

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**  
**DOUTORADO EM CLÍNICA INTEGRADA**

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS E IMUNOHISTOQUÍMICO**  
**DA DENTINOGENESE E PULPOGENESE EM PROLE DE**  
**RATAS TRATADAS COM FLUOXETINA DURANTE A**  
**GESTAÇÃO E LACTAÇÃO**

**ISABELA MARIA SANTIAGO JAEGGER**

**RECIFE**

**2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**  
**DOUTORADO EM CLÍNICA INTEGRADA**

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS E IMUNOHISTOQUÍMICO**  
**DA DENTINOGENESE E PULPOGENESE EM PROLE DE**  
**RATAS TRATADAS COM FLUOXETINA DURANTE A**  
**GESTAÇÃO E LACTAÇÃO**

**ISABELA MARIA SANTIAGO JAEGGER**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de doutor em Clínica Odontológica Integrada.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Liriane Baratella Evêncio

**RECIFE**

**2015**

Catálogo na fonte  
Bibliotecária Gláucia Cândida, CRB4-1662

J22a Jaegger, Isabela Maria Santiago.  
Aspectos morfológicos e imunohistoquímico da dentinogênese e pulvogênese em prole de ratas tratadas com fluoxetina durante a gestação e lactação / Isabela Maria Santiago Jaegger. – Recife: O autor, 2015.  
110. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Liriane Baratella Evêncio.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.  
Pós-graduação em Odontologia, 2015.  
Inclui referências e anexos.

1. Fluoxetina. 2. Serotonina. 3. Dente. I. Evêncio, Liriane Baratella. (Orientadora). II. Título.

617.6 CDD (22.ed.) UFPE (CCS2015-178)

**ATA DA TRIGÉSSIMA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.**

Às 9hs (nove horas) do dia 21 (vinte e um) do mês de maio do ano de 2015 (dois mil e quinze), reuniram-se em caráter de Solenidade Pública, a Comissão Examinadora para avaliar o trabalho da Doutoranda ISABELA MARIA SANTIAGO JAEGGER, candidata ao grau de Doutor em Odontologia com área de concentração em Clínica Integrada, os membros da banca Examinadora, composta pelos professores: Profa. Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO, da Universidade Federal de Pernambuco, atuando como Presidente; Prof. Dr. FÁBIO DE SOUZA MENDONÇA, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como primeiro examinador; Prof. Dr. JOAQUIM EVÊNCIO NETO, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como segundo examinador; Prof<sup>ra</sup>. Dr<sup>a</sup> JULIANA PINTO DE MEDEIROS da Universidade Federal de Pernambuco, como terceiro examinador; Profa. Dra. FLÁVIA MARIA DE MORAES RAMOS PEREZ, da Universidade Federal de Pernambuco, como quarto examinador. A sessão foi aberta pela Profa. Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, fez as apresentações e compôs a Banca Examinadora, agradeceu a presença de todos. Iniciando convidou a Doutoranda ISABELA MARIA SANTIAGO JAEGGER, sob a orientação da Profa. Dra. LIRIANE BARATELLA EVÊNCIO, sendo comunicado que conforme consta das normas a candidata teria trinta minutos para exposição. A doutoranda iniciou a apresentação do seu trabalho intitulado: “ASPECTOS MORFOLÓGICOS E IMUNOHISTOQUÍMICO DA DENTINOGÊNESE E PULPOGÊNESE EM PROLE DE RATAS TRATADAS COM FLUOXETINA DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO”. Concluída a apresentação, a Banca Examinadora compôs a mesa e foi dado início a arguição. Ao término das arguições, os examinadores reuniram-se em secreto para deliberações formais. Ao término da discussão, atribuíram a candidata os seguintes conceitos: Prof. Dr. FÁBIO DE SOUZA MENDONÇA (APROVADA), Prof. Dr. JOAQUIM EVÊNCIO NETO (APROVADA), Profa. Dra. JULIANA PINTO DE MEDEIROS (APROVADA), Profa. Dra. FLÁVIA MARIA DE MORAES RAMOS PEREZ (APROVADA), Profa. Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO (APROVADA), a candidata recebeu por unanimidade o conceito (APROVADA) é considerada (APROVADA), devendo a mesma acatar as sugestões da Banca Examinadora, face a aprovação, fica a candidata, apta a receber o Grau de Doutor em Odontologia desde de que tenha cumprido as exigências estabelecidas de acordo com o Regimento Interno do curso, cabendo a Universidade Federal de Pernambuco através de sua Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação, tomar as providências cabíveis. Nada mais havendo a tratar, a presidente da Banca Examinadora encerrou a sessão e para constar foi lavrada a presente ata que vai por mim assinada, Oziclere Sena de Araujo e pelos demais componentes da Banca Examinadora e pelo recém formado Doutor pela UFPE. **ISABELA MARIA SANTIAGO JAEGGER.**

**Recife, 21 de maio de 2015.**

Profa. Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO  
(Presidente)

Prof. Dr. FÁBIO DE SOUZA MENDONÇA  
(1º Examinador)

Prof. Dr. JOAQUIM EVÊNCIO NETO  
(2º Examinador)

Profa. Dra. JULIANA PINTO DE MEDEIROS  
(3º Examinador)

Profa. Dra. FLAVIA MARIA DE MORAES RAMOS PEREZ  
(4º Examinador)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**REITOR**

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**VICE-REITOR**

Prof. Dr. Sílvio Romero Marques

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**DIRETOR**

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

Profa. Dra. Alessandra Albuquerque Tavares de Carvalho

**COLEGIADO**

Profa. Dra. Alessandra Albuquerque Tavares de Carvalho

Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes

Prof. Dr. Arnaldo de França Caldas Júnior

Prof. Dr. Carlos Menezes Aguiar

Prof. Dr. Cláudio Heliomar Vicente da Silva

Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

Prof. Dr. Edvaldo Rodrigues de Almeida

Profa. Dra. Flávia Maria de Moraes Ramos Perez

Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

Profa. Dra. Liriane Baratella Evêncio

Profa. Dra. Lúcia Carneiro de Souza Beatrice

Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Profa. Dra. Maria Luiza dos Anjos Pontual

Prof. Dr. Paulo Sávio Angeiras Goés

Profa. Dra. Renata Cimões Jovino Silveira

Profa. Dra. Sílvia Regina Jamelli

Profa. Dra. Simone Guimarães Farias Gomes

Prof. Dr. Tibério César Uchoa Matheus

**SECRETÁRIA**

Oziclere Sena de Araújo

*Ao meu esposo Ricardo e à minha filha Luísa.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, razão da minha existência e esperança de todos os dias, sem Ele nada sou. Ele me fortaleceu nos dias difíceis e me deu fé para continuar na minha jornada.*

*À toda a minha família pela torcida incondicional pela minha vitória, tanto pessoal quanto profissional.*

*Gratidões eternas a minha mãe por ter sido o meu espelho e minha companheira em todos os momentos maravilhosos da minha vida. Sem você nada sou. Obrigada!!!*

*Ao meu querido pai por sempre ter acreditado em meu potencial e nunca ter poupado esforços para garantir meus estudos. Para sempre obrigada!!!*

*Aos meus irmãos Romero, Rômulo e Rodolfo, agradeço a compreensão de vocês nos meus momentos mais difíceis e chatos.*

*A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco que contribuíram na minha formação.*

*A minha orientadora Professora Doutora Liriane Baratella Evêncio, pela dedicação e paciência para que este projeto saísse do papel e pelo apoio e experiência prestados no decorrer da preparação deste trabalho.*

*Ao Professor Doutor Joaquim Evêncio Neto, professor associado do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal*

*Rural de Pernambuco, por ter disponibilizado o microscópio para a análise das preparações histológicas.*

*A todos os funcionários do Biotério de Cirurgia Experimental pelos cuidados para com os animais e pela ajuda durante a manipulação dos mesmos. Obrigada!!*

*A técnica em histologia Silvânia Tavares Paz por ter confeccionado as minhas preparações histológicas, sempre de bom humor e dedicação. Muito obrigada!!!!*

*As minhas amigas Luciana Silva Regueira e Priscylla Gonçalves Correia Leite de Marcelos pelos momentos bons, alegres e gratificantes que passamos juntas durante a fase experimental desta pesquisa. Muito obrigada pela ajuda incondicional de vocês durante minha gestação!!*

*Ao Programa Bolsas REUNI de Assistência ao Ensino.*

*Por fim, a todas as pessoas que direta ou indiretamente tenham contribuído para que eu pudesse ter chegado até aqui. Um muito obrigada a todos vocês!*

## RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar histologicamente a influência da fluoxetina no desenvolvimento do complexo dentino-pulpar de primeiros molares superiores de ratos. Para tal, foram utilizados 48 filhotes de ratos da linhagem Wistar cujas mães foram tratadas com cloridrato de fluoxetina durante a gestação e lactação, divididas em quatro grupos: grupo controle gestação (CG), grupo controle gestação e lactação (CL), grupo tratado com fluoxetina durante a gestação (FG) e grupo tratado com fluoxetina durante a gestação e a lactação (FL). Foram administrados cloreto de sódio ou cloridrato de fluoxetina na dose de 20 mg/kg a essas mães do 1º ao 21º dia de gestação e durante os 21 dias da lactação, por via oral. Posteriormente, cada grupo foi dividido em 2 subgrupos, de acordo com a idade do desenvolvimento do elemento dentário a ser estudado (15 e 25 dias de vida) e em cada subgrupo havia 6 filhotes (n=6). Os animais foram anestesiados, e a maxila com os elementos dentários direito e esquerdo foi seccionada frontalmente a face mesial do primeiro molar. Secções de 5 µm foram coradas com Hematoxilina e Eosina, Tricrômico de Masson e *Picrosírius Red* e marcadas com o anticorpo para colágeno Tipo I para análise imunohistoquímica. Análises morfológicas, quantitativas e qualitativas revelaram diminuição nas espessuras da pré-dentina e dentina, diminuição no comprimento dos odontoblastos e diminuição no número de fibroblastos na zona central da polpa nos grupos tratados com fluoxetina durante a gestação e lactação. Estes dados sugerem que na dose e nas condições estudadas e quando aplicada durante a gestação e lactação, a fluoxetina pode alterar o desenvolvimento das estruturas dentárias analisadas.

**PALAVRAS-CHAVE:** 1. Fluoxetina. 2. Serotonina. 3. Dente. 4. Complexo Dentino-Pulpar. 5. Rato Wistar

## ABSTRACT

Previous studies have evaluated the presence of serotonin receptors in tissues of teeth. Thus, we aimed to evaluate the use of fluoxetine (a selective serotonin reuptake inhibitor) was able to interfere with dentinogenesis and pulpogenesis these teeth of rats. For this , we used 48 puppies Wistar rats whose mothers were treated with fluoxetine during pregnancy and lactation, divided into four groups: control group gestation (CG), control group pregnancy and lactation (CL), treated group fluoxetine during pregnancy (FG) and group treated with fluoxetine during pregnancy and lactation (FL). Sodium chloride 0.9% or fluoxetine were administered in these mothers from the 1st to 21st day of pregnancy and during 21 days of lactation orally. Thereafter, each group was divided into two subgroups, according to the age of development of the tooth to be studied (15 and 25 days of life) in each subgroup were 6 pups (n = 6). Animals were anesthetized, and the jaw was removed and the maxilla with right and left teeth were sectioned frontally the mesial surface of the first molar. Sections of 5  $\mu$ m were stained with hematoxylin and eosin, Masson's Trichrome and *Picrosirius Red* and labeled with the antibody to collagen type I for immunohistochemical analysis. Morphological, quantitative and qualitative analyzes of odontoblasts, fibroblasts, collagen, dentin and pre-dentin revealed structural differences in the group treated with fluoxetine during pregnancy and lactation. These data suggest that, the dose and the conditions studied and when applied during pregnancy and lactation, fluoxetine may alter the development of dental structures analyzed.

**KEY-WORDS:** 1. Fluoxetine. 2. Serotonin. 3. Tooth. 4. Dentin - Pulp Complex. 5. Rat Wistar

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Figura 1.** Fluxograma do Grupo C: foram utilizadas 4 ratas prenhes, sendo 1 animal prenhe por idade de desenvolvimento dentário a ser analisado. De cada ninhada foram utilizados 6 filhotes (n = 6). 37

**Figura 2.** Fluxograma do Grupo F: foram utilizadas 8 ratas prenhes, sendo 2 animais prenhes por idade de desenvolvimento dentário a ser analisado. De cada ninhada foram utilizados 3 filhotes, totalizando 6 filhotes (n = 6). 37

## ARTIGO ORIGINAL 1

**Figura 1** Fotomicrografias de parte da coroa de primeiro molar superior de rato com 15 dias de vida, correspondentes aos grupos CG, CL, FG e FL. Observaram-se que a dentina (D) e a pré-dentina (PD) apresentaram fibras colágenas com coloração azulada quando coradas com Tricrômico de Masson (1B) e com coloração avermelhada quando coradas com *Picrosíríus Red* (1C) e sob o microscópio de polarização (1D), indicando a presença de colágeno tipo I. Nos cortes em que se utilizou a imunohistoquímica (1E) a dentina e a pré-dentina mostraram positividade para o colágeno tipo I, onde se observou coloração marrom-acastanhada. P: Polpa Dental. O: Odontoblastos. VS: Vasos Sanguíneos. Coloração HE (1A), TM, *Picrosíríus Red*, polarização e Imunohistoquímica. 68

**Figura 2.** . Fotomicrografias de parte da coroa de primeiro molar superior de rato com 15 dias de vida correspondentes aos grupos CG, CL, FG e FL. Observaram-se que a dentina (D) e a pré-dentina (PD) apresentaram fibras colágenas com coloração azulada quando coradas com Tricrômico de Masson (2B) e com coloração avermelhada quando coradas com *Picrosíríus Red* (2C) e sob o microscópio de polarização (2D), indicando a presença de colágeno tipo I. Nos cortes em que se utilizou a imunohistoquímica (2E) a dentina e a pré-dentina mostraram positividade para o colágeno tipo I, onde se observou coloração marrom-acastanhada. P: Polpa Dental. O: Odontoblastos. VS: Vasos Sanguíneos. Coloração HE (2A), TM, *Picrosíríus Red*, polarização e Imunohistoquímica. 69

**Figura 3.** Fotomicrografias de parte da raiz de primeiro molar superior de rato com 15 dias de vida, correspondentes aos grupos CG, CL, FG e FL. Observaram-se que a dentina (D) e a pré-dentina (PD) apresentaram fibras colágenas com coloração azulada quando coradas com Tricrômico de Masson (3B) e com coloração avermelhada quando coradas com *Picrosíríus Red* (3C) e sob o microscópio de polarização (3D), indicando a presença de colágeno tipo I. Nos cortes em que se utilizou a imunohistoquímica (3E) a dentina e a pré-dentina mostraram positividade para o colágeno tipo I, onde se observou coloração marrom-acastanhada. P: Polpa Dental. O: Odontoblastos. VS: Vasos Sanguíneos. Coloração HE (3A), TM, *Picrosíríus Red*, polarização e Imunohistoquímica. 70

## ARTIGO ORIGINAL 2

**Figura 1** Fotomicrografias de parte da coroa de primeiro molar superior de rato com 15 dias de vida, correspondentes aos grupos CG, CL, FG e FL. Observaram-se presença de fibras colágenas com coloração azulada quando coradas com Tricrômico de Masson (1B) e com predominância da coloração avermelhada quando coradas com *Picrossírius Red* (1C). Nos cortes em que se utilizou a imunohistoquímica (1D) notou-se que a polpa dentária apresentou positividade para o colágeno tipo I, onde se observou coloração marrom-acastanhada. P: Polpa Dental. VS: Vasos Sanguíneos. Coloração HE (1A), TM, *Picrossírius Red* e Imunohistoquímica. 89

**Figura 2.** Fotomicrografias de parte da coroa de primeiro molar superior de rato com 25 dias de vida, correspondentes aos grupos CG, CL, FG e FL. Observaram-se presença de fibras colágenas com coloração azulada quando coradas com Tricrômico de Masson (2B) e com predominância da coloração avermelhada quando coradas com *Picrossírius Red* (2C). Nos cortes em que se utilizou a imunohistoquímica (2D) notou-se que a polpa dentária apresentou positividade para o colágeno tipo I, onde se observou coloração marrom-acastanhada. P: Polpa Dental. VS: Vasos Sanguíneos. Coloração HE (2A), TM, *Picrossírius Red* e Imunohistoquímica. 90

**Figura 3.** Fotomicrografias de parte da raiz de primeiro molar superior de rato com 25 dias de vida, correspondentes aos grupos CG, CL, FG e FL. Observaram-se presença de fibras colágenas com coloração azulada quando coradas com Tricrômico de Masson (3B) e com predominância da coloração avermelhada quando coradas com *Picrossírius Red* (3C). Nos cortes em que se utilizou a imunohistoquímica (3D) notou-se que a polpa dentária apresentou positividade para o colágeno tipo I, onde se observou coloração marrom-acastanhada. P: Polpa Dental. VS: Vasos Sanguíneos. Coloração HE (3A), TM, *Picrossírius Red* e Imunohistoquímica. 91

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO ORIGINAL 1

**Tabela 1: Animais com 15 dias de vida:** Comparação da espessura da dentina, da espessura da pré-dentina e do comprimento dos odontoblastos em primeiros molares superiores de ratos (grupos CG, CL, FG e FL). 66

**Tabela 2: Animais com 25 dias de vida:** Comparação da espessura da dentina, da espessura da pré-dentina e do comprimento dos odontoblastos em primeiros molares superiores de ratos (grupos CG, CL, FG e FL). 67

### ARTIGO ORIGINAL 2

**Tabela 1: Animais com 15 dias de vida:** Comparação do número de fibroblastos e da densidade do colágeno em primeiros molares de ratos (grupos CG, CL, FG, FL). 87

**Tabela 2: Animais com 25 dias de vida:** Comparação do número de fibroblastos e da densidade do colágeno em primeiros molares de ratos (grupos CG, CL, FG, FL). 88

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

### INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

<b>ISRSs</b> – Inibidores seletivos da recaptação de serotonina	17
<b>FDA</b> – Food and Drug Administration	19
<b>5-HT</b> – Serotonina	19
<b>SNC</b> – Sistema Nervoso Central	20
<b>TGI</b> – Trato gastrointestinal	22
<b>PCR</b> - Reação de polimerase em cadeia	23
<b>TC</b> - Tomografia computadorizada	24
<b>DMP1</b> - Proteínas da matriz dentinária 1	29
<b>DSSP</b> - Sialofosfoproteína dentinária	29
<b>EFEM</b> - Fosfoglicoproteína da matriz extracelular	29
<b>BSP</b> - Sialoproteína óssea	29
<b>ATMs</b> - Articulação têmporo-mandibular	31

### MATERIAIS E MÉTODOS

<b>LIKA</b> – Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami	35
<b>CEUA-UFPE</b> – Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco	35
<b>i.p.</b> – intra-peritoneal	38
<b>EDTA</b> – Ácido etilenodiamino tetraacético	39
<b>HE</b> - Hematoxilina e Eosina	39
<b>TM</b> – Tricrômico de Masson	39
<b>PBS</b> – Tampão fosfato de sódio	41
<b>DAB</b> – Diaminobenzidina	42

## **ARTIGO ORIGINAL 1**

<b>5-HT</b> – Serotonina	43
<b>SNC</b> – Sistema Nervoso Central	43
<b>ISRSs</b> - Inibidores seletivos da recaptação de serotonina	45
<b>CEUA-UFPE</b> – Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco	45
<b>EDTA</b> – Ácido etilenodiamino tetraacético	47
<b>HE</b> - Hematoxilina e Eosina	47
<b>TM</b> – Tricrômico de Masson	47
<b>PBS</b> – Tampão fosfato de sódio	49
<b>DAB</b> – Diaminobenzidina	49
<b>ATMs</b> – Articulação têmporo-mandibular	59

## **ARTIGO ORIGINAL 2**

<b>ISRSs</b> - Inibidores seletivos da recaptação de serotonina	71
<b>5-HT</b> – Serotonina	71
<b>CEUA-UFPE</b> – Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco	73
<b>EDTA</b> – Ácido etilenodiamino tetraacético	75
<b>HE</b> - Hematoxilina e Eosina	75
<b>TM</b> – Tricrômico de Masson	75
<b>PBS</b> – Tampão fosfato de sódio	77
<b>DAB</b> – Diaminobenzidina	77

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA</b>	17
<b>1.1 Depressão e o uso da fluoxetina em pacientes gestantes e lactantes</b>	19
<b>1.2 A neurotransmissão serotoninérgica e a morfogênese óssea</b>	21
<b>1.3 Papel da serotonina na odontogênese</b>	25
<b>2 OBJETIVOS</b>	34
<b>2.1 Objetivo geral</b>	34
<b>2.2 Objetivos específicos</b>	34
<b>3 MÉTODOS</b>	35
<b>3.1 Localização do estudo</b>	35
<b>3.2 Considerações éticas</b>	35
<b>3.3 Animais</b>	35
<b>3.3.1 Grupos de estudo</b>	36
<b>3.3.2 Tratamento farmacológico dos animais</b>	38
<b>3.4 Microscopia de luz</b>	39
<b>3.5 Estudos histológicos, histométricos, histoquímicos e imunohistoquímico</b>	40
<b>3.6 Análise estatística</b>	42
<b>4 RESULTADOS</b>	43
<b>4.1 Efeitos da fluoxetina na dentinogênese de ratos cujas mães foram tratadas durante a gestação e lactação</b>	43

<b>4.2 Características histológicas da pulvogênese de ratos tratados com fluoxetina durante a gestação e lactação</b>	71
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	92
<b>REFERÊNCIAS</b>	93
<b>ANEXO A - Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco</b>	105
<b>ANEXO B – Normas da revista do artigo original 1</b>	106
<b>ANEXO C – Normas da revista do artigo original 2</b>	107

## 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

A odontogênese é o resultado de um complexo de interações entre dois tecidos, o ectoderma oral primitivo e o ectomesênquima, sendo dividida em diferentes fases: botão, capuz, campânula, coroa e raiz. O conjunto destas fases dará origem ao elemento dental e as suas estruturas circunvizinhas (Thesleff, 2003).

A dentina constitui o tecido mineralizado que forma a maior parte do elemento dental, sendo composta de 70% de cristais de hidroxiapatita, 20% de fibras colágenas e 10% de água. A dentina delimita uma cavidade que contém a polpa dental e formam uma verdadeira unidade biológica conhecida como complexo dentino-pulpar por apresentarem componentes semelhantes nos aspectos estruturais, embrionários e funcionais (Katchburian e Arana-Chavez, 2004).

Sendo assim, qualquer perturbação de ordem sistêmica, mesmo que de curta duração, durante as fases de desenvolvimento embrionário, poderá deixar seqüelas permanentes nos dentes. Os tecidos do dente humano, assim como os tecidos de outros órgãos do corpo, são vulneráveis à privação nutricional, a alguns medicamentos, a algumas infecções, a alterações metabólicas, a anomalias hereditárias e anormalidades neurológicas (Cavalli, Baraldi e Cunha, 2006).

Pelo impacto negativo sobre a gestação e o conceito, a depressão na gravidez e a depressão pós-parto tendem a ser tratadas com psicofármacos. A gravidez não protege a mulher desses transtornos nem de possíveis recaídas. Não é raro acontecer de um clínico se deparar com uma paciente com história de depressão, em uso de antidepressivo quando recebe o exame positivo de gravidez. Os antidepressivos têm sido utilizados há décadas, principalmente os antidepressivos tricíclicos e a fluoxetina, que é uma droga inibidora seletiva da recaptação da serotonina (ISRSs). Sabe-se que várias drogas são

capazes de atravessar a barreira placentária e muitas delas possuem efeitos teratogênicos sobre o feto, o que pode provocar alterações e desordens no desenvolvimento embrionário, principalmente nos três primeiros meses de vida intra-uterina, devido à velocidade com que ocorrem a multiplicação e diferenciação celular, o que dá margem para que o fármaco promova malformações (Campigotto *et al.*, 2008).

Baseado nas evidências de que o sistema serotoninérgico está associado ao desenvolvimento de diferentes tecidos, mediando interações epitélio-mesenquimais importantes, justificou-se a realização desta pesquisa com o propósito de avaliar a influência da fluoxetina no desenvolvimento e crescimento do complexo dentino-pulpar durante a gestação e a lactação.

Para isto, os objetivos deste estudo foram avaliar a influência da fluoxetina no desenvolvimento do complexo dentino-pulpar em primeiros molares superiores de ratos, utilizando análises histológicas, histométricas, histoquímicas e imunohistoquímica.

Este trabalho foi desmembrado em dois artigos científicos. O primeiro intitulado: “Efeitos da fluoxetina na dentinogênese de ratos cujas mães foram tratadas durante a gestação e lactação”, que foi submetido como um artigo original ao periódico *Histology and Histopathology*. Neste artigo foram realizadas análises histológicas, histométricas, histoquímicas e imunohistoquímica dos efeitos entre a fluoxetina e o desenvolvimento dos tecidos que compõem o complexo dentino-pulpar.

O segundo manuscrito intitulado: “Características histológicas da pulvogênese de ratos tratados com fluoxetina durante a gestação e lactação” foi submetido como artigo original ao periódico *Anatomia, Histologia e Embryologia*. Neste artigo foram investigadas as possíveis alterações morfológicas, quantitativas e qualitativas que ocorreram durante a pulvogênese de molares superiores de ratos cujas mães foram tratadas com cloridrato de fluoxetina durante a gestação e lactação.

## 1.1 Depressão e o uso da fluoxetina em pacientes gestantes e lactantes

A depressão é, reconhecidamente, um problema de saúde pública mundial (Belik, 2008), interferindo de modo decisivo e intenso na vida pessoal, profissional, social e econômica de seus portadores (Berle e Spigset, 2011). As mulheres apresentam uma alta porcentagem de incidência principalmente no período gestacional ou no pós-parto (Sit *et al.*, 2011; Pawluski *et al.*, 2012; Hein *et al.*, 2014). O tratamento da depressão durante o período gestacional e pós-gestacional é importante para prevenir complicações obstétricas, como o nascimento de bebês prematuros ou de baixo peso ao nascer (Hendrick e Altshuler, 2002).

Em 1987, a agência reguladora de medicamentos e alimentos, Food and Drug Administration (FDA), dos Estados Unidos, aprovou o primeiro antidepressivo (fluoxetina) do grupo dos ISRSs (Wong, Bymaster e Engleman, 1995).

Frente às opções de tratamento para depressão, a fluoxetina é o fármaco de primeira escolha devido não apenas à sua eficácia, mas também a sua alta tolerância (Gupta, Masand e Rangwani, 1998). A implicância do uso de fármacos antidepressivos durante a gestação e lactação foi tema de diversas pesquisas, as quais evidenciaram tanto em humanos como em animais, alguns efeitos que comprometeram o desenvolvimento dos neonatos, como restrição do crescimento, baixo peso ao nascer e dificuldade de adaptação (agitação, taquipnéia, hipoglicemia, hipotermia, palidez e choro fraco ou ausente) tal como foi relatado no estudo de Morrison, Riggs e Rurak (2005).

O cloridrato de fluoxetina é o antidepressivo mais amplamente prescrito em todo o mundo. É um fármaco capaz de inibir de forma potente e seletiva a recaptação de serotonina (5-HT), potencializando a neurotransmissão serotoninérgica. O mecanismo de ação da fluoxetina está ligado à inibição da recaptação neuronal de 5-HT e um

aumento resultante na neurotransmissão serotoninérgica no Sistema Nervoso Central (SNC) (Gupta, Masand e Rangwani, 1998; Raap e Van de Kar, 1999).

Vários fármacos são capazes de atravessar a barreira placentária (Hendrick *et al.*, 2003) e muitos deles possuem efeitos teratogênicos sobre o feto, o que pode provocar alterações e desordens no desenvolvimento embrionário, principalmente nos três primeiros meses de vida intra-uterina (Hendrick e Altshuler, 2002). Amostras de sangue do cordão umbilical foram obtidas de neonatos expostos à fluoxetina no útero e mostraram um nível da droga equivalente a 60% do valor da mãe (Hendrick *et al.*, 2003).

A utilização da fluoxetina “*in vivo*” foi pesquisada por Chambers *et al.* (1996) os quais acompanharam mulheres gestantes que usavam fluoxetina por motivos diversos e, compararam-as com gestantes que não fizeram o uso desta droga. Os autores concluíram que gestantes usuárias da fluoxetina não tiveram um risco maior de perda espontânea da gravidez nem de anomalias fetais, no entanto, gestantes que tomaram a medicação no terceiro trimestre da gestação apresentaram um risco aumentado para complicações perinatais, como partos prematuros.

A fluoxetina age potencializando a neurotransmissão serotoninérgica e, por sua vez a 5-HT, que participa da regulação do humor, sono, atividade sexual, apetite, ritmo circadiano, sensibilidade à dor, atividade motora e de funções neuroendócrinas (Buznikov, 1984; Buznikov, Lambert e Lauder, 2001). Além disso, esse neurotransmissor regula eventos durante embriogênese como a neurogênese e a diferenciação neuronal agindo também na interação epitélio-mesênquima promovendo a estimulação da diferenciação e a migração celular durante o desenvolvimento do tubo neural e dos arcos branquiais (Shuey *et al.*, 1993; Turlejski, 1996; Byrd *et al.*, 2000; Moiseiwitsch, 2000).

Estudos mostraram que alterações ocorridas nos níveis de 5-HT do organismo durante o período da embriogênese provocaram perturbações no crescimento e desenvolvimento de muitos tecidos, destacando-se os da região crânio-facial, onde se demonstrou um atraso na diferenciação neuronal quando se inibiu a síntese da 5-HT (Mendes-da-Silva *et al.*, 2002). Relatos de Lauder *et al.* (2000) mostraram que os embriões expostos a antagonistas de receptores 5-HT apresentaram diferentes malformações embriológicas (defeitos do tubo neural, hipoplasia do processo frontonasal e dos arcos viscerais), mas estas alterações dependeram da dose e da seletividade do antagonista utilizado.

Pesquisas realizadas em animais revelaram a presença de sítios de captação de 5-HT na região craniofacial em sincronia com os principais eventos morfogenéticos desta região, fato este que deu muita importância às possíveis influências da 5-HT no desenvolvimento dental (Lauder e Zimmerman, 1988; Tecott, Shtrom e Julius, 1995).

## **1.2 A neurotransmissão serotoninérgica e a morfogênese óssea**

O sistema de neurotransmissão serotoninérgico é composto pelos neurônios serotoninérgicos e seus receptores situados sobre as células (Barnes e Sharp, 1999). Em cérebros humanos, os primeiros neurônios que liberam 5-HT estão presentes a partir da 5ª semana e aumentam rapidamente até a 10ª semana de gestação (Kontur *et al.*, 1993; Levallois *et al.*, 1997). Por volta da 15ª semana gestacional, a organização típica dos neurônios serotoninérgicos pode ser vista nos núcleos da rafe. Os neurotransmissores interagem com seus receptores, estes alteram o metabolismo celular, influenciando as diversas etapas da embriogênese e organogênese (Buznikov, 1984).

Os neurotransmissores podem modular a proliferação celular em diversos tecidos (Lauder, Luo e Persico, 2003). Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, a 5-HT age possivelmente como um fator neuronal trófico atuando em seus múltiplos receptores promovendo a auto-regulação do desenvolvimento dos neurônios serotoninérgicos e participando do desenvolvimento dos seus tecidos-alvos (Lauder, 1990).

A neurotransmissão serotoninérgica tem sido implicada na morfogênese de uma variedade de tecidos do organismo (desenvolvimento do coração, do intestino grosso e da região crânio-facial) e sua regulação tem sido objeto de interesse e investigação nestes últimos anos (Buznikov, 1984; Lauder e Zimmerman, 1988; Lauder, 1990; Whitaker-Azmitia, 1991; Johnson e Heinemann, 1995). Estudos anatômicos e *in vitro* demonstraram que o crescimento e desenvolvimento dos diversos tecidos do organismo, dentre eles os tecidos mineralizados é influenciado pelo SNC e seus neurotransmissores (Teccot, Shtrom e Julius, 1995; Levallois *et al.*, 1997; Lauder *et al.*, 2000; Buznikov, Lambert e Lauder, 2001; Lauder, Luo e Persico, 2003).

A 5-HT apresenta funções reconhecidas no SNC, no trato gastrointestinal (TGI) e no sistema cardiovascular e em células ósseas. Os seus efeitos são modulados pelos transportadores de 5-HT (5-HTT), que regulam a duração da atividade serotoninérgica pela captação de 5-HT a partir do espaço extracelular (Warden *et al.*, 2008).

Uma vez liberada, um eficiente mecanismo de recaptção é ativado para remoção da 5-HT da fenda sináptica graças à ação de proteínas transportadoras presentes na membrana do neurônio pré-sináptico (Lauder, Tamir e Sandler, 1988). Uma atividade serotoninérgica diminuída parece participar da fisiopatologia da depressão em humanos e em modelos experimentais (Lauder, Luo e Persico, 2003). Os ISRSs são utilizados como antidepressivos que apresentam mecanismos comuns de

ação, porém diferem em sua estrutura química, metabolismo e farmacocinética. Sua ação permite o aumento da disponibilidade de 5-HT na fenda sináptica (Hyttel, 1994).

Os receptores da 5-HT estão situados na membrana das viscosidades das fibras nervosas terminais, de onde a 5-HT é liberada por ação do impulso nervoso. A estimulação de tais receptores diminui a quantidade de 5-HT liberada, regulando a liberação dos neurotransmissores, limitando as concentrações de aminas na fenda sináptica quando estas atingem níveis elevados. Trata-se de um mecanismo conhecido como retroalimentação negativa (feedback negativo) (Graeff, 2001).

Estudos usando a técnica da reação de polimerase em cadeia (PCR) e a imunohistoquímica demonstraram pela primeira vez, receptores de 5-HT presentes no osso, sugerindo possíveis interações serotoninérgicas neste sistema (Bliziotis *et al.*, 2001; Bliziotis *et al.*, 2006).

A expressão *in situ* de receptores 5-HT em osteoblastos e osteócitos indicaram que as células ósseas possuem vias serotoninérgicas funcionais que regulam a recaptação da 5-HT. A identificação de transportadores 5-HTT nos ossos sugere que a 5-HT pode estar envolvida no metabolismo ósseo, tanto na regulação quanto na absorção destes tecidos (Warden *et al.*, 2008, Ziere *et al.*, 2008).

A 5-HT regula vias do metabolismo ósseo, pois estes tecidos apresentam receptores nas células ósseas, como os receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, e 5-HT<sub>2B</sub>. Esses receptores serotoninérgicos são expressos em uma linhagem de células osteocíticas e em osteoblastos. A função destes receptores nos osteoblastos e nos osteócitos é desconhecida, mas sabe-se que estão associados à formação e remodelação óssea. Quando existe uma interrupção ou alteração na função destes receptores, há uma redução crucial no crescimento ósseo, pois há uma inibição da diferenciação dos osteoblastos (Bliziotis *et al.*, 2001; Battaglini *et al.*, 2004; Bliziotis *et al.*, 2006;

Gustafsson *et al.*, 2006; Battaglino *et al.*, 2007; Bonnet *et al.*, 2007; Westbroek *et al.*, 2007; Mortazavi *et al.*, 2009).

Estudos demonstraram que os neurotransmissores e seus receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, e 5-HT<sub>2B</sub> desempenham papel importante na diferenciação dos osteoblastos e osteócitos contribuindo para a formação da massa óssea (Battaglino *et al.*, 2004; Bliziotis *et al.*, 2006). Foi evidenciado em outro estudo que o uso, por período prolongado, de fluoxetina em ratas foi capaz de conduzir a uma menor densidade mineral óssea (Gustafsson *et al.*, 2006).

Foi sugerido também que a fluoxetina poderia afetar a formação e/ou reabsorção óssea em uma pesquisa com ratos fazendo uso da Tomografia Computadorizada (TC), por terem encontrado menor espessura óssea na metáfise do fêmur dos ratos do grupo experimental. Porém esses dados não foram estatisticamente significativos, com isso, não se pôde concluir que a fluoxetina poderia apresentar efeito significativo sobre a arquitetura óssea de ratos e suas propriedades mecânicas (Westbroek *et al.*, 2007). Outra pesquisa revelou, entretanto, que o uso da fluoxetina utilizada durante o processo de reparação óssea demonstrou maior aumento de formação de osso trabecular em ratos na dose de 15 mg/kg de peso animal (Mortazavi *et al.*, 2009).

A pesquisa realizada por Warden *et al.* (2008) com o objetivo de analisar a influência da fluoxetina sobre o esqueleto adulto, independente da deficiência de estrogênio, demonstrou que o uso de ISRSs pode ser associado com a perda óssea acelerada após a menopausa e destaca a necessidade de mais pesquisas sobre os efeitos da fluoxetina sobre os ossos. Neste estudo foram observados diminuição na formação e um aumento da reabsorção óssea, o que ficou evidente através da diminuição na formação de osso periosteal e uma maior abundância de fosfatase ácida com presença de osteoclastos nos animais tratados com fluoxetina. Os efeitos da fluoxetina não foram

influenciados pela deficiência de estrogênio, pois não houve interação significativa entre a inibição mediada pela fluoxetina e pela ovariectomia.

Um estudo avaliou a possível atividade mutagênica e citotóxica do cloridrato de fluoxetina, com e sem a utilização concomitante de substâncias reconhecidamente como anti-mutagênicas (vitamina A e C) e observaram que a fluoxetina não se mostrou citotóxica ou mutagênica em experimentos com ratos Wistar tratados por via intraperitoneal por 24 h (forma aguda) ou por meio de gavagem durante 24 horas (forma aguda) ou 7 dias (forma subcrônica) (Dusman *et al.*, 2014).

Apesar de estudos terem evidenciado pouca influência da fluoxetina em tecidos calcificados, são necessários mais dados clínicos que corroborem com estes achados. Há evidências que revelaram que o tratamento com os ISRSs, especificamente a fluoxetina, pode afetar a estrutura dos tecidos mineralizados, como os ossos e os elementos dentais (Santiago *et al.*, 2013 - 1).

### **1.3 Papel da serotonina na odontogênese**

O crescimento e o desenvolvimento dos dentes envolvem uma série eventos morfogenéticos complexos e diferenciações entre as células do epitélio oral e células ectomesenquimais derivadas da crista neural (Slavkin e Bavetta, 1968; Pispá e Thesleff, 2003; Michon *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2013). As células do epitélio oral darão origem ao órgão do esmalte, que acabará sendo o responsável pela produção de esmalte, enquanto as células ectomesenquimais derivadas da crista neural irão formar a papila dental e o folículo dentário que irão originar o complexo dentino-pulpar e o periodonto, respectivamente (Baratella, Arana-Chavez e Katchburian, 1999).

Nas fases iniciais da odontogênese, células originárias da crista neural migram para o mesênquima para-axial e chegam ao território do primeiro arco branquial onde contribuem para a formação dos botões de dente. Na região mediana da maxila, células precursoras dos odontoblastos migram do broto fronto-nasal. A interação entre células epiteliais da lâmina dentária e as condensações mesenquimais contribuem para a formação da polpa embrionária. Durante o período de pré-migração os odontoblastos proliferaram e um número fixo de divisões permite que estas células possam alcançar a periferia da polpa dentária (Goldberg *et al.*, 2012). De acordo com a teoria do desenvolvimento dentário clássico, as células primitivas da papila dental são os precursores dos odontoblastos e, estes são também responsáveis pela secreção e maturação de pré-dentina e dentina (Guo *et al.*, 2013).

O desenvolvimento e diferenciação do germe dentário são acompanhados por mudanças rápidas em sua matriz extracelular (Cotrim *et al.*, 2002). Extensas remodelações do epitélio, proliferação celular, apoptose e mudanças na forma e no posicionamento dos grupos celulares são determinados por gradientes morfogenéticos que devem desempenhar um papel crítico durante a morfogênese do elemento dentário (Thesleff *et al.*, 1996; Thesleff e Sharpe, 1997; Matalova, Tucker e Sharpe, 2004; Lesot e Brook, 2008).

O germe dentário desenvolve-se através de cinco fases: botão, capuz, campânula, coroa e raiz. Estabelecida a fase de campânula, o germe dentário apresenta todos os primórdios para a formação do dente e seu tecido de sustentação e proteção (Thesleff, 1976). A fase de coroa corresponde ao período em que os tecidos mineralizados da coroa do futuro dente estão se formando, onde ocorre deposição de dentina e maturação dos odontoblastos (Ten Cate, 1978).

A dentina é o tecido mineralizado que constitui a maior parte do dente. Ela está intimamente relacionada com a polpa dentária com o qual compartilha a mesma origem embrionária. A deposição da matriz extracelular de dentina começa quando as células da periferia da papila dental são induzidas a diferenciar-se em odontoblastos (Arana-Chavez e Massa, 2004; Magne *et al.*, 2004; Goldberg *et al.*, 2012). A dentina é limitada pelo esmalte altamente mineralizado e com função de proteção, e na raiz, é coberta por cimento, uma estrutura implicada na fixação dos dentes no osso. Em contraste com o osso, a dentina não é vascularizada. A dentina circumpulpar forma a maior parte da camada de dentina. Fina em estágios iniciais de dentinogênese, a sua espessura aumenta continuamente. A dentina não constitui uma camada homogênea. Esta ainda é dividida em dentina intertubular e peritubular. Enquanto a dentina peritubular é encontrada ao redor do lúmen dos túbulos dentinários, a dentina peritubular forma a maior parte da dentina circumpulpar. No interior dos dentes localiza-se a polpa dentária, estrutura não mineralizada, que por ser um tecido conjuntivo frouxo apresenta estrutura nervosa e extensa rede vascular que se relaciona com os tecidos circundantes, ligamento periodontal e o osso alveolar (Goldberg *et al.*, 2012).

Os odontoblastos são células altamente especializadas derivadas da papila dentária, envolvidos na síntese da matriz colagenosa e não colagenosa da dentina, pré-dentina e polpa dentária (Hao, Ramachandran e George, 2009). São os responsáveis pela formação de dentina, o tecido celular mineralizado à base de colágeno que forma a maior parte dos dentes. Durante a dentinogênese, eles se apresentam alinhados ao longo da periferia da polpa dentária, desempenhando assim um papel na manutenção da integridade do dente, devido à sua capacidade de depositar novas camadas de dentina ao longo da vida. São células polarizadas e alongadas presentes na periferia da polpa dental que apresentam duas partes distintas: o corpo celular e o processo odontoblástico. Os

corpos celulares apresentam-se localizados fora do tecido mineralizado, ao longo da fronteira da mineralização e os longos processos odontoblásticos ocupam o lúmen dos túbulos dentinários (Goldberg *et al.*, 2012). Assim, a dentina formada é atravessada por milhares de túbulos dentinários e canalículos, que contêm os processos dos odontoblastos e, os corpos celulares formam a camada de odontoblastos na periferia da polpa dental (Ruch, Lesot e Begue-Birn, 1995; Arana-Chaves e Massa, 2004).

Durante sua formação, os odontoblastos secretam uma matriz não-mineralizada rica em colágeno tipo 1 denominada pré-dentina. Esta fase orgânica não-mineralizada situa-se entre a frente de mineralização e as suas células de formação, e são transformados para a fase mineralizada depois que os cristais de hidroxiapatita são depositados. Este processo de biomineralização é dinâmico e envolve interações ativas entre uma série de moléculas, incluindo o colágeno tipo I e inúmeras proteínas não-colágenas. As proteínas não-colágenas são responsáveis por promover e controlar a mineralização das fibras de colágeno e o crescimento de cristais dentro da pré-dentina quando este tecido é convertido em dentina (Suzuki *et al.*, 2009; Prasad, Butler e Qin, 2010).

A fina camada de pré-dentina encontra-se localizada entre a dentina mineralizada e o tecido conjuntivo frouxo da polpa dentária. A pré-dentina constitui uma matriz orgânica não mineralizada e sem a inclusão de corpos celulares. Apresenta a largura de 10 a 30  $\mu\text{m}$  e está presente durante dentinogênese e existe ao longo de toda a vida do elemento dentário. A pré-dentina é consideravelmente mais estreita na porção radicular do que na porção coronária (Linde e Goldberg, 1993).

O colágeno tipo I é o componente orgânico principal da matriz extracelular da dentina, entretanto uma variedade de proteínas não-colagenosas também se encontra presente na matriz de dentina. Os odontoblastos são capazes de sintetizar e secretar

todos os constituintes da matriz dentinária e, portanto, eles exibem organelas de síntese bem desenvolvidas (Arana-Chaves e Massa, 2004; Massa *et al.*, 2005).

O colágeno do tipo I é a proteína fibrosa dominante no complexo dentino-pulpar. Na dentina, o colágeno tipo I compreende cerca de 80-90% da matriz orgânica e está presente como fibras nanométricas, mas quantidades vestigiais de tipo III e V podem ser encontradas (Boskey, 1991; Linde e Goldberg, 1993; Abrahão *et al.*, 2006). Estudos indicaram que colágeno tipo I acelera a diferenciação das células pulpares, pois por ser o principal componente da matriz extracelular fornece um ambiente mais apropriado e natural para estas células (Wang *et al.*, 2011). O colágeno tipo I não só fornece propriedades viscoelásticas a estes tecidos, como também define compartimentos para deposição ordenada dos cristais de hidroxapatita. Em conjunto com as proteínas não-colagenosas (proteínas da matriz dentinária – DMP1, sialofosfoproteína dentinária – DSPP, osteopontina, fosfoglicoproteína da matriz extracelular - EFEM e sialoproteína óssea – BSP), o colágeno tipo I desempenha um importante papel na promoção da mineralização do tecido dentinário ou na inibição desse processo (He e George, 2004; Hao, Ramachandran, George, 2009; Nudelman *et al.*, 2013).

O colágeno tipo I resulta da auto-montagem de duas cadeias alfa 1 e alfa 2, estas correntes são montadas em uma tripla hélice com uma conformação em espiral enrolada. Cerca de 3% das fibras colágenas são compostos por fibrilas do tipo V e III. O colágeno é sintetizado e, subseqüentemente, controlado pelos fibroblastos. A montagem de cadeias de pró-colágeno é iniciada no âmbito do retículo endoplasmático rugoso, glicosilação e sulfatação ocorrem no Aparelho de Golgi, e a maturação do pró-colágeno ocorre em vesículas secretoras iniciais. No entanto, a utilização de certas drogas, como vimblastina ou outros alcalóides e a colchicina, prejudica a secreção do colágeno, pois atuam de forma prejudicial sobre polimerização de proteínas do citoesqueleto,

nomeadamente as tubulinas (Munksgaard *et al.*, 1978; Butler e Ritchie, 1995; Goldberg *et al.*, 2012).

A polpa dentária é um tecido conjuntivo frouxo com uma organização e localização peculiar. É cercada pela dentina, que é um tecido duro e inelástico. A polpa dentária é composta de células (fibroblastos, odontoblastos e células mesenquimais indiferenciadas) que em contato com uma cadeia complexa de macromoléculas secretadas extracelularmente formam a matriz extracelular. Além de fornecer estrutura para os tecidos, essa matriz tem um papel bioativo na regulação do comportamento das células, influenciando seu desenvolvimento, migração, proliferação, forma e função (Abrahão *et al.*, 2006).

Gronthos *et al.* (2000) demonstraram que a polpa dentária contém células mesenquimais indiferenciadas, altamente proliferativas e capazes de se diferenciarem em resposta à uma agressão, originando odontoblastos que irão produzir dentina reparadora.

No final da formação de coroa e, relacionada com o aparecimento da erupção dos dentes, começa a formação da dentina radicular. A partir da junção entre os epitélios interno e externo do órgão do esmalte, na região da alça cervical, a bainha epitelial de Hertwig começa a se desenvolver. Na periferia da papila dental, os odontoblastos começam a se desenvolver e tornam-se polarizados e iniciam a formação da pré-dentina, que por sua vez irá originar a dentina. As diferenças na incorporação de precursores, bem como as diferenças na composição de alguns componentes da matriz refletem variações substanciais e importantes entre as dentinas coronária e radicular (Linde e Goldberg, 1993).

Segundo estudos, a 5-HT exerce um papel estimulador sobre o desenvolvimento do germe dental desempenhando ações que são capazes de induzir a formação do órgão

do esmalte e da papila dentária originando os estágios de campânula e coroa. Esses fenômenos constituem etapas de cito e histodiferenciação que ocorre durante a odontogênese e que dará origem ao elemento dental (Moiseiwitsch e Lauder, 1996; Moiseiwitsch *et al.*, 1998).

A ação da 5-HT nos tecidos mineralizados já havia sido questionada anteriormente. A presença deste neurotransmissor foi confirmada no interior do mesênquima dental através de um estudo onde se utilizou mandíbulas de embriões de ratos que foram colocadas em meios de cultura com diferentes concentrações de 5-HT. A expressão da 5-HT foi estabelecida com um anti-soro contra 5-HT usando a imunohistoquímica como técnica e o padrão avidina/biotina peroxidase. Quando as mandíbulas foram colocadas em meios de cultura contendo a fluoxetina, o desenvolvimento do germe dentário foi reduzido, isto sugeriu que a fluoxetina apresentou capacidade de inibir os efeitos da 5-HT sobre o desenvolvimento do germe dentário, como a formação da papila dental, a diferenciação do órgão do esmalte e a indução dos pré-odontoblastos e pré-ameloblastos (Moiseiwitsch e Lauder, 1996; Moiseiwitsch *et al.*, 1998).

Uma pesquisa avaliou as alterações morfológicas e de desenvolvimento embrionário que poderiam ocorrer em ossos da região craniofacial de animais cujas mães foram tratadas com o cloridrato de fluoxetina na dosagem de 10 mg/kg de peso animal. Neste estudo, as articulações têmporo-mandibulares (ATMs) foram analisadas por estarem relacionadas com o desenvolvimento craniofacial, que é influenciado pelo sistema serotoninérgico. Entretanto, os resultados mostraram que o tratamento com a fluoxetina não foi capaz de promover efeitos deletérios sobre a arquitetura das ATMs (Cavalcanti *et al.*, 2009).

A ação direta da fluoxetina no desenvolvimento do esmalte dentário e na amelogênese foi também avaliada a fim de identificar as possíveis alterações morfológicas e estruturais que este fármaco poderia produzir no órgão do esmalte de primeiros molares superiores de ratos. Neste estudo, ratas prenhes foram tratadas com o cloridrato de fluoxetina na dosagem de 10 mg/kg de peso animal, e os resultados não foram capazes de evidenciar alterações estruturais e no desenvolvimento dos tecidos que deram origem ao esmalte dentário (Silva *et al.*, 2010).

Santiago *et al.* (2013 - 2) avaliaram os aspectos morfológicos da dentinogênese coronária de primeiros molares superiores de ratos, cujas mães foram tratadas com fluoxetina durante a gestação e não encontram evidências estatisticamente significantes que pudessem sugerir que o cloridrato de fluoxetina interfere, de forma deletéria, a nível estrutural no desenvolvimento dos tecidos que formam o complexo dentino-pulpar, e sugeriram a importância de acompanhar o desenvolvimento destes tecidos em outras idades do desenvolvimento e também durante a lactação para observar se este fármaco é capaz promover algum tipo de malformação durante a odontogênese.

Por outro lado, estudos têm demonstrado que a fluoxetina pode atuar inibindo os níveis de perda óssea nos casos de doenças de origem inflamatória, como as periodontites. Segundo Branco de Almeida *et al.* (2012) a fluoxetina possui propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e imunorreguladoras. De acordo com estes autores, a fluoxetina pode reduzir a produção de importantes mediadores inflamatórios. Portanto, juntamente com a sua segurança e as altas taxas de prescrição médica na prática clínica, a fluoxetina poderia afetar o desenvolvimento da doença periodontal, pois além de reduzir a reabsorção do osso alveolar, teve um efeito positivo sobre a degradação do colágeno nos tecidos gengivais. Em conjunto, esses achados não só foram capazes de confirmar o potencial antiinflamatório da fluoxetina, como também

são os primeiros a demonstrar a potência da fluoxetina sobre a doença periodontal. Em outro estudo, Aguiar *et al.* (2013) analisaram a hipótese de que a inibição do estresse crônico através da fluoxetina poderia diminuir os níveis de perda óssea na periodontite crônica. Foi possível verificar que o stress pode estar associado com a progressão da perda de osso em ratos e que o tratamento com a fluoxetina foi capaz de reduzir a severidade da perda óssea, pois tem sido sugerido que a fluoxetina apresenta efeitos antiinflamatórios por agir inibido citocinas pró-inflamatórias.

O aumento do consumo dos ISRSs em todo o mundo tem permitido observar um importante comprometimento da histofisiologia óssea mediante o uso desses medicamentos. Portanto, é possível que exposições a níveis significativos de antidepressivos apresentem alterações no desenvolvimento do sistema serotoninérgico, entretanto esta evidência não está bem estabelecida, sendo importante um número maior de estudos nesta área (Ornstein, Stuart e Jenkins, 2000; Van Marwijk, 2001).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar histologicamente a influência da fluoxetina no desenvolvimento do complexo dentino-pulpar de primeiros molares superiores de ratos cujas mães foram tratadas com cloridrato de fluoxetina durante a gestação e lactação.

### **2.2 Objetivos específicos**

2.2.1 Verificar a influência da fluoxetina sobre a odontogênese de primeiros molares superiores de ratos durante as fases de desenvolvimento da coroa e raiz através de estudos histológicos, histométricos, histoquímicos e imunohistoquímico, durante os 42 de exposição à droga.

2.2.2 Avaliar a influência da fluoxetina sobre a produção de fibras colágenas do tipo I de primeiros molares superiores de ratos durante as fases de desenvolvimento da coroa e raiz através de estudos histológicos, histométricos, histoquímicos e imunohistoquímico, durante os 42 dias de exposição à droga.

2.2.3 Identificar se houve agenesia dentária e alterações numéricas nos ratos cujas mães foram tratadas com cloridrato de fluoxetina durante a gestação e lactação.

## **3 MÉTODOS**

### **3.1 Local de realização do estudo**

O estudo foi realizado no Biotério do Núcleo de Cirurgia Experimental, no Laboratório de Patologia Oral do Departamento de Clínica e Odontologia Preventiva, no Laboratório de Histotécnica do Departamento de Histologia e Embriologia, no Laboratório de Histotécnica do Programa de Pós-graduação em Patologia pertencentes à Universidade Federal de Pernambuco. O estudo imunohistoquímico foi realizado no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA).

### **3.2 Considerações éticas**

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE), processo nº 23076.017680/2011 - 83 (em anexo).

### **3.3 Animais**

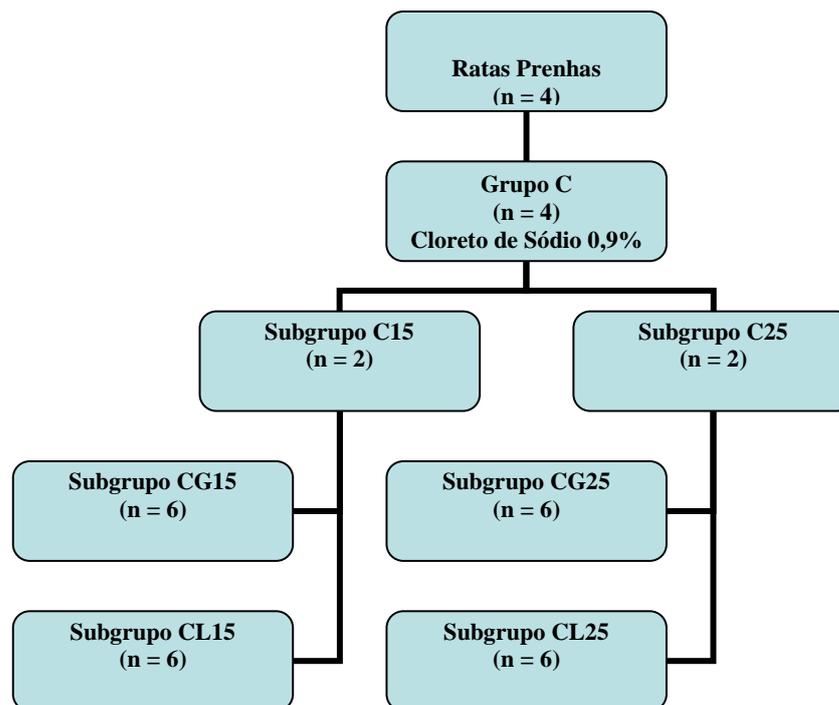
Foram utilizados 12 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, pesando aproximadamente 180 g e com 120 dias de vida. Os animais receberam a dieta padrão do biotério (Presence Ratos e Camudongos – Presence, Paulínia, SP, Brasil) e água *ad libitum*. Foram mantidos em sala com temperatura de 23 ± 2° C e ciclo de claro e escuro de 12:12 horas (claro das 06 às 18 horas e escuro das 18 às 06 horas).

Após o período de adaptação, para obtenção de neonatos, foram realizados acasalamentos entre animais adultos na proporção de um macho para duas fêmeas. A

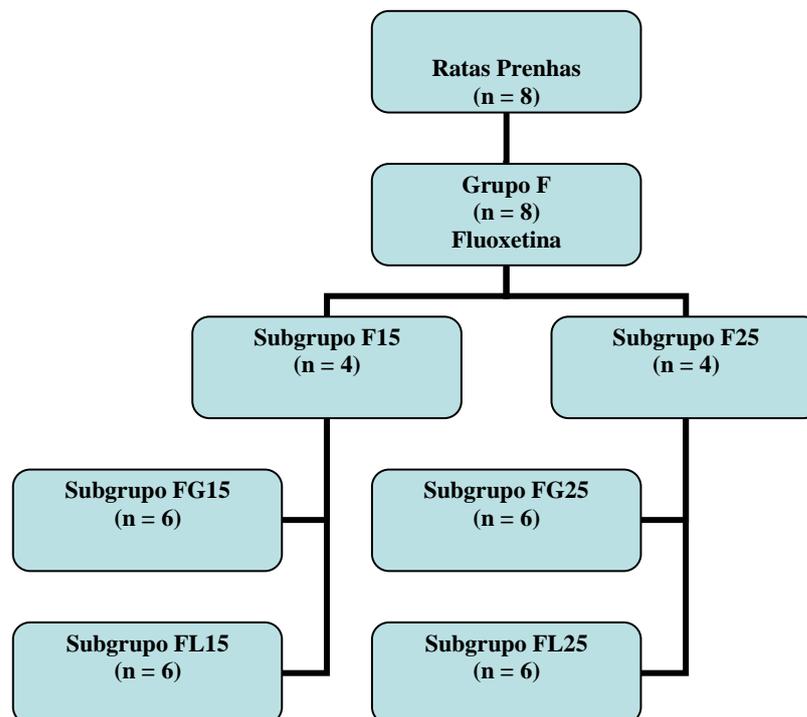
gravidez foi diagnosticada através da realização de esfregaço vaginal, na manhã seguinte ao acasalamento, e posterior observação da presença de espermatozóides associada ao acompanhamento de ganho de peso corporal. Uma vez detectada a presença de espermatozóides, a fêmea foi considerada prenhe sendo este dia considerado como o 1º dia da prenhez e o início do tratamento dos animais (Lankas, Minsker e Robertson, 1989).

### **3.3.1 Grupos de estudo**

As ratas prenhes foram distribuídas aleatoriamente, sendo 4 animais para o grupo tratado com cloreto de sódio a 0,9% na dose de 10µl/g (Grupo C) e 8 animais para o grupo tratado com fluoxetina (Pharma Nostra, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) na concentração de 20 mg/kg de peso animal (Grupo F). Cada grupo foi dividido em subgrupos de acordo com a idade do desenvolvimento do elemento dental a ser estudado (15 e 25 dias de vida). Os grupos C e F foram, ainda, divididos em 2 subgrupos: animais tratados durante a gestação (CG e FG) e tratados durante a gestação e lactação (CL e FL). Os subgrupos do grupo C foram: CG15 e CG25 (sem lactação) e CL15 e CL25 (com lactação) e os subgrupos do grupo F foram: FG15 e FG25 (sem lactação) e FL15 e FL25 (com lactação). Foi utilizada 1 rata prenhe para cada subgrupo dos grupos controles e de cada ninhada foram utilizados 6 filhotes, machos e fêmeas (n = 6). Para os grupos tratados com a fluoxetina foram utilizadas 2 ratas prenhes para cada subgrupo sendo que de cada ninhada foram utilizados 3 filhotes machos e fêmeas, totalizando 6 (n = 6) animais por subgrupo. No total foram utilizados 48 filhotes. Os animais de cada subgrupo foram obtidos de mães tratadas ou não, a partir do primeiro dia de gestação (Figuras 1 e 2).



**Figura 1.** Fluxograma do Grupo C: foram utilizadas 4 ratas prenhas, sendo 1 animal prenhe por idade de desenvolvimento dentário a ser analisado. De cada ninhada foram utilizados 6 filhotes (n = 6).



**Figura 2.** Fluxograma do Grupo F: foram utilizadas 8 ratas prenhas, sendo 2 animais prenhas por idade de desenvolvimento dentário a ser analisado. De cada ninhada foram utilizados 3 filhotes, totalizando 6 filhotes (n = 6).

### 3.3.2 Tratamento farmacológico dos animais

Uma vez diagnosticada a prenhez, as ratas foram submetidas ao tratamento estabelecido de acordo com o grupo de estudo a que pertencia. No grupo C as mães receberam diariamente cloreto de sódio a 0,9% na dose de 10µl/g e no grupo F as mães foram tratadas com cloridrato de fluoxetina (Pharma Nostra, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) na dose de 20mg/kg de peso animal, ambos administrados por sonda orogástrica entre 7 e 8 horas da manhã. Para a introdução da sonda foi realizada a contenção manual da rata gestante evitando que ela se movimentasse. Com o auxílio dos dedos polegar e o indicador da mão esquerda, a rata foi contida e posicionada verticalmente e sua cabeça levemente puxada para trás, deixando plana a curvatura anatômica entre o tórax e a boca. Com o animal contido, a sonda foi introduzida na cavidade oral usando a mão direita. A extensão da sonda foi mensurada e demarcada antes da introdução da mesma para facilitar sua penetração até a porção inferior da cavidade gástrica. A introdução do soro fisiológico ou do cloridrato de fluoxetina no estômago dos animais foi realizada lentamente para evitar a formação de bolhas de ar, e minimizar a distensão gástrica.

Tanto a solução fisiológica quanto o cloridrato de fluoxetina foram administrados do 1º ao 21º dia da prenhez para os animais dos grupos CG e FG e durante a gestação e nos 21 dias de lactação para os animais dos grupos CL e FL.

Ao completar 15 e 25 dias de vida os filhotes foram anestesiados com xilazina (CEVA, Paulínia, São Paulo, Brasil) na dose de 20mg/kg de peso animal (i. p.) e quetamina (CEVA, Paulínia, São Paulo, Brasil) na dose de 50mg/kg de peso animal (i. p.) e em seguida perfundidos por via intracardíaca com solução de formaldeído a 4% (obtido a partir do paraformaldeído - Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil).

A seguir foram decapitados, suas mandíbulas removidas e, a maxila com os elementos dentários direito e esquerdo foi seccionada frontalmente a face mesial do primeiro molar. As peças foram fixados “*in toto*” segundo os procedimentos para estudos histológicos, histométricos, histoquímicos e imunohistoquímico.

### **3.4 Microscopia de luz**

Os espécimes foram fixados em solução neutra de formaldeído a 4% (obtido a partir do paraformaldeído - Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil) durante 24 horas à temperatura ambiente. A seguir, os espécimes de 15 dias foram descalcificados em solução aquosa de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) a 5% (Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil) por 08 dias e os espécimes de 25 dias foram descalcificados com a mesma solução por 15 dias. Seguiu-se a técnica histológica convencional na seguinte sequência: desidratação em uma série crescente de etanol (70% a 100%, por 40 minutos cada); diafanização com xilol (dois banhos de 40 minutos cada); embebição em parafina (3 banhos de 40 minutos cada) e inclusão no mesmo material (Michalanny, 1990).

Os cortes histológicos foram obtidos com 5 $\mu$ m cada, através de um micrótomo LEICA RM 2125 RT (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha), utilizando-se navalha LEICA 818 (LEICA RM 2125 RT, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha), foram estirados em banho-maria histológico (ANCAP - Equipamentos Eletro-eletrônicos Ltda.), dispostos em lâminas untadas com albumina de Mayer, colocados em estufa (J PROLAB 102, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) por, aproximadamente, 30 minutos a 37° C para secagem do material e foram corados pela Hematoxilina-Eosina (HE), Tricrômico de Masson (TM) e *Picrossírius Red* e montados em Entellan<sup>®</sup> (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Todas as preparações foram

obsevdadas e fotografadas em microscópio de luz LEICA ICC50 HD (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha).

### **3.5 Estudos histológicos, histométricos, histoquímicos e imunohistoquímico**

Para análise histológica, foram selecionadas preparações coradas em HE e foi utilizado microscópio de luz LEICA ICC50 HD (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha). A coroa de cada dente foi dividida em três terços: terços cuspídico, médio e cervical e a raiz foi dividida em dois terços: cervical e médio. Nestas regiões foram observadas as características histológicas das regiões da dentina, pré-dentina, camada odontoblástica e zona central da polpa.

Para análise histométrica foi utilizado microscópio de luz LEICA ICC50 HD (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha), acoplado em uma microcâmera, conectado a um computador contendo uma placa de captura de imagem e o software para histometria IMAGE J (Macintosh Computers, Maryland, EUA). As preparações histológicas, coradas em HE, foram escolhidas aleatoriamente, de modo que no final desta seleção fosse possível fazer uma histometria seriada. Os três terços da coroa e os dois terços da raiz foram analisados, sendo que, de cada região analisada selecionavam-se 10 campos, sob a objetiva de 10x, e eram mensurados espessura da dentina e pré-dentina, comprimento dos odontoblastos e quantidade de fibroblastos presentes na zona central da polpa coronária e radicular.

Para análise histométrica da densidade das fibras colágenas na zona central da polpa coronária e radicular foram utilizadas as preparações coradas em TM e as imagens foram obtidas utilizando microscópio de luz LEICA ICC50 HD (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha) acoplado em uma microcâmera,

conectado a um computador contendo uma placa de captura de imagem e o software para histometria IMAGE PRO PLUS 6.0 (Macintosh Computers, Maryland, EUA).

Para a análise histoquímica do colágeno foram utilizadas as preparações coradas por HE, TM e *Picrosírius Red*. As fibras colágenas das preparações coradas por *Picrosírius Red* foram observadas através da fluorescência emitida pelo tecido, utilizando um microscópio petrográfico polarizado (Olympus BX40, Olympus Corporation, Tóquio, Japão).

Para o estudo imunohistoquímico para detecção de fibras colágenas do tipo I foi utilizado o “kit” Anti-Collagen I antibody ab34710 (Abcam Inc, Cambridge, Massachusetts, EUA). Foram utilizados 8 filhotes, sendo 1 animal para cada grupo de estudo (CG15, CG25, CL15, CL25, FG15, FG25, FL15 e FL25). Os espécimes foram fixados em solução contendo paraformaldeído (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil) a 4% tamponado neutro, durante 20 horas a 4° C. Após a desidratação e diafanização pelos procedimentos convencionais, foram incluídos em parafina e cortes de aproximadamente 5µm, foram obtidos e montados em lâminas silanizadas de alta aderência (Easypath, São Paulo, São Paulo, Brasil). A seguir, os cortes foram desparafinizados, reidratados e, então, foi realizada a recuperação antigênica com solução tampão fosfato de sódio (PBS), pH 7.6 em panela de pressão por 30 minutos. Após este procedimento, as preparações foram tratadas em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol absoluto por 15 minutos a temperatura ambiente, para bloquear a peroxidase endógena. Foram, então, lavadas em PBS 3 vezes, por 5 minutos. A seguir, foi aplicado o anticorpo primário na diluição de 1:500, por 30 minutos, segundo o protocolo do fabricante. Foram, então, lavadas, novamente, em PBS 3 vezes, por 5 minutos. Logo após, realizou-se a adição do “Kit” N-Histofine<sup>®</sup> Simple Stain MAX PO (MULTI) (Universal immuno-peroxidase polymer, anti-mouse and rabbit -

Nichirei Biosciences INC., Tóquio, Japão), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Foram, então, lavadas em PBS 3 vezes, por 5 minutos. Foi aplicado o cromógeno diaminobenzidina (DAB - Easypath, São Paulo, São Paulo, Brasil) sobre as preparações durante 20 minutos a temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em água destilada 3 vezes, por 5 minutos. As preparações foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha) por 5 minutos, lavadas em água corrente, diafanizadas em xilol e montadas em Entellan<sup>®</sup> (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). As preparações foram observadas e fotografadas em microscópio de luz LEICA ICC50 HD (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha).

### **3.6 Análise estatística**

Para a tabulação dos dados quantitativos foram utilizados os Softwares STATA/SE para Windows e o Excel 2007. Foram realizadas comparações com dois grupos utilizando-se o Teste de Mann-Whitney, uma vez excluída a hipótese de normalidade dos dados. Quando a distribuição dos dados apresentou-se normal o Teste t Student foi aplicado. Todos os testes foram aplicados considerando o intervalo de confiança de 95%

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 EFEITOS DA FLUOXETINA NA DENTINOGENESE DE RATOS CUJAS MÃES FORAM TRATADAS DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO**

#### **INTRODUÇÃO**

A depressão é, reconhecidamente, um problema de saúde pública mundial (Belik, 2008), interferindo de modo decisivo e intenso na vida pessoal, profissional, social e econômica de seus portadores (Berle e Spigset, 2011). As mulheres apresentam uma alta porcentagem de incidência principalmente no período gestacional ou no pós-parto (Sit *et al.*, 2011; Pawluski *et al.*, 2012). O tratamento da depressão durante o período gestacional e pós-gestacional é importante para prevenir complicações obstétricas, como o nascimento de bebês prematuros ou de baixo peso ao nascer (Hendrick e Altshuler, 2002).

Frente às opções de tratamento para depressão em pacientes gestantes e no pós-parto, o cloridrato de fluoxetina tornou-se o fármaco de primeira escolha devido não apenas à sua eficácia, mas também a sua alta tolerância (Gupta, Masand e Rangwani, 1998). É um fármaco capaz de inibir de forma potente e seletiva a recaptação de serotonina (5-HT), potencializando a neurotransmissão serotoninérgica. O mecanismo de ação da fluoxetina está ligado à inibição da recaptação neuronal de 5-HT e um aumento na neurotransmissão serotoninérgica no Sistema Nervoso Central (SNC) (Gupta, Masand e Rangwani, 1998; Raap e Van de Kar, 1999).

O metabolismo dos tecidos mineralizados pode ser influenciado pelo SNC, sendo este capaz de controlar as atividades das células ósseas, como os osteoblastos e osteócitos, por exemplo (Bliziotis *et al.*, 2006). Mecanismos neuroendócrinos, principalmente os relacionados com a 5-HT, estão associados à diferenciação e ativação destas células. Há relatos na literatura, de que o cloridrato de fluoxetina bloqueando recaptação da 5-HT poderia induzir reabsorção óssea em ratos (Battaglini *et al.*, 2004; Bonnet *et al.*, 2007).

Estudos mostraram que alterações ocorridas nos níveis de 5-HT do organismo durante o período da embriogênese provocaram alterações no crescimento e desenvolvimento de muitos tecidos, destacando-se os da região crânio-facial (Mendes-da-Silva *et al.*, 2002). Pesquisas realizadas em animais revelaram a presença de sítios de captação de 5-HT na região craniofacial em sincronia com os principais eventos morfogênicos desta região, incluindo o desenvolvimento dos tecidos da face, fato este que deu muita importância às possíveis influências da 5-HT no desenvolvimento dental (Lauder e Zimmerman, 1988; Tecott, Shtrom e Julius, 1995).

A 5-HT exerce um papel estimulador sobre o desenvolvimento do germe dental desempenhando ações que são capazes de induzir a formação do órgão do esmalte e da papila dentária originando os estágios de campânula e coroa. Esses fenômenos constituem etapas de cito e histodiferenciação que ocorre durante a odontogênese e que dará origem ao elemento dental (Moiseiwitsch e Lauder, 1996; Moiseiwitsch *et al.*, 1998).

O germe dentário desenvolve-se através de cinco fases: fase de botão, capuz, campânula, coroa e raiz. Estabelecida a fase de campânula, o germe dentário apresenta todos os primórdios para a formação do dente e seu tecido de sustentação e proteção. A fase de coroa corresponde ao período em que os tecidos mineralizados da coroa do

futuro dente estão se formando, onde ocorre deposição de dentina e maturação dos odontoblastos (Thesleff, 2003).

O desenvolvimento e diferenciação do germe dentário são acompanhados por mudanças rápidas em sua matriz extracelular (Cotrim *et al.*, 2002). Extensas remodelações do epitélio, proliferação celular, apoptose e mudanças na forma e no posicionamento dos grupos celulares são determinados por gradientes morfogenéticos que devem desempenhar um papel crítico durante a morfogênese do elemento dentário (Lesot e Brook, 2008).

Portanto, é possível que exposições a doses terapêuticas crônicas de inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs) apresentem alterações no desenvolvimento do sistema serotoninérgico. Entretanto esta evidência não está bem esclarecida, sendo importante um número maior de estudos nesta área (Kiryanova, McAllister e Dyck, 2013).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os aspectos histológicos, histométricos, histoquímicos e imunohistoquímico da dentinogênese de primeiros molares superiores de ratos com 15 e 25 dias de vida, cujas mães foram tratadas com fluoxetina durante a gestação e lactação.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Animais**

A presentepesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE), processo n° 23076.017680/2011

Foram utilizadas 12 ratas albinas da linhagem Wistar, mantidas em sala com temperatura de  $23 \pm 2^\circ \text{C}$  e ciclo de claro e escuro de 12/12 horas (claro das 06 às 18 horas e escuro das 18 às 06 horas), recebendo a dieta padrão do biotério (Presence Ratos e Camudongos – Presence, Paulínia, SP, Brasil) e água *ad libitum*. Após o período de adaptação, foram realizados acasalamentos entre os animais adultos e testes de esfregaço vaginal para a comprovação da gravidez. O dia da comprovação da gravidez configurou o primeiro dia de gestação e o início dos tratamentos dos animais (Lankas, Minsker, e Robertson, 1989).

### **Tratamento**

Dois grupos compuseram a pesquisa: o grupo controle (grupo C) e o grupo tratado com fluoxetina (Grupo F). Cada grupo foi dividido em subgrupos de acordo com a idade do desenvolvimento do elemento dental a ser estudado (15 e 25 dias de vida). Os grupos foram ainda divididos em 2 subgrupos: animais que foram tratados apenas na gestação e animais que foram tratados na gestação e lactação. Os subgrupos do grupo C foram: CG15 e CG25 (gestação) e CL15 e CL25 (gestação e lactação) e os subgrupos do grupo F foram: FG15 e FG25 (gestação) e FL15 e FL25 (gestação e lactação). Foi utilizada 1 rata prenhe para cada subgrupo dos grupos controle e, de cada ninhada foram utilizados 6 filhotes, de ambos os sexos ( $n = 6$ ). Para o grupo tratado com a fluoxetina foram utilizadas 2 ratas prenhes para cada subgrupo sendo que de cada ninhada foram utilizados 3 filhotes, de ambos os sexos, totalizando 6 ( $n = 6$ ) animais por subgrupo, totalizando uma amostra de 48 filhotes. Nos grupos CG15 e CG25 os animais eram provenientes de ratas que receberam cloreto de sódio a 0,9% na dose de  $10\mu\text{l/g}$  por via oral (gavagem) durante todo o período de gestação; nos grupos CL15 e CL25 os animais eram provenientes de ratas que receberam cloreto de sódio a 0,9% na dose de

10µl/g por via oral (gavagem) durante a gestação e lactação e nos grupos FG e FL os animais eram provenientes de ratas que foram tratadas com cloridrato de fluoxetina (Pharma Nostra, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) na dose de 20mg/kg de peso animal por via oral (gavagem) administrada até o término da gestação (grupos FG15 e FG25) e nos grupos FL15 e FL25 os animais foram tratados com a fluoxetina durante a gestação até o fim da amamentação, ou seja, 21 dias após o nascimento.

Os animais de 15 e 25 dias de vida foram anestesiados com xilazina (CEVA, Paulínia, São Paulo, Brasil) na dose de 20mg/kg de peso animal (i. p.) e quetamina (CEVA, Paulínia, São Paulo, Brasil) na dose de 50mg/kg de peso animal (i. p.) e em seguida perfundidos por via intracardíaca com solução de formaldeído a 4% tamponado neutro (obtido a partir do paraformaldeído - Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil). Os animais foram decapitados, suas mandíbulas removidas e a maxila com os elementos dentários foi seccionada frontalmente a face mesial do primeiro molar.

### **Processamento e análises histológicas, histométricas e histoquímicas**

As peças foram fixadas em solução neutra de formaldeído a 4% (obtido a partir do paraformaldeído - Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil) durante 24 horas à temperatura ambiente. A seguir, os espécimes de 15 dias foram descalcificados em solução aquosa de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) a 5% (Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil) por 08 dias e os espécimes de 25 dias foram descalcificados com a mesma solução por 15 dias. Após a descalcificação, os espécimes foram submetidos a processamento histológico convencional para inclusão em parafina (Michallany, 1990). Cortes semi-seriados de 5 µm foram obtidos com micrótomo (LEICA RM 2125 RT, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha), corados pela Hematoxilina-Eosina (HE), Tricrômico de Masson (TM) e *Picrosíruius*

*Red* e montados em Entellan<sup>®</sup> (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Para análise histológica, foram selecionadas preparações coradas em HE e foram observadas em microscópio de luz LEICA ICC50 HD (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha). A coroa de cada elemento dentário foi dividida em três terços: terços cuspídeo, médio e cervical e a raiz dividida em terços: cervical e médio. Nestas regiões foram observadas as características histológicas das regiões da dentina, pré-dentina e camada odontoblástica.

Para análise histométrica foi utilizado microscópio de luz LEICA ICC50 HD (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha), acoplado em uma microcâmera, conectado a um computador contendo uma placa de captura de imagem e o software para histometria IMAGE J (Macintosh Computers, Maryland, EUA). As preparações histológicas, coradas em HE, foram escolhidas aleatoriamente, de modo que no final desta seleção fosse possível fazer uma histometria seriada.

Para a análise histoquímica do colágeno foram utilizadas as preparações coradas por HE, TM e *Picrossírius Red*. As fibras colágenas das preparações coradas por *Picrossírius Red* foram observadas através da fluorescência emitida pelo tecido, utilizando um microscópio petrográfico polarizado (Olympus BX40, Olympus Corporation, Tóquio, Japão).

### **Análise imunohistoquímica**

Para a realização da imunohistoquímica para detecção de fibras colágenas do tipo I foi utilizado o “kit” Anti-Collagen I antibody ab34710 (Abcam Inc, Cambridge, Massachusetts, EUA). Foram utilizados 8 filhotes, sendo 1 animal para cada grupo de estudo (CG15, CG25, CL15, CL25, FG15, FG25, FL15 e FL25). Os espécimes foram fixados em solução contendo paraformaldeído (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil) a 4%

tamponado neutro, durante 20 horas a 4° C. Após a desidratação e diafanização pelos procedimentos convencionais, foram incluídos em parafina e cortes de 5µm, foram obtidos e montados em lâminas silanizadas de alta aderência (Easypath, São Paulo, São Paulo, Brasil). A seguir, os cortes foram desparafinizados, reidratados e, então, foi realizada a recuperação antigênica com solução tampão fosfato de sódio (PBS), pH 7.6 em panela de pressão por 30 minutos. Após este procedimento, as preparações foram tratadas em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol absoluto por 15 minutos a temperatura ambiente, para bloquear a peroxidase endógena. Foram, então, lavadas em PBS 3 vezes, por 5 minutos. A seguir, foi aplicado o anticorpo primário na diluição de 1:500, por 30 minutos, segundo o protocolo do fabricante. Foram, então, lavadas, novamente, em PBS 3 vezes, por 5 minutos. Logo após, realizou-se a adição do “Kit” N-Histofine<sup>®</sup> Simple Stain MAX PO (MULTI) (Universal immuno-peroxidase polymer, anti-mouse and rabbit - Nichirei Biosciences INC., Tóquio, Japão), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Foram, então, lavadas em PBS 3 vezes, por 5 minutos. Foi aplicado o cromógeno diaminobenzidina (DAB - Easypath, São Paulo, São Paulo, Brasil) sobre as preparações durante 20 minutos a temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em água destilada 3 vezes, por 5 minutos. As preparações foram contracoradas com Hematoxilina de Harris (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha) por 5 minutos, lavadas em água corrente, diafanizadas em xilol e montadas em Entellan<sup>®</sup> (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). As preparações foram observadas e fotografadas em microscópio de luz LEICA ICC50 HD (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha).

## **Estatística**

Para a tabulação dos dados quantitativos foram utilizados os Softwares STATA/SE para Windows e o Excel 2007. Foram realizadas comparações com dois grupos utilizando-se o Teste de Mann-Whitney, uma vez excluída a hipótese de normalidade dos dados. Quando a distribuição dos dados apresentou-se normal o Teste t Student foi aplicado. Todos os testes foram aplicados considerando o intervalo de confiança de 95%

## **RESULTADOS**

Cada rata gestante gerou por ninhada uma média de 8 filhotes, conferindo um padrão de normalidade nutricional dos animais submetidos às intervenções do estudo. Não foram observadas agenesias dentárias, bem como alterações morfológicas ou numéricas da dentição em estudo.

### **Análise histológica e histoquímica**

A análise histológica não evidenciou diferenças estruturais na morfologia do complexo dentino-pulpar entre os grupos controles e experimentais do estudo. Nos animais com 15 dias de vida, o primeiro molar superior encontrava-se na fase inicial de rizogênese, sendo que a coroa ainda não havia irrompido. Nos animais de 25 dias de vida, o primeiro molar superior encontrava-se na fase de rizogênese com aproximadamente metade da raiz formada, sendo que a coroa já se encontrava irrompida.

Observaram-se, em ambas as idades, no terço cuspídico, uma dentina, de coloração rosa escuro e a camada de pré-dentina de coloração rosa claro. Abaixo da

camada de pré-dentina, observaram-se odontoblastos dispostos em paliçada com aspecto prismático alto e núcleo polarizado em direção a papila dentária, assemelhando-se a um epitélio pseudo-estratificado. No terço médio da coroa, descendo pela vertente da coroa, observou-se a presença das camadas de dentina e pré-dentina, menos espessas que no terço cuspídico, que foram adelgaçando-se em direção ao terço cervical. Os odontoblastos subjacentes a camada de pré-dentina encontraram-se prismáticos com o núcleo polarizado em direção a papila dentária, porém mais baixos que no terço cuspídico. No terço cervical a presença das camadas de dentina e pré-dentina apresentou espessura menor que as regiões cuspídica e média. Abaixo da camada de pré-dentina, observamos a camada odontoblástica disposta em paliçada com aspecto prismático baixo e núcleo em direção a papila dentária (Figuras 1A e 2A).

Na região radicular dos animais com 25 dias de vida, observou-se tanto no grupo controle como nos grupos experimentais presença da dentina mais espessa no terço cervical, sendo que sua espessura diminuiu progressivamente em direção apical. Esta camada apresentou uma matriz homogênea, acidófila cortada pelos túbulos dentinários contendo os processos celulares dos odontoblastos no seu interior. Foi também observada a presença de uma fina camada de pré-dentina, com tonalidade fracamente acidófila entre a dentina e a camada odontoblástica. Os odontoblastos, localizados perifericamente na região pulpar, mostraram-se prismáticos baixos e em camada única; na porção média da raiz adquiriram aspecto cubóide. Na porção mais apical da raiz, evidenciou-se o começo da formação do ápice radicular (Figura 3A).

Nos cortes corados pelo método de TM e *Picrosírius Red* observaram-se em todos os grupos analisados que as fibras colágenas da pré-dentina e da dentina apresentaram reação positiva quando coradas com o TM e com o *Picrosírius Red*, sendo que a camada de dentina apresentou reação mais intensa quando comparada com a pré-

dentina, porém sem diferenças estruturais entre os grupos analisados (Figuras 1B, 1C, 2B, 2C, 3B, 3C).

### **Análise sob microscopia de polarização**

As amostras avaliadas não apresentaram diferenças quanto ao tipo e a disposição do colágeno na dentina dos animais submetidos ou não a fluoxetina durante o seu desenvolvimento. Sob a análise pela microscopia de polarização com preparações coradas pelo *Picrossírius Red*, a dentina dos animais de ambos os grupos estudados evidenciaram a presença maior de fibras colágenas do tipo I, entremeadas por fibras colágenas tipo III. Percebeu-se também a presença de moléculas de colágeno tipo I na região de pré-dentina. A técnica de polarização permitiu avaliar o tipo de feixes de fibras colágenas dentinárias, bem como observar a presença e a direção dos túbulos dentinários (Figuras 1D, 2D e 3D).

### **Análise histométrica**

*Animais com 15 dias de vida:* As mensurações realizadas não revelaram diferença estatística entre os grupos CG, CL e FG em nenhuma das variáveis analisadas (Tabela 1).

Nos animais do grupo FL, foram identificadas diminuição na espessura da dentina coronária nos terços médio e cervical e diminuição no comprimento dos odontoblastos no terço cuspídeo. O grupo FL mostrou uma diminuição estatisticamente significativa da espessura da dentina no terço cervical da coroa ( $p = 0,028$ ) e diminuição no comprimento dos odontoblastos no terço cuspídeo ( $p = 0,026$ ) quando comparado ao seu respectivo grupo controle (CL) (Tabela 1).

*Animais com 25 dias de vida:* As mensurações realizadas revelaram diferença estatística entre os grupos CG e FL quando foram comparadas as espessuras de dentina no terço médio da coroa ( $p = 0,040$ ), espessura da pré-dentina no terço cúspido ( $p = 0,023$ ) e o comprimento dos odontoblastos em todos os terços analisados ( $p = 0,009$ ,  $p = 0,004$ ,  $p = 0,031$ ,  $p = 0,014$  e  $p = 0,009$ , respectivamente). Ao se comparar os grupos CG e FG obtiveram-se diferenças significativas na espessura da dentina no terço médio da coroa ( $p = 0,025$ ) e no comprimento dos odontoblastos no terço cervical da coroa e da raiz ( $p = 0,014$  e  $p = 0,028$ , respectivamente) (Tabela 2).

Nos animais do grupo FL, foram identificadas diminuição na espessura da dentina e pré-dentina coronária e radicular e alterações no comprimento dos odontoblastos. O grupo FL mostrou uma diminuição estatisticamente significativa da espessura da dentina nos terços médio da coroa e da raiz ( $p = 0,016$  e  $p = 0,024$ , respectivamente); diminuição estatisticamente significativa da espessura da pré-dentina no terço médio da coroa ( $p = 0,034$ ) e diminuição no comprimento dos odontoblastos nos terços cervical e médio da raiz ( $p = 0,019$  e  $p = 0,008$ , respectivamente) quando comparado ao seu respectivo grupo controle (CL) (Tabela 2).

O grupo FL quando comparado com o grupo FG mostrou uma diminuição estatisticamente significativa da espessura da pré-dentina nos terços cúspido e médio da coroa ( $p = 0,040$  e  $p = 0,022$ , respectivamente) (Tabela 2).

### **Análise imunohistoquímica**

Os resultados mostraram reação positiva para o colágeno tipo I, sendo que a camada de dentina apresentou reação mais intensa quando comparada com a pré-dentina, porém sem diferenças estruturais entre os grupos analisados (Figuras 1E, 2E e 3E).

## DISCUSSÃO

O crescimento e o desenvolvimento dos dentes de mamíferos envolvem uma série de eventos morfogênicos complexos e diferenciações entre as células do epitélio oral e células ectomesenquimais derivadas da crista neural (Gaunt, 1967; Slavkin e Bavetta, 1968; Pispá e Thesleff, 2003; Michon *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2013). A odontogênese acontece como consequência da interação entre estes tecidos, sendo dividida em diferentes fases: botão, capuz, campânula, coroa e raiz. A união destas fases dará origem ao elemento dental e as suas estruturas circunvizinhas (Thesleff, 2003).

No presente estudo, observou-se que a cronologia do primeiro molar superior dos animais de 15 dias de vida se apresentou de maneira semelhante em todos os grupos, ou seja, encontrava-se na fase inicial de rizogênese e a coroa ainda não havia irrompido, estes dados estão de acordo com o descrito classicamente por Bevelander e Hiroshi (1966) os quais afirmaram que a dentina começa a ser formada no estágio avançado de campânula e é função da papila dental. Os odontoblastos apresentaram-se justapostos a camada de pré-dentina e em maior número por área nas porções mais próximas das cúspides (Ruch, Lesot e Begue-Birn, 1995; Sasaki e Garant, 1996; Arana-Chaves e Massa, 2004; Hao, Ramachandran e George, 2009).

À medida que a dentinogênese avançou, os odontoblastos foram sintetizando a matriz orgânica da dentina, recuando e deixando um prolongamento celular no interior da dentina. Uma faixa estreita de pré-dentina situada entre os odontoblastos e a dentina foi facilmente distinguível nos animais com 15 e 25 dias de vida. Estes achados estão de acordo com os dados relatados na literatura onde se descreveu a presença de uma camada de matriz ricamente sulfurosa e menos acidófila de matriz orgânica de dentina

(pré-dentina) nas adjacências da camada odontoblástica (Symons, 1956; Reith, 1968; Goracci, Mori e Baldi, 1999).

No final da formação de coroa e, relacionada com o aparecimento da erupção dos dentes, começa a formação da dentina radicular. A partir da junção entre os epitélios interno e externo do órgão do esmalte, na região da alça cervical, a bainha epitelial de Hertwig começa a se desenvolver. Na periferia da papila dental, os odontoblastos começam a se desenvolver e tornam-se polarizados e iniciam a formação da pré-dentina, que por sua vez irá originar a dentina. Nos animais de 25 dias de vida, observou-se a formação de dentina radicular mais espessa no terço cervical, e sua espessura foi diminuindo progressivamente em direção apical. Esta camada apresentou uma matriz homogênea, acidófila cortada pelos túbulos dentinários contendo os processos celulares dos odontoblastos no interior, de acordo com o descrito por Linde e Goldberg, 1993.

Neste estudo observamos que não existiram agenesias dentárias. A agenesia dentária pode ser caracterizada pela ausência de um ou todos os elementos dentários, sendo freqüente na dentição permanente e é capaz de produzir um desequilíbrio nas estruturas dentofaciais (Yüksel e Üçem, 1997). Moiseiwitsch e Lauder (1996) observaram em seus experimentos que a 5-HT apresentou ação no desenvolvimento dos germes dentários, na diferenciação dental, e que tal ação poderia ser bloqueada pela fluoxetina, ocasionando agenesias ou malformações dentárias.

As preparações coradas com o TM mostraram a presença de fibras colágenas na dentina e na pré-dentina coradas em tonalidade azul, entretanto corroborando com os achados de Abrahão *et al.* (2006), não pudemos identificar o tipo do colágeno presente, já que esta técnica não apresenta especificidade para tipos de colágeno. Já a análise das preparações coradas com o *Picrosírius Red* sob microscópio de luz evidenciou fibras colágenas do tipo I espessas e de coloração avermelhada e, sob o microscópio de

polarização as fibras colágenas do tipo I apresentaram-se, fortemente birrefringentes e de coloração avermelhada, o que está de acordo com o que escreveu Montes e Junqueira (1991), que afirmaram que o *Picrosírius Red* é um corante ácido que reage com o colágeno e promove um aprimoramento da birrefringência normal do tecido.

Os resultados da imunohistoquímica mostraram áreas da dentina e da pré-dentina coradas em marrom-acastanhado, caracterizando positividade ao colágeno tipo I em todos os grupos analisados, sendo que a dentina apresenta coloração mais intensa quando comparada com a pré-dentina. Optamos por utilizar neste ensaio experimental um anticorpo para detectar fibras colágenas do tipo I e nossos achados estão de acordo com o que já foi descrito na literatura, na qual afirma que o colágeno do tipo I é a proteína fibrosa dominante no complexo dentino-pulpar, compreende cerca de 80-90% da matriz orgânica, está presente como fibras nanométricas, acelera a diferenciação das células pulpares, pois é o principal componente da matriz extracelular, fornecendo um ambiente mais apropriado e natural para estas células, desempenhando um importante papel na promoção da mineralização do tecido dentinário ou na inibição desse processo (Boskey, 1991; Linde e Goldberg, 1993; Abrahão *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2011).

As mensurações realizadas não revelaram diferença estatística entre os grupos CG e FG em nenhuma das variáveis analisadas nos animais com 15 dias de vida. Os resultados histométricos estão de acordo com os dados apresentados no estudo de Santiago *et al.* (2013) em que a fluoxetina, nas doses de 10 mg/kg e 20 mg/kg de peso animal, não foi capaz de promover alterações em tecidos dentários de ratos de 1 e 5 dias de vida cujas mães foram tratadas somente na gestação. Entretanto, nos animais com 25 dias de vida, as mensurações realizadas revelaram diferença estatística entre os grupos CG25 e FG25 na espessura da dentina no terço médio da coroa e no comprimento dos odontoblastos no terço cervical da coroa e da raiz. Estas alterações talvez possam ter

ocorrido devido à diferença de angulação do corte e da região da vertente da cúspide em que o elemento dentário foi seccionado, conforme foi relatado por Pinzón, Kozlov e Burch (1967).

Nos animais submetidos à fluoxetina durante a gestação e lactação, foram identificadas diminuição na espessura da dentina e pré-dentina coronária e radicular e alterações no comprimento dos odontoblastos em algumas regiões mensuradas, tanto nos animais de 15 dias quanto nos animais de 25 dias de vida. A partir daí, pode-se presumir que o efeito da fluoxetina nos tecidos dentinários e na polpa dental possivelmente depende do tempo de exposição ao fármaco. Pois, segundo Berle e Spigset (2011) o uso da fluoxetina durante a amamentação expõe os neonatos à droga, sendo assim, os animais do grupo FL15 e FL25 tiveram um somatório da exposição intrauterina à fluoxetina com a da lactação, fator apontado como responsável pela diminuição das estruturas analisadas. A fluoxetina também apresenta ação de modular ou inibir o apetite e, isso pode estar relacionado com estudos como os realizados por Müller *et al.* (2013) que verificaram que a fluoxetina apresenta toxicidade fetal e neonatal caracterizada pela restrição do crescimento intrauterino que pode ser refletida pelo menor peso da prole no nascimento. Além disso, o baixo peso ao nascer está relacionado a maiores taxas de mortalidade e de desenvolvimento problemas neurológicos (Sousa-Ferreira *et al.*, 2014)

Observamos diminuição no comprimento dos odontoblastos nos animais dos grupos FL15 e FL25 dias de vida, nas áreas mensuradas. Estudos como o de Lauder e Zimmerman (1988) e Lauder *et al.* (2000) indicaram que a 5-HT pode desempenhar um papel estimulador sobre a odontogênese pela presença de receptores serotoninérgicos no germe dentário em desenvolvimento. Como os odontoblastos são as células responsáveis pela formação da matriz mineralizada da dentina e, o cloridrato de

fluoxetina, atuando de forma a inibir estes receptores, pode estar havendo uma diminuição na velocidade de síntese e secreção da produção da matriz de dentina, já que os odontoblastos apresentaram tamanho alterado e foram observadas menor espessura de dentina e pré-dentina em áreas mensuradas da coroa e da raiz.

Como, segundo Hao, Ramachandran e George (2009) estas estruturas apresentam funções de proteção do elemento dentário, estes dados nos levaram a acreditar que um dente com camada de dentina mais delgada torna-se mais vulnerável a injúrias químicas, físicas e biológicas, como as cáries dentárias. Os odontoblastos sendo as células responsáveis pela produção dos constituintes da matriz dentinária devem exibir organelas de síntese bem desenvolvidas (Arana-Chaves e Massa, 2004; Massa *et al.*, 2005), entretanto por estar com seu tamanho diminuído, pode-se presumir que as organelas presentes também estejam com seu tamanho alterado e a atividade secretora diminuída, então frente a tais injúrias, estas células que são capazes de se regenerarem e produzir novo tecido mineralizado pode não conseguir fazê-lo. Entretanto, estudos adicionais devem ser realizados para saber se a velocidade de síntese e secreção dos odontoblastos volta ao normal, após serem retirados os estímulos deletérios provocados pela fluoxetina.

Moiseiwitsch e Lauder (1996); Moiseiwitsch *et al.* (1998) analisando a ação inibidora que os ISRSs causam durante a organogênese, desenvolveram meios de culturas com mandíbulas de ratos, as quais foram expostas a diferentes concentrações de 5-HT. Estes autores concluíram que a 5-HT era capaz de influenciar a papila dentária para induzir o órgão do esmalte a se diferenciar no epitélio externo, epitélio interno, retículo estrelado e estrato intermediário, tecidos essenciais para o desenvolvimento e crescimento do germe dentário. Porém, não fizeram nenhuma descrição a respeito da dentinogênese.

Cavalcanti *et al.* (2009) avaliaram as alterações morfológicas e de desenvolvimento embrionário que poderiam ocorrer em ossos esqueléticos em animais cujas mães foram tratadas como cloridrato de fluoxetina na dosagem de 10 mg/kg de peso animal. Neste estudo, as articulações têmporo-mandibulares (ATMs) foram analisadas por estarem relacionadas com o desenvolvimento craniofacial. Entretanto, os resultados mostraram que o tratamento com a fluoxetina não foi capaz de promover efeitos deletérios sobre a arquitetura das ATMs.

Outros estudos com a finalidade de avaliar a ação direta da fluoxetina no desenvolvimento do esmalte dentário e na amelogênese foram realizados com o intuito de identificar as possíveis alterações morfológicas e estruturais que este fármaco poderia produzir no órgão do esmalte de primeiros molares superiores de ratos. Neste estudo, ratas prenhas foram tratadas com o cloridrato de fluoxetina na dosagem de 10 mg/kg de peso animal, e os resultados não foram capazes de evidenciar alterações estruturais e no desenvolvimento dos tecidos que deram origem ao esmalte dentário (Silva *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos sugerem que a dentinogênese é sensível à ação da fluoxetina na dose de 20 mg/kg de peso animal, e que a presença de alterações na morfogênese no complexo dentino-pulpar parece ser dependente do tempo de exposição, uma vez que apenas o grupo exposto durante a gestação e lactação apresentou alterações nos tecidos analisados. Entretanto, estudos adicionais devem ser realizados para determinar se as alterações morfológicas permanecem com o avançar da idade ou, se o complexo dentino-pulpar volta a se desenvolver normalmente após retirado o estímulo deletério.

## AGRADECIMENTOS

Ao programa Bolsas REUNI de assistência ao ensino

## REFERÊNCIAS

Abrahão I. J., Martins M. D., Katayama E., Antoniazzi J. H., Segmentilli A., Marques M. M. (2006). Collagen analysis in human tooth germ papillae. *Braz Dent J.* 17, 208-212.

Arana-Chaves V. E., Massa L. F. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. (2004). *Int J Biochem Cell Biol.* 36, 1367–1373.

Battaglino R., Fu J., Späte U., Ersoy U., Joe M., Sedaghat L., Stashenko P. (2004). Serotonin regulates osteoclast differentiation through its transporter. *J Bone Miner Res.* 19, 1420-1431.

Belik, J. M. D. Fetal and neonatal effects of maternal drug treatment for depression. (2008). *SeminPerinatol.* 32, 350-354.

Berle J.O, Spigset O. Antidepressant use during breastfeeding. (2011). *Curr Women's Health Rev.* 7, 28-34.

Bevelander G., Hiroshi N. (1966). The formation and mineralization of dentine. *Anat Rec.* 156, 303-323.

Bliziotis M., Eshleman A., Burt-Pichat B., Zhang X. W., Hashimoto J., Wiren K., Chenu, C. (2006). Serotonin transporter and receptor expression in osteocytic MLO-Y4 cells. *Bone.* 39, 1313-1321.

- Bonnet N., Bernard P., Beaupied H., Bizot J. C., Trovero F., Courteix D., Benhamou C. L. (2007). Various effects of antidepressant drugs on bone microarchitecture, mechanical properties and bone remodeling. *Toxicol Appl Pharmacol.* 221, 111-118.
- Boskey A. L. (1991). The role of extracellular matrix components in dentin mineralization. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2, 369-387.
- Cavalcanti U. D. N. T., Baratella-Evêncio L., Neto J. E., Castro R. M., Cardona A. S., Melo M. L. M., Lins R. C. (2010). Morphological aspects of the embryonic development of the TMJ in rats (*Rattus norvegicus albinus*) treated with fluoxetine. *Int J Morphol.* 27, 899-903.
- Cotrim P., Andrade C. R., Line S., Almeida O. P., Coletta R. D. (2002). Expression and activity of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in the development of rat first molar tooth germ. *Braz Dent J.* 13, 97-102.
- Gaunt W. A. Quantitative aspects of the developing tooth germ. (1967). *J Dent Res.* 46, 851-857.
- Goracci G., Mori G., Baldi M. (1999). Terminal end of the human odontoblasts process: a study using SEM and confocal microscopy. *Clin Oral Investig.* 3,126-132.
- Guo L., Li J., Qiao X., Yu M., Tang W., Wang H., Guo W., Tian W. (2013). Comparison of odontogenic differentiation of human dental follicle cells and human dental papilla cells. *Plos One.* 8, 1-14.
- Gupta S., Masand, P. S., Rangwani, S. (1998). Selective serotonin reuptake inhibitors in pregnancy and lactation. *Obstet Gynecol Surv.* 53, 733-736.
- Hao J., Ramachandran A., George A. (2009). Temporal and spatial localization of the dentin matrix proteins during dentin biomineralization. *J Histochem Cytochem.* 57, 227–237.

- Hendrick V., Altshuler L. (2002). Management of major depression during pregnancy. *Am J Psychiatry*. 159, 1667-1673.
- Kiryanova V., McAllister B. B., Dyck R. H. (2013). Long-term outcomes of developmental exposure to fluoxetine: a review of the animal literature. *Devel Neurosci*. 35, 437-449.
- Lankas G. R., Minsker D. H., Robertson R. T. (1989). Effects of ivermectin on reproduction and neonatal toxicity in rats. *Food Chem Toxicol*. 27, 523-529.
- Lauder J. M., Zimmerman E. F. (1988). Sites of serotonin uptake in epithelia of the developing mouse palate, oral cavity and face: possible role of morphogenesis. *J Craniofac Genet Dev Biol*. 8, 265-276.
- Lauder J. M., Wilkie M. B., Wu C., Singh S. (2000). Expression of 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors in the mouse embryo. *Int J Dev Neurosci*. 18, 653-662.
- Lesot H., Brook A. H. (2008). Epithelial histogenesis during tooth development. *Arch Oral Biol*. 19, 1-9.
- Linde A., Goldberg M. (1993). Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 4, 679-728.
- Massa L. F., Ramachandran A., George A., Arana-Chavez, V. E. (2005). Developmental appearance of dentin matrix protein 1 during the early dentinogenesis in rat molars as identified by high-resolution immunocytochemistry. *Histochem Cell Biol*. 124: 197-205.
- Mendes-da-Silva C., De Souza S. L., Barreto-Medeiros J. M., Freitas-Silva S. R., Antunes D. E. C., Cunha A. D. U., Ribas V. R., De França M. F. S., Nogueira M. I., Manhães-de-Castro R. (2002). Neonatal treatment with fluoxetine reduces depressive behavior induced by forced swim in adult rats. *Arq Neuro-Psiquiatr*. 60, 928-931.
- Michallany J. (1990). *Técnica histológica em anatomia patológica com Instruções para o Cirurgião, Enfermeira e Citotécnico*. São Paulo: Gráfica e Editora Michallany. 247 p.

- Michon F., Tummers M., Kyyrönen M., Frilander M. J., Thesleff I. (2010). Tooth morphogenesis and ameloblast differentiation are regulated by micro-RNAs. *Dev Biol.* 340, 355-36.
- Moiseiwitsch J. R. D., Lauder J. M. (1996). Simulation of murine tooth development in organotypic culture by the neurotransmitter serotonin. *Arch Oral Biol.* 41, 161-165.
- Moiseiwitsch J. R. D., Raymond J. R., Tamir H., Lauder J. M. (1998). Regulation by serotonin of tooth-germ morphogenesis and gene expression in mouse mandibular explant cultures. *Arch Oral Biol.* 43, 789-800.
- Montes G. S., Junqueira L. C. (1991). The use of picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 86, 1-11.
- Müller J. C., Boareto A. C., Lourenço E. L. B., Zaia R. M., Kienast M. F., Spencoski K. M., Morais R. N., Martino-Andrade A. J., Dalsenter P. R. (2013). *In utero* and lactational exposure to fluoxetine in wistar rats: pregnancy outcomes and sexual development. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 113, 132–140.
- Pawloski J. L., Charlier T. D., Fillet M., Houbart V., Crispin H. T., Steinbusch H. W., Van den Hove D. L. Chronic fluoxetine treatment and maternal adversity differentially alter neurobehavioral outcomes in the rat dam. (2012). *Behav Brain Res.* 228, 159-168.
- Pinzón R. D., Kozlov M., Burch W. P. (1967). Histology of rat molar pulp at different ages. *J Dent Res.* 46, 202-208.
- Pispa J., Thesleff I. (2003). Mechanisms of ectodermal organogenesis. *Dev Biol.* 262, 195–205.
- Raap D. K., Van de Kar L. D. (1999). Selective serotonin reuptake inhibitor and neuroendocrine function. *Life Sci.* 65, 1217-1235.
- Reith E. J. (1968). Collagen formation in developing molar teeth of rats. *J Ultrastruct Res.* 21, 383-414.

Ruch J. V., Lesot H., Begue-Birn C. (1995). Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol.* 39, 51-68.

Santiago I. M. A., Regueira L. S., Correia P. G., Alcântara R. J. B., Evêncio-Neto J., Baratella-Evêncio L. (2013). Morphological aspects of dentin-pulp complex development in the offspring of rats treated with fluoxetine during pregnancy. *Braz J Oral Sci.* 12, 30-36.

Sasaki T., Garant P. R. (1996). Structure and organization of odontoblasts. *Anat Rec.* 245, 235-249.

Sit D., Perel J. M., Wisniewski S. R., Helsel J. C., Luther J. F., Wisner K. L. Mother-infant antidepressant levels, maternal depression and perinatal events. (2011). *J Clin Psychiatry.* 72, 994-1001.

Silva I. H. M., Leão J. C., Evêncio L. B., Porter S. R., Castro R. M. (2010). Morphological analysis of the enamel organ in rats treated with fluoxetine. *Clinics.* 65, 61-66.

Slavkin H. C., Bavetta L. A. (1968). Odontogenic epithelial-mesenchymal interactions *in vitro*. *J Dent Res.* 47, 779-785.

Sousa-Ferreira L., Aveleira C., Botelho M., Álvaro A. R., Almeida L. P., Cavadas C. (2014). Fluoxetine induces proliferation and inhibits differentiation of hypothalamic neuroprogenitor cells *in vitro*. *Plos One.* 9, 1-10.

Symons N. B. (1956). The development of the fibers of the dentine matrix. *Br Dent J.* 101, 252.

Teccot L., Shtrom S., Julius D. (1995). Expression of a serotonin-gated ion channel in embryonic neural and nonneural tissues. *Mol Cell Neurosci.* 6, 43-55.

Thesleff I. (2003). Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci.* 116, 1647-1648.

Yüksel S., Üçem T. (1997). The effect of tooth agenesis on dentofacial structures. *Eur J Orthod.* 19, 71-78.

Wang J., Ma H., Jin X., Hu J., Liu X., Ni L., Ma P. X. (2011). The effect of scaffold architecture on odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *Biomaterials.* 32, 7822-7830.

**Tabela 1: Animais com 15 dias de vida:** Comparação da espessura da dentina, da espessura da pré-dentina e do comprimento dos odontoblastos em primeiros molares superiores de ratos (grupos CG, CL, FG e FL).

Variáveis	Grupos*			
	CG	CL	FG	FL
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Dentina coronário	3,34 ± 0,68	3,31 ± 0,67	3,31 ± 0,15	2,59 ± 0,74
Dentina médio da coroa	2,06 ± 0,18	1,97 ± 0,17	1,89 ± 0,07	1,66 ± 0,32 <sup>a</sup>
Dentina cervical da coroa	1,06 ± 0,12	1,03 ± 0,07	1,01 ± 0,06	0,83 ± 0,12 <sup>a b c</sup>
Pré-Dentina coronário	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,02
Pré-Dentina médio da coroa	0,21 ± 0,03	0,21 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,20 ± 0,02
Pré-Dentina cervical da coroa	0,26 ± 0,05	0,26 ± 0,03	0,25 ± 0,04	0,23 ± 0,03
Odontoblastos coronário	0,35 ± 0,02	0,35 ± 0,02	0,35 ± 0,03	0,32 ± 0,02 <sup>b</sup>
Odontoblastos médio da coroa	0,27 ± 0,03	0,27 ± 0,01	0,27 ± 0,02	0,26 ± 0,02
Odontoblastos cervical da coroa	0,27 ± 0,03	0,27 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,24 ± 0,03

(\*) Teste de Mann-Whitney

(a) Diferença estatisticamente significativa com o grupo CG

(b) Diferença estatisticamente significativa com o grupo CL

(c) Diferença estatisticamente significativa com o grupo FG

**Tabela 2: Animais com 25 dias de vida:** Comparação da espessura da dentina, da espessura da pré-dentina e do comprimento dos odontoblastos em primeiros molares superiores de ratos (grupos CG, CL, FG e FL).

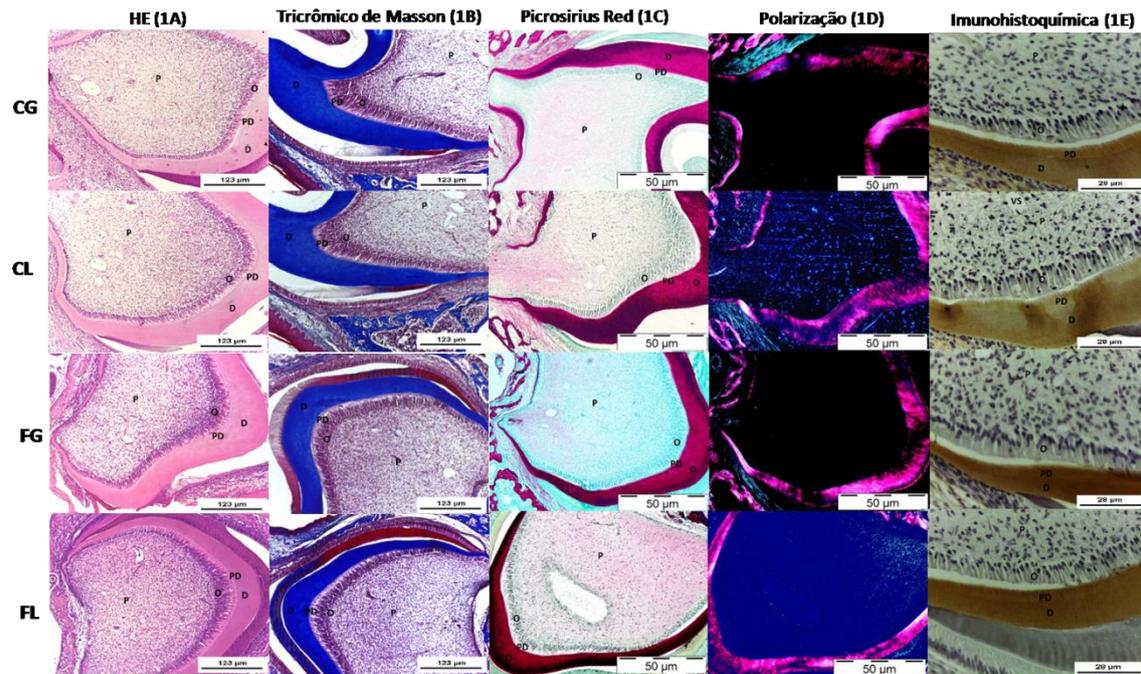
Variáveis	Grupos *			
	CG	CL	FG	FL
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Dentina coronário	5,39 ± 0,30	5,38 ± 0,28	5,15 ± 0,19	4,75 ± 0,66
Dentina médio da coroa	3,28 ± 0,19	3,28 ± 0,37	2,97 ± 0,17 <sup>a</sup>	2,78 ± 0,22 <sup>a,b</sup>
Dentina cervical da coroa	1,81 ± 0,18	1,80 ± 0,08	1,75 ± 0,06	1,74 ± 0,17
Dentina médio da raiz	1,36 ± 0,12	1,35 ± 0,10	1,28 ± 0,17	1,27 ± 0,10
Pré-Dentina coronário	0,67 ± 0,09	0,66 ± 0,04	0,62 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,61 ± 0,04 <sup>b</sup>
Pré-Dentina médio da coroa	0,20 ± 0,02	0,19 ± 0,04	0,19 ± 0,01	0,17 ± 0,02 <sup>a,c</sup>
Pré-Dentina cervical da coroa	0,19 ± 0,04	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,17 ± 0,02 <sup>b,c</sup>
Pré-Dentina cervical da raiz	0,18 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,02
Pré-Dentina médio da raiz	0,18 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,16 ± 0,02
Pré-Dentina médio da raiz	0,19 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,01
Odontoblastos coronário	0,38 ± 0,02	0,37 ± 0,03	0,36 ± 0,02	0,35 ± 0,02 <sup>a</sup>
Odontoblastos médio da coroa	0,34 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,31 ± 0,03	0,29 ± 0,03 <sup>a</sup>
Odontoblastos cervical da coroa	0,25 ± 0,01	0,24 ± 0,02	0,23 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,03 <sup>a</sup>
Odontoblastos cervical da raiz	0,22 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,20 ± 0,01 <sup>a,b</sup>	0,19 ± 0,02 <sup>a,b</sup>
Odontoblastos médio da raiz	0,22 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,20 ± 0,02	0,18 ± 0,02 <sup>a,b</sup>

(\*) Teste de Mann-Whitney

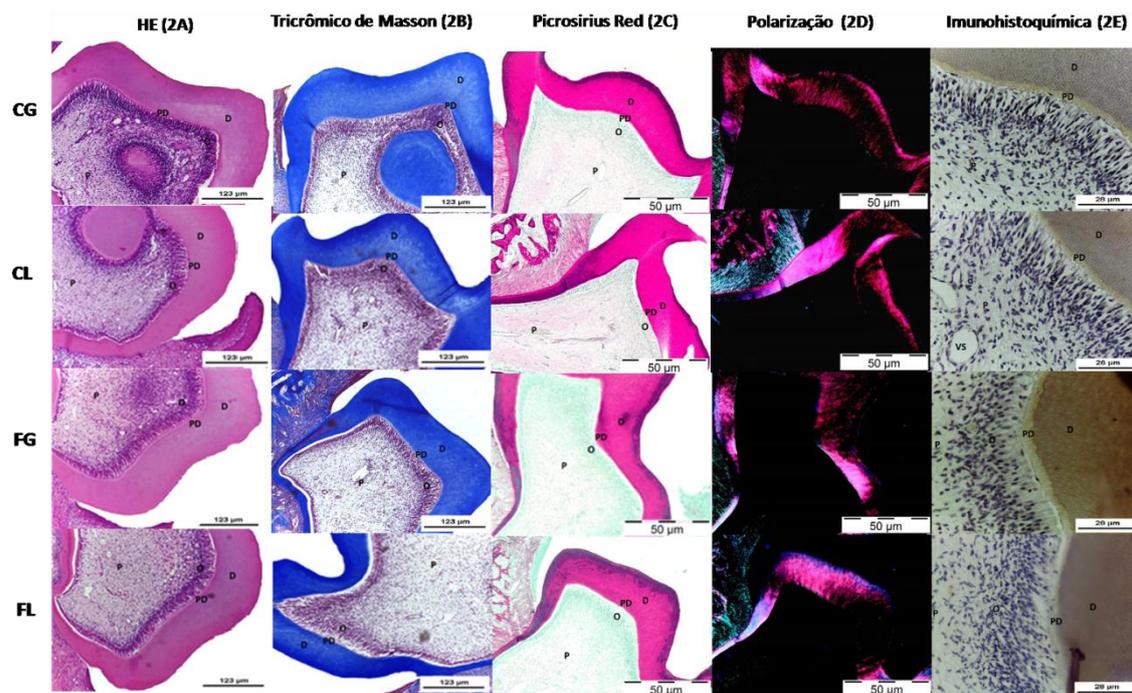
(a) Diferença estatisticamente significativa com o grupo CG

(b) Diferença estatisticamente significativa com o grupo CL

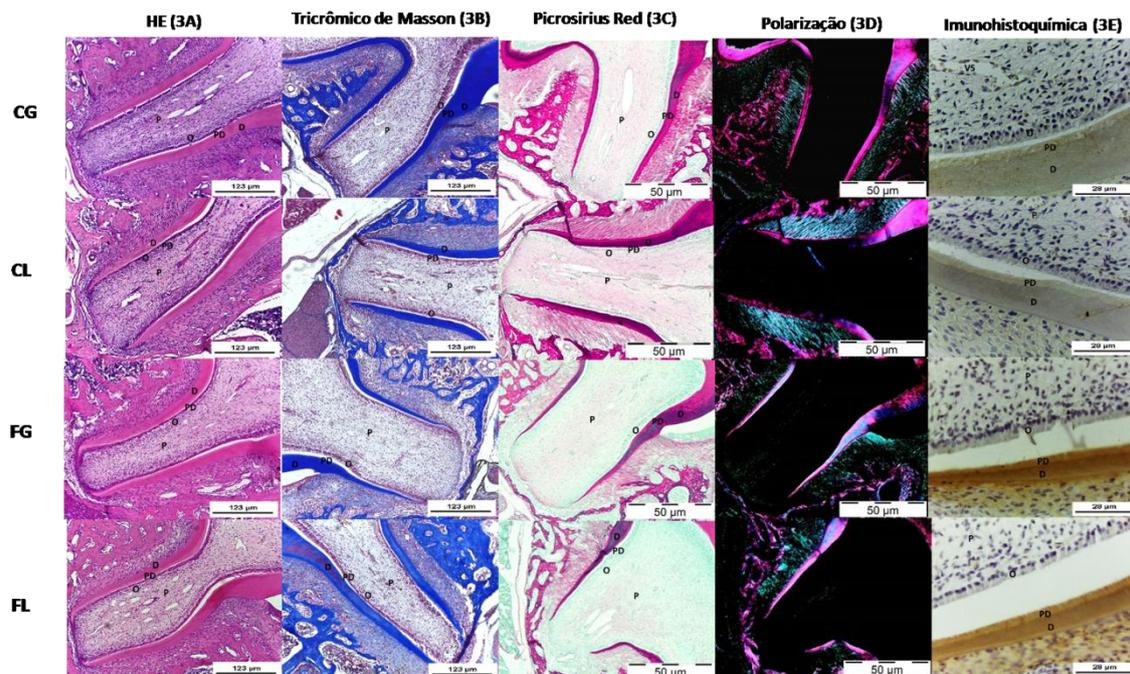
(c) Diferença estatisticamente significativa com o grupo FG



**Figura 1.** Fotomicrografias de parte da coroa de primeiro molar superior de rato com 15 dias de vida, correspondentes aos grupos CG, CL, FG e FL. Observaram-se que a dentina (D) e a pré-dentina (PD) apresentaram fibras colágenas com coloração azulada quando coradas com Tricrômico de Masson (1B) e com coloração avermelhada quando coradas com *Picrossírius Red* (1C) e sob o microscópio de polarização (1D), indicando a presença de colágeno tipo I. Nos cortes em que se utilizou a imunohistoquímica (1E) a dentina e a pré-dentina mostraram positividade para o colágeno tipo I, onde se observou coloração marrom-acastanhada. P: Polpa Dental. O: Odontoblastos. VS: Vasos Sanguíneos. Coloração HE (1A), TM, *Picrossírius Red*, polarização e Imunohistoquímica.



**Figura 2.** Fotomicrografias de parte da coroa de primeiro molar superior de rato com 15 dias de vida correspondentes aos grupos CG, CL, FG e FL. Observaram-se que a dentina (D) e a pré-dentina (PD) apresentaram fibras colágenas com coloração azulada quando coradas com Tricrômico de Masson (2B) e com coloração avermelhada quando coradas com *Picrosírius Red* (2C) e sob o microscópio de polarização (2D), indicando a presença de colágeno tipo I. Nos cortes em que se utilizou a imunohistoquímica (2E) a dentina e a pré-dentina mostraram positividade para o colágeno tipo I, onde se observou coloração marrom-acastanhada. P: Polpa Dental. O: Odontoblastos. VS: Vasos Sanguíneos. Coloração HE (2A), TM, *Picrosírius Red*, polarização e Imunohistoquímica.



**Figura 3.** Fotomicrografias de parte da raiz de primeiro molar superior de rato com 15 dias de vida, correspondentes aos grupos CG, CL, FG e FL. Observaram-se que a dentina (D) e a pré-dentina (PD) apresentaram fibras colágenas com coloração azulada quando coradas com Tricrômico de Masson (3B) e com coloração avermelhada quando coradas com *Picrosirius Red* (3C) e sob o microscópio de polarização (3D), indicando a presença de colágeno tipo I. Nos cortes em que se utilizou a imunohistoquímica (3E) a dentina e a pré-dentina mostraram positividade para o colágeno tipo I, onde se observou coloração marrom-acastanhada. P: Polpa Dental. O: Odontoblastos. VS: Vasos Sanguíneos. Coloração HE (3A), TM, *Picrosirius Red*, polarização e Imunohistoquímica.

## **4.2 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DA PULPOGÊNESE DE RATOS TRATADOS COM FLUOXETINA DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO**

### **INTRODUÇÃO**

A depressão é um problema clínico importante durante a gravidez. Sabe-se também que o período perinatal é desencadeador ou reativador de quadros depressivos e que a depressão pós-parto possivelmente é um quadro que se inicia durante a gestação e não é reconhecido nesta fase. Para a maioria das mulheres com quadros depressivos leves e moderados a psicoterapia é suficiente para o controle dos sintomas. A terapia farmacológica está reservada para os quadros graves, não responsivos à psicoterapia (Hein *et al.*, 2014).

Dentro do arsenal terapêutico, os antidepressivos cujo mecanismo de ação envolve a inibição seletiva da recaptação de serotonina (ISRSs) são os mais comumente prescritos, entre eles a fluoxetina (Gupta, Masand e Rangwani, 1998).

A fluoxetina age potencializando a neurotransmissão serotoninérgica e, por sua vez a serotonina (5-HT), que participa da regulação do humor, sono, atividade sexual, apetite, ritmo circadiano, sensibilidade à dor, atividade motora e de funções neuroendócrinas (Buznikov, 1984; Buznikov, Lambert e Lauder, 2001). Além disso, esse neurotransmissor regula eventos durante embriogênese como a neurogênese e a diferenciação neuronal agindo também na interação epitélio-mesênquima promovendo a estimulação da diferenciação e a migração celular durante o desenvolvimento do tubo neural e dos arcos branquiais promovendo a formação de tecidos, como os que formam a região crânio-facial (Shuey *et al.*, 1993; Turlejski, 1996; Byrd *et al.*, 2000; Moiseiwitsch, 2000).

A descoberta da presença de 5-HT no interior do mesênquima dental (Lauder e Zimmerman, 1988) e no epitélio dental (Moiseiwitsch e Lauder, 1996) foi importante para a hipótese da participação da 5-HT no desenvolvimento dos tecidos dentais. Esta possibilidade foi retomada quando se encontraram receptores serotoninérgicos no epitélio dental na fase de botão (Tecott, Strom e Julius, 1995) e no interior da papila dentária no estágio de campânula (Johnson e Heinemann, 1995). A presença de receptores nestes dois tecidos mostra que a 5-HT está envolvida em interações epitélio-mesenquimais importantes (Shuey *et al.*, 1993).

A polpa dentária é um tecido conjuntivo frouxo com uma organização e localização peculiar. É cercada pela dentina, que é um tecido duro e inelástico. A polpa dentária é composta de células, principalmente fibroblastos, odontoblastos e células mesenquimais indiferenciadas, que em contato com uma cadeia complexa de macromoléculas secretadas extracelularmente formam a matriz extracelular. Além de fornecer estrutura para os tecidos, essa matriz tem um papel bioativo na regulação do comportamento das células, influenciando seu desenvolvimento, migração, proliferação, forma e função (Abrahão *et al.*, 2006).

O colágeno constitui cerca de 34% das proteínas totais da matriz extracelular e os tipos I e III são os mais predominantes. O colágeno tipo I, mais comumente encontrado em tecidos conjuntivos densos, é necessário para a estabilização da arquitetura do tecido, enquanto o colágeno tipo III, mais comumente encontrado em tecido conjuntivo frouxo, tem uma função importante na elasticidade dos tecidos. Colágeno do tipo I é a proteína mais abundante em tecidos mineralizados, exceto para o esmalte, e é também o principal componente orgânico da matriz extracelular da polpa dentária. Tem sido sugerido que esta proteína pode estar envolvida na diferenciação dos odontoblastos. O colágeno tipo I foi identificado em regiões da papila dental durante o

desenvolvimento do órgão dental, pré-dentina, dentina intertubular e reparadora (Boskey, 1991; Abrahão *et al.*, 2006).

Até o presente momento, nada foi descrito na literatura sobre a influência do cloridrato de fluoxetina sobre a pulvogênese de primeiros molares de ratos com 15 e 25 dias de vida, cujas mães foram tratadas com fluoxetina durante a gestação e lactação. O objetivo desta pesquisa foi, portanto, avaliar as características histológicas da polpa dental através de análises histológicas, histométricas, histoquímicas e imunohistoquímica.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Animais**

A presente pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE), processo nº 23076.017680/2011 - 83.

Foram utilizadas 12 ratas albinas da linhagem Wistar, mantidas em sala com temperatura de  $23 \pm 2^\circ \text{C}$  e ciclo de claro e escuro de 12/12 horas (claro das 06 às 18 horas e escuro das 18 às 06 horas), recebendo a dieta padrão do biotério (Presence Ratos e Camudongos – Presence, Paulínia, SP, Brasil) e água *ad libitum*. Foram realizados acasalamentos entre os animais adultos e testes de esfregaço vaginal para a comprovação da gravidez. O dia da comprovação da gravidez configurou o primeiro dia de gestação e o início dos tratamentos dos animais (Lankas, Minsker e Robertson, 1989).

## **Tratamento**

Dois grupos compuseram a pesquisa: o grupo controle (grupo C) e o grupo tratado com fluoxetina (Grupo F). Cada grupo foi dividido em subgrupos de acordo com a idade do desenvolvimento do elemento dental a ser estudado (15 e 25 dias de vida). Os grupos foram ainda divididos em 2 subgrupos: animais que foram tratados apenas na gestação e animais que foram tratados na gestação e lactação. Os subgrupos do grupo C foram: CG15 e CG25 (gestação) e CL15 e CL25 (gestação e lactação) e os subgrupos do grupo F foram: FG15 e FG25 (gestação) e FL15 e FL25 (gestação e lactação). Foi utilizada 1 rata prenhe para cada subgrupo dos grupos controle e, de cada ninhada foram utilizados 6 filhotes, de ambos os sexos ( $n = 6$ ). Para o grupo tratado com a fluoxetina foram utilizadas 2 ratas prenhes para cada subgrupo sendo que de cada ninhada foram utilizados 3 filhotes, de ambos os sexos, totalizando 6 ( $n = 6$ ) animais por subgrupo, totalizando uma amostra de 48 filhotes. Nos grupos CG15 e CG25 os animais eram provenientes de ratas que receberam cloreto de sódio a 0,9% na dose de  $10\mu\text{l/g}$  por via oral (gavagem) durante todo o período de gestação; nos grupos CL15 e CL25 os animais eram provenientes de ratas que receberam cloreto de sódio a 0,9% na dose de  $10\mu\text{l/g}$  por via oral (gavagem) durante a gestação e lactação e nos grupos FG e FL os animais eram provenientes de ratas que foram tratadas com cloridrato de fluoxetina (Pharma Nostra, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) na dose de  $20\text{mg/kg}$  de peso animal por via oral (gavagem) administrada até o término da gestação (grupos FG15 e FG25) e nos grupos FL15 e FL25 os animais foram tratados com a fluoxetina durante a gestação até o fim da amamentação, ou seja, 21 dias após o nascimento.

Os animais de 15 e 25 dias de vida foram anestesiados com xilazina (CEVA, Paulínia, São Paulo, Brasil) na dose de  $20\text{mg/kg}$  de peso animal (i. p.) e quetamina (CEVA, Paulínia, São Paulo, Brasil) na dose de  $50\text{mg/kg}$  de peso animal (i. p.) e em

seguida perfundidos por via intracardíaca com solução de formaldeído a 4% tamponado neutro (obtido a partir do paraformaldeído - Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil). Os animais foram decapitados, suas mandíbulas removidas e a maxila com os elementos dentários foi seccionada frontalmente a face mesial do primeiro molar.

### **Processamento e análises histológicas, histométricas e histoquímicas**

As peças foram fixadas em solução neutra de formaldeído a 4% (obtido a partir do paraformaldeído - Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil) durante 24 horas à temperatura ambiente. A seguir, os espécimes de 15 dias foram descalcificados em solução aquosa de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) a 5% (Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil) por 08 dias e os espécimes de 25 dias foram descalcificados com a mesma solução por 15 dias. Após a descalcificação, os espécimes foram submetidos a processamento histológico convencional para inclusão em parafina (Michallany, 1990). Cortes semi-seriados de 5 µm foram obtidos com micrótomo (LEICA RM 2125 RT, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha), corados pela Hematoxilina-Eosina (HE), Tricrômico de Masson (TM) e *Picrosíríus Red* e montados em Entellan<sup>®</sup> (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

Para análise histológica da zona central da polpa coronária e radicular, foram selecionadas preparações coradas em HE e foi utilizado microscópio de luz LEICA ICC50 HD (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha) acoplado a uma microcâmera, conectado a um computador contendo uma placa de captura de imagem.

Para análise histométrica das preparações coradas em HE foi utilizado microscópio de luz LEICA ICC50 HD (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha) acoplado a uma microcâmera, conectado a um computador contendo uma placa de captura de imagem e o software para histometria IMAGE J (Macintosh

Computers, Maryland, EUA). A zona central das polpas dentárias da coroa e da raiz foi analisada, sendo que, de cada tecido estudado selecionavam-se 10 campos, sob a objetiva de 40x, para mensurar a quantidade de fibroblastos. As preparações histológicas foram escolhidas aleatoriamente, de modo que no final desta seleção fosse possível fazer uma histometria seriada.

Para mensurar a densidade das fibras colágenas na zona central da polpa coronária e radicular foram utilizadas as preparações coradas com TM e as imagens foram obtidas utilizando-se microscópio de luz LEICA ICC50 HD (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha), acoplado em uma microcâmera, conectado a um computador contendo uma placa de captura de imagem e o software para histometria IMAGE PRO PLUS 6.0 (Macintosh Computers, Maryland, EUA).

Para a análise histoquímica do colágeno foram utilizadas as preparações coradas por HE, TM e *Picrossírius Red* utilizando um microscópio de luz LEICA ICC50 HD (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha), acoplado em uma microcâmera, conectado a um computador contendo uma placa de captura de imagem.

### **Análise imunohistoquímica**

Para a realização da imunohistoquímica para detecção de fibras colágenas do tipo I foi utilizado o “kit” Anti-Collagen I antibody ab34710 (Abcam Inc, Cambridge, Massachusetts, EUA). Foram utilizados 8 filhotes, sendo 1 animal para cada grupo de estudo (CG15, CG25, CL15, CL25, FG15, FG25, FL15 e FL25). Os espécimes foram fixados em solução contendo paraformaldeído (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil) a 4% tamponado neutro, durante 20 horas a 4° C. Após a desidratação e diafanização pelos procedimentos convencionais, foram incluídos em parafina e cortes de 5µm, foram obtidos e montados em lâminas silanizadas de alta aderência (Easypath, São Paulo, São

Paulo, Brasil). A seguir, os cortes foram desparafinizados, reidratados e, então, foi realizada a recuperação antigênica com solução tampão fosfato de sódio (PBS), pH 7.6 em panela de pressão por 30 minutos. Após este procedimento, as preparações foram tratadas em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol absoluto por 15 minutos a temperatura ambiente, para bloquear a peroxidase endógena. Foram, então, lavadas em PBS 3 vezes, por 5 minutos. A seguir, foi aplicado o anticorpo primário na diluição de 1:500, por 30 minutos, segundo o protocolo do fabricante. Foram, então, lavadas, novamente, em PBS 3 vezes, por 5 minutos. Logo após, realizou-se a adição do “Kit” N-Histofine<sup>®</sup> Simple Stain MAX PO (MULTI) (Universal immuno-peroxidase polymer, anti-mouse and rabbit - Nichirei Biosciences INC., Tóquio, Japão), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Foram, então, lavadas em PBS 3 vezes, por 5 minutos. Foi aplicado o cromógeno diaminobenzidina (DAB - Easypath, São Paulo, São Paulo, Brasil) sobre as preparações durante 20 minutos a temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em água destilada 3 vezes, por 5 minutos. As preparações foram contracordadas com Hematoxilina de Harris (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha), lavadas em água corrente, diafanizadas em xilol e montadas em Entellan<sup>®</sup> (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). As preparações foram observadas e fotografadas em microscópio de luz LEICA ICC50 HD (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha).

### **Estatística**

Para a tabulação dos dados quantitativos foram utilizados os Softwares STATA/SE para Windows e o Excel 2007. Foram realizadas comparações com dois grupos utilizando-se o Teste de Mann-Whitney, uma vez excluída a hipótese de normalidade dos dados. Quando a distribuição dos dados apresentou-se normal o Teste t

Student foi aplicado. Todos os testes foram aplicados considerando o intervalo de confiança de 95%

## **RESULTADOS**

Cada rata gestante gerou por ninhada uma média de 8 filhotes, conferindo um padrão de normalidade nutricional dos animais submetidos às intervenções do estudo. Não foram observadas agenesias dentárias, bem como alterações morfológicas ou numéricas da dentição em estudo.

### **Análise histológica e histoquímica**

A análise histológica não evidenciou diferença na morfologia da zona central da polpa dentária coronária e radicular entre os grupos controles e experimentais do estudo.

Nos animais com 15 dias de vida, a polpa dentária mostrou-se ampla e altamente celular. Observaram-se células com aspecto fusiforme, núcleo central ovóide, longos prolongamentos e dispostas obliquamente acompanhando o sentido das fibras colágenas, caracterizando as células da linhagem fibroblástica (fibroblastos e fibrócitos). Em menor quantidade, mas distribuídas uniformemente em toda a polpa, observaram-se células com aspecto estrelado, sugestivas das células mesenquimais indiferenciadas e, nas áreas adjacentes a bainha de epitelial de Hertwig, foi observada uma maior densidade celular. Também foi possível observar, sendo que em menor número, presença de células de defesa dispersas na matriz extracelular. Os vasos sanguíneos apresentaram-se distribuídos uniformemente por toda a polpa dentária (Figura 1A).

Nos animais de 25 dias de vida, as fibras colágenas aumentaram em quantidade, especialmente na polpa coronária, onde a redução da câmara pulpar foi mais visível que nas raízes (Figura 2A). Na região radicular da polpa dentária, foram identificados fibroblastos como as células mais abundantes, células mesenquimais indiferenciadas, vasos sanguíneos, todos imersos em uma matriz colágena. As fibras colágenas são mais evidentes nesta região, pois as raízes encontram-se em desenvolvimento (Figura 3A).

Nos cortes corados pelo método de TM e *Picrossírius Red* mostraram reação positiva para fibras colágenas na zona central da polpa dentária. Observou-se que estas fibras são imaturas nos animais de 15 dias de vida e, nos animais de 25 dias de vida observou-se maior concentração destas fibras na polpa radicular do que na polpa coronária. Nas preparações coradas com TM, nos animais de 15 dias de vida, os feixes de fibras colágenas apresentaram-se fracamente positivos, abundantes e distribuídos uniformemente por toda a zona central da polpa coronária. Nos animais de 25 dias de vida, os feixes de fibras colágenas apresentaram-se mais fortemente positivos que as fibras colágenas dos animais com 15 dias de vida, indicando maturação destas fibras, que se apresentaram mais espessas, tanto na porção coronária quanto na porção radicular. As fibras colágenas do tipo I da zona central polpa dental coronária e radicular dos animais de 15 e 25 dias de vida, apresentaram positividade quando foram evidenciadas pelo *Picrossírius Red*. Entretanto, não foram observadas diferenças estruturais entre os grupos analisados (Figuras 1B, 2B, 3B, 1C, 2C, 3C).

### **Análise histométrica**

*Animais com 15 dias de vida:* As mensurações realizadas não revelaram diferença entre os grupos CG, CL, FG e FL em nenhuma das variáveis analisadas (Tabela 1).

*Animais com 25 dias de vida:* As mensurações realizadas revelaram diminuição na quantidade de fibroblastos da zona central da polpa radicular dos animais do grupo FL ao ser comparado com o grupo CG ( $p = 0,008$ ). Ao se comparar o grupo FL com o seu respectivo grupo controle, obteve-se uma diminuição significativa na quantidade de fibroblastos na polpa coronária e radicular ( $p = 0,045$  e  $p = 0,037$ , respectivamente), nos animais tratados com a fluoxetina até a lactação. Quando se comparou os grupos tratados com o cloridrato de fluoxetina (FG X FL), observou-se diminuição na quantidade de fibroblastos na polpa coronária e radicular nos animais tratados até o período de lactação ( $p = 0,036$  e  $p = 0,008$ , respectivamente). Em nenhum dos grupos analisados observou-se diferença estatisticamente significativa quando foram comparadas as densidades do colágeno coronário e radicular (Tabela 2).

### **Análise imunohistoquímica**

Os resultados mostraram que as fibras colágenas da polpa dentária apresentaram positividade para o colágeno Tipo 1 em todos os grupos analisados, porém sem diferenças estruturais entre eles. Foi observado que a polpa coronária apresentou áreas coradas de maneira mais intensa e a polpa radicular corada de maneira mais branda, evidenciando a presença de colágeno tipo I ainda em maturação (Figura 1E, 2E e 3E).

## **DISCUSSÃO**

O desenvolvimento dos molares de ratos são modelos clássicos para se estudar a odontogênese (Pinzon, Kozlov e Burch, 1967). O molar rato alcançou proeminência no campo da pesquisa odontológica e substituiu o incisivo de rato na exploração das complexidades do seu crescimento e desenvolvimento (Lefkowitz, Bodecker e Mardfin,

1953). Em uma série de estudos histológicos, os molares de ratos foram utilizados como objetivo de pesquisas e analisados por suas reações a diversos medicamentos e condições experimentais (Peterková *et al.*, 2002).

Não foram observadas agenesias dentárias neste estudo. A agenesia dentária pode ser caracterizada pela ausência de um ou todos os elementos dentários, sendo freqüente na dentição permanente e é capaz de produzir um desequilíbrio nas estruturas dentofaciais (Yüksel e Üçem, 1997). Moiseiwitsch e Lauder (1996) observaram em seus experimentos que a 5-HT apresentou ação no desenvolvimento dos germes dentários, na diferenciação dental, e que tal ação poderia ser bloqueada pela fluoxetina, ocasionando agenesias ou malformações dentárias.

Em nosso estudo observamos que a polpa dentária apresentou-se como um tecido conjuntivo frouxo ainda jovem e imaturo, com células numerosas, mais evidentes nas porções radiculares. A presença de células mesenquimais indiferenciadas mostra que a polpa dentária de rato possui capacidade de crescimento e reparação (Abrahão *et al.*, 2006).

As mensurações realizadas não revelaram diminuição no número de fibroblastos coronários quando se compararam os animais com 15 dias de vida, em nenhum dos grupos analisados. Entretanto, as mensurações realizadas nos animais de 25 dias de vida revelaram uma diminuição na quantidade dos fibroblastos coronários e radiculares quando foram comparados os grupos CG, CL e FG com o FL, corroborando com estudos de Westbroek *et al.* (2001) que demonstraram que a serotonina poderia estimular a proliferação de fibroblastos, devido a presença de receptores serotoninérgicos nesta população de células. Desta forma, a fluoxetina parece ter agido como um bloqueador dos receptores serotoninérgicos, inibindo conseqüentemente a proliferação dos fibroblastos. Além disso, o efeito da fluoxetina durante a pulvogênese

possivelmente deve estar relacionado ao tempo de exposição ao fármaco, já que apenas o grupo FL25 apresentou alterações histométricas.

Estudos evidenciaram receptores serotoninérgicos no epitélio dental na fase de botão (Tecott, Strom e Julius, 1995) e no interior da papila dentária no estágio de campânula (Johnson e Heinemann, 1995). A presença de receptores nestes tecidos sugere que a 5-HT pode estar envolvida em interações epitélio-mesenquimais importantes (Shuey *et al.*, 1993), pois este neurotransmissor regula eventos durante embriogênese agindo na interação epitélio-mesênquimal (Shuey *et al.*, 1993; Turlejski, 1996; Byrd *et al.*, 2000; Moiseiwitsch, 2000). Como o cloridrato de fluoxetina atua de forma a inibir estes receptores, deveria também estar havendo uma diminuição na produção das fibras colágenas na zona central da polpa dos animais tratados durante a gestação e lactação, mas os dados histométricos da densidade das fibras colágenas não mostraram diferença estatisticamente significativa, isto é, o conteúdo fibroso da matriz extracelular da zona central polpa dentária não se alterou nos grupos tratados com a fluoxetina.

Observamos que houve diminuição do número de fibroblastos da zona central da polpa coronária nos animais de 25 dias de vida em comparação com os animais de 15 dias de vida em todos os grupos analisados, o que corrobora com os achados de Pinzón, Kozlov e Burch (1967), que descreveram que o conteúdo celular do tecido pulpar diminui apenas nos períodos de formação das raízes, erupção e posterior oclusão funcional; isto é, entre 15 dias e 25 dias.

Dois métodos histoquímicos foram utilizados para a detecção de colágeno: TM e Picrosirius Red. A técnica do TM permitiu observar a presença de fibras colágenas na polpa dentária coradas em tonalidade azul distribuídas de forma homogênea, independentemente das fases de desenvolvimento do dente, entretanto corroborando

com os achados de Abrahão *et al.* (2006) não pudemos identificar o tipo do colágeno presente, já que esta técnica não apresenta especificidade para tipos de colágeno. Já a análise das preparações coradas com o *Picrossírius Red* sob microscópio óptico evidenciou fibras colágenas do tipo I espessas e de coloração avermelhada. Estes resultados obtidos indicam presença de fibras colágenas do tipo I, pois a presença de colágeno tipo I em polpas dentária tem sido amplamente divulgada, como fibras coradas de vermelho ou amarelo pelo método do *Picrossírius Red* (Abrahão *et al.*, 2006).

Os resultados da imunohistoquímica mostraram áreas da polpa dentária coradas em marrom-acastanhado, caracterizando positividade ao colágeno tipo I em todos os grupos analisados. Foi observado que a polpa coronária apresentou áreas coradas de maneira mais intensa e a polpa radicular corada de maneira mais branda, o que pode sugerir presença de colágeno tipo I ainda em maturação. Estudos realizados por He e George (2004), Hao, Ramachandran e George (2009), Nudelman *et al.* (2013) revelaram que a presença do colágeno tipo I na polpa dentária, principalmente na periferia onde os pré-odontoblastos estão situados suporta a idéia de que esta síntese de colágeno tipo I poderia ser um passo significativo no processo de diferenciação destas células.

Os resultados obtidos sugerem que a pulvogênese pode ser sensível à ação da fluoxetina e que a diminuição no número dos fibroblastos da polpa dental parece estar relacionada com a inibição de sua proliferação pela fluoxetina. Além disso esta população de células parece ser dependente do tempo de exposição, uma vez que, apenas, o grupo dos animais de 25 dias expostos durante a gestação e lactação apresentou diminuição da quantidade de fibroblastos. Entretanto, estudos adicionais devem ser realizados para saber por que a densidade das fibras colágenas do tipo I não sofreu alteração.

## REFERÊNCIAS

Abrahão I. J., Martins M. D., Katayama E., Antoniazzi J. H., Segmentilli A., Marques M. M., 2008: Collagen analysis in human tooth germ papillae. *Braz Dent J.* 17: 208-212.

Boskey A. L., 1991: The role of extracellular matrix components in dentin mineralization. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2: 369-387.

Buznikov G. A., 1984: The action of neurotransmitters and related substances on early embryogenesis. *Pharmacol Ther.* 25: 23-59.

Buznikov G. A., Lambert H. W., Lauder J. M., 2001: Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. *Cell Tissue Res.* 305: 177-186.

Byrd K. E., Yang L., Yancey K. W., Teomim D., Domb A. J., 2000: Increased *in vivo* levels of neurotransmitters to trigeminal motoneurons: effects on craniofacial bone and TMJ. *Anat Rec.* 258: 369-83.

Gupta S., Masand, P. S., Rangwani, S., 1998: Selective serotonin reuptake inhibitors in pregnancy and lactation. *Obstet Gynecol Surv.* 53: 733-736.

Hao J., Ramachandran A., George A., 2009: Temporal and spatial localization of the dentin matrix proteins during dentin biomineralization. *J Histochem Cytochem.* 57: 227-237.

He G., George A., 2004: Dentin matrix protein 1 immobilized on type I collagen fibrils facilitates apatite deposition *in vitro*. *J Biol Chem.* 279: 11649-11656.

Hein A., Rauh C., Engel A., Häberle L., Dammer U., Voigt F., Fasching P. A., Faschingbauer F., Burger P., Beckmann M. W., Kornhuber J., Goecke T. W., 2014: Socioeconomic status and depression during and after pregnancy in the Franconian Maternal Health Evaluation Studies (FRAMES). *Arch Gynecol Obstet.* 289: 755-763.

- Johnson D. S., Heinemann S. F., 1995: Embryonic expression of the 5-HT<sub>3</sub> receptor subunit 5-HT<sub>3</sub> R-A, in the rat: an in situ hybridization study. *Mol Cell Neurosci.* 6: 122-38.
- Lankas G. R., Minsker D. H., Robertson R. T., 1989: Effects of ivermectin on reproduction and neonatal toxicity in rats. *Food Chem Toxicol.* 27: 523-529.
- Lefkowitz W., Bodecker C. F., Mardfin D. F., 1953: Odontogenesis of the rat molar: prenatal stage. *J Dent Res.* 32: 749-772.
- Michallany J., 1990: *Técnica histológica em anatomia patológica com Instruções para o Cirurgião, Enfermeira e Citotécnico.* São Paulo: Gráfica e Editora Michallany. 247 p.
- Moiseiwitsch J. R. D., 2000: The role of serotonin and neurotransmitters during craniofacial development. *Crit Rev Oral Biol Med.* 11: 230-39.
- Moiseiwitsch J. R. D., Lauder J. M., 1996: Simulation of murine tooth development in organotypic culture by the neurotransmitter serotonin. *Arch Oral Biol.* 41: 161-65.
- Moiseiwitsch J. R. D., Raymond J. R., Tamir H., Lauder J. M., 1998: Regulation by serotonin of tooth-germ morphogenesis and gene expression in mouse mandibular explant cultures. *Arch Oral Biol.* 43: 789-800.
- Nudelman F., Lausch A. J., Sommerdijk N. A. J. M., Sone E. D., 2013: *In vitro* structural of collagen biomineralization. *J Struct Biol.* 183: 258-269.
- Peterkova R., Peterka M., Viriot L., Lesot H., 2002: Development of the vestigial tooth primordia as part of mouse odontogenesis. *Connect Tissue Res.* 43, 120–128.
- Pinzón R. D., Kozlov M., Burch W. P., 1967: Histology of rat molar pulp at different ages. *J Dent Res.* 46, 202-208.

Shuey D. L., Sadler T. W., Tamir H., Lauder J. M., 1993: Serotonin and morphogenesis: transient expression of serotonin uptake and binding protein during craniofacial morphogenesis in the mouse. *Anat Embryol.* 187: 75-85.

Teccot L., Shtrom S., Julius D., 1995: Expression of a serotonin-gated ion channel in embryonic neural and nonneural tissues. *Mol Cell Neurosci.* 6: 43-55.

Turlejski K., 1996: Evolutionary ancient roles of serotonin: long-lasting regulation of activity and development. *Acta Neurobiol Exp.* 56: 619-636.

Yüksel S., Üçem T., 1997: The effect of tooth agenesis on dentofacial structures. *Eur J Orthod.* 19: 71-78.

Westbroek I., Van der Plas A., Rooij K. E., Klein-Nulend J., Nijweide P. J., 2001: Expression of serotonin receptors in bone. *J Biol Chem.* 276: 28961–28968.

**Tabela 1: Animais com 15 dias de vida:** Comparação do número de fibroblastos e da densidade do colágeno em primeiros molares de ratos (grupos CG, CL, FG, FL).

Variáveis	Grupos *			
	CG	CL	FG	FL
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Fibroblastos	93,50 ± 20,29	94,33 ± 10,93	92,67 ± 6,62	91,00 ± 4,53
Colágeno (densidade)	283,67 ± 17,39	284,00 ± 6,57	279,33 ± 13,40	268,20 ± 18,86

(\*) Teste de Mann-Whitney

**Tabela 2: Animais com 25 dias de vida:** Comparação do número de fibroblastos e da densidade do colágeno em primeiros molares de ratos (grupos CG, CL, FG, FL).

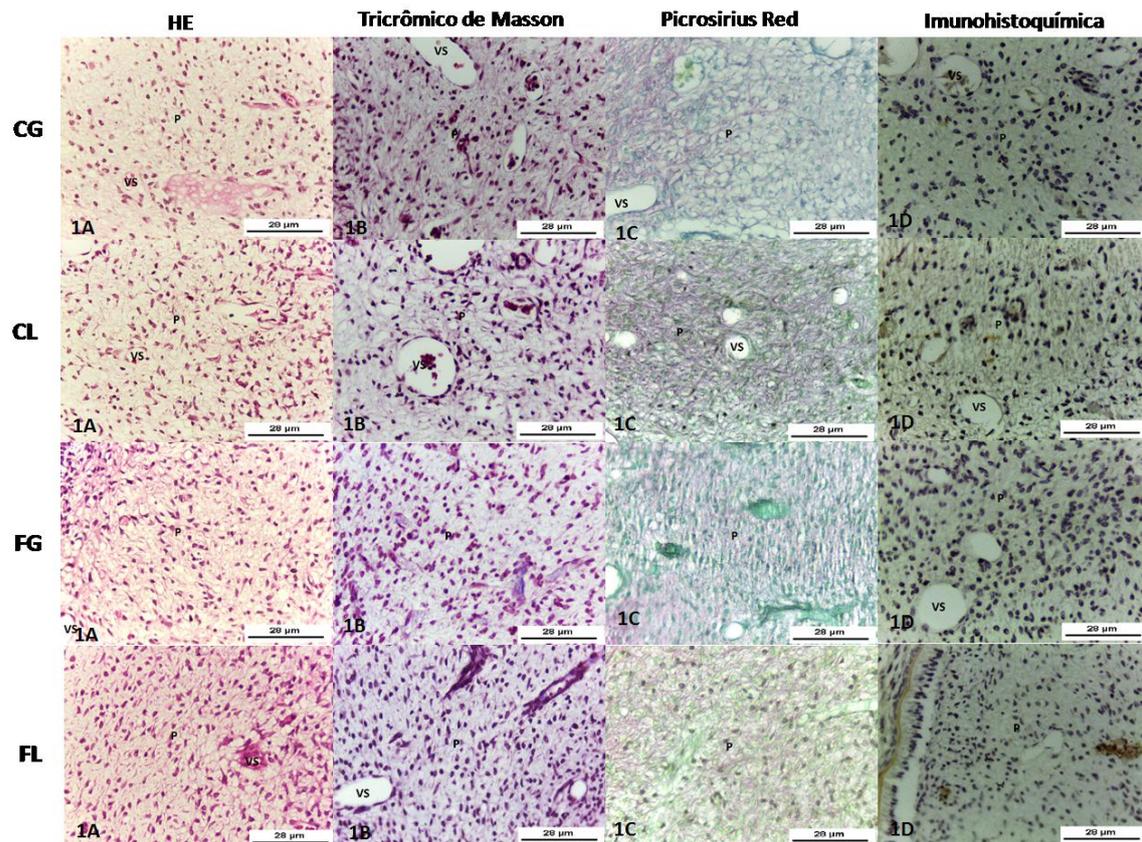
Variáveis	Grupos *			
	CG	CL	FG	FL
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Fibroblastos da coroa	79,83 ± 5,49	80,17 ± 6,59	80,33 ± 5,68	68,17 ± 9,95 <sup>b,c</sup>
Fibroblastos da raiz	85,00 ± 3,90	84,50 ± 6,83	84,33 ± 3,27	74,83 ± 6,71 <sup>a,b,c</sup>
Colágeno da coroa (densidade)	284,00 ± 12,54	284,33 ± 9,89	284,17 ± 11,97	283,67 ± 4,72
Colágeno da raiz (densidade)	269,33 ± 3,39	269,33 ± 22,54	268,83 ± 15,14	269,00 ± 18,46

(\*) Teste de Mann-Whitney

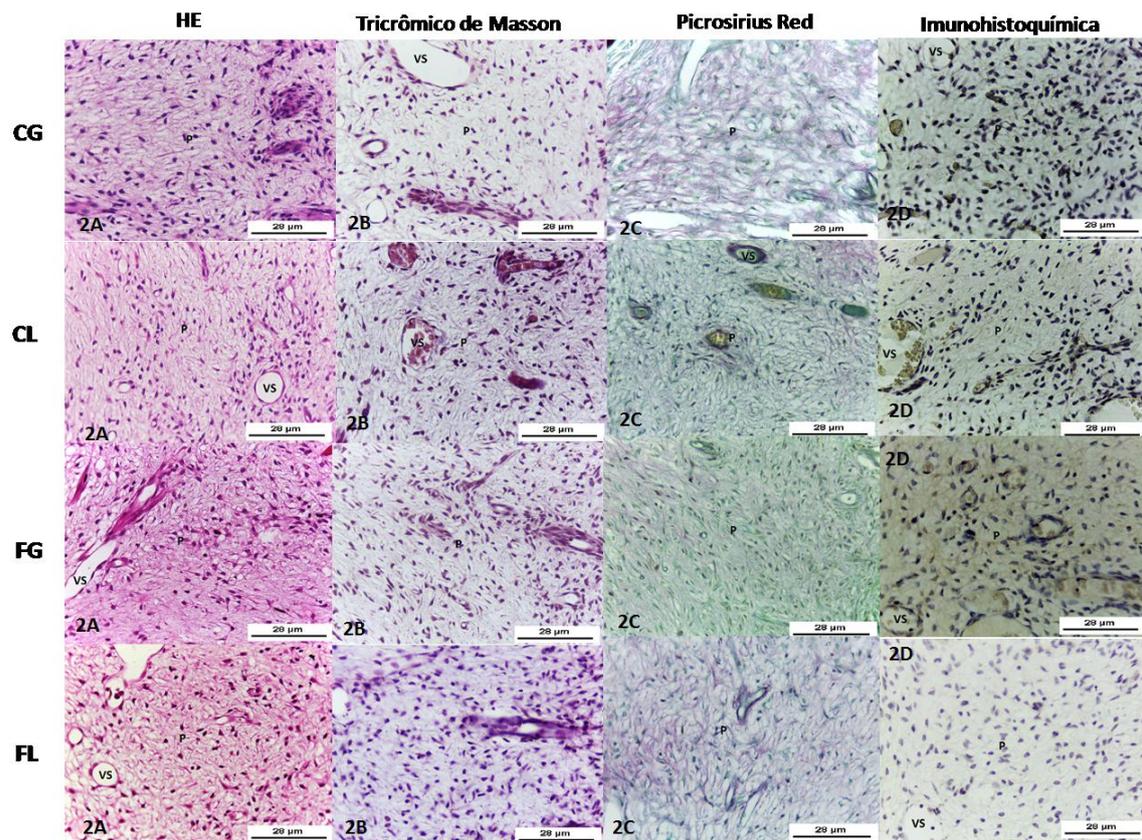
(a) Diferença estatisticamente significativa com o grupo CG

(b) Diferença estatisticamente significativa com o grupo CL

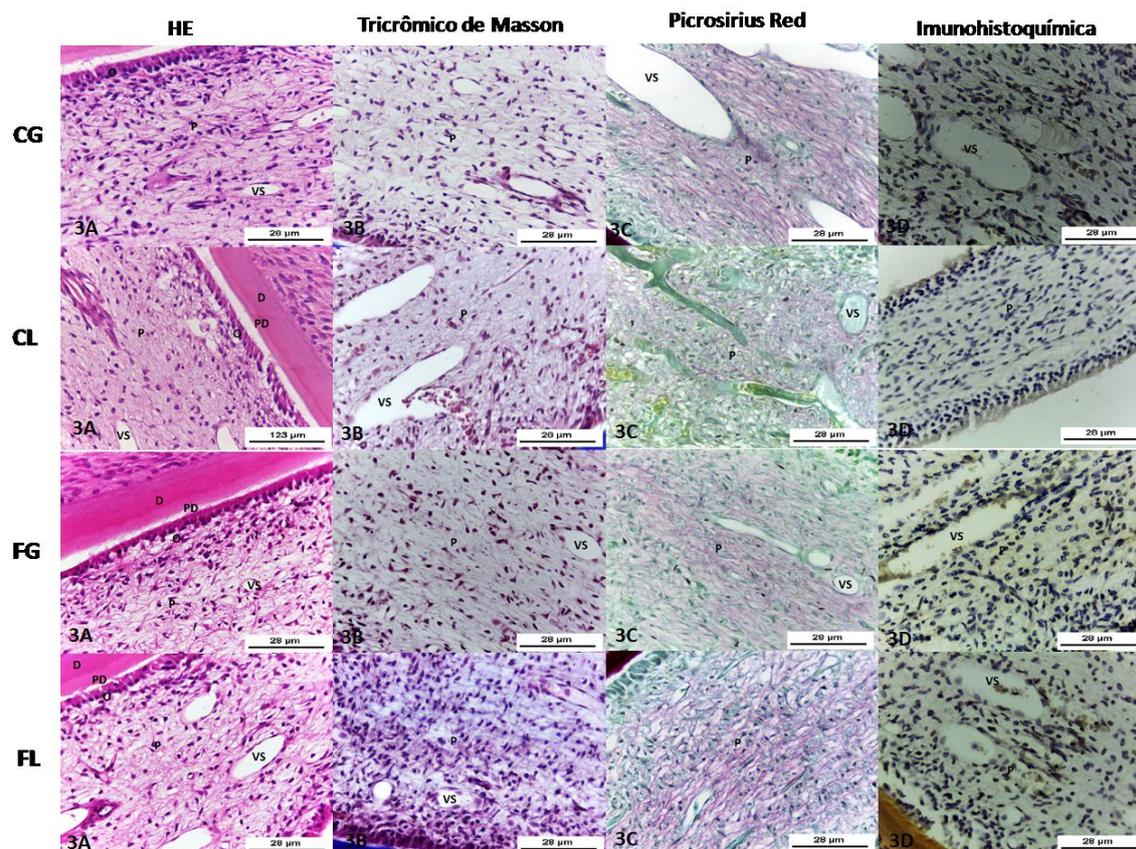
(c) Diferença estatisticamente significativa com o grupo FG



**Figura 1.** Fotomicrografias de parte da coroa de primeiro molar superior de rato com 15 dias de vida, correspondentes aos grupos CG, CL, FG e FL. Observaram-se presença de fibras colágenas com coloração azulada quando coradas com Tricômico de Masson (1B) e com predominância da coloração avermelhada quando coradas com *Picrossírius Red* (1C). Nos cortes em que se utilizou a imunohistoquímica (1D) notou-se que a polpa dentária apresentou positividade para o colágeno tipo I, onde se observou coloração marrom-acastanhada. P: Polpa Dental. VS: Vasos Sanguíneos. Coloração HE (1A), TM, *Picrossírius Red* e Imunohistoquímica.



**Figura 2.** Fotomicrografias de parte da coroa de primeiro molar superior de rato com 25 dias de vida, correspondentes aos grupos CG, CL, FG e FL. Observaram-se presença de fibras colágenas com coloração azulada quando coradas com Tricrômico de Masson (2B) e com predominância da coloração avermelhada quando coradas com *Picrossírius Red* (2C). Nos cortes em que se utilizou a imunohistoquímica (2D) notou-se que a polpa dentária apresentou positividade para o colágeno tipo I, onde se observou coloração marrom-acastanhada. P: Polpa Dental. VS: Vasos Sanguíneos. Coloração HE (2A), TM, *Picrossírius Red* e Imunohistoquímica.



**Figura 3.** Fotomicrografias de parte da raiz de primeiro molar superior de rato com 25 dias de vida, correspondentes aos grupos CG, CL, FG e FL. Observaram-se presença de fibras colágenas com coloração azulada quando coradas com Tricrômico de Masson (3B) e com predominância da coloração avermelhada quando coradas com *Picrossírius Red* (3C). Nos cortes em que se utilizou a imunohistoquímica (3D) notou-se que a polpa dentária apresentou positividade para o colágeno tipo I, onde se observou coloração marrom-acastanhada. P: Polpa Dental. VS: Vasos Sanguíneos. Coloração HE (3A), TM, *Picrossírius Red* e Imunohistoquímica.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a análise morfológica e histométrica realizada na dentina, pré-dentina, odontoblastos, fibroblastos e fibras colágenas foram evidenciadas alterações estruturais significativas no complexo dentino-pulpar de ratos cujas mães foram tratadas com cloridrato de fluoxetina na concentração de 20mg/kg de peso animal durante a gestação e lactação. Entretanto seria importante que mais estudos fossem elaborados, para tentar determinar de estas alterações persistem ao longo da vida, ou se uma vez removido o estímulo da droga, as estruturas voltam a se desenvolver adequadamente.

Por fim, estudos prévios foram capazes de identificar receptores serotoninérgicos no órgão do esmalte, na papila dentária, em células ósseas e fibroblásticas, porém não existem relatos na literatura sobre a presença destes receptores em células da linhagem odontoblástica. Como perspectiva, estudos adicionais, utilizados métodos imunohistoquímicos e de biologia molecular seriam importantes para tentar determinar a localização destes receptores em células diferenciadas da polpa dental, como os odontoblastos.

## REFERÊNCIAS

1. Abrahão IJ, Martins MD, Katayama E, Antoniazzi JH, Segmentilli A, Marques MM. Collagen analysis in human tooth germ papillae. *Brazilian Dental Journal*. 2008; 17: 208-212.
2. Aguiar JCA, Gomes EPP, Fonseca-Silva T, Velloso NA, Vieira LT, Fernandes MF, Santos SHS, Neto JFR, De-Paula AMB, Guimarães ALS. Fluoxetine reduces periodontal disease progression in a conditioned fear stress model in rats. *Journal of Periodontal Research*. 2013; 48: 632–637.
3. Arana-Chaves VE, Massa LF. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *International Journal of Biochemistry e Cell Biology*. 2004; 36: 1367–1373.
4. Baratella L, Arana-Chavez VE, Katchburian E. Apoptosis in the early involuting stellate reticulum of rat molar tooth germs. *Anatomy And Embryology*. 1999; 200: 49–54.
5. Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*. 1999; 38: 1038-52.
6. Battaglino R, Fu J, Späte U, Ersoy U, Joe M, Sedaghat L, Stashenko P. Serotonin regulates osteoclast differentiation through its transporter. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2004; 19: 1420-1431.
7. Battaglino R, Vokes M, Schulze-Späte U, Sharma A, Graves D, Kohler T, Muller R, Yoganathan S, Stashenko P. Fluoxetine treatment increases trabecular bone formation in mice (Fluoxetine affects bone mass). *Journal of Cellular Biochemistry*. 2007; 100: 1387-1394.
8. Belik, JMD. Fetal and neonatal effects of maternal drug treatment for depression. *Seminars in Perinatology*. 2008; 32: 350-54.

9. Berle JO, Spigset O. Antidepressant use during breastfeeding. *Current Women's Health Reviews*. 2011; 7: 28-34.
10. Bevelander G, Hiroshi N. The formation and mineralization of dentine. *Anatomical Record*. 1966; 156: 303-323.
11. Bliziotis MM, Eshleman AJ, Burt-Pichat B, Zhang XW, Hashimoto J, Wiren K, Chenu, C. Serotonin transporter and receptor expression in osteocytic MLO-Y4 cells. *Bone*. 2006; 39: 1313-1321.
12. Bliziotis MM, Eshleman AJ, Zhang XW, Wiren KM. Neurotransmitter action in osteoblasts: expression of a functional system for serotonin receptor activation and reuptake. *Bone*. 2001; 29: 477-486.
13. Bonnet N, Bernard P, Beaupied H, Bizot JC, Trovero F, Courteix D, Benhamou CL. Various effects of antidepressant drugs on bone microarchitecture, mechanical properties and bone remodeling. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2007; 221: 111-118.
14. Boskey AL. The role of extracellular matrix components in dentin mineralization. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 1991; 2: 369-387.
15. Branco-de-Almeida LS, Franco GC, Castro ML, Santos JG, Anbinder AL, Cortelli SC, Kajiya M, Kawai T, Rosalen PL. Fluoxetine inhibits inflammatory response and bone loss in a rat model of ligature-induced periodontitis. *Journal of Periodontology*. 2012; 83: 664-671.
16. Butler WT, Ritchie H. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *International Journal of Developmental Biology*. 1995; 39: 169-79.
17. Buznikov GA. The action of neurotransmitters and related substances on early embryogenesis. *Pharmacology and Therapeutics*. 1984; 25: 23-59.

18. Buznikov GA, Lambert HW, Lauder JM. Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. *Cell and Tissue Research*. 2001; 305: 177-186.
19. Byrd KE, Yang L, Yancey KW, Teomim D, Domb AJ. Increased in vivo levels of neurotransmitters to trigeminal motoneurons: effects on craniofacial bone and TMJ. *Anatomical Record*. 2000; 258: 369-83.
20. Campigotto KF; Teixeira JJV; Cano FG; Sanches ACC; Cano MFF; Guimarães DSL. Detecção de risco de interações entre fármacos antidepressivos e associados prescritos a pacientes adultos. *Revista de Psiquiatria Clínica*. 2008; 35: 1-5.
21. Cavalcanti UDNT, Baratella-Evêncio L, Neto JE, Castro RM, Cardona AS, Melo MLM, Lins RC. Morphological aspects of the embryonic development of the TMJ in rats (*Rattus norvegicus albinus*) treated with fluoxetine. *International Journal of Morphology*. 2009; 27: 899-903.
22. Cavalli RC; Baraldi CO; Cunha SP. Transferência placentária de drogas. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 2006; 28: 557-64.
23. Chambers CD, Johnson KA, Dick LM, Felix RJ, Jones KL. Birth outcomes in pregnant women taking fluoxetine. *New England Journal of Medicine*. 1996; 335: 1010-15.
24. Cotrim P, Andrade CR, Line S, Almeida OP, Coletta RD. Expression and activity of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in the development of rat first molar tooth germ. *Brazilian Dental Journal*. 2002; 13: 97-102.
25. Düsman E, Almeida IV, Mariucci RG, Mantovani MS, Vicentini VEP. Cytotoxicity and mutagenicity of fluoxetine hydrochloride (Prozac), with or without vitamins A and C, in plant and animal model systems. *Genetics and Molecular Research*. 2014; 13: 578-89.

26. Gaunt WA. Quantitative aspects of the developing tooth germ. *Journal of Dental Reseach*. 1967; 46: 851-857.
27. Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization: The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization. *Frontiers in Bioscience*. 2012; 3: 711–35.
28. Goracci G, Mori G, Baldi M. Terminal end of the human odontoblasts process: a study using SEM and confocal microscopy. *Clinical Oral Investigations*. 1999; 3: 126-132.
29. Graeff FG. 2001. Aspectos neuroquímicos: o papel da serotonina no TOC. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 23: 35-37.
30. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Gehron-Robey P, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *PNAS*. 2000, 97; 13625–30.
31. Guo L, Li J, Qiao X, Yu M, Tang W, Wang H, Guo W, Tian W. Comparison of odontogenic differentiation of human dental follicle cells and human dental papilla cells. *Plos One*. 2013; 8: 1-14.
32. Gupta S, Masand, PS, Rangwani, S. Selective serotonin reuptake inhibitors in pregnancy and lactation. *Obstetrical and Gynecological Survey*. 1998; 53: 733-36.
33. Gustafsson BI, Thommesen L, Stunes AK, Tommeras K, Westbroek I, Waldum HL, Slordahl K, Tamburstuen MV, Reseland JE, Syversen U. Serotonin and fluoxetine modulate bone cell function *in vitro*. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2006; 98: 139-151.
34. Hao J, Ramachandran A, George A. Temporal and spatial localization of the dentin matrix proteins during dentin biomineralization. *Journal of Histochemistry e Cytochemistry*. 2009; 57: 227–237.

35. He G, George A. Dentin matrix protein 1 immobilized on type I collagen fibrils facilitates apatite deposition *in vitro*. *Journal Of Biological Chemistry*. 2004; 279: 11649–11656.
36. Hein A, Rauh C, Engel A, Häberle L, Dammer U, Voigt F, Fasching PA, Faschingbauer F, Burger P, Beckmann MW, Kornhuber J, Goecke TW. Socioeconomic status and depression during and after pregnancy in the Franconian Maternal Health Evaluation Studies (FRAMES). *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2014; 289: 755-763.
37. Hendrick V, Altshuler L. Management of major depression during pregnancy. *American Journal of Psychiatry*. 2002; 159: 1667-73.  
Hendrick V, Stowe ZN, Altshuler L, Hwang S, Lee E, Haynes D. Placental passage of antidepressant medications. *American Journal of Psychiatry*. 2003; 160: 993-96.
38. Hyttel, J. Pharmacological characterization of selective reuptake inhibitors (SSRIs). *International Clinical Psychopharmacology*. 1994; 9: 19-26.
39. Johnson DS, Heinemann SF. Embryonic expression of the 5-HT<sub>3</sub> receptor subunit 5-HT<sub>3</sub> R-A, in the rat: an in situ hybridization study. *Molecular and Cellular Neurosciences*. 1995; 6; 122-38.
40. Katchburian E; Arana-Chaves VE. *Histologia e Embriologia Oral*. 2 ed. São Paulo: Editora Panamericana, 2004.
41. Kiryanova V, McAllister BB, Dyck RH. Long-term outcomes of developmental exposure to fluoxetine: a review of the animal literature. *Developmental Neuroscience*. 2013; 35: 437–449.
42. Kontur PJ, Leranath C, Redmond DEJR, Roth RH, Robbins RJ. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity and monoamine and metabolite levels in cryopreserved human Fetal ventral mesencephalon. *Experimental Neurology*. 1993; 121: 172-80.

43. Lankas GR, Minsker DH, Robertson RT. Effects of ivermectin on reproduction and neonatal toxicity in rats. *Food Chemical Toxicology*. 1989; 27: 523-529.
44. Lauder JM. Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal. *Annals of The New York Academy of Sciences*. 1990; 600: 297-313.
45. Lauder JM, Luo X, Persico AM. Serotonergic regulation of somatosensory cortical development: lessons from genetic mouse models. *Developmental Neuroscience*. 2003; 25: 173-83.
46. Lauder JM, Tamir H, Sadler W. 1988. Serotonin and morphogenesis: sites of serotonin uptake and-binding protein immunoreactivity in the midgestation mouse embryo. *Development* 102:709-20.
47. Lauder JM, Wilkie MB, Wu C, Singh S. Expression of 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors in the mouse embryo. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2000; 18: 653-662.
48. Lauder JM, Zimmerman EF. Sites of serotonin uptake in epithelia of the developing mouse palate, oral cavity and face: possible role of morphogenesis. *Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology*. 1988; 8: 265-76.
49. Lefkowitz W, Bodecker CF, Mardfin DF. Odontogenesis of the rat molar: prenatal stage. *Journal of Dental Research*. 1953; 32: 749-772.
50. Lesot H, Brook AH. Epithelial histogenesis during tooth development. *Archives of Oral Biology*. 2008; 19: 1-9.
51. Levallois C, Valence C, Baldet P, Prival A. Morphological and morphometric analysis of serotonin-containing neurons in primary dissociated cultures of human rhombencephalon: a study of development. *Developmental Brain Research*. 1997; 99: 243-252.

52. Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 1993; 4: 679-728.
53. Magne D, Bluteau G, Lopez-Cazaux S, Weiss P, Pilet P, Ritchie HH, Daculsi G, Guicheux J. Development of an odontoblast in vitro model to study dentin mineralization. *Connective Tissue Research*. 2004; 45: 101–108.
54. Massa LF, Ramachandran A, George A, Arana-Chavez, VE. Developmental appearance of dentin matrix protein 1 during the early dentinogenesis in rat molars as identified by high-resolution immunocytochemistry. *Histochemistry and Cell Biology*. 2005; 124: 197–205.
55. Matalova E, Tucker AS, Sharpe PT. Death in the life of a tooth. *Journal of Dental Research*. 2004; 83: 11-16.
56. Mendes-da-Silva C, De Souza SL, Barreto-Medeiros JM, Freitas-Silva SR, Antunes DEC, Cunha ADU, Ribas VR, De França MFS, Nogueira MI, Manhães-de-Castro R. Neonatal treatment with fluoxetine reduces depressive behavior induced by forced swim in adult rats. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. 2002; 60: 928-31.
57. Michallany, J. 1990. *Técnica histológica em anatomia patológica com Instruções para o Cirurgião, Enfermeira e Citotécnico*. São Paulo: Gráfica e Editora Michallany. 247 p.
58. Michon F, Tummers M, Kyyrönen M, Frilander MJ, Thesleff I. Tooth morphogenesis and ameloblast differentiation are regulated by micro-RNAs. *Developmental Biology*. 2010; 340: 355-368.
59. Moiseiwitsch JRD. The role of serotonin and neurotransmitters during craniofacial development. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. Biol. 2000; 11: 230-39.
60. Moiseiwitsch JRD, Lauder JM. Simulation of murine tooth development in organotypic culture by the neurotransmitter serotonin. *Archives of Oral Biology*. 1996; 41: 161-65.

61. Moiseiwitsch JRD, Raymond JR, Tamir H, Lauder JM. Regulation by serotonin of tooth-germ morphogenesis and gene expression in mouse mandibular explant cultures. *Archives of Oral Biology*. 1998; 43: 789-800.
62. Montes GS, Junqueira LC. The use of picosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Memoriais do Instituto Oswaldo Cruz*. 1991; 86: 1-11.
63. Morrison JL, Riggs KW, Rurak DW. Fluoxetine during pregnancy: impact on fetal development. *Reproduction, Fertility, and Development*. 2005; 17: 641-50.
64. Mortazavi SH, Khojasteh A, Vaziri H, Khoshzaban A, Roudsari MV, Razavi SHE. The effect of fluoxetine on bone regeneration in rat calvarial bone defects. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 2009; 108: 22-27.
65. Müller JC, Boareto AC, Lourenço ELB, Zaia RM, Kienast MF, Spercoski KM, Morais RN, Martino-Andrade AJ, Dalsenter PR. *In utero* and lactational exposure to fluoxetine in wistar rats: pregnancy outcomes and sexual development. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 2013; 113: 132–140.
66. Munksgaard EC, Rhodes M, Mayne R, Butler WT. Collagen synthesis and secretion by rat incisor odontoblasts in organ culture. *European Journal of Biochemistry*. 1978; 82: 609-617.
67. Nudelman F, Lausch AJ, Sommerdijk NAJM, Sone ED. In vitro structural of collagen biomineralization. *Journal of Structural Biology*. 2013; 183: 258-269.
68. Ornstein S, Stuart G, Jenkins R. Depression diagnoses and antidepressant use in primary care practices: a study from the Practice Partner Research Network (PPRNet). *Journal of Family Practice*. 2000; 49: 68–72.
69. Pawloski JL, Charlier TD, Fillet M, Houbart V, Crispin HT, Steinbusch HW, Van den Hove DL. Chronic fluoxetine treatment and maternal adversity differentially alter

neurobehavioral outcomes in the rat dam. *Behavioural Brain Research*. 2012; 228: 159-68.

70. Peterkova R, Peterka M, Viriot L, Lesot H. Development of the vestigial tooth primordia as part of mouse odontogenesis. *Connective Tissue Research*. 2002; 43: 120-128.

71. Pispá J, Thesleff I. Mechanisms of ectodermal organogenesis. *Developmental Biology*. 2003; 262: 195-205.

72. Pinzón RD, Kozlov M, Burch WP. Histology of rat molar pulp at different ages. *Journal of Dental Research*. 1967; 46: 202-208.

73. Prasad M, Butler WT, Qin C. Dentin sialophosphoprotein (DSPP) in biomineralization. *Connective Tissue Research*. 2010; 51: 404-417.

74. Raap DK, Van de Kar LD. 1999. Selective serotonin reuptake inhibitor and neuroendocrine function. *Life Sciences*. 65:1217-1235.

75. Reith EJ. Collagen formation in developing molar teeth of rats. *Journal of Ultrastructural Research*. 1968; 21: 383-414.

76. Ruch JV, Lesot H, Begue-Birn C. Odontoblast differentiation. *International Journal of Developmental Biology*. 1995; 39: 51-68.

77-1. Santiago IMA, Regueira LS, Correia PG, Alcântara RJB, Evêncio-Neto J, Baratella-Evêncio L. Efeitos da utilização do cloridrato de fluoxetina sobre o desenvolvimento de tecidos mineralizados de ratos: revisão sistemática. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*. 2013; 17: 181-188.

78-2. Santiago IMA, Regueira LS, Correia PG, Alcântara RJB, Evêncio-Neto J, Baratella-Evêncio L. Morphological aspects of dentin-pulp complex development in the offspring of rats treated with fluoxetine during pregnancy. *Brazilian Journal of Oral Science*. 2013; 12: 30-6.

79. Sasaki T, Garant PR. Structure and organization of odontoblasts. *Anatomical Record*. 1996; 245: 235-249.
80. Shuey DL, Sadler TW, Tamir H, Lauder JM. Serotonin and morphogenesis: transient expression of serotonin uptake and binding protein during craniofacial morphogenesis in the mouse. *Anatomy and Embryology*. 1993; 187: 75-85.
81. Silva IHM, Leão JC, Evêncio LB, Porter SR, Castro RM. Morphological analysis of the enamel organ in rats treated with fluoxetine. *Clinics*. 2010; 65: 61-66.
82. Sit D, Perel JM, Wisniewski SR, Helsel JC, Luther JF, Wisner KL. Mother-infant antidepressant levels, maternal depression and perinatal events. *Journal of Clinical Psychiatry*. 2011; 72: 994-1001.
83. Slavkin HC, Bavetta LA. Odontogenic epithelial-mesenchymal interactions *in vitro*. *Journal of Dental Research*. 1968; 47: 779-785.
84. Sousa-Ferreira L, Aveleira C, Botelho M, Álvaro AR, Almeida LP, Cavadas C. Fluoxetine induces proliferation and inhibits differentiation of hypothalamic neuroprogenitor cells *in vitro*. *Plos One*. 2014; 9: 1-10.
85. Suzuki S, Sreenath T, Haruyama N, Honeycutt C, Terse A, Cho A, Kohler T, Müller R, Goldberg M, Kulkarni AB. Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biology*. 2009; 288: 221-229.
86. Symons NB. The development of the fibers of the dentine matrix. *British Dental Journal*. 1956; 101: 252.
87. Teccot L, Shtrom S, Julius D. Expression of a serotonin-gated ion channel in embryonic neural and nonneural tissues. *Molecular and Cellular Neurosciences*. 1995; 6: 43-55.

88. Ten Cate AR. A fine structural study of coronal and root dentinogenesis in the mouse: observations on the so-called “von Korff fibers” and their contribution to mantle dentine. *Journal of Anatomy*. 1978; 125: 183-97.
89. Thesleff I. Differentiation of odontogenic tissues in organ culture. *Scandinavian Journal of Dental Research*. 1976; 84: 353-56.
90. Thesleff, I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *Journal of Cell Science*. 2003; 116: 1647-1648.
91. Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental development. *Mechanisms of Development*. 1997; 67: 111–123.
92. Thesleff I, Vaahtokari A, Vainio S, Jowett A. Molecular mechanisms of cell and tissue interactions during early tooth development. *Anatomical Record*. 1996; 245: 151-161.
93. Turlejski K. Evolutionary ancient roles of serotonin: long-lasting regulation of activity and development. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 1996; 56: 619-636.
94. Van Marwijk HWJ, Bijl D, Ader HJ, De Haan M. Antidepressant prescription for depression in general practice in The Netherlands. *Pharmacy World and Science*. 2001; 23: 46–49.
95. Wang J, Ma H, Jin X, Hu J, Liu X, Ni L, Ma PX. The effect of scaffold architecture on odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *Biomaterials*. 2011; 32: 7822–7830.
96. Warden SJ, Robling AG, Sanders MS, Bliziotes MM, Turner CH. Inhibition of the serotonin (5-Hydroxytryptamine) transporter reduces bone accrual during growth. *Endocrinology*. 2005; 146: 685–93.
97. Westbroek I, Waarsing JH, Van Leeuwen JPTM, Waldum H, Reseland JE, Weinans H, Syversen U, Gustafsson BI. Long-term fluoxetine administration does not result in

major changes in bone architecture and strength in growing rats. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2007; 101: 360-368.

98. Whitaker-Azmitia PM. Role of serotonin and other neurotransmitter receptors in brain development: basis for developmental pharmacology. *Pharmacological Reviews*. 1991; 43: 553-61.

99. Wong DT, Bymaster FP, Engleman E. Prozac (Fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. *Life Sciences*. 1995; 57: 411-41.

100. Yüksel S, Üçem T. The effect of tooth agenesis on dentofacial structures. *European Journal of Orthodontics*. 1997; 19: 71-78.

101. Ziere G, Dieleman JP, Van der Cammen TJM, Hofman A, Pols HAP, Stricker BHC. Selective serotonin reuptake inhibiting antidepressants are associated with an increased risk of nonvertebral fractures. *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 2008; 28: 411-417.

## ANEXO A

## PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
50670-420 / Recife - PE - Brasil  
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351  
fax: (55 81) 2126 8350  
www.ccb.ufpe.br



Recife, 29 de junho de 2011.

Ofício nº 381/11

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE  
Para: **Profª. Liriane Baratella Evêncio**  
Departamento de Histologia e Embriologia  
Universidade Federal de Pernambuco  
Processo nº 23076.017680/2011-83

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **“Efeito do tratamento crônico com Fluoxetina na prole de ratas tratadas durante a gestação e lactação.”**

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição (aquisição); Biotério de Cirurgia Experimental (manutenção); Animais: Ratos; Linhagem: Wistar; Sexo: Machos e Fêmeas; Idade: filhotes de 10 dias (15g-20g), filhotes de 25 dias (40g-55g), filhotes de 60 dias (200g), ratas de 120 dias (260g); Número de animais previsto no protocolo: 131 animais.

Atenciosamente,

*Maria Teresa Jansen*  
Profª. Maria Teresa Jansen  
Presidente do CEEA  
UFPE

## ANEXO B

### NORMAS DA REVISTA DO ARTIGO ORIGINAL 1

# HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY

<http://www.hh.um.es>

**This Journal publishes works in all fields of microscopical morphology; high quality is the overall consideration.**

**HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY** is an international journal, the purpose of which is to publish original works in English in histology, histopathology and cell biology. Its format is the standard international size of 21 x 27.7 cm. One volume is published every year. Each volume consists of 12 numbers published monthly online. The printed version of the journal includes 4 books every year; each of them compiles 3 numbers previously published online. The **price** per volume, including postage by surface mail and free online access, is 550 euros (or equivalent USD) for 2012. Impact factor: 2.502. Journal Citation Report® 2010, published by Thomson Scientific.

**Subscriptions and manuscripts** should be addressed to the Editors:

Prof. F. Hernández, Editor, HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY, Plaza Fuensanta, 2-7°C, E-30008 Murcia. Spain  
or

Prof. Juan F. Madrid, Editor, HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY, Histology Area, School of Medicine, University of Murcia, E-30100 Espinardo-MURCIA. Spain

#### NOTICE TO CONTRIBUTORS:

- Two copies of each manuscript and illustrations (no photocopies) should be submitted in English, as hard copies and on disk. Authors should retain one copy, as the Editor cannot accept responsibility for damage or loss of manuscripts. Submission of a paper to **HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY** must be based on the tacit assurance that no similar paper, except for a preliminary report, has been or will be submitted for publication elsewhere. The decision on acceptance of manuscripts will be made on the basis of a peer review system.
- The **first page** should contain the full title, the author's name(s), place of work, postal and e-mail addresses for correspondence and a short running title (no more than 40 spaces).
- For indexing purposes, a small number of "key words" (no more than 5) must be supplied.
- The **text** should be preceded by a short summary not exceeding 250 words and should then proceed to sections of Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgements and References.
- Do not divide words at the end of lines. Pages should be numbered consecutively in arabic numerals. Tables, footnotes and figure legends including magnifications, should be submitted on separate sheets. Tables and figures should be referred in the text as (Table 1), (Fig. 1)...
- References** to the literature should be cited in the text by the name of the author(s) followed by the year of publication. In cases in which there are more than two authors, only the first is named, followed by "et al.". Examples: Smith (1980) reported that...; (Smith, 1980, 1982); (Smith and Tanaka, 1980); (Smith et al., 1980). Suffixes a, b, etc., should be used following the year to distinguish two or more papers by the same author(s) published in the same year; example (Smith, 1981a). When two or more references are included in the same bracket, they must be quoted in the chronological order; example (Smith, 1980; Bell et al., 1984).
- The reference list should be in alphabetical order. References to articles in periodical publications must include: Names and initials of all authors, year of publication, complete title of paper, name of journal (abbreviated in accordance with Index Medicus), number of volume, and first and last page numbers. Example:  
Morita T., Suzuki Y. and Churg J. (1973). Structure and development of the glomerular crescent. *Am. J. Pathol.* 72, 349-368.  
  
Reference to books must include: Name and initials of authors, year of publication, full title, edition, editor, publisher, place of publication and page numbers.  
Example:  
Powell D. and Skrabanek P. (1981). Substance P. In: *Gut Hormones*. 2nd ed. Bloom S.R. and Polak J.M. (eds). Churchill Livingstone. Edinburgh. pp 396-401.
- Illustrations** should be labelled with the figure number and author's name in soft pencil on the back identifying the top edge. Photographs should be glossy bromide prints of good contrast and well matched, preferably not mounted on card. Photographs should not exceed 17.8 x 22.2 cm. The Editor reserves the right to reduce or enlarge the illustrations. Colour photographs will be allowable only in special circumstances and the author will be asked to contribute to the cost of reproduction. Line diagrams should be drawn with black ink on tracing paper or white card or supplied as glossy prints. Illustrations should be submitted protected by resistant cardboard. Apply figure numbers to the lower left-hand corner of each photograph; dry transfer lettering (such as letraset) may be used. **Digital images** are welcome. They must be submitted on either Zip Disk or CDROM (CD-R or CD-RW). We cannot use other types of disk. Images should be TIFF file format, preferentially, although other formats could be useful (jpg, ppt, etc). Black and white figures must be at gray scale. Color figures should be preferentially in CMYK, but RGB is also allowed. Line art files must have a 500dpi resolution, while other images must have a 300dpi resolution. Supplying digital images is not a substitute for the press set of figures.
- Charges to authors:** The authors are requested to cover part of the printing cost (each paper about 600 euros; with colour, about 900 euros). The authors receive **25 reprints** free of charge. The charge for reprints exceeding this number is 25 € per page each copy.
- Electronic submission.** Alternatively, the articles can be submitted by e-mail to Prof Juan F. Madrid, Editor (jfmadrid@um.es) or uploaded to [this page](#). The text document must be saved as Word or RTF format. Tables must be included in the text document. Figures must be saved in the formats and at the resolution indicated in point 8 (Illustrations).

## ANEXO C

### NORMAS DA REVISTA DO ARTIGO ORIGINAL 2

#### ANATOMIA, HISTOLOGIA, EMBRYOLOGIA

**Original Articles:** Original papers should not exceed 30 DIN A4 typewritten pages including figures, tables and references. Summaries of original papers should not exceed 1200 characters.

**Short Communications:** Short communications should not exceed 5 DIN A4 typewritten pages including figures, tables and references. Summaries of short communications should not exceed 600 characters. Short communications may be given priority for publication.

**Reviews:** Due to their nature, reviews are not limited in length per se, however editors reserve the right to have them shortened for brevity during review.

#### MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

##### Format

**Language:** The language of publication is English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. It is preferred that manuscripts are professionally edited. A list of independent suppliers of editing services can be found at [http://authorservices.wiley.com/bauthor/english\\_language.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp). All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

**Abbreviations, Symbols and Nomenclature:** All measurement specifications must follow the S.I. system. Solution concentrations are to be given in mol/l. All other concentrations are to be given in % (volume or weight). Abbreviations of biological, chemical or other terms should only be employed when it is certain they are internationally known. The full name must be stated in brackets when an abbreviation is used for the first time in a paper.

**Scientific Names:** All biological, chemical, medical or other names are to be given according to the most recent international nomenclature. In the case of substances or reagents obtained commercially, the name and address of the manufacturer or supplier (as a footnote) should be given the first time the product is mentioned. Products with a trademark should be marked with ©. Names of bacteria should be in accordance with the latest edition of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (The Williams and Wilkins Co., Baltimore). Viruses should be classified and named as recommended by the International Committee on the Nomenclature of Viruses.

**Font:** Names of micro-organisms and zoological or botanical names should be given in italics.

## Structure

All manuscripts submitted to *Anatomia*, *Histologia*, *Embryologia* should include: Summary, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, and References.

**Title Page:** The following information should be given on page one of the manuscript: the name of the institution where the work was carried out, the title of the manuscript, the name(s) of the author(s), the address(es) of the author(s), the e-mail address of the corresponding author, and the number of figures and tables accompanying the manuscript.

**Summary:** Summaries of original articles should not exceed 1200 characters, and those of short communications should not exceed 600 characters.

## Optimizing Your Summary for Search Engines

Many students and researchers looking for information online will use search engines such as Google, Yahoo or similar. By optimizing your article for search engines, you will increase the chance of someone finding it. This in turn will make it more likely to be viewed and/or cited in another work. We have compiled these guidelines to enable you to maximize the web-friendliness of the most public part of your article.

### 6.3. References

Each original paper should have a list of references which should be restricted to a minimum. The references should be listed alphabetically according to the name of the first author.

Every reference should be structured as follows: author or author's surname and initials of the given name; year of publication (without brackets); title of paper; name of the journal; volume number (bold); page numbers, e.g.:

Gothe, R., Y. Gold and A. Kraiss, 1986: On the subspecific validity of *Rhipicephalus evertsi mimeticus* DÖNitz, 1910. *J. Vet. Med. B* 33, 47-59.

Books or separate publications should be quoted as follows:

Boch, J. and R. Supperer, 1977: *Veterinary Medical Parasitology*. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin.

Reference to the quoted literature in the text should be given by putting the name(s) of the author(s) in brackets, with the year of publication, e.g.: (Thein and Härtl, 1986).

The editor and publisher recommend that citation of online published papers and other material should be done via a DOI (digital object identifier), which all reputable online

published material should have - see [www.doi.org/](http://www.doi.org/) for more information. If an author cites anything which does not have a DOI they run the risk of the cited material not being traceable.

We recommend the use of a tool such as Reference Manager for reference management and formatting.

Reference Manager reference styles can be searched for here: [www.refman.com/support/rmstyles.asp](http://www.refman.com/support/rmstyles.asp)

#### **6.4. Tables, Figures and Figure Legends**

The number and size of illustrations and tables should be kept to the minimum necessary.

**Tables:** Tables should be created using the table function.

**Figures:** Please note that figures will generally be reduced to fit within the column-width or the print area. This means that numbering and lettering must still be readable when reduced (e.g. maps) and that the scale might not correspond with the original (microscopic pictures), thereby invalidating references to scale in the text. These figures should include a bar the size of which is defined in the caption of the photograph concerned. If a figure is to be cropped, please mark the lines on a photocopy or tracing paper. Printouts should be made with a laserprinter at the highest resolution (> 600 dpi). If artwork is to be scanned, line drawings should only be contour drawings without halftones (shades of grey). Please do not use patterns; rough hatching is possible.

Graphs with an x and y axis should not be enclosed in frames; only 2-dimensional representations. Do not forget the labels and units. **Preparation of Electronic Figures for Publication**

Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (line art) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of at least 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). Please submit the data for figures in black and white or submit a Colour Work Agreement Form (see Colour Charges below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: line art: >600 dpi; halftones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Further information can be obtained at Wiley-Blackwell's guidelines for figures: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

Check your electronic artwork before submitting it: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>

**Permissions:** If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publisher.

**Colour Charges:** It is the policy of the *Anatomia, Histologia, Embryologia* for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork. However, in the event that an author is not able to cover the costs of reproducing colour figures in colour in the printed version of the journal, *Anatomia, Histologia, Embryologia* offers authors the opportunity to reproduce colour figures in colour for free in the online version of the article (but they will still appear in black and white in the print version). Questions concerning colour figures should be directed to the Editorial Office, Iduna Haus (iduna-haus@ethz.ch). If an author wishes to take advantage of this free colour-on-the-web service, they should liaise with the Editorial Office (iduna-haus@ethz.ch) to ensure that the appropriate documentation is completed for the Publisher. Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Wiley-Blackwell Publishing require you to complete and return a colour work agreement form before your paper can be published. This form can be downloaded from the Author Guidelines here. Please return the Colour Work Agreement Form to the address listed on the form.

**Figure Legends:** Legends for the figures should give a precise description of the content and should not be repeated within the figure.

Note to NIH Grantees: Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see [www.wiley.com/go/nihmandate](http://www.wiley.com/go/nihmandate)