sobre as estruturas límbicas. Com isso, a teoria de um único centro atencional, apesar de bem comprovada por estudos neuropsicológicos, de neuroimagem funcional e neurotransmissores, só pode explicar alguns casos de TDAH.

A visão anatomofuncional mais abrangente e completa deve incluir um circuito neural com dois sistemas atencionais: um anterior que tende a ser dopaminérgico e envolve a região pré-frontal e suas conexões subcorticais (responsável pelo controle inibitório e funções executivas, como a memória de trabalho) e outro posterior, principalmente noradrenérgico (responsável pela regulação da atenção seletiva) (RIESGO; RODHE, 2004).

Apesar da importância das funções dos dois sistemas atencionais na neurobiologia do TDAH, ainda são poucas as demonstrações diretas das suas relações recíprocas no transtorno.

2.1.4 Apresentação Clínica

Classicamente mencionam-se três subtipos de TDAH: com predomínio de desatenção; com predomínio de hiperatividade e com uma combinação de ambos. É considerado um distúrbio que se inicia tipicamente cedo na infância e continua na idade adulta (CASTELLANOS, 1997).

O quadro clínico se baseia fundamentalmente nos três sinais principais que são identificados como déficit de atenção, a hiperatividade e a impulsividade, com possíveis variações entre eles. A descrição da sintomatologia está definida pelos

critérios do Manual Diagnóstico e Estatístico das Doenças Mentais (DSM-IV), as crianças com TDAH são facilmente reconhecidas em clínicas, escolas e em casa (TAYLOR *et al.*, 2001).

A desatenção, a hiperatividade ou a impulsividade como sintomas isolados podem resultar de muitos problemas de relacionamento, sistemas educacionais inadequados ou podem estar associados a outros transtornos comumente encontrados na infância e adolescência. Portanto, para o diagnóstico do TDAH, é sempre necessário contextualizar os sintomas na história de vida da criança (RODHE *et al.*, 2000).

Algumas condições especiais são requeridas para o seu diagnóstico: a. A duração dos sintomas de desatenção e ou hiperatividade/impulsividade: as crianças com o transtorno têm história clínica desde a idade pré-escolar com presença dos sintomas ou pelo menos um período de vários meses de sintomatologia intensa; b. Frequência e intensidade dos sintomas: é fundamental que pelo menos 6 dos sintomas de desatenção e ou 6 dos sintomas de hiperatividade/impulsividade estejam presentes na vida da criança; c. Persistência dos sintomas em vários locais e ao longo do tempo: por exemplo casa e escola; d. Prejuízo clínico significativo na vida da criança; e. Verificar cuidadosamente se o sintoma supostamente presente correlaciona-se com o constructo básico do transtorno, ou seja, a desatenção, hiperatividade/impulsividade (RHODE *et al.*, 2000).

A apresentação pode variar de acordo com o estágio de desenvolvimento. O diagnóstico deve ser cauteloso antes dos 6 anos de idade. Existe uma alta prevalência de comorbidades entre o TDAH e os transtornos disruptivos do comportamento, como o transtorno de conduta e o do opositor desafiante, situada na faixa de 30 a 50%. As taxas de comorbidades também são bastante significativas com a depressão (5 a 20%), transtornos de ansiedade (25%) e transtorno de aprendizado (10 a 25%) (BIEDERMAN *et al.*, 1991).

Também há associação de TDAH e abuso e dependência de drogas na adolescência e, principalmente, na fase adulta (BIEDERMAN, 1991). A base para a avaliação diagnóstica é formada pela história clínica, observação do comportamento atual do paciente e relato dos pais e professores sobre o comportamento da criança nos diversos ambientes que frequenta. A história clínica pregressa sobre o comportamento é decisiva para definição diagnóstica, assim como a história médica perinatal e os problemas relacionados à prematuridade (LOWE, 2003). A avaliação

neurológica também é de extrema relevância, e além do exame neurológico evolutivo, testes neuropsicológicos também podem ser realizados (RODHE *et al.*, 2003).

2.1.5 Tratamento

O tratamento do TDAH envolve uma abordagem múltipla, englobando intervenções psicossociais e psicofarmacológicas (AMERICAN ACADEMY PEDIATRICS GUIDELINE, 1997). Burgess (2002) cita que a associação desses dois componentes é clinicamente efetiva e de custo relativamente baixo, mas ressalva que deve haver monitorização freqüente em crianças que recebem medicação psicoestimulante.

O tratamento não-farmacológico engloba manejo educacional, avaliação psicossocial e psiquiátrica, acompanhamento paciente/família- ambientes e terapia cognitiva comportamental, que tem sido vista como uma das formas de tratamento de maior eficácia (MTA COOPERATIVE GROUP, 2004).

No tratamento farmacológico, estimulantes do SNC são os fármacos de primeira linha. A farmacoterapia deve ser orientada levando-se em consideração as comorbidades, sendo o Metilfenidato a droga mais utilizada no tratamento do transtorno (ISHIMATSU, 2002).

2.2 Metilfenidato

2.2.1 Propriedades Gerais

O metilfenidato tem sido usado como tratamento para o TDAH por mais de 50 anos, por apresentar resultados efetivos, é o fármaco mais prescrito entre os especialistas, pois reduz de maneira considerável os sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade (GREENNHILL *et al.*, 2002).

Suas propriedades farmacológicas têm sido bem caracterizadas, mas seu mecanismo de ação não está totalmente claro (SOLANTO, 1998).

O metilfenidato é um derivado da piperidina e está relacionado estruturalmente à anfetamina. É considerado um modesto estimulante do SNC, mas com proeminentes efeitos em atividades mentais e motoras. Em grandes doses provoca sinais de estimulação generalizada do SNC, que podem levar a crises convulsivas e apresenta propriedades farmacológicas essenciais idênticas às anfetaminas. O metilfenidato também compartilha o potencial de uso abusivo das Anfetaminas, considerado como substância controlada da classe II nos EUA. O fármaco está envolvido no controle da atenção em nível de córtex cerebral. Além do TDAH, está indicado para o tratamento da narcolepsia (GOODMAN, 1998).

O principal mecanismo de ação deste fármaco está relacionado com o aumento de dopamina na fenda sináptica, liberada em resposta a um estímulo evidente. Ele o faz principalmente pela ligação com os transportadores de dopamina (DAT), bloqueando-os (CASTELANOS *et al.*, 1996; VOLKOW *et al.*, 1994). Além disso, bloqueia também transportadores de noradrenalina (DOUGHERTY *et al.*, 1999).

A disfunção nos sistemas dopaminérgicos e noradrenérgicos tem uma função de auto-regulação como atenção seletiva (neurônios noradrenérgicos) e motivação (sistema dopaminérgicos), os quais estão implicados na patogênese do TDAH (DOUGHERTY *et al.*, 1999; SOLANTO, 1998). O efeito do metilfenidato pode envolver outros sistemas de neurotransmissores como noradrenalina (KUCZENSKI; SEGEL, 1997), serotonina (GAINETDINOV *et al.*, 1999) e glutamato (GAINETDINOV, 2001).

2.2.2 Farmacocinética

A farmacocinética específica do metilfenidato reside principalmente no enantiômero *D* (DING *et al.*, 1997; PATRICK *et al.*, 1987). No cérebro humano, o *D*-metilfenidato liga-se aos DAT enquanto o enantiômero *L*-metilfenidato não (DING *et al.*, 1997).

A distribuição do *D*-metilfenidato em cérebros de babuínos e humanos é maior nos gânglios da base, enquanto o enantiômero *L*-metilfenidato se distribui de forma homogênea em todo cérebro. Ambos enantiômeros têm taxas similares de captação, com pico de concentração alcançado dentro de 10 minutos após a administração. No entanto, a taxa de depuração do enantiômero *D* é significativamente mais lenta do que do *L*. Segundo Volkow *et al.* (2005), a farmacocinética do metilfenidato no cérebro humano é investigada através do uso de PET e carbono-11 ([¹¹C] metilfenidato) (VOLKOW *et al.*, 1995).

Quando administrado de forma intravenosa a captação de [¹¹C] metilfenidato pelo cérebro humano foi alta (7,5% ± 1,5%) e rápida, com o pico alcançado em 4 a 10 minutos. A distribuição do metilfenidato administrado por via oral foi significativamente mais lenta do que por via intravenosa. Após a administração oral, o fármaco atinge seu pico de concentração cerebral entre 60 a 90 minutos, bloqueando mais de 50% dos DAT, fazendo com que aumente significativamente o nível de dopamina extracelular nos gânglios basais, em especial no estriado (VOLKOW *et al.*, 1995).

Estudos de imagem em cérebros humanos têm demonstrado que o bloqueio dos DAT pelo metilfenidato é dose-dependente (VOLKOW *et al.*, 1998). A dose terapêutica é variável, porém, parece razoável que a dose máxima diária não ultrapasse 60 mg, conforme indicação do laboratório farmacêutico responsável pela distribuição da droga no Brasil (NOVARTIS, 2010). Um estudo duplo cego realizado por Barkley *et al.*, (1990), cujo objetivo era avaliar os efeitos colaterais do Metilfenidato em diferentes doses, classificou as doses de 0,3 mg/Kg e 0,5 mg/Kg como baixa e como alta dose respectivamente.

Spencer *et al.* (1995), descreveram doses diferentes aplicadas a pacientes adultos e pediátricos. Essa meta análise mostrou que as doses utilizadas em pacientes adultos eram menores do que as utilizadas em crianças (0,5 mg/Kg/dia X

1,0 mg/Kg/dia respectivamente), o que justificava os melhores resultados no controle dos sintomas do TDAH nos infantis.

Independente da dose, o pico de ação do metilfenidato é de 2 horas e o tempo de meia-vida, de 1 a 3 horas (HARDMAN, 1996). tendo como principal metabólito urinário um produto desesterificado, denominado ácido ritalínico (HARDMAN ET AL 2003). Por esse motivo, o metilfenidato tem sido considerado um fraco estimulante do SNC, pois possui rápido metabolismo em ácido ritalínico, nas doses orais recomendadas. Seu metabólito tem pouca afinidade pelos DAT, indicando que o metilfenidato, na dose terapêutica, bloqueia um grande percentual de DAT (VOLKOW *et al.*, 1998).

2.2.3 Farmacodinâmica

O tratamento com metilfenidato leva a uma amplificação do sinal dopaminérgico pelo bloqueio dos DAT, visto que a dopamina diminui no neurônio estriatal após sua liberação enquanto o sinal córticoestriatal se fortalece nas células do estriado. Esta amplificação aumenta o sinal seletivo nos neurônios alvo (KIYATKIN; REBEC, 1996). Dessa forma, uma conclusão que se chega é a de que em indivíduos com TDAH, o tratamento com metilfenidato induz um aumento na amplificação do sinal dopaminérgico estriatal, que poderia levar à melhora da atenção e diminuição da distração. Adicionalmente, a dopamina é um neurotransmissor que salienta o sinal do estímulo e dirige a motivação da performance na direção da meta do comportamento (BERRIDGE; ROBINSON, 1998; HOLLERMAN; SCHULTZ 1998; KOOB, 1996).

Desse modo, poderia se especular que a melhora do sinal dopaminérgico induzida pelo metilfenidato causa um aumento na percepção do estímulo para realização e motivação do indivíduo para engajar-se em tarefas com melhora da atenção e performance. Volkow *et al.* (2005) relataram que o efeito do metilfenidato tem duas hipóteses.

A primeira considera que pelo bloqueio dos DAT, a dopamina extracelular ativa autorreceptores locais pré-sinápticos, levando a uma atenuação da dopamina liberada em resposta a fase celular dopaminérgica de gatilho (SEEMAN, MADRAS, 1998). A segunda hipótese sugere que os bloqueios dos DAT dominam os efeitos inibitórios da ativação de auto-receptores, o que leva a um efeito de rede

acumulando dopamina na sinapse e amplificando o sinal dopaminérgico. A dopamina está envolvida em diversas doenças do SNC, como Doença de Parkinson, esquizofrenia e TDAH, em certos distúrbios endócrinos e na dependência de drogas (AZMITIA, 1995).

A distribuição de dopamina no cérebro é mais restrita do que a noradrenalina, encontra-se em quantidades mais abundantes no corpo estriado, uma parte do sistema motor extrapiramidal relacionada coordenação do movimento (BERRIDGE, 1998).

Os receptores dopaminérgicos são em grande número e distribuem-se amplamente no cérebro, estão mais concentrados no estriado, sistema límbico, córtex frontal, hipotálamo e adenohipófise. Estão agrupados em duas famílias, D1 e D2, relacionados respectivamente com ativação e inibição da adenilatociclase (KIYATKIN, 1996).

A família de receptores D1 inclui D1 e D5 e a família D2 inclui D2, D3 e D4. Todos os receptores são pertencentes à família dos receptores transmembranas acoplados à proteína G. Os receptores D1 são mais abundantes em regiões dopaminérgicas, como o estriado, sistema límbico, tálamo e hipotálamo. Os receptores D3 são encontrados no sistema límbico, mas não no estriado. Os receptores D4 são fracamente expressos, principalmente no córtex e no sistema límbico, porém são de grande interesse pelo possível envolvimento com a esquizofrenia, dependência de drogas e com o TDAH. (VOLKOW *et al.*, 1994).

Apesar da interação medicamentosa com tais receptores cerebrais, e da potente ação amplificadora dos sinais dopaminérgicos, outros efeitos relacionados ao uso do metilfenidato são conhecidos e descritos na literatura como efeitos adversos, destacando-se como os mais comuns: dor abdominal, insônia, anorexia, perda de apetite e déficit de crescimento (EFRON *et al.*, 1997; GOLINKO, 1984). Apesar disso, pouco se conhece sobre seus efeitos em outros sistemas, que não o Sistema Nervoso Central.

Em 1999, um estudo realizado por Thai e seus colaboradores revelou em amostras colhidas 30 minutos após injeção intra-peritoneal de 37 $\mu\text{mol/kg}$ de metilfenidato em ratos a seguinte ordem de concentração tecidual: rins > pulmões > cérebro > coração = fígado (Thai *et al.*, 1999). Decorridos 120 minutos, a concentração da droga ainda era maior nos rins e pulmões que no cérebro das cobaias, demonstrando distribuição e absorção sistêmicas importantes na

administração da droga, o que justifica a necessidade de desenvolvimento de novos estudos abordando os efeitos do metilfenidato sobre outros órgãos e sistemas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Estudar o parênquima pulmonar de ratos sob efeito de metilfenidato.

3.2 Objetivo específico

- Realizar análise do diâmetro alveolar médio dos pulmões dos ratos.

MATERIAL E MÉTODO

4.1 Amostra

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais/CEUA/UFMS pelo certificado nº 205/2009, e todos os procedimentos respeitaram as normas internacionais para experimentação animal, sendo realizado no laboratório experimental de fisiologia animal da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (UNIDERP), em Campo Grande, MS.

Foram estudados dezoito *Rattus norvegicus albinus*, linhagem *Wistar*, procedentes do Biotério da UNIDERP. Todos animais eram machos, com idade variando entre sessenta e setenta e cinco dias, e peso variando entre cento e cinquenta e duzentos gramas, mantidos em caixas de polipropileno (seis animais por caixa) com dimensões de trinta e três centímetros de largura, quarenta centímetros de profundidade e dezessete centímetros de altura, com tampas/grades de aço inoxidável contendo espaço para ração e água - Brasholanda®.

O laboratório experimental foi mantido com temperatura oscilando entre vinte e vinte e cinco graus celcius, e iluminado artificialmente por aproximadamente doze horas/dia.

A oferta alimentar foi realizada de forma contínua, *ad libitum* com ração da marca Nuvilab CR1 – Nuvital Nutrientes, sendo essa substituída uma vez ao dia, e a oferta hídrica realizada apenas com água potável, colocada em bebedouros com capacidade para quinhentos mililitros adaptados às caixas, também substituídos diariamente.

O peso dos animais foi aferido em balança de precisão da marca Marte AS 2000C, com capacidade máxima de 400 gramas e variação de um centésimo de grama. A pesagem foi realizada em todos os animais diariamente durante o período de experimento, procedendo-se o registro em formulário apropriado.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos, contendo seis ratos cada, conforme descrito a seguir:

G1 – Grupo Controle (Solução Fisiológica 0,9%)

G2 – Grupo Dose terapêutica (Cloridrato de Metilfenidato 0,8 ml/Kg/dia)

G3 – Grupo Superdose (Cloridrato de Metilfenidato 1,2 ml/Kg/dia)

Os animais do G3 foram submetidos a uma dosagem de Cloridrato de Metilfenidato 50% maior que a do G2, caracterizando a “superdose” (Figura 1).

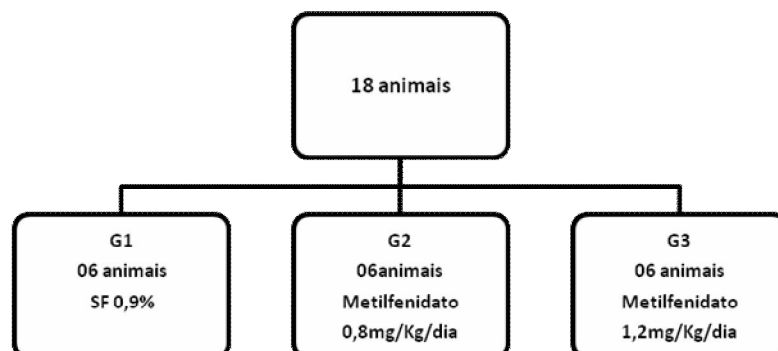


Figura 1: Caracterização da distribuição dos animais em três grupos

4.2 Procedimentos

4.2.1 Administração da droga

Para a infusão da droga, foram utilizados comprimidos de Metilfeniato em apresentação de 10 mg, que eram diluídos em 10 ml de Solução Fisiológica, proporcionando dessa forma, 1 mg/ml da solução a ser administrada.

A administração da droga era feita por uma seringa de insulina acoplada a uma agulha de gavagem orogástrica, contendo a solução preparada pela diluição. As doses calculadas para cada animal eram aplicadas uma vez ao dia, administradas com intervalo exato de 24 horas.

Os grupos receberam a infusão específica das soluções durante o período de 90 dias, quando então, no 91º dia de experimento, foram submetidos eutanásia, com posterior retirada dos pulmões.

4.2.2 Eutanásia e retirada dos pulmões

A eutanásia foi realizada por meio de injeção letal de Tiopental Sódico (Cristália – Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. – Campinas, SP) pó estéril diluído em Solução Fisiológica de Cloreto de Sódio a 0,9% em concentração de 100 mg/Kg via intraperitoneal.

A retirada dos pulmões foi realizada com os animais posicionados e fixados em decúbito dorsal, submetidos à incisão mediana partindo da região cervical anterior e estendendo-se até aproximadamente um centímetro abaixo do apêndice xifóide (Figura 2). O acesso a cavidade torácica foi feito a partir da incisão sub-xifóide e osteotomia costal paraesternal. Antes de se proceder à pleurotomia a traquéia era clampeada com pinça hemostática para prevenção do colapso maciço do tecido pulmonar, conforme método descrito por Silva (2006).

Após cuidadosa ressecção, os pulmões eram submersos em formol tamponado a 10% e enviados para processamento dos cortes histológicos.

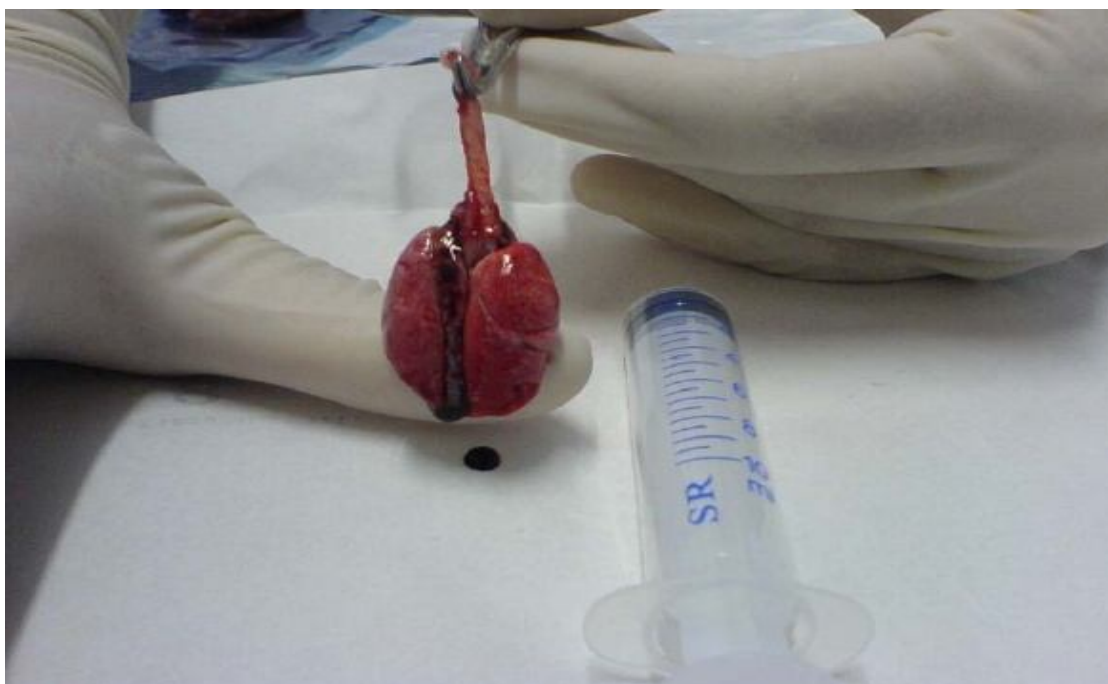


Figura 2: Fotografia da peça anatômica após cuidadosa ressecção. Notar insuflação pulmonar mantida pelo pinçamento traqueal. *Silva (2006).

4.2.3 Preparo e Análise Histológica

O processo histológico foi iniciado após 24 horas de imersão em formaldeído, com 01 hora de imersão em álcool etílico a 90%, 01 hora de imersão em álcool etílico a 95%, e 04 sessões de imersão com uma 01 hora de duração cada em álcool etílico absoluto.

Posteriormente as peças foram submersas em 02 sessões de 01 hora cada em xilol, seguida de imersão em parafina I durante 02 horas, parafina II durante 02 horas e emblocamento com parafina histológica acrescida de 20% de cera de abelha em 02 sessões de 2,5 minutos.

Os blocos foram cortados com navalha de 04 micras, sendo os cortes resultantes colocados em lâminas e posteriormente em estufa a 60°C por aproximadamente 12 horas.

Após desparafinização, os cortes sofreram coloração com hematoxilina-eosina (HE). Inicialmente as lâminas eram submersas durante 02 minutos em xilol I seguido de 02 minutos em xilol II, hidratadas com imersão por 1,5 minutos em álcool etílico absoluto; 1,5 minutos em álcool etílico a 90%; 1,5 minutos em álcool etílico a 80%; 1,5 minutos em álcool etílico a 70%; 02 minutos em água e imersão em hematoxilina por 1,5 minutos.

O processo de desidratação foi realizado com imersão em água seguido de imersão por 04 minutos em eosina. Foram realizadas sessões de imersão com duração de 1,5 minutos em álcool etílico a 80%; 90%; e 03 sessões em álcool etílico absoluto. Novamente banho de xilol I durante 01 minuto, banho de xilol II durante 01 minuto e imersão em xilol III durante aproximadamente 20 minutos.

Os cortes foram analisados por um profissional patologista e os achados histopatológicos descritos para posterior análise. As imagens de cada campo coradas por hematoxilina-eosina (HE) foram obtidas a partir de um microscópio de luz ZEISS® - ICS/KSZ com lente Achromat-0,25 com objetiva de imersão e aumento final de 200X.

4.2.4 Análise histológica - L_m

Para a análise quantitativa foi verificada a presença de destruição alveolar determinada pela medida do diâmetro alveolar médio em micrômetros (L_m) dos pulmões direitos.

Essa técnica consiste na determinação do número de vezes que estruturas do parênquima de troca gasosa intercepta um conjunto de retas coerentes (Figura 3). Dessa forma, no caso de presença de enfisema, o número de interceptos das estruturas alveolares com o sistema de retas é menor, indicando destruição alveolar.

O diâmetro alveolar médio L_m é obtido pela relação: $L_m = L_{tot} / L_i$

sendo L_{tot} o comprimento total das retas do campo microscópico e L_i o número de interceptos de estruturas alveolares com as retas do retículo (FUSCO et al, 2002).

Com objetivo de realizar a morfometria, 15 campos microscópicos (ZEISS® - ICS/KSZ), com aumento de 100 vezes, escolhidos aleatoriamente, não-coincidentes, foram examinados com a ajuda de uma ocular integradora.

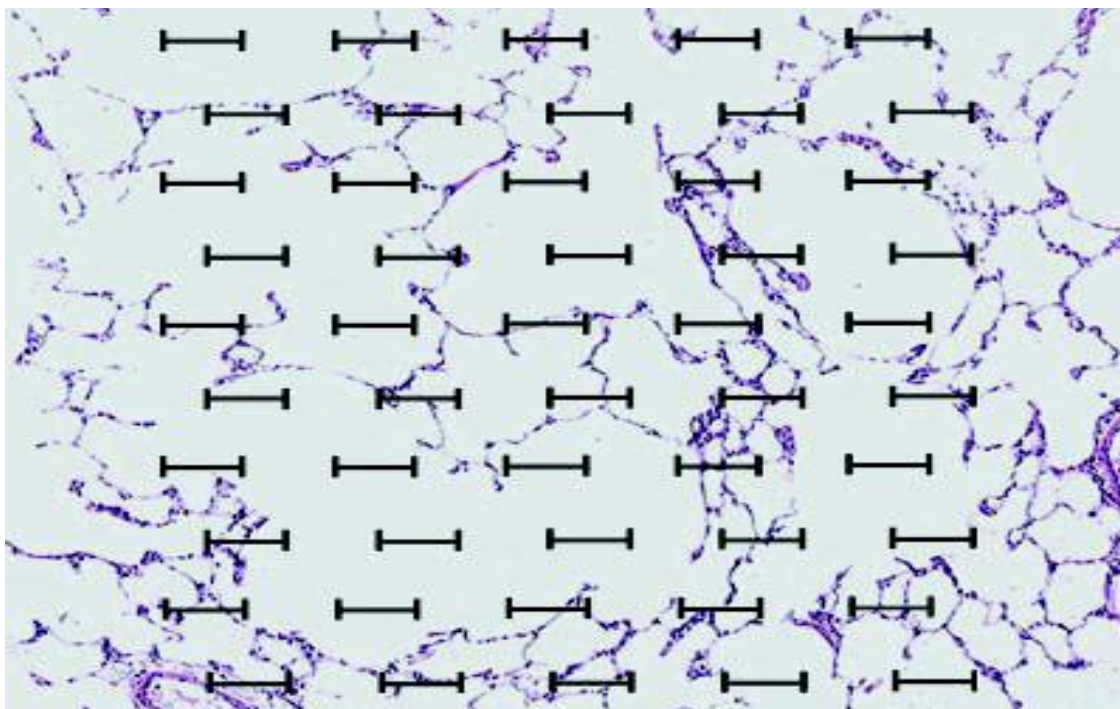


Figura 3: Fotomicrografia das secções pulmonares coradas em HE, com as retas coerentes (retículo de Weibel) sobrepostas à imagem. **Fusco et al. (2002).

4.2.5 Análise estatística

Os dados foram tabulados em planilha eletrônica Microsoft Excel 2007 e analisados estatisticamente no Software BioEstat 5.0.

Os valores relacionados ao " L_m " foram tabulados com a obtenção das medidas de tendência central (média) e de dispersão (desvio padrão). Para a observação quanto à distribuição dos valores foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk aplicado para a avaliação do " L_m ". Foi testada a hipótese de nulidade, com distribuição normal dos valores e a hipótese alternativa com distribuição não normal. O nível de decisão estabelecido foi de $p \leq 0,05$. Em relação à variável " L_m " aceitou-se a hipótese de nulidade com distribuição normal dos valores ($p > 0,05$).

5 RESULTADOS

Para a comparação entre os grupos foi utilizada análise da variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey.

Os valores de comparação estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Valores de L_m para G1, G2 e G3. Valores expressos em média e desvio padrão.

Variável	G1 SF	G2 0,8	G3 1,2	ANOVA	Pós-Teste Tukey
“ L_m ”	40.00±3.48	47.91±3.13	46.36±4.39	0.0053	SF vs 0.8 <0.01
					SF vs 1.2 <0.05

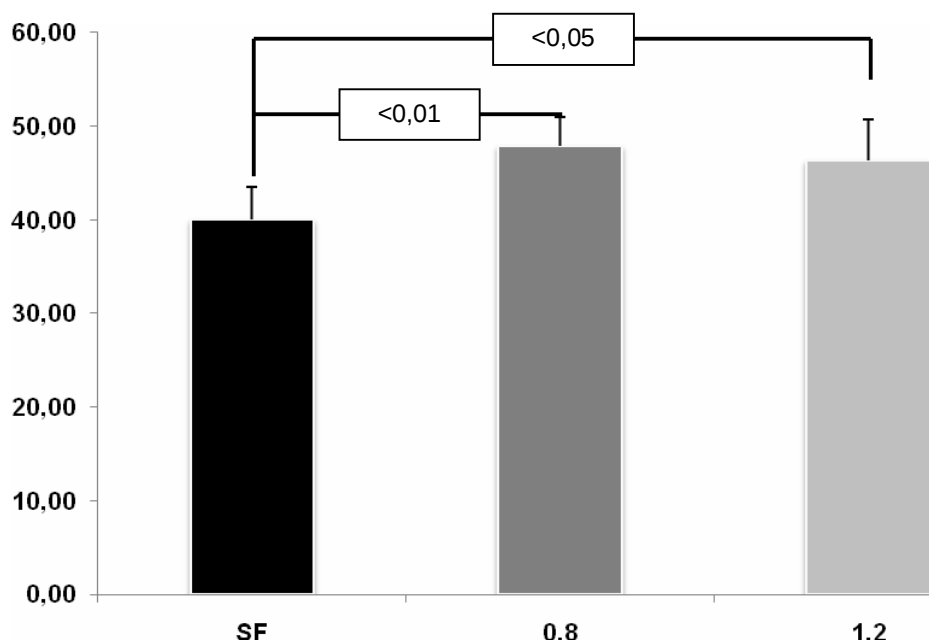


Figura 4. Valores de L_m expressos em média e desvio padrão para todos os grupos.

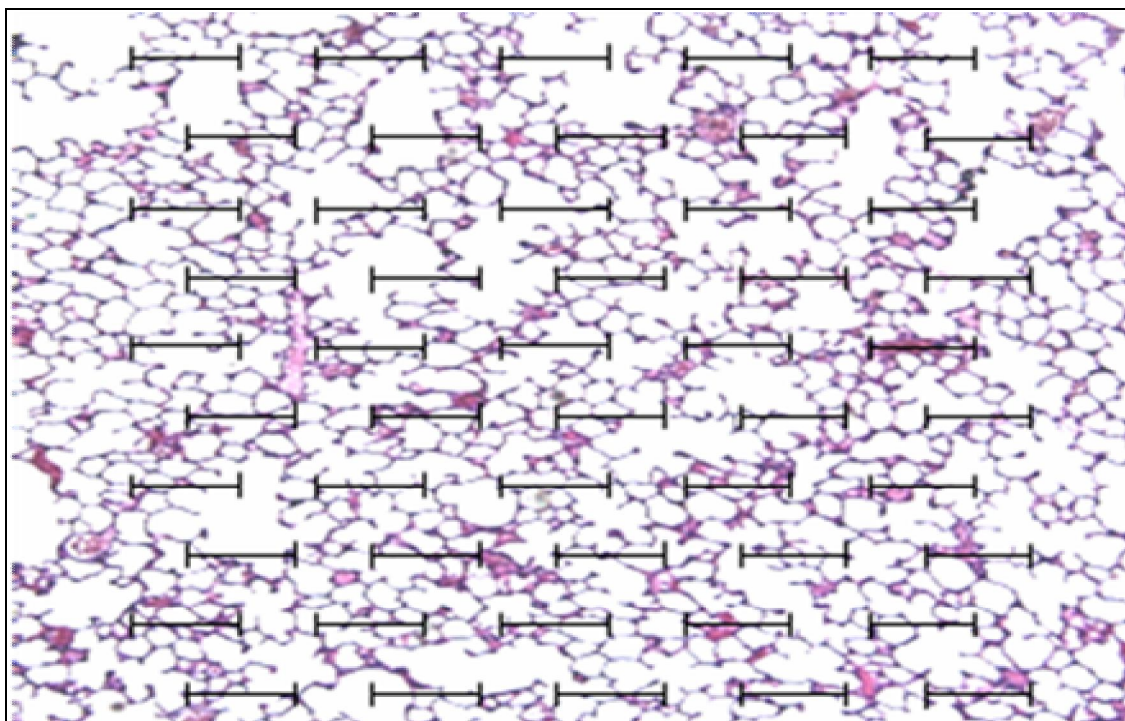


Figura 5 – Fotomicrografias de parênquima pulmonar de rato do Grupo Controle para determinação do diâmetro alveolar médio (L_m) com auxílio de uma ocular composta por retículo de retas e pontos.

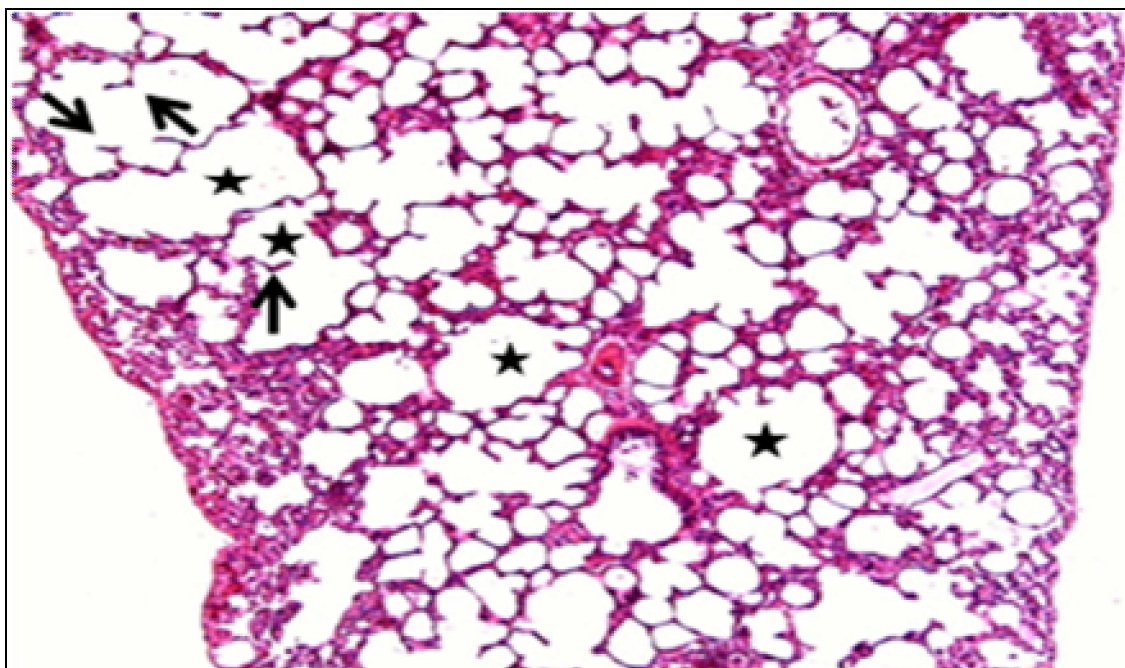


Figura 6 – Fotomicrografias de parênquima pulmonar de rato do Grupo Metilfenidato 0,8 mg/Kg. Destaque para as áreas de alargamento do espaço alveolar (estrela) devido à

ruptura dos septos alveolares com formação de “baquetas” (setas). Coloração HE. Aumento de 100X.

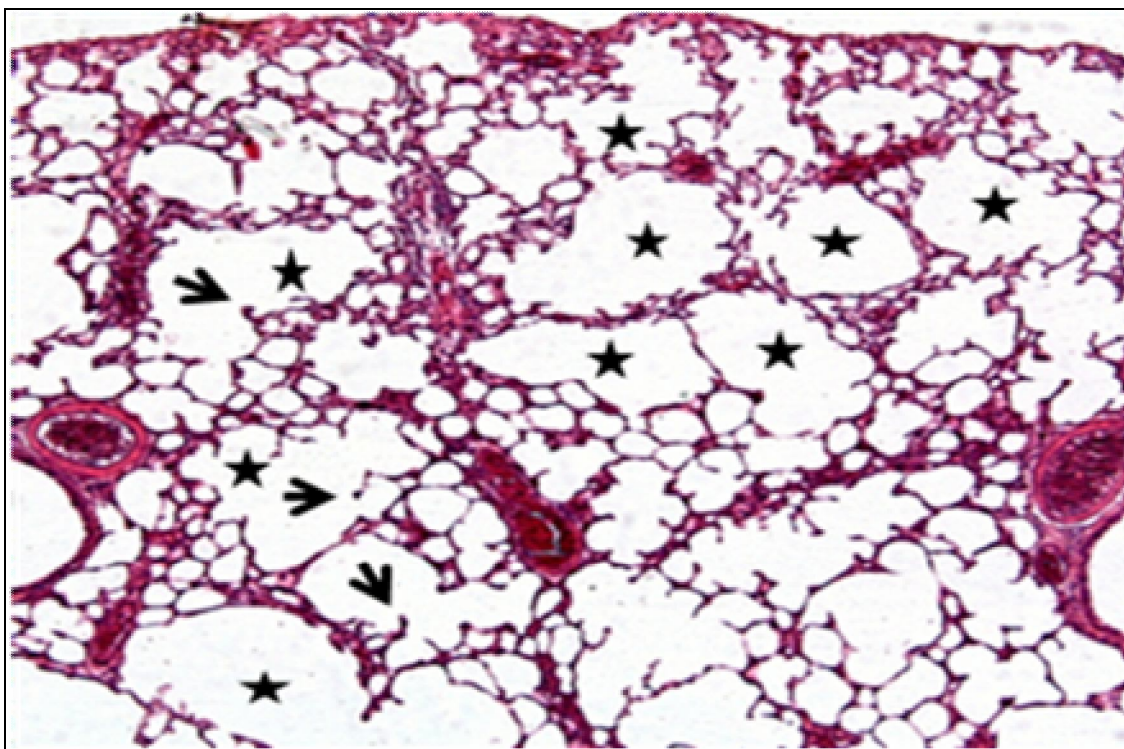


Figura 7 – Fotomicrografias de parênquima pulmonar de rato do Grupo Metilfenidato 1,2 mg/Kg. Destaque para as áreas de alargamento do espaço alveolar (estrela) devido à ruptura dos septos alveolares com formação de “baquetas” (setas). Coloração HE. Aumento de 100X.

6. DISCUSSÃO

O metilfenidato é citado em vários momentos como a droga de primeira escolha no tratamento medicamentoso do TDAH (ISHIMATSU, 2002; FARAONE *et al.*, 2006), e em conjunto com outros tipos de tratamento mostra-se clinicamente efetivo (BURGUESS, 2002), e ainda com custo relativamente baixo, porém, isso não exclui a necessidade de melhor monitoração, principalmente quanto aos efeitos colaterais.

A correlação ainda não explicada entre o uso do Metilfenidato e o surgimento de alterações compatíveis com enfisema nos pulmões de usuários da droga (SHERMAN *et al.*, 1987), parece não ter despertado o interesse da comunidade científica para as possíveis alterações respiratórias causadas pelo uso do medicamento. Talvez esse fato justifique-se pela escassez de informações metodológicas do estudo, que por exemplo, não esclarece as doses ingeridas e o tempo de exposição à droga pelos usuários.

Outro estudo que aguça a busca pelos efeitos da exposição do metilfenidato no sistema respiratório é o de Thai *et al.* (1999), cujo objetivo foi estudar a distribuição sistêmica da droga. Para tal, eles avaliaram amostras colhidas 30 minutos após a aplicação de 37 $\mu\text{mol/kg}$ de Metilfenidato em ratos, e observaram que a concentração do medicamento era maior nos pulmões do que em órgãos como o coração, fígado e o próprio cérebro. Eles perceberam ainda que mesmo após duas horas da aplicação, os rins e pulmões possuíam maior concentração da droga em relação ao cérebro.

Contudo, apesar da existência de dois relatos dessa magnitude, estudos controlados não foram realizados, ficando evidente a necessidade da criação de protocolos de investigação dessa correlação (metilfenidato x enfisema pulmonar).

Para formulação da proposta deste estudo, pensando no melhor controle metodológico, optou-se pelo uso de ratos, pois estes representam uma boa opção para modelos animais de doença. Dawkins e Stockley (2001), afirmaram que o genoma destes animais é amplamente estudado, e que a sua sequência demonstra similaridade com o genoma humano.

Carregaro *et al.* (2005), também apresentam os roedores como uma ótima opção para os experimentos científicos devido à facilidade de produção, manutenção e manuseio das cobaias, entretanto, eles afirmam que devido a diminuta massa corporal dos ratos, os métodos mais utilizados para aplicação das substâncias nos estudos são as injeções intraperitoneal e subcutânea.

Diversos estudos cujo objetivo estaria relacionado aos efeitos do Metilfenidato utilizam de protocolos com ratos, porém, na maioria dos estudos, não há similaridade quanto à via de administração deste estudo.

Por exemplo, no próprio estudo de Thai *et al.*, (1999), cujos resultados acusaram alta concentração tecidual do Metilfenidato no sistema respiratório dos ratos, a administração da droga era feita por injeção intraperitoneal.

Devido ao elevado número de aplicações aos quais as cobaias deste estudo foram submetidas ao longo dos 90 dias de experimento, optou-se por buscar outra metodologia que não a usada no estudo de Thai e seus colaboradores, pensando no risco de peritonite, haja vista que, estes autores analisaram a distribuição sistêmica da droga após única aplicação.

Torres *et al.* (1999), estudando os efeitos da irrigação peritoneal com SF 0,9% em ratos com Peritonite Fecal, afirmaram que a peritonite secundária pode ocorrer por perfuração aguda da víscera abdominal, o que respalda a escolha de outro método de aplicação.

Por se tratar de uma droga cuja apresentação farmacêutica se faz por comprimidos para ingestão por via oral, optou-se por propor método de administração similar, adaptado as cobaias com o uso da agulha de gavagem orogástrica, por se tratar de um procedimento bem difundido na literatura, usado em diversos estudos toxicológicos e farmacocinéticos com ratos, coelhos e macacos (ALBAN *et al.*, 2001; NICKERSON *et al.*, 1994; MURPHY *et al.*, 2001).

A oferta da droga por via oral proporciona distribuição sistêmica do medicamento, o que permitiu um desenho metodológico onde foram analisados apenas o pulmão direito das cobaias.

Situação igual ocorreu no estudo de Fusco *et al.* (2002), cujo objetivo era desenvolver um modelo experimental de indução a enfisema pulmonar com papaína. No referido estudo, os autores investigaram apenas o pulmão direito das cobaias,

comprovando a hipótese de que a instilação traqueal de papaína induziu a formação de enfisema pulmonar através da análise diâmetro alveolar médio.

A mesma metodologia para análise histológica foi utilizada neste estudo, por ser considerada padrão ouro no diagnóstico histológico de destruição de septos alveolares, o que por sua vez aumenta o diâmetro alveolar médio, caracterizando o enfisema pulmonar. Fusco et al. *et al.* (2002), classificaram esse achado como o indicador mais sensível do processo enfisematoso, especialmente no enfisema pan-acinar.

Segundo Snider *et al.* (1986), o enfisema pan-acinar apresenta o ácino pulmonar comprometido por um alargamento difuso, habitualmente estendendo-se desde a região hilar até a periferia dos pulmões. Esse enfisema é encontrado nos pacientes portadores de deficiência de alfa-1 antitripsina e é o padrão de enfisema também verificado na reprodução experimental com o uso de enzimas proteolíticas, como papaína e elastase.

Este estudo apresenta pela análise do L_m , resultados compatíveis com o surgimento de enfisema pulmonar nos dois grupos de animais que tiveram o uso da droga como protocolo, independente da dose. Esse fato infere na hipótese de que para o protocolo proposto, o ponto determinante na destruição dos septos alveolares pode ter sido o tempo de aplicação, e não as doses aplicadas, divergindo da maioria das revisões sistemáticas, que apontam os efeitos adversos como conseqüências dose-dependentes (LOUZÃ ; MATOS, 2007)

O mecanismo do aparecimento das lesões não é claro, como na hipótese apresentada por Sherman et al (1987), que correlacionam as alterações respiratórias com a aplicação endovenosa do talco (trissilicato de Magnésio) presente no comprimido. Apesar do raciocínio dos autores sobre os mecanismos, informações relevantes como o tempo de exposição e dose não foram elucidadas.

Pensando nisso, a discussão sobre a dose ideal parece ser bastante importante, porém, muito complexa devido ao elevado número de estudos que abordam o uso da droga com doses muito diferentes.

Um estudo duplo cego realizado por Barkley *et al.* (1990), cujo objetivo era avaliar os efeitos colaterais do Metilfenidato em diferentes doses, classificou as doses de 0,3 mg/Kg e 0,5 mg/Kg como baixa e alta dose respectivamente, diferente da metanálise de Spencer *et al.* (1995), que constatarem as doses utilizadas em

pacientes adultos eram menores do que as utilizadas em crianças (0,5 mg/Kg/dia X 1,0 mg/Kg/dia respectivamente).

Devido a falta de consenso sobre a dosagem ideal de metilfenidato, e tomando por base a dose máxima diária (60 mg) descrita na bula da medicação na apresentação do laboratório distribuidor no Brasil (Novartis, 2010), pode se pensar que para um indivíduo de 70 Kg, a dose máxima teria de ser inferior a 0,9mg/Kg/dia, pois essa multiplicada pelo seu peso corporal, totalizaria 63 mg/dia, ultrapassando os limites tidos como normais. Talvez essa seja a explicação das respostas para as diferentes doses encontradas na metanálise de Spencer e seus colaboradores, haja vista que, utilizando dose superior em crianças, a chances de ultrapassar a dose diária seriam mínimas, diferentemente do indivíduo adulto, devido ao elevado peso corporal em relação aos infantis.

Por esse motivo, optou-se em utilizar como dose terapêutica aos ratos, 0,8 mg/Kg/dia, e sugeriu-se como superdose, a aplicação da dose terapêutica adicionada a mais 50%, ou seja, 1,2 mg/Kg/dia.

Quanto ao tempo de exposição no protocolo proposto, optou-se por analisar o L_m após um período longo de exposição à droga (90 dias), haja vista que a abordagem medicamentosa do TDAH é longa. Estudos demonstram que o comprometimento funcional dos portadores do transtorno inicia-se em idade pré-escolar, se estendendo até vida adulta (SPENCER *et al.*, 1998; SHEKIM *et al.*, 1990).

Com tudo, pensando na reprodução e comparação de estudos controlados, a inexistência de experimentos na mesma linha de pesquisa dificulta à discussão sobre o estudo realizado e o protocolo proposto; porém, isso não diminui a expressão do resultado encontrado quanto a destruição do septos alveolares.

Entretanto, apesar da significância do resultado, é importante salientar que uma única variável foi analisada (L_m), devendo novas pesquisas serem elaboradas, com o intuito de abordar outras variáveis importantes, como tempo de exposição a droga, doses diversificadas e vias de administração. Além disso, outras metodologias de análise devem ser utilizadas, como a análise de fibra elástica, exames clínicos de imagem e estudo da mecânica respiratória, de modo a explicar a correlação Metilfenidato x enfisema pulmonar.

7. CONCLUSÕES

O uso do metilfenidato nas doses estudadas promoveu aumento do diâmetro alveolar médio. Essa alteração é compatível com enfisema pulmonar.

8 REFERÊNCIAS

Alban L, Dahl PJ, Hansen AK, Hejgaard KC, Jensen AL, Kragh M, Thomsen P, Steensgaard P. The welfare impact of increased gavaging doses in rats. *Anim. Welfare*. 2001;10:303-14.

American Academy of Pediatrics. In Practice parameters from the American Academy of Pediatrics. A compilation of evidence-based guidelines for Pediatric Practice. 1997;167-86.

Ball C. Attention-deficit hyperactivity disorder and the use of methylphenidate. *Psychiatric Bulletin*. 2001; 25: 301-04.

Barkley RA, McMurray MB, Edelbrock CS, Robbins K. Side effects of metlyphenidate in children with attention deficit hyperactivity disorder: a systemic, placebo-controlled evaluation. *Pediatrics*. 1990;86(2):184-92.

Barkley RA. Behavioral inhibition, sustained attention, and executive functions: Constructing a unifying theory of ADHD. *Psychological Bulletin*. 1997;121:65-94.

Baumgardner TL, Singer HS, Denckia MB, Rubin MA, Abrams MT, Colli MJ, Reiss AL. Corpus callosum morphology in children with Tourett syndrome and attention deficit hyperactivity disorder. *Neurology*. 1996; 47: 477-82.

Bense L, [Eklund G](#), [Lewande R](#). Hereditary pulmonary emphysema. *Chest*. 2002; 121(1): 297-300.

Berridge KC, Robinson TE. GAT is the role of dopamine in reward: Hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Brain Res Rev*. 1998; 28: 309-69.

Biedermann J, Newcorn J, Sprich S. Comorbidity of attention deficit hyperactivity disorder with conduct, depressive, anxiety, and other disorders. *Am. J. Psychiatry*. 1991; 564-77.

Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 11ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2006. p.233-301.

Burguess IC. Service innovations: attention-deficit hyperactivity disorder – development of a multi-professional integrated care pathway. *Psychiatric Bulletin*. 2002; 26:148-51.

Bush G, Frazier JÁ, Rauch SL, Seidman LJ, Whalen PJ, Janike MA, et al. Anterior cingulate cortex dysfunction in attention deficit/hyperactivity disorder revealed by MRI and counting stroop. *Biol Psychiatry*. 1999;45:1542-52.

Carregaro AB, Castro MB, Martins FS. Estudo da ação inflamatória aguda do tiopental intraperitoneal em ratos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 2005;57(2):191-95.

Castellenos FX, Elia J, Kruesi MJ, Gulotta CS, Mefford IN, Potter WZ, Ritchie GF, Rapoport JL. Cerebrospinal fluid monoamine metabolites in boys with attention-deficit hyperactivity disorder. *Psychiatry Res*. 1996a;52:305-16.

Castellanos FX, Giedd JN, Marsh WL, Hamburger SD, Vaituzis AC, Dicksteins DP, et al. Quantitative brain magnetic resonance imaging in attention deficit hyperactivity disorder. *Arch. Gen. Psychiatry*. 1996b; 607- 16.

Castellanos FX, Elia J, Kruesi MJ, Marsh WL, Gulotta CS, Potter WZ, et al. Cerebrospinal fluid homovalilic acid predicts behavioral response to stimulants in 45 boys with attention deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychol*. 1996c;14: 125-772.

Castellenos FX. Toward a pathophysiology of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Cin Pediatr (Phila)*. 1997;36:381-93.

Dawkins PA, Stockley RA. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2001; 56: 972-77.

Ding YS, Fowler JS, Volkow ND, Dewey SL, Wang GJ, Logan J, et al. Chiral drugs: Comparison of the pharmacokinetics of [11C]d-treo and L-treomethylfenidate in the human and baboon brain *Psychopharmacology (Berl)*. 1997;71-78.

Dinn WWM, Robbins NC, Harris CL. Adult attention- deficit/hyperactivity disorder: neuropsychological and clinical presentation. *Brain Cogn*. 2001;46:114-21.

Dougherty DD, Bonab AA, Spencer TJ, Rauch SL, Madras K, Fischman AJ. Dopamine transporter density in patients with attention deficit hyperactivity disorder. *Lancet*. 1999;354:2132-33.

Ebstein RP, Nemanov L, Klotz I, Grintsenko I, Belmaker RH. Additional evidence for na association between the dopamine D4 receptor(DRD4) axon III repeat polymorphism and human personality trait of novelty seeking. *Mol. Psychiatry*. 1997;2: 472-77.

Efron D, Jarman F, Barker M. Side effectas of methylphenidate and dexamphetamine in children whit attention deficit hyperactivity disorder : A doubleblind, crossover trial. *Pediatrics*. 1997;100:662-66.

Faraone SV, Biederman J, Mick E. The age-dependent decline of attention déficit hyperactivity disorder: a meta-analysis of follow-up studies. *Psychol Med*. 2006;36:159-65.

Faraone SV, Biederman J. Neurobiology of attention deficit hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*. 1998;44:951-58.

Faraone SV, Sergeat J, Gillberg C, Biederman J. The worldwide prevalence of ADHD: is it an Americam conditio? *World Psychiatry*; 2003.

Filipek PA, Semrudclikeman M, Steingard RJ, Renshaw PF, Kennedy DN, Biederman J. Volumetric MRI analysis comparing subjects having attention-deficit hyperactivity disorder with normal controls. *Neurolog*. 1997;48:589-601.

Fusco LB, Pêgo-Fernandes PM, Xavier AM, Pazetti R, Rivero DHFR, Capelozzi VL, ET al. Modelo experimental de enfisema pulmonar em ratos induzido por papaína. *J Penumol*. 2002;28:1-7

Gainetdinov RR, Wetsel SR, Jones ED, Levin M, Jaber MG. Role on serotoninina in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity. *Science*. 2001;98:397-401.

Gainetdinov RR, Wetsel WC, Jones SR, Levin ED, Jaber M, Caron MG. Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity. *Science*. 1999;283:397-402.

Goldman LS, Genel M, Slanetz PJ. Diagnosis and treatment of attention deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents. Council on Scientific Affairs, American Medical Association. *JAMA*. 1998;279:1100-07.

Golinko BE. Side effects of dextroamphetamine and methylphenidate in hyperactive children- a brief review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1984;8:1-8.

Greenhill LL, Pliszka S, Dulcan MK, Bernet W, Arnold V, Beitchman J, Benson RS, Bukstein O, Kinlan J, McClellan J, Rue D, Shaw JA, Stock S. (American Academy of Child and Adolescent Psychiatry): Practice parameter for the use of stimulant medications in the treatment of children, adolescents, and adults. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 2002;41:26S-49S.

Hardman JG, Limbird, LE. Goodman & Gilman - As bases farmacológicas da terapêutica. 9 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Companies; 2003.

Hogg JC, Senior RM. Chronic obstructive pulmonary disease- part 2: pathology and biochemistry of emphysema. *Thorax*. 2002; 57:830- 34.

Hollerman JR, Schultz W. Dopamine neurons report an error in the temporal prediction of reward during learning. *Nat Neurosci*. 1998;1:304-09.

Ishimatsu M, [Kidani Y](#), [Tsuda A](#), [Akasu T](#). Effects of methylphenidate on the membrane potential and current in neurons of the rat locus coeruleus. *Journal of Neurophysiology*. 2002; 87(3):1206-12.

Janicak PG, Davis JM, Preskorn SH, Junior FJA. Princípios e práticas em psicofarmacoterapia. Rio de Janeiro: Medsi; 1996.

Kay J, Tasman A. Psiquiatria – ciência comportamental e fundamentos clínicos. São Paulo: Manole; 2000.

Kirby K, Rutman LE, Bernstein H. Attention-deficit/hyperactivity disorder: A therapeutic update. *Curr Opin Pediatr*. 2002;14:236-46.

Kiyatkin EA, Rebec GV. Dopaminergic modulation of glutamate-induced excitations of neurons in the neostriatum and nucleus accumbens of awake, unrestrained rats. *J Neurophysiol.* 1996;75:142-53.

Koob GF. Hedonic valence, dopamine and motivation. *Mol Psychiatry.* 1996;1:186-89.

Kuczenski R, Segal DS. Effects of methylphenidate on extracellular dopamine, serotonin, and norepinephrine: Comparison with amphetamine. *J Neurochem.* 1997;68:2032-37.

Kupersanin E. Report Decries College Students' 'Culture of High-Risk Drinking'. *Psychiatric News.* 2002;37(9):10.

Louzã MR, Mattos PJ. *Bras. Psiquiatr.* 2007; 56(supl 1):53-56.

Lowe N, Kirley A, Hawi Z, Sham P, Wickham H, Kratochvill CJ, et al. Joint analysis of DRD5 marker concludes association with ADHD confined to the predominantly inattentive and combined subtypes. *Am J Hum Genet.* 2003;74:348-56.

Mataro M, Garciasanchez C, Junque C, Estevezgonzalvez A, Pujol J. Magnetic resonance imaging measurement of the caudate nucleus in adolescence with attention-deficit hyperactivity disorder and its relationship with neuropsychological and behavioral measures. *Arch. Neurol.* 1997;54:963-68.

Matsumoto M, Hidaka K, Tada S, Tasaki Y, Yamaguchi T. Full-length cDNA cloning and distribution of human dopamine D4 receptor. *Molecular Brain Research.* 2002;135:237-51.

Mick E, Biederman J, Prince J, Fischer MJ, Faraone SV. Impact of low birth weight on attention-deficit hyperactivity disorder. *J Dev. Behav. Pediatr.* 2002;23 (1):16-22.

Miller KJ, Castellanos FX. Attention deficit/hyperactivity disorders. *Pediatr Rev.* 1998;19:373-84.

MTA COOPERATIVE GROUP. National Institute of Mental Health Multimodal Treatment Study of ADHD follow-up: 24 month outcomes of treatment strategies for attention deficit/ hyperactivity disorder. *Pediatrics.* 2004;113:754-61.

Murphy SJ, Smith P, Shaivitz AB, [Rossberg MI](#), [Hurn PD](#). The effect of brief halothane anesthesia during daily gavage on complications and body weight in rats. *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* 2001;40:9-12.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Consensus development conference statement: diagnosis and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry.* 2000;39:182-93.

Nickerson DF, Weaver ML and Tse FLS. The effect of oral dose volume on the absorption of a highly and a poorly water soluble drug in the rat. *Biopharmaceutics Drug. Dispos.* 1994;15:419-29.

Ritalina (Cloridato de Metilfenidato): comprimidos [bula de remédios]. Responsável técnico:_____. Brasil: Novartis; 2010.

Patrick KS, Caldwell RW, Ferris RM, Breese GR. Pharmacology of the enantiomers of threo-methylphenidate. *J Pharracol Exp Ther.* 1987;241:152-58.

Riesgo R, Rohde LA. A neurobiologia do TDAH. In: Kapczinski F, Quevedo JL, Izquierdo I, editores. *Bases Neuroquímicas do trasntornos Psiquiátricos 2ª edição.* Porto Alegre: Artes Médicas; 2004.

Rohde LA, Barbose G, Tramontina S, Polanczyk G. Transtorno de Déficit de atenção/hiperatividade. *Rev Bras. Psiquiatria.* 2000;22(Supl II):7-11.

Rohde LA, Biederman J, Busnello EA, Zimmermann H, Schmitz M, Martins S, et al. ADHD in a school sample of Brazilian adolescents: a study of prevalence, comorbid conditions and impairments. *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry.* 1999;716-22.

Rohde LA, Roman T, Szobot C, Cunha RD, Hutz MH, Biederman J. Dopamine Transporter gene, response to methylphenidate and cerebral blood flow in attention-deficit/hyperactivity disorder: a pilot study. *Synapse.* 2003;48(2):87-89.

Seeman P, Madras BK. Anti-hiperactivity medication: Methylphenidate and and amphetamine. *Mol Psychiatry.* 1998;3:386-96.

Shekim WO, Asarnow RF, Hess E, Zaucha K, Wheeler N. A Clinical and Demographic Profile of a Sample of adults with attention Deficit Hyperactivity Disorder, Residual State. *Compr Psychiatry*. 1990;31:416-25.

Sherman CB. Severe precocious emphysema in intravenous methylphenidate (ritalin) abusers. *Chest*. 1987; 92:1085-87.

Silva BAK. Elaboração de um modelo experimental de Carcinogênese Pulmonar em ratos *Wistar*. Campo Grande, 2002. 79 p. Dissertação (Mestrado) – Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Rede Centro-Oeste, Convênio Universidade de Brasília, Universidade federal de Goiás e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2006.

Snider GL, Lucey EC, Stone PJ. Animal models of emphysema. *Am Rev Respir Dis*. 1986;133:149-69.

Solanto MV. Neuropsychopharmacological mechanisms of stimulant drug action in attention-deficit hyperactivity disorder: a review and integration. *Behavioural Brain Research*. 1998;94:127-52.

Spencer T, Biederman J, Wilens T, Harding M, O'Donnell D, Griffin S. Pharmacotherapy of attention-deficit hyperactivity disorder across the life cycle. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1996;35(4):409-28.

Spencer T, Biederman J, Wilens TE, Faraone S. Adults with Attention-deficit/Hyperactivity Disorder: a controversial Diagnosis. *J Clinical Psychiatry*. 1998;59(suppl 7): 59-68.

Swanson JM, Sergeant JA, Taylor E, Sonuga-Barke EJS, Jensen PS, Cantwell DP. Attention deficit disorder and hyperkinetic disorder. *Lancet*. 1998;351:429-33.

Tannock R. Attention- deficit/ hyperactivity disorder; advances in cognitive, neurobiological, and genetic research. *J Child Psychol Psychiat*. 1998;39:65-99.

Taylor FB, Russo J. Comparing guanfacine and dextroamphetamine for the treatment of adult attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin psychopharmacol*. 2001;21:223-28.

Thai DL, Yurasits LN, Rudolph GR, Perel JM.. Comparative pharmacokinetics and tissue distribution of the d-enantiomers of para-substituted methylphenidate analogs. *Drug Metabolism and Disposition*. 1999; 27(6):645-50.

Thapar A, Holmes J, Poulton K, Harrington R. Genetic basis of attention deficit and hyperactivity. *Br. J. psychiatry*. 1999;174:105-11.

Thapar A, [Harrington R](#), [McGuffin P](#). Examining the comorbidity of ADHD-related behaviours and conduct problems using a twin study design. *British Journal of Psychiatry*. 2001; 179: 224-29.

THE MTA COOPERATIVE GROUP. MULTIMODAL TREATMENT STUDY OF CHILDREN WITH ADHD. A 14-month Randomized Clinical Trial of Treatment Strategies for Attention-Deficit/ hyperactivity Disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 1999;56 (12):11073-86.

Torres OJM, Macedo EL, Melo TCM, Costa JVG, Nunes PMS, Viana RMM, Dietz UA. Peritonite fecal em ratos: eficácia da lavagem da cavidade peritoneal com solução de cloreto de sódio a 0,9% [on line]. *Acta Cir Bras*. 1999;14(2) [acesso em 10 dez 2010]. Disponível em: <http://www.scielo.br/acb>.

Ungerstedt U. 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. [European J of Pharmacol](#). 1968;5(1):107-10

Volkow ND, Ding YS, Fowler JS, Wang GJ, Logan J, Atley JS, et al. Is methylphenidate like cocaine? Studies on their pharmacokinetics and distribution in the human brain. *Archives of General Psychiatry*. 1995;52:456-63.

Volkow ND, Ding YS, Fowler JS, Wang GJ, Logan, J. Gatley. Dopamine transporter occupancies in the human brain induced by therapeutic doses of oral methylphenidate. *Am J psychiatry*. 1998;155:1325-31.

Volkow ND, Wang G, Fowler JS, and Ding YS. Imaging the effects of methylphenidate on brain dopamine: new model on its therapeutic actions for attention- deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*. 2005;57:1410-15.

Volkow ND, Wang GJ, Fowler M, Logan J, Schlyer D, Hitzemann R, et al. Imaging endogenous dopamine competition with (11C)raclopride in the human brain. *Synapse*. 1994;16(4):255-62,.

Zametkin AAJ, Liebenauter LL, Fitzgerald GA, King AC, Minkunas DV, Herscoviich P, Yamada EM, Cohen RM. Brain metabolism in teenagers with attention-deficit hyperactivity disorder. *Arch. Gen. Psychiatry*. 1993;50:333-40.

APÊNDICE

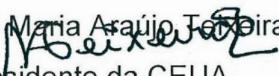
APÊNDICE A – Parecer do Comitê de Ética



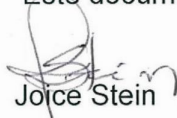
C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 205/2009 do Mestrando Gabriel Victor Guimarães Rapello, sob a orientação da Prof^a. Andréia Conceição Milan Brochado Antoniolli Silva, referente ao projeto de pesquisa **“Uso abusivo de Metilfenidato em ratos: análise do parênquima pulmonar”**, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião de 19 de março de 2009.

Campo Grande (MS), 19 de março de 2009.

Dr^a Maria Araújo Teixeira

Presidente da CEUA

Este documento é uma 2ª via do original


Joice Stein

Coordenador da CEUA

APÊNDICE B – Protocolo de coleta de dados da Pesquisa

UNIVERSIDADE PARA O DESENVOLVIMENTO DO ESTADO E DA REGIÃO DO
PANTANAL
LABORATÓRIO DE FISIOLOGIA ANIMAL

Estudo: Uso do Metilfenidato em ratos – Análise do parênquima pulmonar

No de identificação do Animal: _____.

Grupo:

- () SF0,9%
- () Metilfenidato 0,8 mg/Kg/dia
- () Metilfenidato 1,2 mg/Kg/dia

DIA	DATA	PESO	DOSE (ml)		DIA	DATA	PESO	DOSE (ml)
1					31			
2					32			
3					33			
4					34			
5					35			
6					36			
7					37			
8					38			
9					39			
10					40			
11					41			
12					42			
13					43			
14					44			
15					45			
16					46			
17					47			
18					48			
19					49			
20					50			
21					51			
22					52			
23					53			
24					54			
25					55			
26					56			
27					57			
28					58			
29					59			
30					60			

Estudo: Uso do Metilfenidato em ratos – Análise do parênquima pulmonar

Nº de identificação do Animal: _____.

Grupo:

() SF0,9%

() Metilfenidato 0,8 mg/Kg/dia

() Metilfenidato 1,2 mg/Kg/dia

DIA	DATA	PESO	DOSE (ml)		DIA	DATA	PESO	DOSE (ml)
61					76			
62					77			
63					78			
64					79			
65					80			
66					81			
67					82			
68					83			
69					84			
70					85			
71					86			
72					87			
73					88			
74					89			
75					90			

DATA DA EUTANÁSIA: ____/____/____.

RESPONSÁVEL: _____.