



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA INTEGRADA

JOSÉ ANDERSON DE BARROS MATOS

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO DESENVOLVIMENTO DO
OSSO ALVEOLAR DE FILHOTES DE RATAS TRATADAS COM
FLUOXETINA DURANTE A GESTAÇÃO**

RECIFE – 2011

JOSÉ ANDERSON DE BARROS MATOS

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO DESENVOLVIMENTO DO
OSSO ALVEOLAR DE FILHOTES DE RATAS TRATADAS COM
FLUOXETINA DURANTE A GESTAÇÃO**

Dissertação apresentada ao colegiado da Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Odontologia com área de concentração em Clínica Integrada.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Liriane Baratella Evêncio

RECIFE - 2011

Matos, José Anderson de Barros

Aspectos morfológicos do desenvolvimento do osso alveolar de filhotes de ratas tratadas com fluoxetina durante a gestação / José Anderson de Barros Matos. – Recife: O Autor, 2011.

42 folhas: il., fig., gráf.; 30 cm.

Orientador: Liriane Baratella Evêncio

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Odontologia, 2011.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Serotonina. 2. Fluoxetina. 3. Gravidez. 4. Desenvolvimento. 5. Osso alveolar+. I. Evêncio, Liriane Baratella. II. Título.

UFPE

617.632

CDD (20.ed.)

CCS2011-176

Ata da 105ª Defesa de Dissertação do Curso de Mestrado em Odontologia com área de Concentração em Clínica Integrada do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 02 de março de 2011.

Às 14:45(quatorze horas e quarenta e cinco minutos) do dia 02(dois) do mês de março do ano de dois mil e onze, reuniram-se no auditório Agui de Aquino Sales do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, os membros da Banca Examinadora, composta pelos professores: Profa. Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO, atuando como presidente, Profa. Dra. LUCIANA MARIA SILVA DE SEIXAS MAIA, atuando como primeiro examinador, Profa. Dra. SILVIA REGINA JAMELLI, atuando como segundo examinador, para julgar o trabalho intitulado **"ASPECTOS MORFOLOGICOS DO DESENVOLVIMENTO DO OSSO ALVEOLAR DE FILHOTES DE RATAS TRATADAS COM FLUOXETINA DURANTE A GESTAÇÃO"**, do CD. JOSE ANDERSON DE BARROS MATOS, candidato ao Grau de Mestre em Odontologia, na Área de Concentração em CLINICA INTEGRADA, sob orientação da Profa. Dra. LIRIANE BARATELLA EVENCIO. Dando início aos trabalhos Profa. Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO, Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia abriu os trabalhos convidando os senhores membros para compor a Banca Examinadora, foram entregues aos presentes cópias das Normas do Curso de Mestrado em Odontologia, que trata dos critérios de avaliação para julgamento da Dissertação de Mestrado. O presidente da mesa após tomar posse conferiu os membros, seguindo convidou o candidato para expor sobre o aludido tema, tendo sido concedido trinta minutos. O candidato expôs o trabalho e em seguida colocou-se a disposição dos Examinadores para arguição. Após o término da arguição os examinadores reuniram-se em secreto para deliberações formais. Ao término da discussão, atribuiram ao candidato os seguintes conceitos: Profa. Dra. LUCIANA MARIA SILVA DE SEIXAS MAIA (**APROVADO**), Profa. Dra. SILVIA REGINA JAMELLI (**APROVADO**) Profa. Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO (**APROVADO**), o candidato recebeu três conceitos (**APROVADO**) é considerado (**APROVADO**), devendo o mesmo acatar as sugestões da Banca Examinadora, face a aprovação, fica o candidato, apto a receber o Grau de Mestre em Odontologia desde 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, O Presidente da Banca Examinadora encerra a sessão e para constar foi lavrada a presente ata que vai por mim assinada, Ozicleire Sena de Araújo e pelos demais componentes da Banca Examinadora e pela reitora da UFPE,

JOSE ANDERSON DE BARROS MATOS

PA Serviço Notarial e Registral - Ofício Único
Cartório Patrônio Arraes

Certifico que a presente cópia é a reprodução fiel do original que
foi exibido; dou fé.

POJUCA/PE, 26 de Setembro de 2011. Em test. da verdade.

Emol.: R\$ 2,38 - TSMR: R\$ 0,40 DEISE DANILA /Subst.

PA
B1033006

Reside. 02 de marzo de 2011 ■

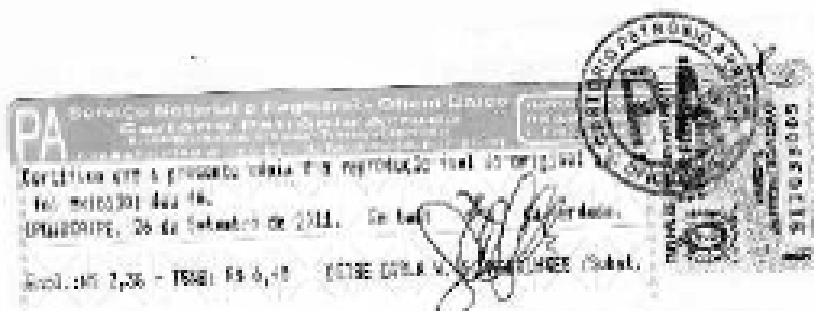
Prof.ª Dr. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO

μ_g g⁻¹ dwt

Prof.ª DR. LUCIANA MARIA SILVA DE OLIVEIRA MALA

1. **Presidential**

Prof. JUD. SILVIA RUFINKA TÁMOŠLÁ

2. **Exemplar**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
(PROPESQ)

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Dr. José Thadeu Pinheiro

COORDENADORA DA PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA INTEGRADA

COLEGIADO

Profa. Dra. Alessandra de Albuquerque T. Carvalho

Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes

Prof. Dr. Arnaldo de França Caldas Júnior

Prof. Dr. Carlos Menezes Aguiar

Prof. Dr. Claudio 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. Geraldo Bosco Lindoso Couto

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. Renata Cimões Jovino Silveira

SECRETÁRIA

Oziclere de Araújo Sena

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Carmem Suzana e José Marcos,
Ao meu irmão, José Wagner e minha vó, Mariinha
Ao meu companheiro Tony Macedo

AGRADECIMENTOS

Todo trabalho carrega no seu entorno uma multidão de colaboradores e neste não seria diferente.

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me carregado no colo nos momentos mais difíceis desta jornada, por sempre me lembrar qual era meu papel nela e por ter me possibilitado o dom da vida.

A meus pais queridos, Carmem Suzana e José Marcos, por me apoiarem incondicionalmente, possibilitando, desde o começo a realização dos meus sonhos mais malucos.

A minha avó Mariinha, fantástica nos seus conselhos e no seu amor e devoção aos meus pontos de vista e meu trabalho. Obrigado pelos jantares e conversas.

Ao meu companheiro de todas as horas, Tony Macedo, que jamais me deixou abater e me abasteceu durante todos estes anos com amor e esperança. Te amo!

Ao meu irmão, José Wagner, que com seu jeito meio introvertido me comoveu com palavras ditas na hora exata.

A minha grande amiga, Roberta Natalie, que sem pestanejar dedicou seu amor, seu tempo e seu esforço aos meus ideais. Este trabalho jamais seria possível sem você!

À Prof^a Dr^a Liriane Baratella, pelo empenho e sensibilidade na orientação e condução dos trabalhos.

Aos técnicos Maria de Fátima da Silva e Paulo, pela grande ajuda e amizade.

À cirurgiã-dentista Priscylla Correia e ao acadêmico Robério Alcântara, pelo apoio indispensável.

Aos meus colegas de mestrado, Edivânia Barbosa e Bruno Gama, pela inspiração.

EPÍGRAFE

“Põe quanto és no mínimo que fazes”

Ricardo Reis

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Fotomicrografias de osso alveolar de primeiro molar superior de ratos com 20dias. Grupo Controle (G1).....28
- Figura 2 -** Fotomicrografias de osso alveolar de primeiro molar superior de ratos com 20dias. Grupo Fluoxetina 10mg/kg de peso animal (G2).....29
- Figura 3 -** Fotomicrografias de osso alveolar de primeiro molar superior de ratos com 20dias. Grupo de Fluoxetina 20mg/kg de peso animal (G3).....30

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Número de osteoblastos do terços cervical, médio e apical distribuídos nos 3 grupos (G1, G2 e G3). Valores expressos em Média e Desvio Padrão. “*” representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)..... 31
- Gráfico 2** - Número de osteócitos do terço cervical, médio e apical distribuídos nos 3 grupos (G1, G2 e G3). Valores expressos em Média e Desvio Padrão. “*” representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).....32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de osteoblastos por terço da raiz dentária do primeiro molar superior de filhotes de ratas tratadas com solução salina 0,9% (G1), fluoxetina 10mg/kg de peso animal (G2) ou fluoxetina 20mg/kg de peso animal (G3).....33

Tabela 2 - Número de osteócitos por terço da raiz dentária do primeiro molar superior de filhotes de ratas tratadas com solução salina 0,9% (G1), fluoxetina 10mg/kg de peso animal (G2) ou fluoxetina 20mg/kg de peso animal (G3)....34

SUMÁRIO

ARTIGO.....	12
Resumo.....	13
Abstract.....	14
Introdução.....	15
Materiais e Método.....	17
Resultados.....	19
Discussão.....	21
Conclusão.....	24
Agradecimentos.....	24
Referências Bibliográficas.....	25
ANEXOS.....	35

ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO DESENVOLVIMENTO DO OSSO ALVEOLAR DE FILHOTES DE RATAS TRATADAS COM FLUOXETINA DURANTE A GESTAÇÃO.

José Anderson de Barros Matos

Mestrando em Odontologia - UFPE

Liriane Baratella Evêncio

Professor Associado do Departamento de Histologia e Embriologia – UFPE

Endereço para correspondência:

Prof^a Liriane Baratella Evêncio

Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – Recife – PE 50670-901

Fone/Fax: (81) 21268615

e-mail: liriane@uol.com.br

RESUMO

O processo de desenvolvimento do dente e do periodonto tem sido objeto de vários estudos, os quais demonstram o importante papel da serotonina durante sua histogênese e histodiferenciação. Uma atividade serotoninérgica diminuída está amplamente associada à depressão em humanos e, durante a gestação, as mulheres são consideradas grupo de risco para o desenvolvimento desta patologia. Devido a sua segurança relativa, os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS) são as drogas de escolha no tratamento, destacando-se, a fluoxetina. O presente estudo objetiva observar aspectos morfológicos e histométricos do desenvolvimento do osso alveolar do primeiro molar de ratos albinos cujas mães foram tratadas com fluotexina durante a gestação. Foram utilizadas 9 ratas prenhes: 3 para cada subgrupo, que recebiam via subcutânea: solução salina 0,9% (G1), fluoxetina 10mg/Kg (G2) ou 20mg/Kg (G3). 18 filhotes (6 por grupo) com 20 dias foram incluídos, tendo sido anestesiados com xilazina 20mg/kg de peso e quetamina 50mg/kg via intraperitoneal e submetidos à perfusão por via intra-cardíaca com formaldeído 10%. Após, foram guilhotinados e o maxilar foi descalcificado com ácido nítrico 5% por 12h, seguindo-se o processamento para análise em microscopia óptica. Com análise dos espécimes, observou-se que a quantidade e a qualidade de osso alveolar respondem a administração de fluoxetina, variando do desenvolvimento normal à completa indiferenciação, demonstrando a influência ser dose-dependente. Como conclusão tem-se que animais com mães tratadas com fluoxetina durante a gestação têm o desenvolvimento do osso alveolar retardado, acentuando-se este efeito com o aumento da dose aplicada.

Palavras-chave: serotonina; desenvolvimento; osso alveolar; gravidez; fluoxetina

ABSTRACT

The development process of teeth and periodontium is a common objective of several studies, which show the important role of serotonin during their histogenesis and histodifferentiation. A decreased serotonin activity is widely associated to human depression and pregnant women are a risk group to this pathology. Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRIs) are the main drugs in the depression treatment, especially fluoxetine. This study aims to evidence morphological and histometric aspects of alveolar bone development of upper first molar of albino rats whose mothers were treated with fluoxetine during pregnancy. 9 pregnant females rats were divided in 3 groups: control group (G1) (n=3), receiving 0,9% of saline solution, experimental group, receiving fluoxetine 10mg/kg of animal weight (G2) (n=3) and experimental group, receiving fluoxetine 20mg/kg of animal weight (G3) (n=3). 18 animals (age: 20 days) were included and anesthetized with xylazine 20mg/kg of animal weight and ketamine 50mg/kg of animal weight intraperitoneally and, after, were perfused with intracardiac passage with 10% of formaldehyde. The animals were decapitated and the upper jaw was decalcified with 5% of nitric acid for 12 hours, following the histologic processing. Specimens analysis reveals that the quantity and quality of alveolar bone are influenced by fluoxetine, being a dose dependent variable. In conclusion, animals whose mothers were treated with fluoxetine during pregnancy have the alveolar bone development retarded, being increased with the administered dose.

Keywords: serotonin; development; alveolar bone; pregnancy; fluoxetine

INTRODUÇÃO

Uma atividade serotoninérgica diminuída parece participar da fisiopatologia da depressão em humanos e em modelos experimentais ^{7, 17,26}. As drogas inibidoras seletivas de recaptação da serotonina (ISRSs) são utilizadas 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 serotonina na fenda sináptica ¹³.

Aproveitando-se dessa capacidade, os ISRSs, podem também ser utilizados como ferramenta em estudos que buscam esclarecer o papel da serotonina no desenvolvimento de diferentes tecidos. Foi comprovado que o tratamento crônico com citalopram, também um ISRSs, durante o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso, provoca, de forma duradoura, reduções do padrão de crescimento do encéfalo, crânio e eixo longitudinal de ratos neonatos ⁷.

A fluoxetina é talvez o ISRS mais utilizado no mundo inteiro. Sabe-se que a mesma ultrapassa a barreira placentária sendo encontrada em concentrações próximas de 60% da concentração no sangue materno. Apesar de ser considerada uma droga segura, por causar poucos ou quase nenhum efeito colateral, a fluoxetina é capaz de aumentar a chance de partos prematuros e de causar baixo peso ao nascer, além de dificuldades respiratórias, especialmente se a droga for administrada no último trimestre da gestação. Quando a administração ocorre em outros períodos da gestação, aparecem os chamados defeitos congênitos menores, que se desenvolvem prioritariamente na cavidade bucal, através da incidência de anodontia e hipodontia ^{2,20}.

A serotonina atua facilitando diversos aspectos do desenvolvimento dentário e craniofacial, no entanto, sua atividade nesta região está intimamente ligada a sua função no desenvolvimento das diversas estruturas que compõem o organismo humano. A partir de diversas investigações que revelaram a presença de receptores de serotonina no complexo crânio-facial desenvolveu-se o modelo hoje aceito de que a serotonina desempenha um importante papel na morfogênese craniofacial, existindo células intervenientes, as quais

executam a função de manter o nível de serotonina numa concentração específica, reforçando o papel crítico da mesma ²⁰.

A serotonina também parece estar envolvida nas relações ectoderma oral – ectomesênquima (derivado da crista neural), uma vez que qualquer perturbação neste processo leva desde defeitos menores a anomalias mais graves no complexo crânio-facial. Isto é particularmente importante quando se observa que a serotonina atua regulando a migração das células da crista neural, crescimento de células mesenquimais e sua diferenciação ^{3,10,20}.

Especificamente no desenvolvimento dentário, a serotonina também parece atuar de forma relevante. Vários estudos indicam a presença de receptores serotoninérgicos nos vários estágios da odontogênese, podendo atuar tanto como indutor da morfogênese dentária, como diretamente nela ²⁰.

Durante o desenvolvimento, especificamente na fase de campânula, o germe dentário apresenta todos os primórdios constituídos para a formação do dente e seu tecido de sustentação e proteção. Caracteriza-se por apresentar as seguintes estruturas: o órgão do esmalte, constituído de epitélio externo, retículo estrelado, estrato intermediário e epitélio interno; a papila dentária e o folículo dentário. O órgão do esmalte, entre outras funções, dará origem ao esmalte dentário; a papila dentária originará o complexo dentina-polpa e o folículo dentário, o periodonto de sustentação do dente ¹⁴.

É justamente nesta fase que os primórdios do alvéolo dentário começam a se delinear histologicamente, uma vez que osteoblastos do osso alveolar desenvolvem-se diretamente de células mesenquimais presentes no folículo dentário. Neste estágio do desenvolvimento dentário, o folículo dentário pode ser subdividido em 3 membranas: uma que se encontra em continuidade com a papila dentária e com o epitélio externo do órgão do esmalte; uma membrana externa, conhecida como membrana perifolicular e que está em íntimo contato com o osso alveolar em desenvolvimento e uma membrana que possui células esparsas entre as outras duas ⁹.

A osteogênese ocorre em momentos distintos: inicialmente, a formação do osso alveolar acompanha a mineralização e calcificação do esmalte dentário e da dentina. Com o desenvolvimento do germe dentário e posterior início da

erupção, a formação de osso alveolar sofre uma série de alterações (remodelação) a fim de que o dente recém-formado possa se acomodar de forma adequada dentro do alvéolo dentário. Para tanto, osteoclastogênese e subsequente ativação de osteoclastos desempenha papel fundamental neste processo ^{11,25}.

Estando envolvida a serotonina com desenvolvimento crânio-facial, a presença de receptores serotoninérgicos expressos em células osteoblásticas primárias e em osteoblastos maduros é bem conhecida, sugerindo que o osso em desenvolvimento teria um mecanismo de transporte e recaptação da serotonina particular ⁴.

Tendo em vista a utilização freqüente da fluoxetina durante a gestação, este estudo objetiva analisar a influência quantitativa e qualitativa no desenvolvimento do primeiro molar de filhotes de ratas tratadas com fluoxetina durante a gestação

MATERIAIS E MÉTODO

O protocolo realizado neste experimento foi aprovado (protocolo nº 23076. 006899/2008-51) (anexo 1) pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas (CEEa-UFPE), seguindo as normas internacionais sugeridas pelo National Institute of Guide for Care and Use of Laboratory Animals. A pesquisa em questão é um recorte do experimento “Aspectos morfológicos do desenvolvimento dos primeiros molares superiores (*Rattus norvegicus albinus*) tratados com cloridrato de fluoxetina”.

Foram selecionados ratos albinos da linhagem Wistar, sendo 9 fêmeas e 3 machos provenientes da colônia do biotério do Departamento de Nutrição da UFPE. A obtenção de neonatos foi realizada no biotério do Departamento de Cirurgia Experimental da UFPE, na proporção de 2 machos para 1 fêmea. Os animais receberam a dieta padrão do biotério (Labina) e água *ad libitum*, tendo sido mantidos em regime de claro/escuro de 12h em 12h cada (claro de 6h às 18h e escuro de 18h às 6h), em temperatura de 23°C ± 2°C. A prenhez foi diagnosticada através de esfregaço vaginal e posterior observação de espermatozóides associado ao ganho de peso corporal nos demais dias de observação. Foram utilizadas 9 ratas prenhes: 3 para cada subgrupo, que

recebiam via subcutânea: solução salina 0,9% (G1), fluoxetina 10mg/Kg (G2) ou 20mg/Kg (G3). Nos 3 grupos as aplicações foram realizadas em horários estabelecidos (07h às 08h), diariamente, do 1º a 20º dia de gestação.

18 filhotes (6 por grupo de estudo), de ambos os sexos ao atingirem 20 dias foram anestesiados por xilazina a 20mg/Kg de peso e quetamina, a 50mg/Kg de peso via intraperitoneal e perfundidos pela via intracardíaca por formaldeído na concentração de 10%. Posteriormente, os animais foram decapitados por guilhotinagem e os maxilares superiores foram dissecados e imersos em solução fixadora semelhante à utilizada na perfusão por 2 dias. Os espécimes foram, em seguida, descalcificados por ácido nítrico 5% (solução aquosa), por um período de 12h. A seguir, o processamento histológico convencional foi realizado, com inclusão dos espécimes em parafina para obtenção de cortes de 5- μ m de espessura e posterior coloração com hematoxilina e eosina (HE). Para a análise morfológica e histométrica foi utilizado microscópio (OLYMPUS BX 50) acoplado em uma microcâmera, conectado a um computador contendo uma placa de captura de imagem (ATI) e software para histometria (Image J, versão 1.38, Maryland, EUA). Descrição morfológica foi realizada, contemplando aspectos celulares relevantes (posição, formato e presença ou não de anormalidade celular), bem como análise do trabeculado ósseo e da medula óssea, evidenciando ou não reabsorção óssea. Para histometria, a contagem de células ósseas principais (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, presentes na faixa de osso alveolar, dos 3 terços existentes na raiz do primeiro molar superior estudado (cervical, médio e apical) foi desempenhada. Para cada terço radicular, 10 campos foram mensurados.

As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Os resultados foram expressos através da média $\pm$ D.P. Para a análise de diferença estatística entre os 3 grupos do experimento os testes de Kruskal-Wallis ou ANOVA foram realizados. Para a análise entre 2 grupos (G1xG2; G1xG3; G2xG3), os testes estatísticos de Mann-Whitney ou *t de Student* não pareado foram empreendidos.

RESULTADOS

Análise Histológica

Para melhor descrição morfológica, a divisão mostrada a seguir do osso alveolar acompanhou a divisão em terços da raiz em desenvolvimento (cervical, médio e apical) nos 3 grupos de estudo.

Terço Cervical

G1

Osso alveolar apresenta-se pouco espesso, com canais medulares bem desenvolvidos. Osteócitos com limites precisos, em lacunas bem visíveis com núcleos ovalados e levemente basófilos, rodeados por matriz acidófila. Osteoblastos dispostos na interface osso/ligamento periodontal, com núcleos basófilos e alongados. Interface osso alveolar/ligamento periodontal apresentando-se levemente irregular com poucas reentrâncias e com fibras de Sharpey visíveis (Figura 1A).

G2

Osso alveolar nitidamente fino, com superfície interrompida por conjuntivo mesenquimal, exibindo, portanto, irregularidade. Osteoblastos dispostos na superfície óssea, alguns ainda em diferenciação. Osteócitos pouco numerosos (Figura 2A).

G3

Osso alveolar bastante delgado, com áreas de pouco desenvolvimento e solução de continuidade entre ligamento periodontal e osso. Osteoblastos e células indiferenciadas apresentam-se como um fronte limitando o tecido conjuntivo e o ligamento periodontal, com interface irregular (Figura 3A).

Terço Médio

G1

Faixa de osso alveolar delgada com osteócitos bem ovalados e preenchendo quase a totalidade das lacunas, que têm tamanhos variados. Osteoblastos são observados paralelos e adjacentes ao limite osso/ligamento periodontal, alternando formas cúbicas/achatadas (Figura 1B).

G2

Osso alveolar bastante fino que o G1 com grande solução de continuidade com o ligamento periodontal. Osteoblastos com núcleos alongados dispostos na superfície do osso alveolar. Osteócitos mostram-se bem próximos entre si, contendo pouca matriz intercelular entre as lacunas (Figura 2B).

G3

Osso alveolar muito fino, estando em alguns pontos pouco desenvolvido. Ampla solução de continuidade, maior irregularidade, com grandes interrupções por conjuntivo mesenquimal. Células indiferenciadas juntamente com osteoblastos formam um blastema linear contornando a superfície do trabeculado ósseo. Osteócitos pouco numerosos e de difícil visualização (Figura 3B).

Terço Apical

G1

Osso alveolar delgado, com interface osso/ligamento periodontal irregular. Osteoblastos jovens com núcleos ovalados e volumosos dispostos de maneira irregular. Osteócitos pouco numerosos, próximos entre si, com pouca matriz intercelular (Figura 1C).

G2

Osso alveolar pouco desenvolvido, com amplas soluções de continuidade entre osso e ligamento periodontal. Osteoblastos em diferenciação, não seguindo o paralelismo usual (Figura 2C).

G3

Osso alveolar não se desenvolveu. Apenas são observadas células indiferenciadas e osteoblastos jovens (Figura 3C).

Em todos os campos analisados a quantidade de osteoclastos se revelou constante não sofrendo acréscimo com a utilização da fluoxetina.

Análise Histométrica

Dados obtidos revelam que em números absolutos, osteoblastos e osteócitos estiveram presentes em maior densidade no grupo controle, caindo de forma proporcional nos grupos experimentais ($G2 > G3$).

A análise de osteoblastos no terço cervical indicou que há diferença estatisticamente significativa apenas entre G1 e G3 ($p=0,001$). No terço médio, o número de osteoblastos do G1 em relação ao G2 e ao G3 é estatisticamente significativo ($p=0,02$ e $p=0,03$, respectivamente). Já no terço apical, a diferença significativa esteve presente entre os grupos G1 e G3, apenas ($p=0,007$). (Gráfico 1)

A análise de osteócitos no terço cervical indicou que houve diferença significativa apenas entre o G1 e G3 ($p=0,005$), enquanto que no terço médio houve diferença entre o G1 e G2 e G1 e G3 ($p=0,0036$ e $p=0,005$, respectivamente). No terço apical, a diferença foi significativa apenas entre G2 e G3 ($p=0,005$). (Gráfico 2)

DISCUSSÃO

Nossos achados demonstraram um desenvolvimento dentário normal para os 3 grupos analisados, corroborando com as conclusões encontradas por outros experimentos^{1,24}. No entanto, o osso alveolar parece ser sensível a alterações nos níveis de serotonina, variando de um tímido desenvolvimento do mesmo no G2 até a sua completa indiferenciação e ausência no G3, não sendo evidenciados pontos de reabsorção óssea, com osteoclastos mantendo um número constante nos 3 grupos.

A utilização de antidepressivos durante a gestação tornou-se um ponto crítico no manejo da depressão²³. Dentre eles, os ISRS são a classe de drogas mais utilizada, não havendo, até 2005 estudos consistentes que indicassem

associação entre esta classe de medicamentos com anomalias congênitas. Entretanto, a prevalência de defeitos do coração em neonatos parece estar associada ao uso de paroxetina, sertralina, fluoxetina e citalopram ²⁶. Até a presente data, poucos estudos longitudinais foram desenvolvidos em qualquer espécie de maneira precoce *in utero*, na prole exposta a ISRSs. Assim, investigações adicionais das conseqüências da exposição no útero a fluoxetina ou a outro IRSS, assim como dos mecanismos envolvidos, é necessária para uma compreensão do impacto destes agentes no desenvolvimento fetal ^{8,21}.

Dentre os ISRS, a fluoxetina é a droga mais prescrita para o tratamento da depressão durante a gestação. Ainda que a fluoxetina não esteja envolvida com defeitos congênito maiores, transtornos durante o parto e efeitos adversos sobre os neonatos são bem estabelecidos², especialmente se a droga é administrada no último trimestre da gestação, estando de acordo com os resultados aqui descritos, principalmente no que se refere ao desenvolvimento do osso alveolar.

Estudo epidemiológico de Buznikov ⁶ (1996) demonstrou que a utilização da fluoxetina aumenta o risco do desenvolvimento de anomalias dentárias, como hipodontia, anodontia e dentes inclusos. Isto é verdadeiro se observada a influência da mesma nos mais variados mecanismos de morfogênese e diferenciação de estruturas craniofaciais, particularmente, o germe dentário, constatada por diversos estudos em culturas de células e embriões de ratos ^{15,16}. Em particular, células ósseas parecem desenvolver uma dinâmica única de metabolismo, com expressão de receptores para serotonina em maior quantidade do outros tecidos do organismo ³. Isto explicaria uma sensibilidade aumentada do osso, quando se referem a anomalias congênitas ditas maiores, como exemplificam diversos experimentos ^{3,27}. Dados do nosso experimento demonstraram que a influência da droga está ligada à formação do osso alveolar, interferindo também no padrão de crescimento do ligamento periodontal, causando-lhe hipertrofia, sugerindo que após a erupção completa do elemento dentário, este tenha possa ter seu suporte comprometido.

Aos 20 dias de idade, ratos estão com o primeiro molar superior em fase final de rizogênese (2/3 terços da raiz dentária formada) e em franca erupção¹.

A utilização da fluoxetina na presente investigação indica que há retardo no padrão de crescimento ósseo, podendo sugerir que em idades mais avançadas a existência de problemas oclusais (infra-oclusão).

Bliziotis et al.³ (2001) indica que o uso de fluoxetina altera de forma quantitativa e qualitativa o osso sistêmico, inibindo seu crescimento normal e o volume de massa óssea trabecular. Mortazavi et al.²² (2009) demonstra que o potencial de alteração de células osteoblásticas deve ser levado em consideração quando da administração de fluoxetina, pois dificulta a regeneração óssea. Warden et al.²⁷ (2005) que relata que o crescimento ósseo em ratos submetidos a anti-depressivos inibidores da recaptação seletiva da serotonina é diminuído. Todos eles demonstraram características semelhantes às encontradas no presente estudo.

Em concordância, ainda, com estes trabalhos, o presente experimento demonstra que células ósseas, especialmente osteoblastos, são sensíveis a perturbações do metabolismo da serotonina, entretanto, este evento depende da dose aplicada. Experimento de Silva et al.²⁴ (2010), conclui que não há alterações significativas no desenvolvimento do germe dentário utilizando-se a dose de 10mg/kg de peso animal em ratos, o que está em total acordo com os resultados no nosso estudo, mesmo que com esta dose alguns efeitos no osso alveolar sejam perceptíveis. Também Bonnet et al.⁵ (2007) relatou que com dose de 10mg/kg de peso animal há desorganização na arquitetura, microarquitetura e biodinâmica do osso sistêmico estudado.

Ainda que não hajam relatos na literatura de que o osso alveolar sofra alteração quando da administração de fluoxetina ou outros antidepressivos, diversos estudos^{3,12,19} em ossos de origem sistêmica devem ser levados em consideração, ensejando, portanto a realização de experimentos mais elaborados que permitam a detecção de receptores específicos ou expressos em maior quantidade, incluindo animais de menor idade e que sofram influência da droga durante a gestação e durante a amamentação. Trabalhos que possam avaliar a possível interferência da fluoxetina durante a amamentação também devem ser considerados, uma vez que ao se manter

níveis constantes da droga no plasma poderá acarretar anomalias ou falhas de desenvolvimento mais severas.

CONCLUSÃO

A interferência da fluoxetina é evidente no desenvolvimento e remodelação óssea de osso alveolar de filhotes de ratas tratadas com a droga em questão, sendo a dose (20mg/kg de peso animal) um fator relevante para a ocorrência de perturbações morfológicas e quantitativas significativas, havendo um retardo no desenvolvimento do osso alveolar.

AGRADECIMENTOS

Ao biotério do núcleo de cirurgia experimental da Universidade Federal de Pernambuco (Dra. Adriana Ferreira Cruz e Paulo), ao Laboratório do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE (Profa. Dra. Belmira Andrade, Prof. Dr. Almir Wanderley), ao Laboratório de Histologia do Departamento de Histologia e Embriologia da UFPE (Maria de Fátima da Silva).

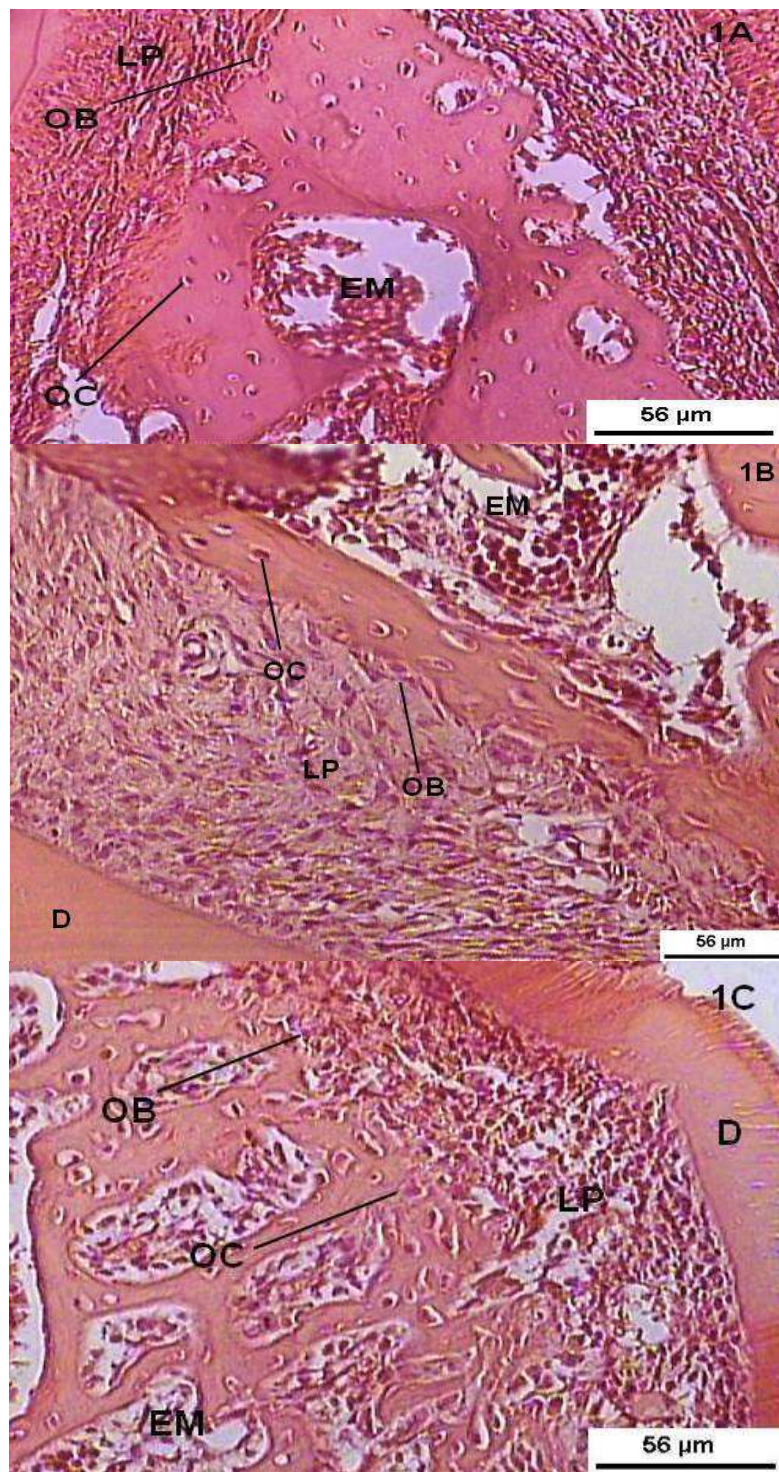
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Atikson ME. The development of the mouse periodontium. *J Periodont Res* 1972; 7: 255-60.
2. Belik, J. Fetal and neonatal effects of maternal drug treatment for depression. *Semin Perinatol* 2008; 32: 350 – 54.
3. Bliziotis MM, Eshleman AJ, Zhang X-W, Wiren KM. Neurotransmitter action in osteoblasts: expression of a functional system for serotonin activation and reuptake. *Bone* 2001; 29:477-486.
4. Bliziotis M, Gunness M, Eshleman A, Wiren K. The role of dopamine and serotonin in regulating bone mass and strength: Studies on dopamine and serotonin transporter null mice. *J Musculoskel Neuron Interact* 2002; 2(3):291-295.
5. Bonnet N, Bernard P, Beaupied H, Bizot JC et al. Various effects of antidepressant drugs on bone microarchitecture, mechanical properties and bone remodeling. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 221: 111-18.
6. Buznikov GA. The action of neurotransmitters and related substances on early embryogenesis. *Pharmacol Ther* 1984; 25 (1): 23-59.
7. Castro RM, Medeiros JMB, Cabral Filho JE, Souza SL et al. Early malnourished rats are not affected by anorexia induced by a selective serotonin reuptake inhibitor in adult life. *Nutr Neurosci* 2002; 5 (3): 211-4.
8. Cipriani A, Brambilla P, Furukawa T, Geddes J et al. Fluoxetine versus other types of pharmacotherapy for depression (Cochrane Review). *Cochrane Database Syst Rev* 2005; 19 (4): CD004185
9. Diep L, Matalova E, Mitsiadis TA, Tucker AS. Contribution of the tooth bud mesenchyme to alveolar bone. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 2009 Jul 15; 312B (5): 510-7.
10. Espinosa L, Itzstein C, Cheynel H, Delmas P et al. Active NMDA glutamate receptors are expressed by mammalian osteoclasts. *J Physiol (Lond)* 1999; 518(Pt 1):47-53.

11. Fleischmannova J, Matalova E, Sharpe PT, Misek I et al. Formation of the tooth-bone interface. *Crit Rev Oral Biol Med* 2009; 108-15.
12. Haney EM, Chan BKS, Diem SJ, Ensrud KE et al. Association of low bone mineral density with selective serotonin reuptake inhibitor use by older men. *Arch Intern Med* 2007; 167: 1246-51.
13. Hyttel J. Pharmacological characterization of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). *Int Clin Psychopharmacol* 1994 Mar; 9 (Suppl 1): 19-26.
14. Katchburian E, Arana-chaves VE. *Histologia e embriologia oral*. São Paulo: Panamericana; 2001.
15. Lauder JM, Zimmerman EF. Sites of serotonin uptake in epithelia in the developing mouse palate, oral cavity and face: possible role in morphogenesis. *J Craniofac Genet Biol* 1988; 8: 265-276.
16. Lauder JM, Moiseiwitsch JRD, Raymond JR, Tamir H. Regulation by serotonin of tooth-germ morphogenesis and gene expression in mouse mandibular explants cultures. *Arch Oral Biol* 1998; 43:789-800.
17. Luo X, Persico AM, Lauder JM. Serotonergic regulation of somatosensory cortical development: lessons from genetic mouse models. *Dev Neurosci* 2003 Mar-Aug; 25 (2-4): 173-83.
18. Mason DJ, Suva LJ, Genever PG, Patton AJ, Steuckle S, Hillam RA, Skerry TM. Mechanically regulated expression of a neural glutamate transporter in bone: a role for excitatory amino acids as osteotropic agents? *Bone* 1997; 20:199-205.
19. Mesuk B, Eaton WW, Golden SH, Wand G et al. Depression, Antidepressants, and Bone Mineral Density in a Population-Based Cohort. *J Geront* 2008; 63(12):1410-15.
20. Moiseiwitsch JRD. The role of serotonin and neurotransmitters during craniofacial development. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11 (2): 230-9.
21. Morrison JL, Riggs KW, Rurak DW. Fluoxetine during pregnancy: impact on fetal development. *Reprod. Fertil. Dev* 2005; 17 (6): 641 – 50.

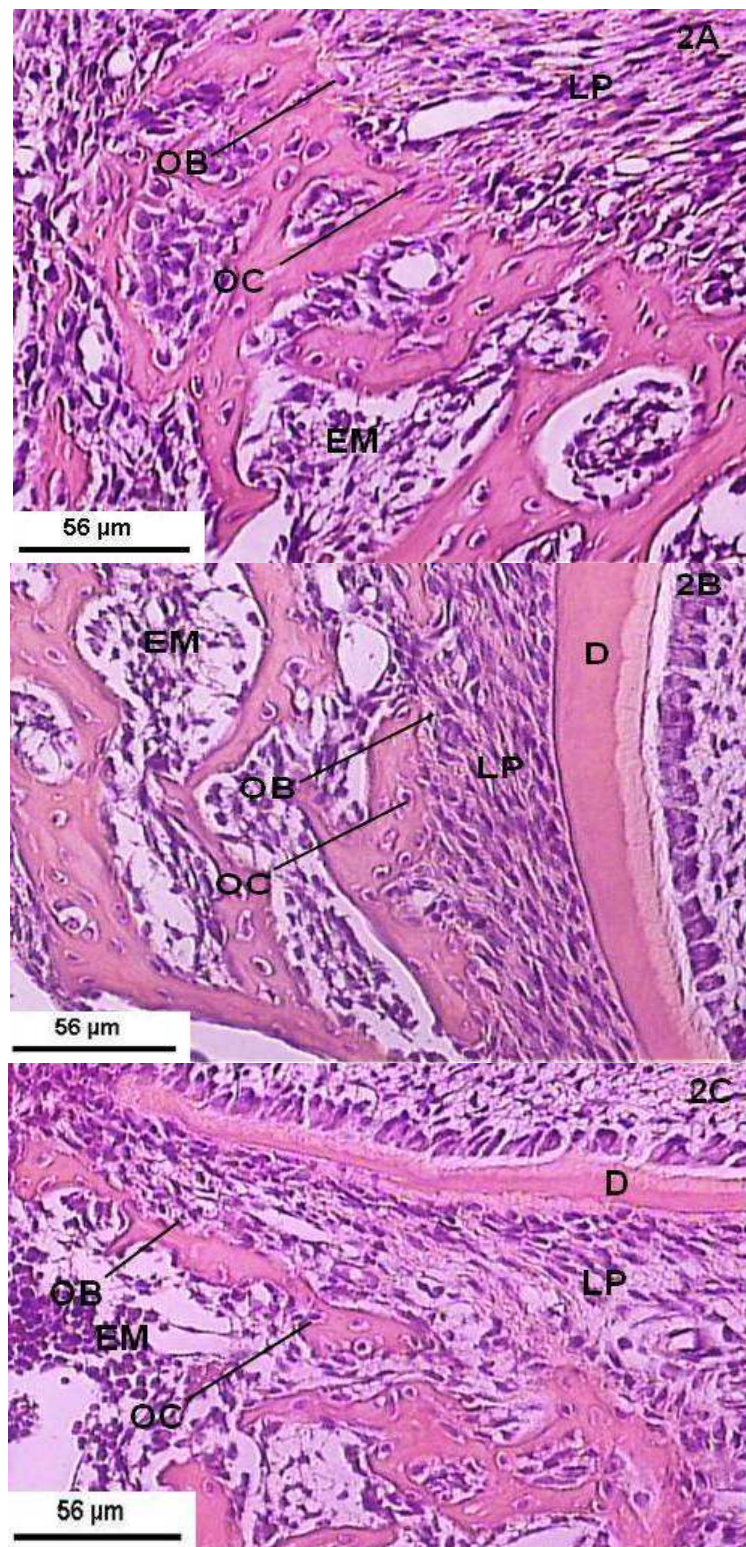
22. Mortazavi SH, Khojasteh A, Vaziri H, Khoshzaban A et al. The effect of fluoxetine bone regeneration in rat calvarial bone defects. *Oral Surg Oral Med Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 108: 22-7.
23. Sackett JC, Weller RA, Weller EB. Selective serotonin reuptake inhibitor use during pregnancy and possible neonatal complications. *Current Psych Report* 2009;11: 253-57.
24. Silva IHM, Leão JC, Evêncio LB, Porter SR et al. Morphological analysis of the enamel organ in ratas treated with fluoxetine. *Clinics* 2010; 65(1): 61-6.
25. Suzuki T, Suda N, Ohshima K. Osteoclastogenesis during mouse tooth germ development is mediated by receptor activator of NFκ-B ligand (RANKL). *J Bone Miner Metab* (2004) 22:185–191.
26. Pedersen LH, Henriksen TB, Vesteergard M, Olsen J et al. Selective serotonin reuptake inhibitors in pregnancy and congenital malformations: population based cohort study. *BMJ* 2009; 339: b3569.
27. Warden SJ, Robling AG, Sanders MS, Bliziotes MM et al. Inhibition of the serotonin (5-hydroxytryptamine) transporter reduces bone accrual during growth. *Endocrinol* 2005; 146: 685 -693.
28. Whitaker-Azmitia PM. Serotonin and brain development: Role in human developmental diseases. *Brain Res Bulletin* 2001; 56 (5): 479 - 485.

Figura 1 – Fotomicrografias de osso alveolar de primeiro molar superior de ratos com 20dias. Grupo Controle (G1).



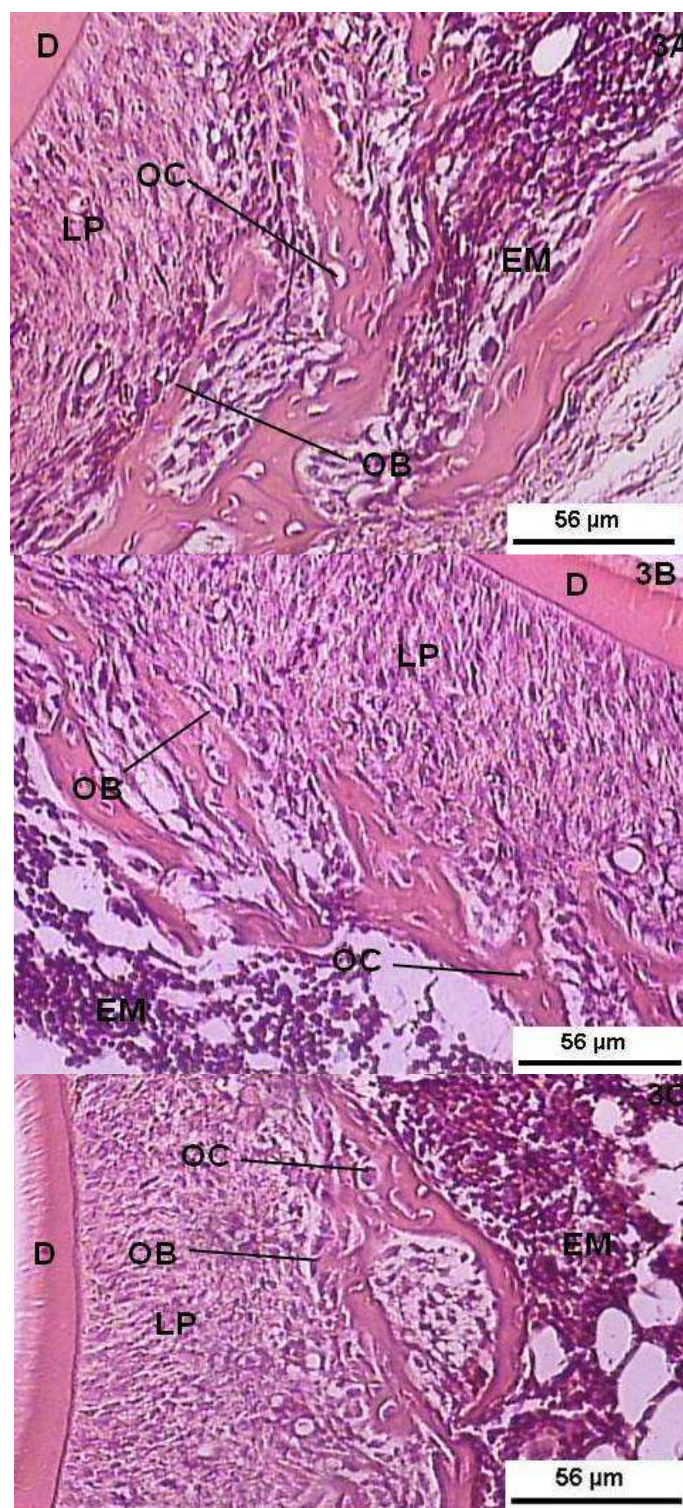
1A – Terço Cervical; 1B - Terço Médio; 1C – Terço Apical. LP – Ligamento Periodontal; OB – Osteoblasto; OC – Osteócito; EM – Espaço Medular; D - Dentina. Coloração: HE

Figura 2 – Fotomicrografias de osso alveolar de primeiro molar superior de ratos com 20 dias. Grupo Fluoxetina 10mg/kg de peso animal (G2)



2A – Terço Cervical; 2B - Terço Médio; 2C – Terço Apical. LP – Ligamento Peridontal; OB – Osteoblasto; OC – Osteócito; EM – Espaço Medular; D - Dentina. Coloração: HE

Figura 3 - Fotomicrografias de osso alveolar de primeiro molar superior de ratos com 20dias. Grupo de Fluoxetina 20mg/kg de peso animal (G3)



3A – Terço Cervical; 3B - Terço Médio; 3C – Terço Apical. LP – Ligamento Peridontal; OB – Osteoblasto; OC – Osteócito; EM – Espaço Medular; D - Dentina. Coloração: HE

Gráfico 1 – Número de osteoblastos dos terços cervical, médio e apical distribuídos nos 3 grupos (G1, G2 e G3). Valores expressos em Média e Desvio Padrão. “*” representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), utilizando os testes de ANOVA + *t de Student* ou Kruskal-Wallis + Mann-Whitney.

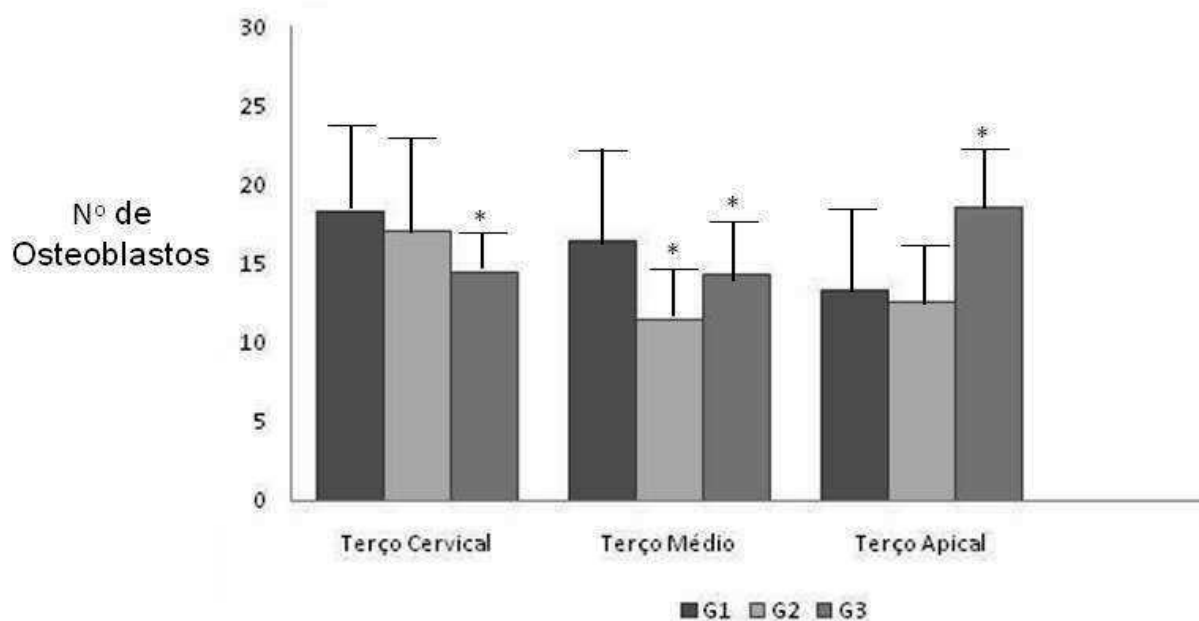


Gráfico 2 - Número de osteócitos dos terços cervical, médio e apical distribuídos nos 3 grupos (G1, G2 e G3). Valores expressos em Média e Desvio Padrão. “*” representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), utilizando os testes de ANOVA + *t de Student*.

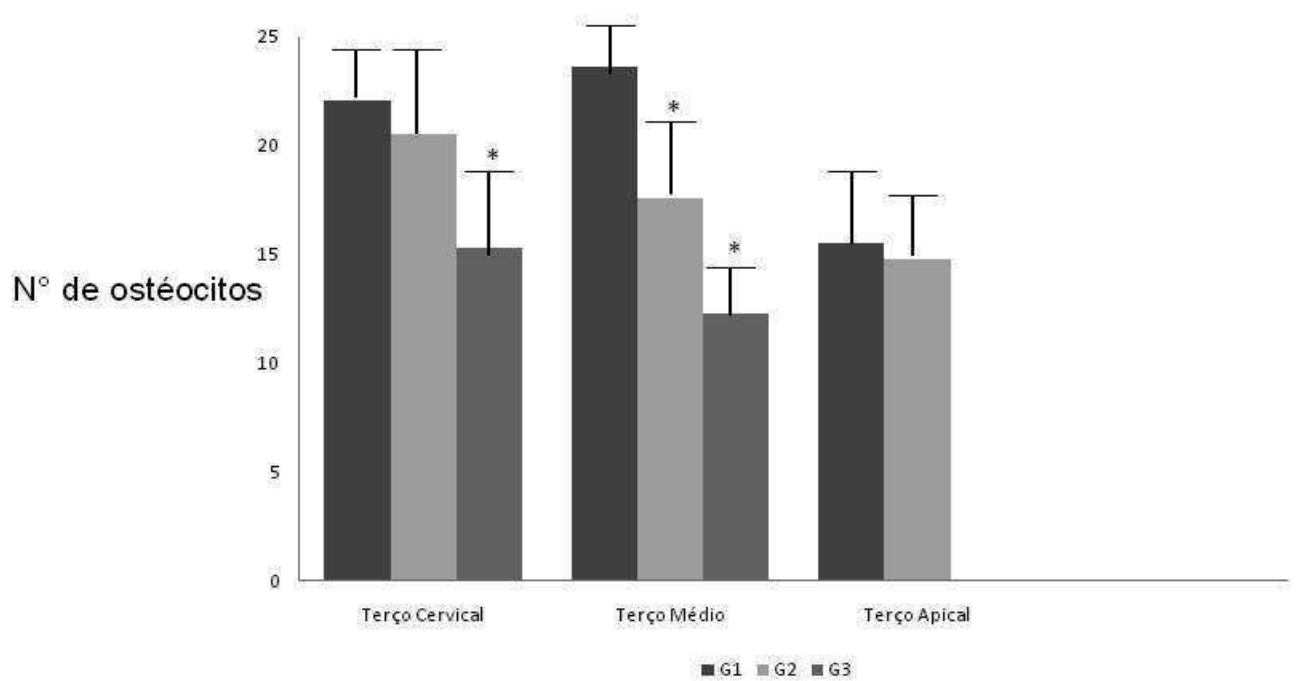


Tabela 1 - Número de osteoblastos por terço da raiz dentária do primeiro molar superior de filhotes de ratas tratadas com solução salina 0,9% (G1), fluoxetina fluoxetina 10mg/kg de peso animal (G2) ou fluoxetina 20mg/kg de peso animal (G3).

Terço	Estatísticas	G1	G2	G3	Valor de p
• Cervical	Média	18,90	16,70	13,00	$p^{(1)}=0,006^*$
	Desvio padrão	3,80	5,30	2,70	
	Coef. variação	20,10	31,73	20,76	
	Mínimo	13,00	9,00	6,00	
	Máximo	27,00	31,00	24,00	
• Médio	Média	17,30	11,40	12,30	$p^{(2)}=0,01^*$
	Desvio padrão	6,10	4,00	3,40	
	Coef. variação	35,26	35,08	27,64	
	Mínimo	8,00	10,00	8,00	
	Máximo	29,00	30,00	21,00	
• Apical	Média	13,70	13,80	19,00	$p^{(2)}=0,005^*$
	Desvio padrão	3,90	3,40	4,00	
	Coef. variação	22,54	24,63	21,05	
	Mínimo	9,00	10,00	5,00	
	Máximo	24,00	28,00	28,00	

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%.

(1): Através do teste de Kruskal-Wallis na comparação entre os terços.

(2): Através do teste ANOVA para comparação entre os terços.

Tabela 2 - Número de osteócitos por terço da raiz dentária do primeiro molar superior de filhotes de ratas tratadas com solução salina 0,9% (G1), fluoxetina 10mg/kg de peso animal (G2) ou fluoxetina 20mg/kg de peso animal (G3).

Terço	Estatísticas	G1	G2	G3	Valor de p
• Cervical	Média	22,20	21,10	14,70	$p^{(1)}=0,007^*$
	Desvio padrão	4,40	4,90	6,10	
	Coef. variação	19,81	23,22	41,49	
	Mínimo	14,00	13,00	6,00	
	Máximo	35,00	40,00	28,00	
• Médio	Média	23,30	17,40	13,30	$p^{(1)}=0,0003^*$
	Desvio padrão	4,30	3,40	6,00	
	Coef. variação	18,45	19,54	45,11	
	Mínimo	12,00	9,00	7,00	
	Máximo	46,00	26,00	26,00	
• Apical	Média	16,00	14,40	19,00	$p^{(1)}=0,09$
	Desvio padrão	6,10	3,10	3,80	
	Coef. variação	38,12	21,52	20,00	
	Mínimo	8,00	10,00	8,00	
	Máximo	31,00	34,00	28,00	

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%.

(1): Através do teste ANOVA na comparação entre os terços.

(2): Através do teste ANOVA para comparação entre os terços.

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

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, 09 de dezembro de 2009

Ofício nº 241/09

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPE
Para: **Profa. Liriane Baratella Evêncio**
Departamento de Histologia- CCB
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076. 006899/2008 - 51

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEAA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado *"Aspectos morfológicos do desenvolvimento de primelros molares superiores de ratos (Rattus norvegicus albinus) tratados com cloridrato de fluoxetina"*.

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 CEEAA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

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

Observação:
Origem dos animais: Biotério do Departamento Nutrição;
Animais: Ratos Wistar; machos;
Número de animais previsto no protocolo: 09 fêmeas prenhas, para obtenção de 54 filhotes, com 90 - 126 dias de vida.
Obs.: Solicitado e aprovado 09 (nove) fêmeas em modificação ao ofício nº 49/2008; para obtenção de 54 filhotes.

Atenciosamente,

Maria Teresa Jansen
Profa. Maria Teresa Jansen
Presidente da CEEAA
UFPE

Anexo 2 – Normas da Revista Journal of Applied Oral Science

Forma e preparação de manuscritos

1 APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO

1.1 Estrutura do manuscrito

- Página de rosto (deverá ser submetida como arquivo suplementar pelo sistema de submissão online da revista) que deverá conter apenas:
 - O título do manuscrito em inglês.
 - Os nomes dos autores na ordem direta seguido da sua principal titulação e filiação institucional em inglês. Correspondências entre as titulações brasileiras e internacionais pode ser obtida em nossa home page: www.fob.usp.br/jaos.
 - Endereço completo do autor correspondente, a quem todas as correspondências devem ser endereçadas, incluindo telefone e fax bem como endereço de e-mail.

1.2 Texto

- Título e subtítulo, se necessário, do trabalho em inglês
- Resumo: deverá incluir o máximo de 300 palavras, ressaltando-se no texto uma pequena introdução, objetivo, material e métodos, resultados e conclusões.
- Palavras-chave: (correspondem às palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo). Para determinação das palavras-chave, os autores deverão consultar a lista de assuntos do "Index Medicus" e os Descritores em Ciências da Saúde – DeCS (consulta eletrônica pelo endereço: <http://decs.bvs.br/>). Deve-se usar ponto final para separar as palavras-chave, que devem ter a primeira letra da primeira palavra em letra maiúscula. Ex: Dental implants. Fixed prosthesis. Photoelasticity. Passive fit.
- Introdução: resumo do raciocínio e a proposta do estudo, citando somente referências pertinentes. Estabelecer a hipótese do trabalho.
- Material e Métodos: o material e os métodos são apresentados com detalhes suficientes para permitir a confirmação das observações. Incluir cidade, estado e país de todos os fabricantes depois da primeira menção dos produtos, reagentes ou equipamentos. Métodos publicados devem ser referenciados e discutidos brevemente, exceto se modificações tenham sido feitas.

Indicar os métodos estatísticos utilizados, se aplicável. Consultar o item 3 para princípios éticos e registro de ensaios clínicos.

- Resultados: apresenta os resultados em uma seqüência lógica no texto, tabelas e ilustrações. Não repetir no texto todos os dados das tabelas e ilustrações, enfatizando somente as observações importantes. Utilizar o mínimo de tabelas e ilustrações possível.

- Discussão: enfatizar os aspectos novos e importantes do estudo e as conclusões resultantes. Não repetir em detalhes dados ou informações citadas na introdução ou resultados. Relatar observações de outros estudos relevantes e apontar as implicações de seus achados e suas limitações.

- Conclusão(ões): (quando houver).

- Agradecimentos: (quando houver) - agradeça pessoas que tenham contribuído de maneira significativa para o estudo. Especifique auxílios financeiros citando o nome da organização de apoio de fomento e o número do processo.

- Referências (ver item 2.3)

2 NORMALIZAÇÃO TÉCNICA

O manuscrito deve ser digitado com: espacejamento de 1,5, fonte ARIAL, tamanho 11, 3cm de margem de cada um dos lados, papel A4, perfazendo um total de, no máximo, 15 páginas, incluindo ilustrações (gráficos, fotografias, tabelas, etc). Os autores devem manter uma cópia do manuscrito para eventuais solicitações.

2.1 Ilustrações e Tabelas

2.1.1 As ilustrações (fotografias, gráficos, desenhos, quadros etc.), serão consideradas no texto como figuras, sendo limitadas ao mínimo indispensáveis e devem ser adicionadas em arquivos separados, numeradas consecutivamente em algarismos arábicos segundo a ordem em que aparecem no texto.

2.1.2 As fotografias deverão ser encaminhadas em cores originais, digitalizadas em formato .tif, .gif ou .jpg, com **no mínimo de 300dpi de resolução e 10cm de largura**. Essas fotos deverão estar em arquivos separados **e não inseridas no texto do Word**.

2.1.3 As legendas correspondentes deverão ser claras, concisas e localizadas ao final do trabalho em forma de lista separada e precedidas da numeração

correspondente.

2.1.4 As tabelas deverão ser logicamente organizadas, numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. A legenda será colocada na parte superior das mesmas. As tabelas deverão ser abertas nas laterais direita e esquerda.

2.1.5 As notas de rodapé serão indicadas por asteriscos e restritas ao mínimo indispensável.

2.2 Citação de autores

A citação dos autores no texto poderá ser feita de duas maneiras:

1) Somente numérica: ... and interfere with the bacterial system and tissue system^{3,4,7-10}. As referências devem ser citadas em ordem ascendente no parágrafo.

2) ou alfanumérica:

- Um autor: Silva²³ (1986)
- Dois autores: Silva and Carvalho²⁵ (1987)
- Três autores: Ferreira, Silva and Martins²⁷ (1997)
- mais que três autores: Silva, et al.²⁸ (1998)

Caracteres de pontuação tal como "pontos" e "vírgulas" devem ser colocados depois da citação numérica dos autores. Ex: Ferreira³⁸.

2.3 Referências

As Referências deverão obedecer aos requisitos "Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals – Vancouver", para a submissão de manuscritos a revistas biomédicas - disponível no seguinte endereço eletrônico:

http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

2.3.1 Toda referência deverá ser citada no texto. Elas devem ser **ordenadas alfabeticamente** pelo sobrenome do autor e numeradas em ordem crescente. A ordem de citação no texto obedecerá a esta numeração. As abreviaturas dos títulos dos periódicos internacionais citados deverão estar de acordo com o Index Medicus/ MEDLINE.

2.3.2 Não incluir comunicações pessoais e materiais bibliográficos sem data de publicação na lista de

referências.

2.3.3 Teses, dissertações, monografias e resumos não serão aceitos como referências.

2.3.4 Listar os nomes dos 6 primeiros autores do trabalho; excedendo este número, os 6 primeiros autores do trabalho devem ser citados, seguidos pela expressão ", et al.", que deve ser seguida por "ponto" e não escrita em itálico. Ex: Uhl, et al.

2.3.5 Não ultrapassar a citação de 30 referências, exceto para artigos de revisão de literatura a convite do Editor-Chefe.

Exemplos de referências:

Livro

Melberg JR, Ripa LW, Leske GS. Fluoride in preventive dentistry: theory and clinical applications. Chicago: Quintessence; 1983.

Capítulo de Livro

Verbeeck RMH. Minerals in human enamel and dentin. In: Driessens FCM, Woltgens JHM, editors. Tooth development and caries. Boca Raton: CRC Press; 1986. p. 95-152.

Artigo de periódico

Wenzel A, Fejerskov O. Validity of diagnosis of questionable caries lesions in occlusal surfaces of extracted third molars. Caries Res. 1992;26:188-93.

Artigos com mais de 6 autores:

Citam-se até os 6 primeiros seguidos da expressão " ,et al."

Parkin DM, Clayton D, Black, RJ, Masuyer E, Friedl HP, Ivanov E, et al. Childhood - leukaemia in Europe after Chernobyl: 5 years follow-up. Br J Cancer. 1996;73:1006-12.

Artigo sem autor

Seeing nature through the lens of gender. Science. 1993;260:428-9.

Volume com suplemento e/ou Número Especial

Davidsdson CL. Advances in glass-ionomer cements. J Appl

Oral Sci. 2006;14(sp. Issue):3-9.

Fascículo no todo

Dental Update. Guildford 1991 Jan/Feb;18(1).

A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores.

3 PRINCÍPIOS ÉTICOS E REGISTROS DE ENSAIOS CLÍNICOS

3.1 Procedimentos experimentais em animais e humanos. O periódico Journal of Applied Oral Science endossa os princípios incorporados na Declaração de Helsinki e insiste que todas as pesquisas que envolvam seres humanos publicadas nesta Revista, sejam conduzidas em conformidade com esses princípios e com outros similares dispostos nos respectivos Comitês de Ética em Pesquisa das respectivas instituições de origem dos autores. No caso de experimentos com animais, estes devem seguir os mesmos princípios de ética envolvidos. Em experimentos que envolvam procedimentos cirúrgicos em animais, os autores devem descrever na seção de Material e Métodos evidências de que a dosagem anestésica produziu efeito adequado e por tempo necessário para a condução do ato cirúrgico. Todos os experimentos com humanos ou animais devem vir acompanhados de descrição, na seção de Material e Métodos de que o estudo foi aprovado pelos respectivos órgãos que gerenciam a Ética em Pesquisa nas suas instituições de origem. O Editor-Chefe e o Conselho Editorial se reservam o direito de recusar artigos que não demonstrem evidência clara de que esses princípios foram seguidos ou que, ao julgamento dos mesmos, os métodos empregados não foram apropriados para o uso de humanos ou animais nos trabalhos submetidos à este periódico.

Registros de Ensaios Clínicos – International Standard Randomized Controlled Trial Number (ISRCTN)

O periódico Journal of Applied Oral Science apóia as políticas para registro de ensaios clínicos da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (ICMJE), reconhecendo a importância dessas iniciativas para o registro e divulgação internacional sobre estudos clínicos com acesso aberto. Sendo assim, somente serão aceitos para publicação os artigos de pesquisas clínicas que tenham recebido um número de identificação, o ISRCTN, em um dos registros de ensaios clínicos, validados pelos critérios estabelecidos pela OMS e pelo ICMJE. A OMS define Ensaio Clínico como "qualquer estudo de pesquisa que prospectivamente designa participantes humanos ou grupos de humanos

para uma ou mais intervenções relacionadas à saúde para avaliar os efeitos e os resultados de saúde. Intervenções incluem, mas não se restringem a drogas, células e outros produtos biológicos, procedimentos cirúrgicos, procedimentos radiológicos, dispositivos, tratamentos comportamentais, mudanças no processo de cuidado, cuidado preventivo etc."

Para realizar o registro do Ensaio Clínico acesse um dos endereços abaixo:

Registro no **Clinicaltrials.gov**

URL: <http://prsinfo.clinicaltrials.gov/>

Registro no **International Standard Randomized Controlled Trial Number (ISRCTN)**

URL: <http://www.controlled-trials.com/>

4 OUTRAS QUESTÕES SERÃO RESOLVIDAS PELO EDITOR-CHEFE E CONSELHO EDITORIAL

Envio de manuscritos

1 SUBMISSÃO DO TRABALHO

1.1 Os manuscritos deverão ser submetidos por meio do endereço: <http://www.scielo.br/jaos>

1.2 O autor correspondente deverá manter uma cópia do original em formato Word assim como as ilustrações (quando aplicável).

1.3 O arquivo original contendo o manuscrito deve ser submetido sem a identificação dos autores e afiliações. A folha de rosto deverá ser submetida como arquivo suplementar contendo o nome dos autores, afiliações e endereço para correspondência.

1.4 As figuras devem ser submetidas como arquivos suplementares de acordo com as especificações do item 2.1 sobre forma e preparação dos manuscritos.

1.5 - As tabelas devem ser preparadas em formato Excel e devem ser submetidas como arquivos suplementares.

1.6 O formulário de submissão, assinado por TODOS os autores, deve ser submetido como arquivo suplementar contendo o seguinte texto:

A assinatura deste formulário de submissão implica

na aceitação do seguinte:

Transferência de Direitos: Considerando a aceitação do trabalho acima descrito, Eu transfiro para o **Journal of Applied Oral Science**, todos os direitos, título e interesse nos direitos autorais do artigo mencionado acima. Este documento se aplica a todas as traduções do mesmo, assim como a apresentação preliminar, sob quaisquer meios de divulgação, do trabalho aceito e ainda não publicado. Se alguma mudança na autoria (ordem, acréscimo ou eliminação) ocorrer após a submissão do trabalho, um documento de concordância de todos os autores deve ser enviado para ser mantido nos arquivos do Editor-Chefe. O nome de um autor(a) somente poderá ser removido mediante solicitação do(a) mesmo(a).

Responsabilidades do autor: Eu atesto que:
 O trabalho é original e não contém dados falsificados, plagiados ou fraudulentos;
 O conteúdo do trabalho não se encontra atualmente em apreciação, e nem será submetido para publicação em outro periódico, até que uma decisão final de não aceitação seja emitida por esta revista;
 Eu tive uma contribuição significativa para o trabalho e estou familiarizado com os dados originais descritos no mesmo;
 Eu li o trabalho por completo e assumo a responsabilidade pelo conteúdo completo da versão final que foi submetida. Entendo que se o trabalho, ou parte dele, for considerada deficiente ou fraudulenta, assumirei a responsabilidade junto com os outros autores.

Descompromisso de conflito de interesse. Todas as minhas afiliações corporativas ou institucionais e todas as fontes de apoio financeiro ao trabalho estão devidamente citadas ou mencionadas em carta anexa. Certifico que não possuo nenhum interesse comercial ou associativo que represente conflito de interesse em conexão com o trabalho submetido.

NOME: _____ ASSINATURA: _____ DATA: _____

1.7 Para maiores informações sobre o sistema de submissão online, consultar o TUTORIAL FOR AUTHORS disponível em: <http://www.scielo.br/jaos>