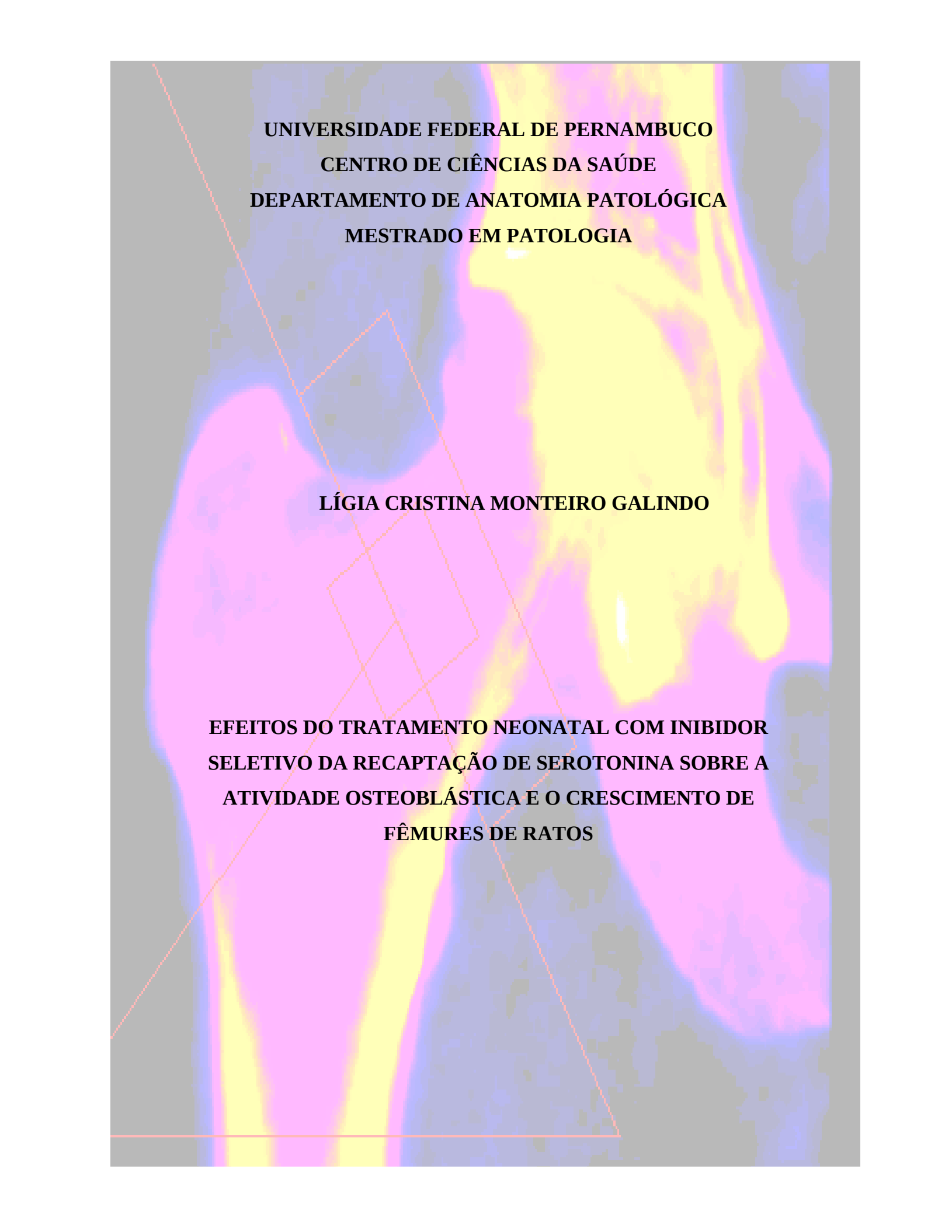




**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLÓGICA
MESTRADO EM PATOLOGIA**

LÍGIA CRISTINA MONTEIRO GALINDO

**EFEITOS DO TRATAMENTO NEONATAL COM INIBIDOR
SELETIVO DA RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA SOBRE A
ATIVIDADE OSTEABLÁSTICA E O CRESCIMENTO DE
FÊMURES DE RATOS**

LÍGIA CRISTINA MONTEIRO GALINDO

**EFEITOS DO TRATAMENTO NEONATAL COM INIBIDOR SELETIVO DA
RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA SOBRE A ATIVIDADE OSTEABLÁSTICA E O
CRESCIMENTO DE FÊMURES DE RATOS**

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Sílvia Regina Arruda de Moraes
Co-orientador: Prof. Dr. Raul Manhães-de-Castro

RECIFE
2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLÓGICA
MESTRADO EM PATOLOGIA**

LÍGIA CRISTINA MONTEIRO GALINDO

**EFEITOS DO TRATAMENTO NEONATAL COM INIBIDOR SELETIVO DA
RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA SOBRE A ATIVIDADE OSTEÓBLÁSTICA E O
CRESCIMENTO DE FÊMURES DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Patologia na área de concentração de Morfologia Aplicada, do Departamento de Anatomia Patológica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof^ª Dr^a Sílvia Regina Arruda de Moraes
Co-orientador: Prof. Dr. Raul Manhães-de-Castro

**RECIFE
2006**

Galindo, Lígia Cristina Monteiro

Efeitos do tratamento neonatal com inibidor seletivo da recaptação de serotonina sobre a atividade osteoblástica e o crescimento de fêmures de ratos / Lígia Cristina Monteiro Galindo. – Recife : O Autor, 2006.

48 folhas : il., fig. gráf.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Patologia, 2006.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Patologia – Morfometria. 2. Metabolismo ósseo – Atividade osteoblástica – Crescimento e alterações morfológicas do fêmur. 3. Desenvolvimento ósseo – Manipulação farmacológica com fluoxetina – Marcadores bioquímicos – Fosfatase alcalina. I. Título.

616.71
616.716

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
BC2006-255



Universidade Federal de Pernambuco
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

AUTOR: LIGIA CRISTINA MONTEIRO GALINDO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: MORFOLOGIA APLICADA

NOME DA TESE: “Efeitos precoces e tardios do tratamento neonatal com inibidor seletivo da recaptação de serotonina sobre a atividade osteoblástica e sobre crescimento e desenvolvimento do fêmur em ratos”

ORIENTADOR: SILVIA REGINA ARRUDA DE MORAES.

TESE DEFENDIDA E APROVADA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM PATOLOGIA.

DATA: 28/03/2006

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Liriane Baratella Evencio

Profa. Sandra Lopes de Souza

Profa. Elizabeth da Silveira Neves

DEDICO:

Aos meus pais, Eliane e Djalma, pelo incentivo, confiança e profundo amor a mim dispensados durante toda a vida.

OFEREÇO:

A Sérgio, meu querido esposo, pelo carinho e apoio constantes.

À nossa filhinha, Giovana, o mais sublime presente de nossas vidas. Sua chegada é aguardada ansiosamente!

AGRADECIMENTOS

- A DEUS, que é simplesmente ABSOLUTO;
- À minha família, reduto de amor, presente nos bons e maus momentos da minha vida;
- Ao meu esposo, Sérgio, por compreender minha ausência neste período de tanta correria;
- À querida Prof. Sílvia Regina Arruda de Moraes, pela amizade, incentivo, confiança e transmissão de tantos valores ao longo destes dos últimos dez anos. A quem chamo carinhosamente de Mãe Científica, minha eterna gratidão;
- Ao Prof. Raul Manhães-de-Castro pelas palavras de incentivo e pelo carinho com que me acolheu;
- À Sandra Lopes de Sousa, reflexo de perseverança e bondade que tenho a honra de ter como AMIGA;
- Aos queridos Tiago Franca e Milena Moura, “garotos de ouro”, pela amizade, disponibilidade e ajuda em todas as ocasiões;
- À família do Laboratório de Plexos Entéricos (LAMPE), pela companhia nos finais de semana de trabalho intenso;
- Aos amigos do Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio, especialmente a Willa, pela ajuda nas duras horas de experimento;
- Ao Dr. Edeondes França e ao Sr. Paulino, pela amizade e por me ensinarem a cuidar bem dos nossos ratinhos;
- Aos professores do Departamento de Anatomia, pelos valiosos conselhos e agradável companhia nos tempos de professora substituta;

- Aos funcionários do Departamento de Anatomia, principalmente a Paulo e Teresa, pela torcida e incentivo;
- Aos professores do Mestrado em Patologia, por contribuírem na minha formação;
- Aos funcionários do laboratório de Histotécnicas do Mestrado em Patologia, Silvânia e Sidicley, pelo apoio técnico;
- À Lúcia Maria Pires Ferreira, pelo auxílio na elaboração das estatísticas;
- Aos colegas de mestrado, pela leveza dos momentos de estudante;
- A todos os meus amigos, pelo incentivo e apoio;
- À vida, que me proporcionou conhecer estas pessoas tão especiais.

RESUMO

São crescentes as evidências de interação entre o sistema nervoso e o metabolismo ósseo. Estudos recentes evidenciam receptores glutamatérgicos, dopaminérgicos e serotoninérgicos nas células ósseas. No entanto ainda não está bem documentado o papel da serotonina no osso. No presente estudo, foi investigado o papel da serotonina sobre o crescimento e desenvolvimento do tecido ósseo em ratos. Foram utilizados 60 ratos machos *Wistar* com idades de 30 e 90 dias. Para cada idade, os animais foram divididos em dois grupos: tratado e salina. Ao grupo tratado foi administrada fluoxetina, um potente inibidor seletivo da recaptação da serotonina – ISRS, em dose de 10mg/Kg p.c. (10µl/g p.c., s.c.). Ao grupo salina foi administrada solução salina a 0,9% (10µl/g). Os tratamentos foram realizados diariamente nos primeiros 21 dias pós-natais dos animais. Nas idades de 30 e de 90 dias, foram coletados para análise o fêmur e o sangue dos animais. O peso corporal ($S = 88,38 \pm 5,9$; $F = 81,34^*$), o peso relativo do fêmur ($S = 3,42 \pm 0,3$; $F = 3,21 \pm 0,22^*$) e o comprimento do fêmur ($S = 21,97 \pm 0,62$, $F = 21,27 \pm 0,78^*$) apresentaram redução nos animais tratados com fluoxetina aos 30 dias de vida (* $p < 0.05$). Os níveis séricos da fosfatase alcalina ($S = 74 \pm 11,9$; $F = 100,4 \pm 12,3^*$) apresentaram-se maiores nos animais tratados aos 30 dias de idade. Aos 90 dias de idade não houve diferenças para estes parâmetros entre os grupos. A densidade do fêmur e seu ângulo colo-diáfise não apresentaram diferenças entre os grupos ou idades. A redução do peso relativo e comprimento femorais entre os animais jovens tratados com ISRS sugere um efeito precoce do ISRS sobre o metabolismo ósseo. Já o aumento na atividade da fosfatase alcalina precocemente sugere que houve incremento da atividade osteoblástica em resposta à agressão farmacológica no período de aleitamento. Sendo assim, a influência da serotonina sobre o metabolismo ósseo parece ser evidente em idade precoce tendo em vista que houve recuperação dos parâmetros estudados entre os animais adultos tratados com ISRS.

Palavras-chave: serotonina, metabolismo ósseo, fosfatase alcalina, fluoxetina, Inibidor Seletivo da Recaptação da Serotonina.

ABSTRACT

The interaction evidences are growing between the nervous system and the bone metabolism. Recent studies evidence glutamatergic, dopaminergic and serotonergic receptors in the bone cells. However it is not still well documented the paper of the serotonin in the bone. In the present study, we investigated the role of the serotonin on the growth and development of the femur. We used 60 male rats Swiss with ages of 30 and 90 days. For each age, the animals were divided in two groups: treated with fluoxetine and non treated. The treated group received fluoxetine, a potent and selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI), at 10mg/Kg (10µl/g). The non-treated group received saline solution at 0.9% (10µl/g). The treatments were realized during the first 21 days of life. In the pre-established ages, we collected and analyzed the femur and the blood of the animals. The body weight ($S = 88.38 \pm 5.9$; $F = 81.34^*$), the relative weight of the femur ($S = 3.42 \pm 0.3$; $F = 3.21 \pm 0.22^*$) and its length ($S = 21.97 \pm 0.62$, $F = 21.27 \pm 0.78^*$) were reduced in the treated group at 30 days. Still at 30 days, the alkaline phosphatase ($S = 74 \pm 11.9$; $F = 100.4 \pm 12.3^*$) presented larger activity among the treated animals ($*p < 0.05$). At 90 days there were no differences among groups. The density of the femur and the femoral neck-shaft angle didn't present differences between the groups or ages. The precocious reduction of the relative weight and femoral length among the treated young animals with SSRI suggest a short term effect of this drug. The increase in the activity of the alkaline phosphatase in a precocious way indicates the increment of the osteoblastic activity as a compensatory mechanism to the newborns pharmacological aggression. These findings show interaction between bone metabolism and serotonin only in young rats treated with SSRI.

KEY WORDS: serotonin, bone metabolism, alkaline phosphatase, fluoxetine, Selective Serotonin Reuptake Inhibitor.

LISTA DE FIGURAS

1. Organograma dos grupos experimentais	20
2. Anestesia e punção cardíaca dos animais experimentais	21
3. Excisão e dissecação do fêmur	22
4. Aferição do peso absoluto do fêmur	23
5. Mensuração do comprimento do fêmur	24
6. Aferição da densidade do fêmur	25
7. Mensuração do ângulo colo- diafisário	26
8. Centrifuga e espectrofotômetro, respectivamente	27
9. Gráfico representando o peso corporal	29
10. Gráficos representando o peso absoluto e o peso relativo do fêmur	30
11. Gráfico representando o comprimento do fêmur	31
12. Gráfico representando a densidade do fêmur	32
13. Gráfico representando o ângulo colo-diafisário do fêmur	33
14. Gráfico representando os níveis séricos de fosfatase alcalina	34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Animais experimentais	19
3.2 Grupos de estudo	20
3.3 Peso corporal, eutanásia e coleta dos materiais	21
3.4 Obtenção dos pesos absoluto e relativo do fêmur	23
3.5 Aferição do comprimento do fêmur	24
3.6 Aferição da densidade do fêmur	25
3.7 Mensuração do ângulo colo-diáfise do fêmur	26
3.8 Dosagem da fosfatase alcalina	27
3.9 Análise estatística	28
4. RESULTADOS	29
4.1 Peso corporal	29
4.2. Peso do fêmur	30
4.3. Comprimento do fêmur	31
4.4 Densidade do fêmur	32
4.5 Ângulo colo-diafisário do fêmur	33
4.6 Níveis séricos de fosfatase alcalina	34
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÕES	40
7. PERSPECTIVAS	41
REFERÊNCIAS	42
ANEXOS	49

Entrega teu caminho ao **Senhor**,
confia **nele** e o mais ele fará.
Salmos 37:5

1. INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é o principal constituinte do esqueleto sendo composto por um tipo especializado de tecido conjuntivo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Os principais tipos celulares que compõem o tecido ósseo são: células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Este conjunto de células produz, mantém, adapta ou repara, se necessário, a matriz óssea mineralizada (WESTBROEK *et al.*, 2001).

Derivadas do mesênquima embrionário, as células osteoprogenitoras possuem potencialidade de diferenciação em osteoblastos (GARTNER; HIATT, 2001). Localizados na superfície do osso, os osteoblastos são responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea (BURGER; KLEIN-NULEND, 1999; GARTNER; HIATT, 2001).

Os osteócitos se diferenciam a partir dos osteoblastos e situam-se em lacunas no interior da matriz óssea calcificada (BURGER; KLEIN-NULEND, 1999). Osteócitos vizinhos formam, entre si, junções comunicantes a partir da emissão de prolongamentos que se acomodam no interior dos canálculos presentes entre as lacunas (BURGER; KLEIN-NULEND, 1999; GARTNER; HIATT, 2001; PARFITT, 2002). Os osteócitos são células sensoriomecânicas por excelência (WESTBROCK *et al.*, 2001). Eles traduzem estímulos mecânicos resultantes da força gravitacional e muscular sobre o esqueleto, em sinais bioquímicos. Os osteoblastos e osteoclastos, fundamentais para a adaptação da massa e estrutura ósseas, são ativados por estes sinais (PARFITT, 2002; BURGER; KLEIN-NULEND, 1999). Dessa forma, através da mecanotransdução, os osteócitos modulam atividades associadas com a remodelação e com a produção de tecido ósseo (TATE *et al.*, 2004).

Os osteoclastos derivam de células precursoras da linhagem monócito-macrófago e são altamente diferenciados para a reabsorção óssea (BURGER; KLEIN-NULEND, 1999; TANAKA *et al.*, 2003). Os osteoclastos ocupam depressões rasas chamadas lacunas de Howship (GARTNER; HIATT, 2001). Assim como os macrófagos, os osteoclastos são atraídos por células em apoptose (BRONCKERS *et al.*, 2000).

No crescimento e desenvolvimento do tecido ósseo, deposição e reabsorção ósseas acontecem de forma harmônica compondo dois processos: modelagem e remodelação (RAISZ, 1999; GENESER, 2004).

Segundo Geneser (2004), na modelagem, que em humanos ocorre até que seja obtido o pico de massa óssea (entre 20 e 25 anos de idade), as atividades osteoblástica e osteoclástica são independentes com o predomínio da formação. Já a remodelação começa na primeira infância e se prolonga até 30 a 40 anos de idade. Ainda de acordo com este autor, neste processo, osteoblastos e osteoclastos trabalham de forma acoplada como uma Unidade Multicelular Básica (BMU) com o objetivo de substituir o tecido ósseo envelhecido, reorganizar a estrutura trabecular do tecido ósseo e assegurar a manutenção da homeostase do cálcio.

Em ratos, a ausência de fechamento entre a epífise e a diáfise dos ossos longos dificulta a determinação da maturidade esquelética (BLAND, 2000). Em ratas e ratos *Sprague-Dawley*, foi verificado que ocorre redução no crescimento esquelético entre 7 a 8 meses de idade (HARLAN, 2005). Baseando-se neste fato, pode-se dizer que os ratos alcançam sua maturidade esquelética em torno dos 210 dias de vida (EDITORIAL OPINION, 2005).

Sabe-se que os eventos de crescimento e desenvolvimento são observados em todo o organismo e podem ser modificados por diversos fatores exógenos, tais como alterações nutricionais (MORGANE *et al.*, 1978) ou por manipulações farmacológicas dos sistemas de

neurotransmissores (MANHÃES DE CASTRO *et al.*, 1993). Podem ocorrer drásticas mudanças morfo-funcionais quando estas agressões acontecem numa etapa vulnerável do desenvolvimento (NOBACK; EISENMAN, 1981). O período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso corresponde a essa etapa vulnerável (MORGANE *et al.*, 1993). Este período varia entre as diferentes espécies: em humanos, inicia-se no último trimestre de gestação e perdura até os três ou quatro primeiros anos de vida (MORGANE *et al.*, 1978). No rato, compreende as três primeiras semanas de vida pós-natal (MORGANE *et al.*, 1978).

Dentre os sistemas de neurotransmissores, o sistema serotoninérgico apresenta-se como tema de interesse em estudos sobre desenvolvimento pela extensão e diversidade de funções as quais está relacionado (JACOBS; AZMITIA, 1992; MAGALHÃES, 2000). A bioamina serotonina ou 5-Hidroxitriptamina (5-HT), além de funcionar como neurotransmissor, regula o crescimento de tecidos neurais e não-neurais (LAUDER, 1990; BUZNIKOV; LAMBERT; LAUDER, 2001). O neurotransmissor 5-HT exerce duplo papel no desenvolvimento: autoregulação dos neurônios serotoninérgicos e desenvolvimento de tecidos-alvo (WHITAKER – AZMITIA *et al.*, 1996). Cada função pode ser mediada por uma variedade de receptores 5-HT localizados em células neuronais e não neuronais (LAUDER, 1990).

O sistema de neurotransmissão serotoninérgico é constituído por neurônios que produzem e liberam a serotonina e por todos os seus receptores. A serotonina exerce suas funções através da interação com seus múltiplos e variados receptores (BARNES; SHARP, 1999). Estes podem estar localizados em diferentes tipos de células, como neurônios, células da glia, células endoteliais e endodimárias, entre outras (AZMITIA, 2001). Com base nas suas características estruturais e operacionais, estes receptores estão divididos em sete classes distintas (5-HT₁ a 5-HT₇), sendo identificados 14 subtipos (HOYER; HANNON; MARTIN, 2002).

A participação de neurotransmissores na regulação do metabolismo ósseo tem sido objeto de interesse e investigação científica crescentes (BLIZIOTES *et al.*, 2001; BLIZIOTES *et al.*, 2002). A interação entre fatores humorais e a atividade de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos já está bem estabelecida (WESTBROEK, *et al.*, 2001). Entretanto, há crescentes evidências de que outros fatores, particularmente elementos do sistema neural, estejam relacionados à regulação do metabolismo ósseo (LAKETIC`- LJUBOJEVIC` *et al.*, 1999; TAKEDA; KARSENTY, 2001; JONES *et al.*, 2004; WARDEN, 2005b). Por exemplo, a presença de neurônios imunorreativos para neuropeptídeos no osso indica presença de inervação sensorial e simpática no osso (HARA-IRIE; AMIZUCA; OZAWA, 1996; SERRE *et al.*, 1999).

Segundo Bhangu *et al.* (2001), a presença de receptores glutamatérgicos em osteoblastos e osteoclastos sugere mecanismo de sinalização semelhante ao que ocorre na neurotransmissão. Osteoblastos também expressam suporte molecular para regular a exocitose de glutamato na presença de neurônios pré-sinápticos. Ainda segundo estes autores, a deleção do gene transportador da dopamina resultou em anormalidades esqueléticas em ratos, sugerindo influência dopaminérgica na formação da estrutura óssea.

Há ainda evidências de interneurônio na estrutura óssea cujo neurotransmissor é a serotonina (TURNER *et al.*, 2002). No interior do periósteo, foram identificados receptores 5-HT em osteoblastos, precursores dos osteoblastos e osteócitos (BLIZIOTES *et al.*, 2001; WESTBROEK *et al.*, 2001). Transportadores de serotonina (5-HTT) e de múltiplos receptores de 5-HT foram evidenciados em osteoblastos de ratos (BLIZIOTE *et al.*, 2002). Além disso, o método do cDNA reverso transcrito do RNAm indicou um alto grau de expressão de receptores 5-HT_{2B} em osteócitos de galinhas e de camundongos Swiss adultos (WESTBROEK *et al.*, 2001). Ainda segundo esses autores, a presença dos receptores 5-HT_{2B} sugere que eles participem da regulação sensoriomecânica dos osteócitos. Westbroek *et al.* (2001), ainda

propõem que na regulação sensoriomecânica, a serotonina inibe o fluxo do fluido lacuno-canalicular e causa um “pulso” detectado pelos osteócitos e traduzido nas moléculas sinalizadoras, como prostaglandinas e óxido nítrico. Dessa transdução resultaria a regulação dos osteócitos e osteoblastos para o carregamento. Processo semelhante ocorre em resposta às cargas mecânicas.

A 5-HT também potencializa o efeito do paratormônio (PTH), induzindo produção de colagenase por osteoblastos (BLIZIOTES *et al.*, 2001). Este achado sugere que os osteoblastos expressam mecanismos para responder e regular a captação de 5-HT (BLIZIOTES *et al.*, 2001; BLIZIOTES *et al.*, 2002). Adicionalmente, este neurotransmissor parece relacionar-se com remodelação óssea e reparo de fraturas através de estímulo às células precursoras de osteoblastos (WESTBROEK *et al.*, 2001) e com a regulação da morfogênese craniofacial (MOISEWITSCH, 2000; BLIZIOTES *et al.*, 2002).

Os Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina (ISRSs) antagonizam os 5-HTTs aumentando a disponibilidade sináptica de 5-HT (YAVARONE *et al.*, 1993). Durante o período neonatal, a maior disponibilidade desta bioamina pode potencializar ou inibir sua ação gerando repercussões sobre o sistema nervoso e outros tecidos-alvos (MANHÃES DE CASTRO *et al.*, 2001.) Evidências clínicas preliminares, levantam questões sobre os efeitos dos ISRSs no crescimento ósseo (WARDEN *et al.*, 2005a).

Os ISRSs são, com frequência, prescritos para tratar depressão em crianças e em adolescentes (WARDEN *et al.*, 2005b). Em humanos, evidências clínicas apontam efeitos colaterais dessas drogas no crescimento ósseo já que adolescentes usuários de ISRS manifestaram atenuação do crescimento durante a terapia medicamentosa (WEINTROB *et al.*, 2002). Observou-se ainda alto risco de crianças usuárias de ISRS apresentarem defeitos no desenvolvimento dos dentes como adontia e hipodontia (MOISEWITSCH, 2000).

Em estudos experimentais, embriões de ratos expostos a ISRSs, tais como, sertralina, fluoxetina e amitriptilina, apresentaram má formação crânio-facial (SHUEI; SADLER; LAUDER, 1992). Ratos neonatos tratados com ISRS demonstraram redução no peso femoral (SUASSUNA, 2004) no tamanho, no peso corporal e no peso de diversos órgãos (MAGALHÃES, 2004; DEIRÓ *et al.*, 2002). Tais achados evidenciam o papel trófico da serotonina no desenvolvimento de tecidos (DEIRÓ *et al.*, 2002; MAGALHÃES, 2004). Em ratos jovens, o tratamento com ISRS ocasionou déficit na formação óssea cortical e trabecular do fêmur (WARDEN *et al.*, 2005a).

Como os ossos são constituídos de tecido metabolicamente ativo em processo contínuo de remodelação (RAISZ, 1999), os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo são substâncias utilizadas na prática clínica há décadas para retratar formação ou reabsorção ósseas (VIEIRA, 1999). Sendo assim, o uso desses marcadores se aplica a qualquer condição que leve à alteração do metabolismo ósseo (WELSH *et al.*, 1997), inclusive estudos clínicos ou testes de drogas que alterem o crescimento (SCHÖNAU; RAUCH, 1997).

Todos os marcadores de formação óssea são produtos dos osteoblastos (SCHÖNAU; RAUCH, 1997). São exemplos de marcadores de formação fosfatase alcalina, osteocalcina e peptídeos pro- colágeno tipo I (SCHÖNAU; RAUCH, 1997). Durante o processo de formação óssea a fase da produção da matriz colágena precede a mineralização e coincide com maior produção de fosfatase alcalina (STEIN; LIAN, 1993; BIKLE, 1997). Em ratos, durante a maturação da matriz colágena foi constatada proliferação de osteoblastos (SIGGELKOW *et al.*, 1999). Esta proliferação foi demonstrada através do incremento na atividade da fosfatase alcalina (SIGGELKOW *et al.*, 1999).

Embora os modelos animais espontâneos ou induzidos não sejam réplicas exatas do que ocorre em humanos, seu uso abriu novos horizontes para pesquisa em deferentes áreas o que pode ser de grande valor no estudo de situações normais e/ou patológicas (DI MASSO;

CELORIA; FONT, 1998). A facilidade de criação combinada com sua relativa fecundidade, estabeleceu o rato como o melhor modelo animal para o estudo da fisiologia e genética dos mamíferos (KLEIN *et al.*, 1998).

Há grande escassez de estudos que abordem a influência da 5-HT na maturação do osso. Sendo assim, este trabalho visa acrescentar informações científicas sobre a interação entre este neurotransmissor e o desenvolvimento esquelético em ratos manipulados farmacologicamente com um ISRS durante o período de aleitamento. O estudo dos efeitos precoces e tardios desta manipulação farmacológica será de grande utilidade clínica, já que os ISRSs são drogas largamente utilizadas para tratar distúrbios emocionais, inclusive em pessoas na fase de desenvolvimento.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar as repercussões precoces e tardias decorrentes da inibição farmacológica seletiva da recaptação da serotonina sobre o crescimento e desenvolvimento do fêmur em ratos.

2.2 Objetivos Específicos

Aos 30 e 90 dias de idade:

- Determinar o peso corpóreo dos animais;
- Determinar o peso, a densidade e o comprimento do fêmur dos animais;
- Determinar o peso relativo do fêmur, através da razão entre o peso do fêmur e o peso corporal (PF/PC);
- Mensurar o ângulo colo-diáfise do fêmur dos animais;
- Quantificar os níveis séricos de fosfatase alcalina dos animais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Para obtenção dos animais experimentais foram acasalados ratos com idade entre 90 e 120 dias na proporção de um macho para duas fêmeas. O diagnóstico de prenhez foi feito pela aferição do peso corporal a cada três dias. Confirmado o estado de prenhez, as ratas foram separadas dos machos e alojadas individualmente em gaiolas-maternidade.

Foram utilizados 60 ratos machos da linhagem *Wistar* da colônia de criação do Departamento de Nutrição da UFPE. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura de $23 \pm 1^\circ \text{C}$, com um ciclo de luz claro (6:00às 18:00) e escuro (18:00às 6:00). Os animais tiveram livre acesso à água *ad libitum* e à dieta de manutenção (Labina-Purina do Brasil S/A, contendo 23% de proteína). Os procedimentos realizados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPE.

Um dia após o nascimento, foram selecionados os ratos machos com peso entre 6.0 e 8.5g. As ninhadas foram compostas por seis filhotes por mãe. Destes seis filhotes, foram escolhidos aleatoriamente, três para constituição do grupo fluoxetina e três para constituição do grupo salina. Os animais foram mantidos em companhia da mãe até os 21º dia de idade, quando foram submetidos ao desmame.

3.2 Grupos de estudo

No primeiro dia pós-natal, os animais foram separados aleatoriamente em dois grupos:

Salina (S) (n=30) – tratado com solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% (10µl/g p.c), via subcutânea (s.c).

Fluoxetina (F) (n=30) – Tratado com Fluoxetina diluída em solução salina em dose de 10mg/Kg p.c (10µl/g p.c), via subcutânea (s.c).

Os tratamentos foram realizados diariamente entre as 7 e 9 horas do 1º ao 21º dia de vida (Figura 1). Quando os animais dos grupos salina e fluoxetina completaram as idades de 30 e 90 dias, foram submetidos à eutanásia por dose excessiva de anestésico associada a dessangramento para coleta do material a ser estudado.

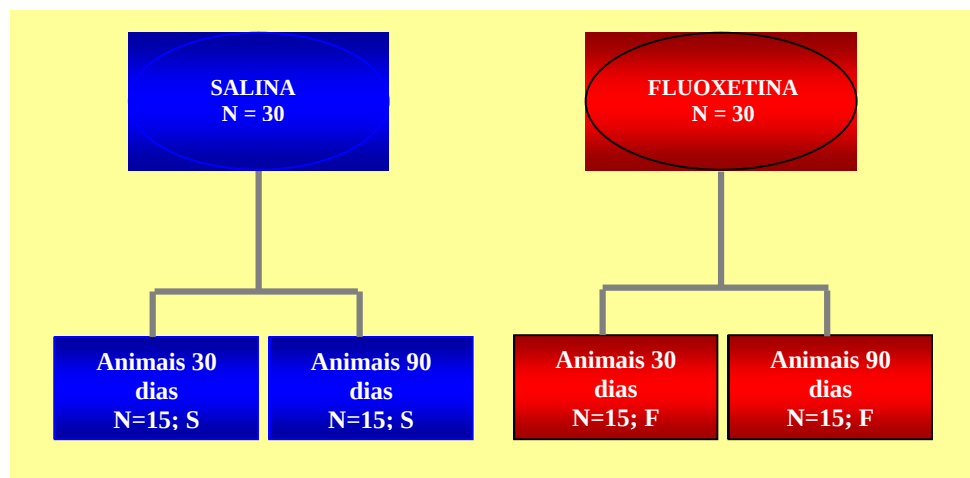


Figura 1 – Organograma dos **grupos experimentais** segundo a manipulação farmacológica em suas respectivas faixas etárias.

3.3 Peso corporal, eutanásia e coleta dos materiais para estudo

No 30º e no 90º dia, os ratos dos grupos salina e fluoxetina foram pesados em balança digital (Marte, modelo S-000, capacidade para 4 Kg, sensibilidade 0.01g) e anestesiados, via intramuscular, com xilazina (Rompum® – Bayer) (0,05 ml/100g) e cloridrato de Ketamina (Ketalar®) (0,25ml/100g) (Figura 2). Após efeito anestésico, os animais foram posicionados em decúbito dorsal. Foi, então, realizada remoção da pele do tórax para abertura da caixa torácica. O tórax foi aberto bilateralmente ao osso esterno com auxílio de tesoura cirúrgica desde o músculo diafragma até a altura das clavículas para evidenciar o coração. A seguir, o plastrão esternal foi fixado e procedeu-se à punção cardíaca direta para retirada de 3ml de sangue dos animais (Figura 2). A punção foi feita com o auxílio de uma seringa estéril com capacidade máxima para 4ml. Imediatamente após a morte dos animais, foi realizada uma incisão cirúrgica para remoção de pele e músculos desde a região abdominal inferior direita até porção inferior da coxa (Figura 3). O fêmur foi evidenciado e desarticulado proximal e distalmente (Figuras 3). Após retirado, o fêmur foi totalmente dissecado (Figura 3). Logo após a dissecação, para retirada total das partes moles, foram realizadas as devidas mensurações.



Figura 2: Procedimento de anestesia (A)



Figura 2: Punção cardíaca (B).



Figura 3– Excisão e dissecação do fêmur direito dos ratos: **A** – Primeira incisão: a partir do ligamento inguinal até 0,5cm abaixo do platô tibial; **B, C, D** – Desarticulações proximal e distal do fêmur; **E** – Fêmur após desarticulação; **F** – Fêmur dissecado pronto para as mensurações.

3.4 Obtenção dos pesos absoluto e relativo do fêmur

Após dissecados, os fêmures foram pesados em balança de pesagem hidrostática, utilizando o recurso que permita obter o peso absoluto do fêmur (sensibilidade para densidade 0,001g; capacidade máxima de 500g e capacidade mínima de 0,02g) (Marte®). (Figura 4). O peso relativo do fêmur foi obtido pela razão entre o peso absoluto do fêmur e o peso corporal (PF/PC) dos animais.



Figura 4 – Balança de pesagem hidrostática. Aferição do peso absoluto do fêmur.

3.5 Aferição do comprimento do fêmur

O comprimento do fêmur foi aferido com auxílio de um paquímetro (DIAL, acurácia: 0,02mm). Para aferição, o fêmur foi posicionado sobre superfície lisa com sua face ventral voltada para cima (Figura 5). A mensuração foi realizada da cabeça do fêmur até a superfície articular dos côndilos femorais.

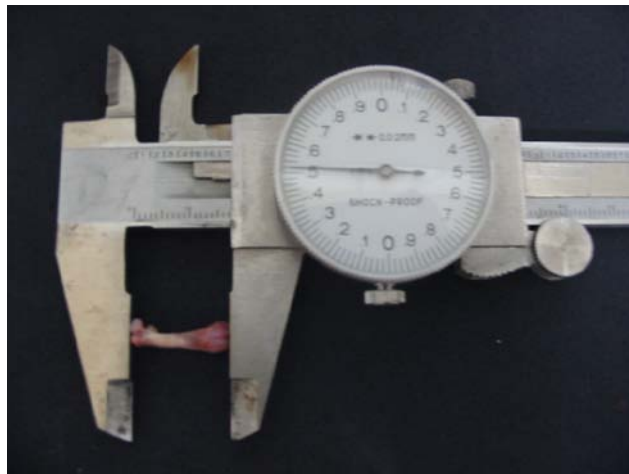


Figura 5 – Mensuração do comprimento do fêmur direito com auxílio de um paquímetro.

3.6 Aferição da densidade do fêmur

A densidade foi aferida com o auxílio de uma balança de pesagem hidrostática (sensibilidade para densidade 0,001g; capacidade máxima de 500g e capacidade mínima de 0,02g) (Marte®) (Figura 6).



Figura 6 - Balança de pesagem hidrostática
Aferição da densidade femoral.

3.7 Mensuração do ângulo colo-diáfisário do fêmur

Com o fêmur sobre uma folha de papel apoiada em superfície lisa e face ventral voltada para cima, foram traçadas duas linhas: uma paralela à diáfise do fêmur e outra projetada a partir do centro da cabeça do fêmur. As linhas foram prolongadas e o ângulo formado por elas foi medido com o auxílio de um transferidor (máximo de 180°) (BAGI *et al.*, 1997). (Figura 7).

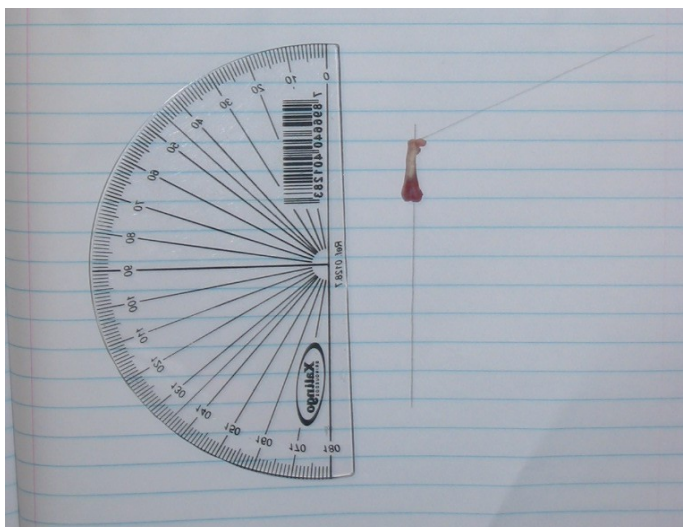


Figura 7 – Mensuração do ângulo colo-diafisário do fêmur com o auxílio de um transferidor.

3.8 Dosagem da fosfatase alcalina

O sangue coletado por punção cardíaca foi resfriado à temperatura de 5 a 6°C por 24 horas a fim de induzir sua coagulação. O sobrenadante foi centrifugado (Centrífuga Avanti J-25) a 3000 rpm durante 10 minutos (temperatura 25°) (Figura 8). Após a centrifugação, o soro obtido (em média, 1.5ml) foi pipetado (Pipeta Pasteur) e congelado. Posteriormente, este soro foi descongelado e mantido à temperatura ambiente (25°) para dosagem, em unidades por litro (U/L) da fosfatase alcalina pelo método colorimétrico (Labtest – Diagnóstica, Brasil). As amostras foram analisadas em triplicatas, através de um espectrofotômetro (BEL, modelo 1105) ajustado no modo absorbância (comprimento de onda de 590nm) (Figura 8).

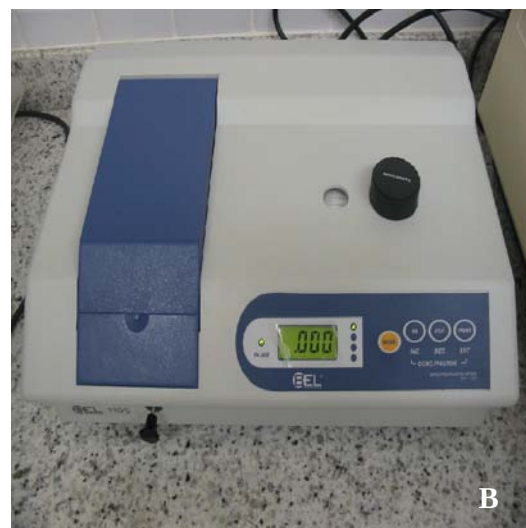


Figura 8: **A** - Centrífuga Avanti J-25; **B** – Espectrofotômetro BEL 1105.

3.9 Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o teste *t student* para comparar os grupos salina e fluoxetina em cada uma das idades estudadas. Os dados estão representados em $X \pm DP$.

4. RESULTADOS

4.1 Peso corporal

Em comparação com o grupo salina, o grupo fluoxetina, aos 30 dias de idade, apresentou redução ($p < 0,05$) do peso corporal ($F = 81,34 \pm 7,4$) ($S = 88,38 \pm 5,9$) (Figura 9).

Não houve diferença significativa dos pesos corporais aos 90 dias de idade entre os grupos salina e fluoxetina ($S = 349,9 \pm 28$; $F = 328,1 \pm 33,3$) (Figura 9).

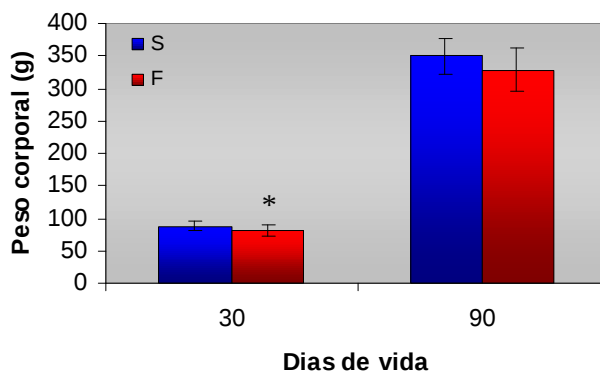


Figura 9- Peso corporal de ratos tratados durante o período de aleitamento com fluoxetina. Os filhotes receberam diariamente fluoxetina (F, $n=15$, 10 mg/Kg p.c., s.c) ou solução salina (S, $n=15$, NaCl 0,9% 1ml/Kg p.c, s.c) do 1º ao 21º dia de vida. Os dados estão representados em $\bar{X} \pm DP$. * Indica diferença ($p < 0,05$) entre os grupos, test *t student*.

4.2. Peso do fêmur

Aos 30 dias de idade, o grupo fluoxetina apresentou redução ($p < 0,05$) do peso absoluto do fêmur ($F = 0,263 \pm 0,03$) em comparação com o grupo salina ($S = 0,298 \pm 0,03$) (Figura 10A). O peso relativo também apresentou redução ($p < 0,05$) no grupo fluoxetina ($F = 3,21 \pm 0,22$) quando comparado ao grupo salina ($S = 3,42 \pm 0,3$) (Figura 10B).

Aos 90 dias de idade não houve diferença significativa dos pesos absoluto ($F = 0,906 \pm 0,08$; $S = 0,946 \pm 0,08$) e relativo do fêmur ($F = 2,76 \pm 0,18$; $S = 2,81 \pm 0,19$) entre os grupos estudados (Figuras 10A e 10B, respectivamente).

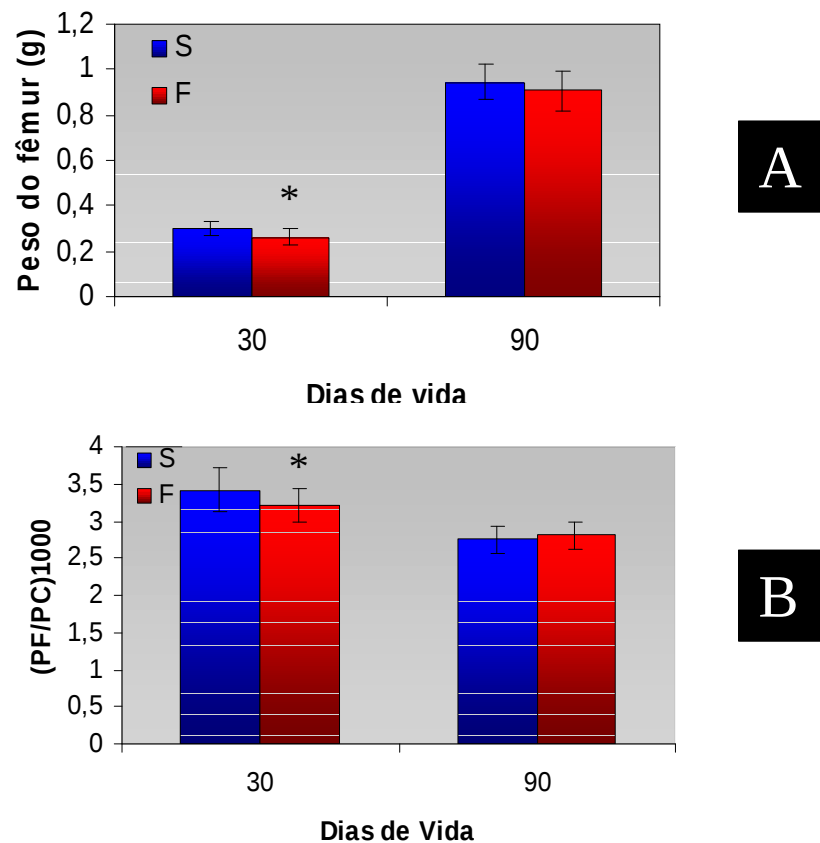


Figura 10 - Peso absoluto (A) e relativo (B) do fêmur de ratos tratados durante o período de aleitamento com fluoxetina. Os filhotes receberam diariamente fluoxetina (F, $n=15$, 10 mg/Kg p.c., s.c.) ou solução salina (S, $n=15$, NaCl 0,9%, 1ml/Kg p.c, s.c) do 1º ao 21º dia de vida. Os dados estão representados em $\bar{X} \pm DP$. * Indica diferença ($p < 0,05$) entre os grupos, test *t student*.

4.3. Comprimento do fêmur

Em comparação com o grupo salina ($S = 21,97 \pm 0,62$), o grupo fluoxetina ($F = 21,27 \pm 0,78$) apresentou redução ($p < 0,05$) do comprimento do fêmur aos 30 dias de idade (Figura 11).

Não houve diferença do comprimento do fêmur entre os grupos estudados aos 90 dias de idade ($F = 35,76 \pm 1,25$; $S = 35,72 \pm 1,78$) (Figura 11).

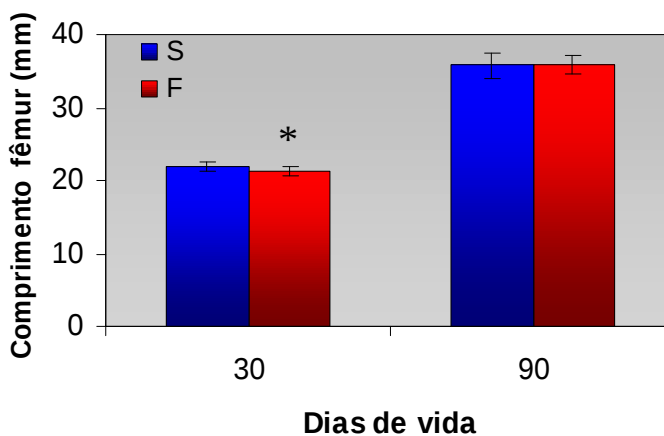


Figura 11- Comprimento do fêmur de ratos tratados durante o período de aleitamento com fluoxetina. Os filhotes receberam diariamente fluoxetina (F, $n=15$, 10 mg/Kg p.c., s.c) ou solução salina (S, $n=15$, NaCl 0,9%, 1ml/Kg p.c., s.c) do 1º ao 21º dia de vida. Os dados estão representados como $X \pm DP$. *Indica diferença ($p < 0,05$) entre os grupos, test *t student*.

4.4 Densidade do fêmur

Não houve diferença significativa na densidade do fêmur entre os grupos salina e fluoxetina aos 30 ($F = 35,76 \pm 1,25$; $S = 35,72 \pm 1,78$) e 90 dias de idade ($F = 21,27 \pm 0,78$; $S = 21,97 \pm 0,62$) (Figura 12).

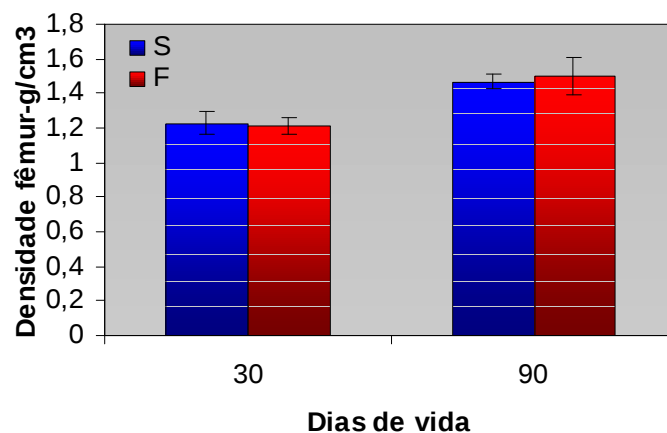


Figura 12- Densidade do fêmur de ratos tratados durante o período de aleitamento com fluoxetina. Os filhotes receberam diariamente fluoxetina (F, n=15, 10 mg/Kg p.c., s.c.) ou solução salina (S, n=15, NaCl 0,9%, 1ml/Kg p.c, s.c) do 1º ao 21º dia de vida. Os dados estão representados em $X \pm DP$. Para análise estatística dos dados foi utilizado o test *t student* ($p < 0,05$).

4.5 Ângulo colo-diafisário do fêmur

O ângulo colo-diafisário do fêmur não apresentou diferença entre os grupos salina e fluoxetina aos 30 ($F = 122,3 \pm 4,6$; $S = 120,5 \pm 4,3$) e 90 dias de idade ($F = 117,9 \pm 4,7$; $S = 120,6 \pm 4,3$) (Figura 13).

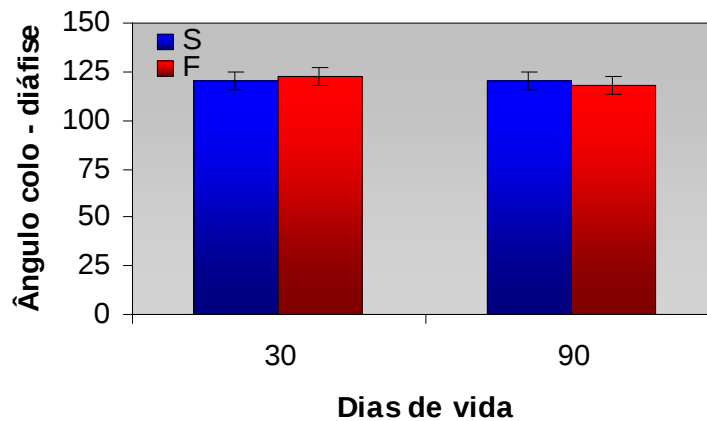


Figura 13- Ângulo colo-diafisário do fêmur de ratos tratados durante o período de aleitamento com fluoxetina. Os filhotes receberam diariamente fluoxetina (F, $n=15$, 10 mg/Kg p.c., s.c.) ou solução salina (S, $n=15$, NaCl 0,9%, 1ml/Kg p.c., s.c.) do 1º ao 21º dia de vida. Os dados estão representados em $X \pm DP$. Para análise estatística dos dados foi utilizado o test *t student* ($p < 0,05$).

4.6 Níveis séricos de fosfatase alcalina

Aos 30 dias de idade, o grupo fluoxetina ($F = 100,4 \pm 12,3$) apresentou níveis mais elevados de fosfatase alcalina no sangue em comparação com o grupo salina ($S = 74 \pm 11,9$) ($p < 0,05$) (Figura 14).

Não houve diferença na quantidade de fosfatase alcalina no sangue entre os grupos estudados aos 90 dias de idade ($F = 48,5 \pm 7,7$; $S = 46 \pm 3,5$) (Figura 14).

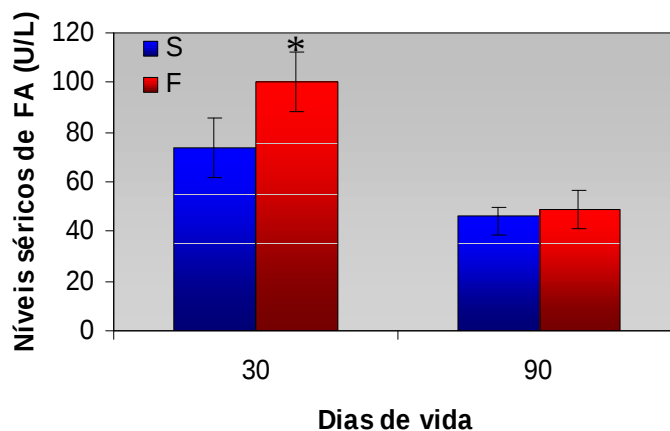


Figura 14- Níveis séricos de fosfatase alcalina de ratos tratados durante o período de aleitamento com fluoxetina. Os filhotes receberam diariamente fluoxetina (F, $n=15$, 10 mg/Kg p.c., s.c.) ou solução salina (S, $n=15$, NaCl 0,9%, 1ml/Kg p.c., s.c.) do 1º ao 21º dia de vida. *Indica diferença ($p < 0,05$) entre os grupos, test *t student*.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que o uso ISRS durante o período crítico de desenvolvimento de ratos originou alterações no peso corporal, no peso relativo e no comprimento femorais na fase precoce da vida dos animais porém, provavelmente, não repercutiu no amadurecimento do osso. Este achado comprova a interferência do ISRS sobre os transportadores de 5-HT com conseqüências no crescimento e desenvolvimento dos animais. O estudo da densidade e do ângulo colo/diáfise sugere que o mesmo ISRS não alterou a estrutura do osso, ao contrário do que é relatado em vários estudos sobre a morfologia óssea. Os níveis séricos de fosfatase alcalina nos animais jovens não acompanharam o comportamento do peso e comprimento femorais para a mesma fase. Este achado demonstra o curioso incremento da atividade osteoblástica, talvez para compensar a agressão farmacológica induzida no período neonatal.

Como a massa óssea obtida na juventude provavelmente é o mais importante determinante da saúde do esqueleto tardiamente, o impacto dos ISRSs no acréscimo mineral ao osso em crescimento é uma questão importantíssima a ser abordada (CONSENSUS CONFERENCE, 2001).

As alterações no peso relativo do fêmur refletem a interferência da 5-HT sobre a regulação da maturação esquelética. Em oposição aos achados, há relatos que a exposição pré e pós-natal a ISRSs não exerce influência na morfologia, mas pode ocasionar efeitos tardios na saúde óssea (WARDEN, *et al.*, 2005a). Por outro lado, há evidências dos efeitos da serotonina sobre a aquisição de massa óssea (WARDEN, *et al.*, 2005a). Foi, inclusive, demonstrado que filhos de usuárias de ISRSs durante a gestação e lactação apresentaram

redução do peso ao nascimento e alterações pós-natais no ganho de peso (SIMON, *et al.*, 2002; HENDRICK, *et al.*, 2003).

Sabe-se que o uso de ISRS aumenta a disponibilidade de 5-HT na fenda sináptica o que pode alterar o comportamento alimentar (SIMANSKY, 1996). Isto poderia ocasionar redução na ingesta alimentar e no ganho de peso (SIMANSKY, 1996). Os ISRSs também podem induzir diminuição da superfície de absorção intestinal e conseqüente perda ponderal de peso (MOTA, *et al.*, 2000). Dessa forma, o menor peso relativo do fêmur em ratos jovens tratados com ISRS, poderia advir da desnutrição por redução na ingesta alimentar ou na absorção intestinal de nutrientes. Há recuperação do peso relativo do fêmur na idade adulta dos animais, porém, este fato não descarta a possibilidade de alterações histomorfométricas na arquitetura óssea.

A 5-HT potencializa o efeito do paratormônio (PTH) e induz produção de collagenase por osteoblastos (BLIZIOTES *et al.*, 2001). Sendo assim, os osteoblastos parecem expressar mecanismos para responder e regular a captação de 5-HT (BLIZIOTES *et al.*, 2001). Isto aponta estas células como parte do sistema serotoninérgico no osso (BLIZIOTES *et al.*, 2001). Adicionalmente, a expressão de receptores 5-HT_{2B} em osteócitos sugere sua participação na regulação sensoriomecânica do metabolismo ósseo (WESTBROEK *et al.*, 2001).

O crescimento femoral apresentou-se diminuído entre os animais jovens tratados com ISRS. Neste caso, a maior disponibilidade da 5-HT pode ter alterado o equilíbrio neurohormonal e sensoriomecânico do metabolismo ósseo. Nos animais adultos, a ausência de alterações no crescimento do fêmur, aponta para a ocorrência de efeitos precoces do ISRS sobre a maturação esquelética. Corroborando com estes achados, o uso de ISRS, acarretou atenuação ou estagnação da velocidade de crescimento em quatro adolescentes (WEINTROB *et al.*, 2002; WARDEN *et al.*, 2005a). Neste caso, o ritmo de crescimento dos adolescentes foi

restabelecido após a suspensão do tratamento ou após a concomitante terapia com hormônio do crescimento (GH) (WEINTROB *et al.*, 2002; WARDEN *et al.*, 2005a). Um outro estudo clínico, constatou que crianças tratadas com ISRS durante dezenove semanas obtiveram ganho médio de altura menor que indivíduos tratados com placebo (ELI LILLY and COMPANY, 2005). Ao contrário, ratos sem o gene 5-HTT e ratos normais manipulados com fluoxetina não apresentaram alterações no comprimento femoral (WARDEN *et al.*, 2005a). Entretanto, este mesmo estudo identificou alterações na aquisição mineral e na arquitetura ósseas (WARDEN *et al.*, 2005a).

A densidade óssea mineral geralmente é dada pela relação percentual entre ossos cortical e esponjoso (CHENG *et al.*, 1997). Para estudá-la, são utilizados imagens de Raio-X ou de tomografia computadorizada quantitativa (CHENG *et al.*, 1997). Pode-se ainda determinar a densidade óssea pelo percentual de trabéculas de osso esponjoso por área (BLIZIOTES *et al.*, 2001; BLIZIOTES *et al.*, 2002). Apesar da interação entre fatores neurohormonais e sensoriomecânicos ter sido evidenciada na regulação do metabolismo ósseo (WESTBROEK *et al.*, 2001; ENSRUD *et al.*, 2003; HANEY *et al.*, 2004; CAULEY *et al.*, 2005) não foram observadas alterações na densidade óssea. No presente estudo, a densidade óssea mineral foi dada em função do volume deslocado (g/cm^3) e não da área, como nos outros estudos que avaliaram este parâmetro (CHENG *et al.*, 1997; ENSRUD *et al.*, 2003; CAULEY *et al.*, 2005). É possível que esta diferença metodológica tenha se refletido nos resultados expressados.

Concordando com os achados sobre densidade, há relatos da inexistência de associações entre uma menor densidade mineral óssea e o uso de anti-depressivos (ENSRUD *et al.*, 2003). Por outro lado, estudos recentes associam o uso de ISRSs à menor aposição de massa óssea (HANEY *et al.*, 2004; CAULEY *et al.*, 2005). O uso de ISRSs foi associado ao decréscimo na densidade óssea mineral em homens e ao aumento da perda óssea em mulheres

idosas (HANEY *et al.*, 2004). Homens idosos tratados com ISRSs apresentaram redução da densidade óssea mineral associada a fraturas na coluna vertebral e na porção proximal do fêmur (CAULEY *et al.*, 2005). Este trabalho, porém, falha ao não isolar o uso de ISRSs de fatores familiares, dietéticos e genéticos. Em mulheres idosas, o uso de ISRSs está relacionado ao aumento na perda óssea do quadril (ENSRUD *et al.*, 2003). Neste caso, o aumento do risco de fraturas no colo do fêmur poderia também ser associado a fatores como alterações cognitivas e neuromusculares ou aos efeitos psicotrópicos dos antidepressivos (ENSRUD *et al.*, 2003).

O ajuste entre o acetábulo do quadril e a cabeça femoral é fortemente influenciado pelo ângulo entre o colo e a diáfise do fêmur (ISAAC *et al.*, 1997). Mudanças neste ângulo podem ser observadas, inclusive, durante o desenvolvimento esquelético normal (ISAAC *et al.*, 1997). Neste estudo não foram evidenciadas alterações no ângulo colo- diafisário de fêmures de ratos expostos a um ISRS no período neonatal. Ao contrário, estudos relatam que ISRSs, tais como, sertralina, fluoxetina e amitriptilina, estariam relacionados com alterações no desenvolvimento crânio-facial normal de ratos neonatos e de crianças tratados com estes compostos (SHUEI; SADLER; LAUDER, 1992; MOISEWITSH, 2000). Os ISRSs estariam ainda associados a malformações fetais quando utilizados no primeiro trimestre de gestação (GOLDSTEIN *et al.*, 1997) e com alterações na formação cortical e trabecular do fêmur de ratos jovens (WARDEN *et al.*, 2005a). Neste estudo, Warden, *et al.* (2005a) observa os mesmos efeitos deletérios no fêmur dos ratos com mutação nula para o gene 5-HTT.

A fosfatase alcalina representa a atividade osteoblástica e é largamente utilizada como marcador de formação óssea (SCHÖNAN; RAUCH, 1997; SIGGELKOW *et al.*, 1999). Entretanto, são raros os estudos experimentais que relacionam diretamente os ISRSs à atividade desta enzima. O incremento dos níveis séricos de fosfatase alcalina nos animais jovens manipulados farmacologicamente aponta para interações entre a atividade

osteoblástica e a 5-HT durante o período de manipulação farmacológica. Nos animais jovens tratados, era esperado que os níveis de fosfatase alcalina estivessem reduzidos assim como o peso relativo e o comprimento femorais, já que esta enzima reflete a atividade osteoblástica. Opondo-se a estes achados, adolescentes tratados com ISRS, demonstraram de forma associada redução no crescimento e nos níveis séricos de fosfatase alcalina (KHOLSA; KLEEREKOPER, 2003). Sabe-se que modificações no tecido ósseo após o uso de ISRSs são atribuídas a alterações em osteoblastos (BLIZIOTES *et al.*, 2001) apesar de também haver evidências entre a interação da 5-HT com osteócitos (WESTBROEK *et al.*, 2001). Em consequência, o equilíbrio entre formação e reabsorção ósseas pode ser alterado por ISRSs (WARDEN *et al.*, 2005b). Nos animais adultos tratados com ISRS, a normalização no peso relativo e no comprimento femorais justifica o aumento da atividade osteoblástica precocemente. No entanto, estudos adicionais são necessários para mapear a atividade da fosfatase alcalina frente ao crescimento e desenvolvimento ósseos.

Sendo assim, a utilização de ISRS durante a fase de aleitamento resulta em anormalidades sistêmicas e esqueléticas em animais jovens. Especialmente a alteração da fosfatase alcalina, sugere um significativo papel da 5-HT sobre o metabolismo ósseo. A não ocorrência de alterações entre os animais adultos, aponta para o efeito a curto prazo do ISRS. Clinicamente, este fato é importante já que os ISRSs são drogas largamente utilizadas para tratar distúrbios emocionais, inclusive de indivíduos na fase de desenvolvimento. Vale salientar que estudos histomorfométricos são necessários para investigar possíveis alterações na estrutura óssea.

6. CONCLUSÕES

- A manipulação farmacológica com inibidor seletivo de recaptação da serotonina produz retardo no crescimento ósseo e somático dos animais em uma fase precoce da vida;
- A elevação dos níveis séricos de fosfatase alcalina em organismos jovens que sofreram manipulação farmacológica com ISRS no período de aleitamento, sugere que a atividade osteoblástica é mais intensa que aquela esperada para o nível metabólico do tecido ósseo para a faixa etária. A recuperação da atividade osteoblástica nos organismos adultos aponta para interação precoce entre o ISRS e o metabolismo ósseo;
- A manipulação farmacológica com ISRS não aponta para o surgimento de alterações precoces ou tardias na conformação óssea e na estrutura do fêmur ;
- A recuperação dos parâmetros estudados em uma fase tardia da vida dos organismos sugere que o tecido ósseo possui a capacidade de se recuperar após uma agressão farmacológica com ISRS.

7. PERSPECTIVAS

- Verificar se a manipulação farmacológica com ISRS promove alterações histomorfométricas no tecido ósseo de animais jovens e adultos;
- Estudar a curva de atividade da fosfatase alcalina, verificando seu início, pico e retorno a valores basais;
- Identificar, através de métodos imunohistoquímicos, as correlações entre a interação dos ISRS e os receptores serotoninérgicos presentes no tecido ósseo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZIMITIA, E.C. Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation and apoptosis. **Brain Res Bull.** v.56, n.5, p.413-424, 2001.

BAGI, C.M.; WILKIE, D.; GEORGELOS, K.; WILLIAMS, D.; BERTOLINI, D. Morphological and structural characteristics of the proximal femur in human and rat. **Bone.** v.21, n.3, p.261-267, 1997.

BARNES, N.M.; KARP, T.A. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology.** v.38, n.8, p.1083-1152, 1999.

BHANGU, P.S.; GENEVER, G.J.; SPENCER, T.S.; GREWAL, T.S; SKERRY, T.M. Evidence for target vesicular glutamate exocytosis in osteoblasts. **Bone,** v.29, n.1, p.16-23, 2001.

BIKLE, D.D. Biochemical markers in the assesment of bone disease. **American Journal of Medicine.** v.103, p.427-435, 1997.

BLAND, S. Steriod hormone receptor expression and action in bone. **Clin. Sci.** v.98, p.217-240, 2000.

BLIZIOTES, M.; McLOUGHLIN, S.; GUNNES, M.; FUMAGALLI, F.; JONES, S.R.; CARON, M. G. Bone histomorphometric and biochemical abnormalities in mice homoizogous for deletion of the dopamine transporter gene. **Bone.** v.26, n.1, p.15-19, 2000.

BLIZIOTES, M.M.; ESHLEMAN, A.J.; ZHANG, X.W.; WIREN, K.M.. Neurotransmitter action in osteoblasts: Expression of a functional system for serotonin receptor activation and reuptake. **Bone.** v.29,n.5, p.477- 486, 2001.

BLIZIOTES, M.; GUNNES, A.; ESHLEMAN A.; WIREN K, M. The role of dopamine and serotonin in regulating bone mass and strength: studies on dopamine and serotonin transporter null mice. **J. Musculoskel Neuron Interact.** v.2, n.3, p.291-295, 2002.

BRONCKERS, A.L.J.J.; GOEI, W.; VAN HEERDE, W.L.; DUMONT, E.A.W.J.; REUTELINGSPERGER, C.P.M.; VAN DEN EIJNDE, S.M. Phagocytosis of dying

chondrocytes by osteoclasts in the mouse growth plate as demonstrated by annexin-V labeling. **Cell and Tissue Research**. v.301, p.267-272, 2000.

BURGER, E.H.; KLEIN-NULEND, J. Mechanotransduction in bone-role of the lacuno-canalicular network. **FASEB J**. v.13 (suppl.), S101-S112, 1999.

BUZINICOV, G.A; LAMBERT, H.W.; LAUDER, J.M. Serotonin as serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. **Cell and Tissue Research**; v. 305, p. 177-186, 2001.

CAULEY, J.A.; FULLMAN, R.L.; STONE, K.L.; LAU, E.M.C.; ORWOLL, E.S. Factors associated with lumbar spine and proximal femur bone mineral density in older men. **Osteoporosis Int**. v.16, p.1525-1537, 2005.

CHENG, X.G.; LOWET, G.; BOONEN, S.; NICHOLSON, P.H.F.; BRYIS, P.; NIJS, J.; DEQUEKER, J. Assessment of the strength of proximal femur in vitro: relationship to femoral bone mineral density and femoral geometry. **Bone**. v.20, p.213-218, 1997.

CONSENSUS CONFERENCE. NIH Consensus development panel on osteoporosis prevention, diagnosis and therapy: osteoporosis prevention, diagnosis and therapy: **JAMA** 285(6):785-795, 2001.

DEIRÓ, T.C.B.J.; MANHÃES DE CASTRO, R.; MANHÃES DE CASTRO, F.M.; SILVA JR., V.A.; SOUZA, S.L.; MORAES, S.R.A. Neonatal treatment with citalopram, a selective serotonin reuptake inhibitor, alters the growth of organs rats. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**. Recife, v.47, n.2, p.107-111, 2002.

DI MASSO, R.J.; CELORIA, G.C.; FONT, M.T. Morphometric skeletal traits, femoral measurements and bone mineral deposition in mice with agonistic selection for body conformation. **Bone**, v.22, p.539-543, 1998.

EDITORIAL OPINION. Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years?. **Nutrition**, v.21, p.775-777, 2005.

ELI LILLY and COMPANY. **Prozac: Fluoxetine Hydrochloride**., Disponível em: <<http://www.lilly.com>>. Acesso em: 26jan. 2005.

ENSRUD, KE.; TERRI, B.; MANGIONI, C.M.; BOWMAN. P.J.; BAUER, D.C.; SCHWATZ, A.; HANLON, J.T.; NEVITT, M.C.; WHOOLEY, M.A. Central nervous system

active medications and risk for fractures in older women. **Arch Intern Med.**, v.163; p.949-957, 2003.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia**. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1999.

GENESER, F. **Histologia com Bases Biomoleculares**. 3ª edição, Ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, RJ, p.212-230, 2004.

GOLDSTEIN, D.J.; CORBIN, L.A.; SUNDELL, K.L.; Effects of first – trimester fluoxetine exposure on the newborn. **Obstetrics and Gynecology**. v.89, n.5, Part 1, 1997

JACOBS, B.L.; AZMITIA, E.C. Structure and functions of brain serotonin system. **Physiological Reviews**, v.72, n.1, p.165-229, 1992.

JONES, K.B.; MOLLANO, A.V.; MORCUENDE, J.A.; COOPER, R.R.; SALTZMAN, C.L.A. Bone and brain: a review of neural, hormonal, and musculoskeletal connections. **Iowa Orthop J**. v.24, p.123-132, 2004.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**, texto/Atlas. 10ª edição, Ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, RJ, 2004.

HANEY, E.M.; CHAN, B.K.S.; LAMBERT, L.; CAULEY, J.; ENSRUD, K.; ORWOEL, E.; BLIZIOTES, M.M.; SSRI use is associated with lower BMD among men. **J. Bone Miner. Res.** v.19 (Suppl 1):S7, 2004.

HARA – IRIE, F.; AMIZUCA, N.; OZAWA, H. Immunocytochemical and Ultrastructural localization of CGRP – positive nerve fibers at the epiphyseal trabeculae facing the growth plate of rat femurs. **Bone**, New York, v.18, p.29-39, 1996.

HARLAN, I. Sprague-Dawley growth chart. Disponível em:
<<http://www.Harlan.com/strain%20detail/rats/sd.html>. Acesso em: mar, 2005.

HENDRICK, V.; SMITH, L.M.; SURI, R.; HWANG, S.; HAYNES, D.; ALTSHULER, L. Birth outcome after prenatal exposure to antidepressant medication. **Am. J. Obstet. Gynecol.** v.188, p.812-815, 2003.

HOYER, D.; HANNON, J.P.; MERTIN, G. R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. **Pharmacol Biochem Behav.** v.71, n.4, p.533-554, 2002.

ISAAC, B.; VETTIVEL, S.; PRASAD, R.; JEYASEELAN, L.; CHANDI, G. Prediction of the femoral neck-shaft angle from the length of the femoral neck. **Clinical Anatomy**, v.10, p.318-323, 1997.

KHOLSA, S.; KLEEREKOPER, M. Biochemical markers of bone turnover. In: Favus, M.J., Primer on the metabolic bone diseases of mineral metabolism. **American Society of Bone and Mineral Research**, p.166-172, 2003.

KLEIN, R.F.; MITCHELL, S.R.; PHILLIPS, T.J.; BELKMAP, J.K.; ORWOLL, E.S. Quantitative trait loci affecting peak bone mineral density. **Journal of Bone and Mineralization Research**, v.13, n.11, p.1648-1656, 1998,

LAKETIC´-LUJUBOJEVIC´, L.J.; SUVA, F.J.; MAATHUIS, M.; SANDERS, D.; SKERRY, T.M. Functional Characterization of N-methyl-D-aspartic Acid-gated Channels in Bone Cells. **Bone**, v.25, n.6, p.631-637, 1999.

LAUDER, J.M. Ontogeny of the serotonergic system in the rat : serotonin as a developmental signal. In: **Annals New York Academy of Sciences**, v.600, p.297-314, 1990.

MAGALHÃES, C.P. Efeitos do tratamento neonatal com inibidor seletivo de recaptura da serotonina sobre o desenvolvimento anatômico crânio-encefálico. **Dissertação de mestrado**, Departamento de Anatomia. UFPE, 2000.

MANHÃES DE CASTRO, R.; CABRAL FILHO, J.E.; COSTA, J.A.; COCT, F.B.R, GALLINDO, M.A.C.; HECKSHER, C.A. Neonatal Treatment with Naxolone causes permanent hyperalgesia in rats. **Brazilian Journal of Medicine and Biology Research**. v.26, p.747-751, 1993.

MANHÃES DE CASTRO, R.; BARRETO MEDEIROS, J.M.; MENDES DA SILVA, C. e col. Reduction of intraspecific aggression in adult rats by neonatal treatment with selective reuptake inhibitor. **Brasilian Journal Medicine Biological Research**, v.34, n.1, p.121-124, 2001.

MOISEIWITSCH, J.R.D. The role of serotonin and neurotransmitters during craniofacial development. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v.11, n.2, p.230-239, 2000.

MORGANE, P.J.; MILLER, M.; KEMPER, T. e col. The effects of protein malnutrition on the developing nervous system in the rat. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.2, p.137-230, 1978.

MORGANE, P.J.; AUSTIN-LaFRANCE, R.; BRONZINO, J.; TONKISS, J.; DIAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L.; KEMPER, T.; GALLER, J.R. Prenatal Malnutrition and development of brain. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.17, p.91-128, 1993.

MOTA, D.L.; MANHÃES DE CASTRO, R.; BITTENCOURT, A.M. e col. Tratamento Neonatal com Inibidor Seletivo da Recaptação da Serotonina (ISRS): mudanças na morfologia intestinal, **Neurobiologia**, v.63. p.55-59, 2000.

NOBACK, C.R.; EISENMAN, L.M. Some effects of protein calorie undernutrition on the developing central nervous system of the rat. **The Anatomical Record**, v.201, n.1, p.67-73, 1981.

PARFITT, A.M. Targeted and non targeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. **Bone**, v.30, p.5-7; 2002.

RAISZ, L.G. Physiology and Pathophysiology of Bone Remodeling. **Clinical Chemistry**. v.45, n.8 (B), p.1353-1358; 1999.

SCHÖNAU, E.; RAUCH, F. Markers of bone and collagen metabolism – problems and perspectives in paediatrics. **Horm. Res.** v.48 (Suppl 5), p.50-59, 1997.

SERRE, C.M.; FARLAY, D.; DELMAN, P.D.; CHENU, C. Evidence for a dense and Intimate Innervation of the Bone Tissue, Including Glutamate –Containing Fibers. **Bone**. v.25, n.6, p.623-629, 1999.

SHUEI, D.; SADLER, T.; LAUDER, J. Serotonin as a regulator of craniofacial morphogenesis: Site specific malformations following exposure to serotonin uptake inhibitors. **Teratology**, New York, v.46, p.367-378, 1992.

SIGGELKOW, H.; REBENSTORFF, K.; KURRE, W.; NIEDHART, C.; ENGEL, F.; SCHULS, H.; ATKINSON, M.J.; HÜFNER, M. Development of the osteoblast phenotype in primary human osteoblast culture: comparison with rat calvarial cells in osteoblast differentiation. **J Cell Biochem.**, v.75, n.1, p.22-35, 1999.

SIMANSKY, K.J. Serotonergic Control of the organization of feeding and satiety. **Behaviour Brain Research**, v.73, p.37-42, 1996.

SIMON, G.E., *et al.* Outcomes of prenatal antidepressant exposure. **Am. J. Psychiatry.** v.159, p.2055-2061, 2002.

STEIN, G.S.; LIAN, J.B.; Molecular Mechanisms Mediating Proliferation/Differentiation Interrelationships During Progressive Development of the Osteoblast Phenotype. **Endocrinology Review**, v.14, p. 424-442, 1993.

SUASSUNA, M.D.M. **Estudo histológico e morfométrico do disco epifisário de ratos neonatos tratados com fluoxetina. Dissertação de Mestrado.** Recife, Departamento de Anatomia. UFPE, 2004.

TAKEDA, S.; KARSENTY, G. Central control of bone formation. **J Bone Miner Metab** v.19, p.195-198, 2001.

TANAKA, S.; NAKAMURA, I.; INOUE, J. ODA, H.; NAKAMURA, K. Signal Transduction Pathways Regulating Osteoclast Differentiation and Function. **Journal of Bone and Mineral Metabolism.** v.21, p.123-133, 2003.

TATE, M.L.K.; ADAMSON, J.R.; TARM, A.E.; BAUER, T.W. The osteocyte. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.** v. 36; p. 1-8, 2004.

TURNER, C.H.; ROBLING, A.G.; DUNCAN, R.L.; BURR, D.B. Do bone cells behave like a neuronal network? **Calcif Tissue Int.** v.70, p.435-442, 2002.

VIEIRA, J.G.H. **Marcadores Bioquímico na Prática.** Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo. v.43, n.6, p.416-422,1999.

WARDEN, J.S.; ROBLING, A.G.; SANDERS, M.S.; BLIZIOTES, M.M.; TURNER, C.H. Inhibition of the serotonin (5-Hidroxitriptamine) transporter reduces bone accrual during growth. **Endocrinology**, v.146, n.2, p.685-693, 2005a.

WARDEN, J.S.; BLIZIOTES, M.M.; WIREN, K.M.; ESHLEMAN, A.J.; TURNER, C. H.; TURNER, C. H. Neural Regulation of bone and the skeletal effects of serotonin (5-hidroxytryptamine). **Molecular and Cellular Endocrinology.** v.242, n.1-2, p.1-9, 2005b.

WEINTROB, N.; COHEN, D.; KLIPPER-AURBACH, Y.; ZADIK, Z.; DICKERMAN, Z. Decrease growth during therapy with Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. **Arch. Pediatr. Adolesc. Md.**, v.156, p. 696-701. 2002.

WELSH, L.; RUTHEFORD, O.M.; JAMES, I.; CROWLEY, C.; COMER, M.; WOLMAN, R. The acute effects of exercise on bone turnover. **International Journal of Sports Medicine**, v.18, p.247-251, 1997.

WESTBROEK I.; VAN DER PLAST, A.; de ROOIJ, K.E.; KLEIN-NULEND, J.; NIJWEIDE, P.J. Expression of serotonin receptors in bone. **J. Biol. Chem.**, v.276, n. 31, Issue 3, p.28961-28968, 2001.

WHITAKER-AZMITIA, P.M.; DRUSE, M.; WALKER, P.; LAUDER, J.M. Serotonin as a developmental signal. **Behavioral Brain Research**, v. 73, p. 19-29, 1996.

YAVARONE, M.S. *et al.* Serotonin and cardiac morphogenesis in the mouse embryo. **Teratology**, v.47, p. 573-584, 1993.

ANEXOS

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



Ofício nº 03/05

Recife, 15 de março de 2005

Da: Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: Profa. Sílvia Regina Arruda de Moraes
Departamento de Anatomia - CCB/UFPE

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram a resposta de V. Sa. referente ao primeiro parecer da CEEA sobre o projeto de pesquisa intitulado "Estudo histomorfométrico e bioquímico do tecido ósseo de animais tratados com fluoxetina durante o período neonatal"

Concluimos 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 CEEA-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 um **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,

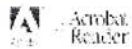
Silene Carneiro
Silene Carneiro do Nascimento
Presidente CEEA

Submissions Being Processed for Author Lígia Cristina Monteiro Galindo, Jr

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
View Submission	BONE-D-06-00198	Neonatal treatment with the selective serotonin reuptake inhibitor increases osteoblastic activity with transitional consequence in the femoral growth and development mice	Apr 12, 2006	Apr 14, 2006	Under Review

[Back to Main Menu](#)

You should use the free Adobe Acrobat Reader 6 or later for best PDF Viewing results.



Manuscript

Neonatal treatment with the selective serotonin reuptake inhibitor increases the osteoblastic activity with transitional consequence in the femoral growth and development of mice.

GALINDO LCM¹, MOURA MCA de A², FRANCA T J B², MANHAES-DE-CASTRO³ R, MORAES SRA⁴

1. Mistress em Patologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil
2. Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil
3. Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.
4. Departamento de Anatomia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

Correspondence Address: Lígia Cristina Monteiro Galindo. Rua São Mateus, 852, Apto.:503-D. Iputinga, Recife, 50680000, Brazil. FAX: 055XX81- 2126-8555 E.mail: galindo_ligia@yahoo.com.br

ABSTRACT

The evidence about the interaction between the nervous system and the bone metabolism is growing. Recent studies emphasize glutamate, dopaminergic and serotonergic receptors in bone cells. However it is not well documented the function of serotonin in the bone. The present study investigated the function of serotonin in the growth and development of bone tissue in mice. Sixty male albino *Wistar* mice at 30 and 90 days of age were used. For each age, the animals were divided into two groups: fluoxetine and saline. The group fluoxetina was injected with fluoxetine, a powerful selective serotonin reuptake inhibitor – SSRI. The group saline was injected with saline solution. Treatment was realized during the first 21 postnatal days of animals. At the ages previously established, femurs and blood of animals were collected for analysis. The analysis of corporal weight, relative weight and length of femur emphasized that these parameters showed a precocious decrease ($p<0.05$). The serum levels of alkaline phosphatase were higher in the young and fluoxetine animals ($p<0.05$). The density and the neck-shaft angle of femur did not show differences among groups or ages. The decrease of relative weight and length of femur among young animals treated with SSRI suggest a short term effect of this substance. The precocious increase in the activity of alkaline phosphatase suggests that there was an increment of osteoblastic activity to

compensate the pharmacologic aggression during breastfeeding period. These found data suggest that there is influence of SSRI in bone metabolism only in precocious phase of life of these animals.

Introduction

The nervous system influences bone metabolism ^(2,5,16) and it is growing the clinical investigation and interest about the participation of the neurotransmitters in its regulation ^{4,5}. Immunoreactive neurons for neuropeptides present in the bone indicate sensorial and autonomic sympathetic innervation ^(12, 20). The presence of glutamate receptors in osteoblasts and osteoclasts suggest a mechanism of signaling similar to the neurotransmission ⁽¹⁾. Osteoblasts also express molecular support to regulate the glutamate exocytosis in the presence of presynaptic neurons ⁽¹⁾. The deletion of dopamine transporter gene resulted in skeletal abnormalities in mice, suggesting dopaminergic influence in the formation of bone structure ⁽³⁾. There is also evidence of interneuron in bone structure which neurotransmitter is serotonin or 5-Hydroxytryptamine (5-HT) ⁽²⁵⁾. Either was found in the interior of periosteum, serotonergic receptors in osteocytes, in osteoblasts and its precursors ^(4,29). The method of cDNA reverse transcription of mRNA emphasized a high degree of expression of receptors 5-HT_{2B} in osteocytes in chickens and mice *Swiss* ⁽²⁹⁾. The expression of serotonin transporters (5-HTT) and the serotonergic receptors it were also emphasized in osteoblasts in mice ⁽⁵⁾. In these mice, 5-HT would increase the effect of parathormone (PTH), inducing production of collagenase ⁽⁴⁾. 5-HT seems to be also related to bone remodeling, fracture repair ⁽²⁹⁾ and to the regulation of craniofacial morphogenesis ^(5,17).

The selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) antagonize the 5-HTT and are frequently prescribed for the treatment of depression in children and teenagers ⁽²⁶⁾. Clinical studies in humans emphasize collateral effects of these drugs in bone growth since teenager users of SSRI showed decrease of growth during the treatment ⁽²⁸⁾. It was observed a high risk of children users of SSRI show defects in the development of teeth like adontia and

hypodontia ⁽¹⁷⁾. In experimental studies, embryos of mice exposed to the SSRIs, like sertraline, fluoxetine and amitriptyline showed malformation craniofacial. ⁽²¹⁾. In young mice, the treatment with SSRI caused deficit in the bone formation cortical and trabecular of femur ⁽²⁶⁾.

Concerning about the influence of serotonin transporter in bone maturation, the dates in the literature are scarce. The aim of this work was to observe the osteoblastic activity and its consequence on the growth and development of femur in mice treated during the breastfeeding with fluoxetine, a powerful and selective serotonin reuptake inhibitor.

Materials and Methods

Experimental Animals

Sixty male albino Wistar mice from the colony of were used. The animals, in 6-8g weight range were kept in collective cages with a maximum of 6 animals. It was established a light-darkness cycle of 12/12h. The temperature was kept at $23 \pm 1^{\circ}$ C. The animals had free access to filtered water and standard ration (LABINA - Purina do Brasil S/A). The experimental use of these animals was approved by the Animal Experimental Ethics Committee from Federal University of Pernambuco (UFPE).

Twenty four hours after the birth, the animals were divided at random into two groups: saline (N=15) and treated with fluoxetine (N=15). In each cage there were 3 animals of each group. The animals of saline group was injected subcutaneous with a saline solution at 0,9% (10 μ l/g). The fluoxetina group was injected subcutaneous with flouxetine 10mg/Kg (10 μ l/g). The groups saline and fluoxetine were manipulated daily from the 1^o up to the 21^o postnatal day. After this period, the animals were kept at the same conditions of the vivarium up to the age of 30 and 90 days, when the material for study was collected.

Euthanasia and collect of material

At the 30^o and the 90^o day, the mice were weighed and anesthetized with xylazine (Rompum ® – Bayer) (0,05 ml/100g) and hydrochloride of Ketamine (Ketalar®) (0,25ml/100g). Afterwards it was collected 3ml of blood of the animals by heart puncture. After the death of animals, the right femur was extracted and dissected. After that, measurements were realized.

Obtainment of the relative weight of femur

After dissected, femurs were weighed on a digital scale (accuracy: 0,1mg, maximum capacity 210g) (A& D Co., Japan). The relative weight of femur was obtained by the relationship between the femur weight and corporal weight (FW/CW) of animals.

Checking the femur length

The length of femur was checked with a pachymeter (DIAL, accuracy: 0,02mm) holding the femur in ventral surface on a flat and smooth surface. The measurement was realized from the head of femur up to the articular surface of femoral condyles.

Measurement of femur density

The density was measured with a hydrostatic scale (accuracy 0,001g; maximum capacity 500g and minimum capacity 0,02g) (Marte®).

Measurement of the femur neck-shaft angle

Holding the femur in ventral surface on a sheet of paper on a flat and smooth surface, two lines were traced: one parallel to femur diaphysis and the other projected from the center of femur head. The angle formed by the meeting of the prolongation of these lines was measured with a protractor (maximum of 180^o).

Alkaline Phosphatase

The blood collected was cooled down at a temperature of 5 to 6°C by 24 hours up to coagulate. The supernatant was centrifugated at 3000rpm during 10 minutes. After the

centrifugation the serum was pipetted (Pipeta Pasteur) and frozen. Afterwards, serum was defrosted and kept at normal temperature (25°) to measure alkaline phosphatase by colorimeter (Labtest –Diagnóstica, Brasil). Samples were analyzed in triplicate by spectrophotometer (BEL, model 1105) at 590nm of absorbance.

Results

Relative weight of femur

The relative weight of femur showed difference only in animals of 30 days treated with SSRI. At 90 days there was not expressive difference of relative weight of femur between groups control and treated (Figure 1).

Checking the femur length

The animals treated with SSRI showed at 30 days, femoral length significantly less than the animals of group control. The average of length values at 90 days did not show significant difference between the two groups (Figure 2).

Measurement of density and neck-shaft angle of femur

The average of density and neck-shaft angle did not show differences in any group (Figures 3 and 4, respectively).

Alkaline Phosphatase

Serum levels of alkaline phosphatase were increased in group treated at 30 days. At 90 days there was not significant difference between the two groups (Figure 5).

Discussion

The present study demonstrated that the use of SSRI during the development period of mice originated alterations of corporal weight, relative weight and length of femur. This work established the interference of SSRI in the transporters of 5-HT with consequences in the growth and development of animals. The study of femoral density and femur neck-shaft angle suggests that the SSRI did not alter the bone structure, contrary to various studies about bone

morphology. The serum levels of alkaline phosphatase in young animals do not follow the behavior of weight and length of femur at same phase. This work established the curious increment of osteoblastic activity, perhaps to compensate the pharmacologic aggression induced during the neonatal period.

The alterations in the relative weight of femur reflect the interference of 5-HT in the regulation of skeletal maturation. Contrary to found data, there are reports that prenatal and postnatal exposure to SSRIs does not influence the morphology, but can cause late effects in bone health ⁽²⁶⁾. On the other hand, there is evidence of the effects of serotonin in the acquisition of bone mass ⁽²⁶⁾. Children of users of SSRIs during gestation and lactation showed decrease of weight at birth and postnatal alterations of weight gain ^(13,24). It is known that the use of SSRI increases the availability of 5-HT in the synaptic gap what can cause alteration of feeding ⁽²³⁾. This could cause a decrease of feeding and weight gain ⁽²³⁾. The SSRIs can also induce a decrease of the surface of intestinal absorption and consequent decrease of weight ⁽¹⁸⁾. Thus, the less relative weight of femur of young mice treated with SSRI could occur due to the decrease of feeding or intestinal absorption of nutrients. However, the recuperation of relative weight at adult age does not discard the possibility of histomorphometric alterations in bone architecture.

The femoral growth showed decreased in the young animals treated with SSRI. In this case, the higher availability of 5-HT can cause alteration of neurohormonal and sensorimotor balance of bone metabolism. In adult animals, the absence of alterations in the femur growth emphasizes the effect of SSRI in skeletal maturation at short term. To corroborate with this found data, the use of SSRI carried attenuation or stagnation of speed of growth in four teenagers ^(26,28). The rhythm of growth of teenagers was recovered after the interruption of treatment or after the therapy with growth hormone (GH) ^(26,28). Another study verified that children treated with SSRI obtained an average gain of height less than the ones treated with

placebo ⁽⁸⁾. On the contrary, mice without gene 5-HTT and normal mice manipulated with fluoxetine did not show alterations in femoral length ⁽²⁶⁾. However, this study also identified alterations in mineral acquisition and bone architecture ⁽²⁶⁾.

The bone mineral density is usually obtained by the percentage relationship between the bones cortical and spongy ⁽⁷⁾. This relationship is analyzed by radiographic images or computed tomography ⁽⁷⁾. It is also possible to determine the bone density by the percentage of cancellous bone per area ^(4,5). Although the interaction between neurohormonal and sensorimotor factors was emphasized in the regulation of bone metabolism ^(6,9,11,29), it was not observed any alterations in bone density. In this study, the bone mineral density was obtained by the displaced volume (g/cm^3) not by the area, like in the other studies that evaluated this parameter ^(6,7,9). It is possible that this difference of methodology can be reflected in the obtained results.

In accordance with the found data about density, there are relates of the absence of relationship between a less bone mineral density and the use of antidepressant drugs ⁽⁹⁾. On the other hand, recent studies associate the use of SSRIs to the apposition of bone mass ^(6,1). The use of SSRIs was associated with the decrease of bone mineral density in men and to the increase of bone loss in aged women ⁽¹¹⁾. Aged men of SSRIs showed decrease of bone mineral density associated with fractures of vertebral column and proximal portion of femur ⁽⁶⁾. However, this work fails when do not isolate the use of SSRIs from familiar, dietetic and genetic factors. In aged women the use of SSRIs is related to the increase of bone loss of hip ⁽⁹⁾. In this case, the increase of risk factors of fractures of femur neck could also be associated with factors like cognitive and neuromuscular alterations or the psychotropic effects of antidepressant drugs ⁽⁹⁾.

Adjustment of the acetabulum to the femoral head is strongly influenced by the neck-shaft angle of the femur ⁽¹⁴⁾. Alterations in this angle can be observed during the normal

skeletal development ⁽¹⁴⁾. There were not emphasized alterations in the neck-shaft angle of femurs of mice exposed to a SSRI in neonatal period. On the contrary, some studies showed that SSRIs like sertraline, fluoxetine and amitriptyline would be related to alterations in the normal development craniofacial of neonate mice and children treated with these substances ^(17, 21). The SSRIs would be associated to malformation of fetus when used in the first trimester of gestation ⁽¹⁰⁾ and with structural alterations in femurs of mice with null mutation for the gene 5-HTT ⁽²⁷⁾.

The alkaline phosphatase represents the osteoblastic activity and it is widely used as marker of bone formation ^(19,22). However, experimental studies that relate SSRIs directly to the activity of this enzyme are scarce. The increase of serum levels of alkaline phosphatase in young animals pharmacologically manipulated emphasizes interactions between osteoblastic activity and 5-HT. However, it was expected that in these animals, the enzymatic levels follow the decrease observed in relative weight and length of femur. On the contrary to the found data, teenagers treated with SSRI showed decrease in the growth and serum levels of alkaline phosphatase ⁽¹⁵⁾. It is known that alterations in bone tissue after the use of SSRIs are due to alterations in osteoblasts ⁽⁴⁾ although there is also evidence between the interaction of 5-HT with osteocytes ⁽²⁹⁾. As a consequence, the balance between the bone formation and reabsorption can be altered by SSRIs ⁽²⁷⁾. In adult animals treated with SSRI, the normalizing of relative weight and length of femur justify the increase of the osteoblastic activity precociously. However, additional studies are necessary to map the activity of alkaline phosphatase in bone growth and development.

Thus, the use of SSRI during the breastfeeding period results in systemic and skeletal abnormalities in young animals. Especially the alteration of alkaline phosphatase suggests a significant action of 5-HT in the bone metabolism. The absence of alterations in adult animals emphasizes the short term effect of SSRI. Clinically, this fact is important, once the SSRIs are

drugs widely used to treat emotional disorders of individuals, including the ones in development phase. It is important to emphasize that histomorphometric studies are necessary to investigate possible alterations in bone structure.

References

1. BHANGU PS, GENEVER GJ, SPENCER TS, GREWAL TS, SKERRY TM. Evidence for Target Vesicular Glutamate Exocytosis in Osteoblasts. **Bone** 2001; 29(1):16-23.
2. BJURHOLM A, KREICBERGS AEB, BRODIN E, SCHULTZBERG M. Substance P and CGRP – immunoreactive nerves in bone. **Peptides** 1987; 9:165-171.
3. BLIZIOTES M, McLOUGHLIN S, GUNNES M, FUMAGALLI F, JONES SR, CARON MG. Bone Histomorphometric and Biochemical Abnormalities in Mice Homozigous for Deletion of the Dopamine Transporter Gene. **Bone** 2000; 26(1):15-19.
4. BLIZIOTES 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(5): 477- 486.
5. BLIZIOTES M., GUNNES A., 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.
6. CAULEY JA, FULLMAN RL, STONE KL, LAU EMC, ORWOLL ES. Factors associated with lumbar spine and proximal femur bone mineral density in older men. **Osteoporosis Int.** 2005; 16:1525-1537.
7. CHENG XG, LOWET G, BOONEN S, NICHOLSON PHF, BRYN P, NIJS J, DEQUEKER J. Assessment of the strength of proximal femur in vitro: relationship to femoral bone mineral density and femoral geometry. **Bone** 1997; 20:213-218.
8. ELI LILLY and COMPANY. **Prozac: Fluoxetine Hydrochloride**. Disponible <<http://www.lilly.com>>. Acesso em: 26jan. 2005.
9. ENSRUD KE, TERRI B, MANGIONI CM, BOWMAN PJ, BAUER DC, SCHWATZ A, HANLON JT, NEVITT MC, WHOOLEY MA. Central nervous system active medications and risk for fractures in older women. **Arch Intern Med.** 2003; 163: 949-957.
10. GOLDSTEIN DJ, CORBIN LA, SUNDELL KL. Effects of first – trimester fluoxetine exposure on the newborn. **Obstetrics and Gynecology.** 1997; 89(5). Part 1.
11. HANEY EM, CHAN BKS, LAMBERT L, CAULEY J, ENSRUD K, ORWOEL E, BLIZIOTES MM. SSRI use is associated with lower BMD among men. **J. Bone Miner. Res.** 2004; 19 (Suppl 1):S7.

12. HARA – IRIE F, AMIZUCA N, OZAWA H. Immunocytochemical and ultrastructural localization of CGRP – positive nerve fibers at the epiphyseal trabecules facing the growth plate of rat femures. **Bone** 1996; 18: 29-39.
13. HENDRICK V, SMITH LM, SURI R, HWANG S, HAYNES D, ALTSHULER L. Birth outcomes after prenatal exposure to antidepressant medication. **Am. J. Obstet. Gynecol.** 2003; 188:812-815.
14. ISAAC B, VETTIVEL S, PRASAD R, JEYASEELAN L, CHANDI G. Prediction of the femoral neck-shaft angle from the length of the femoral neck. **Clinical Anatomy.** 1997; 10:318-323.
15. KHOLSA S, KLEEREKOPER M.. Biochemical markers of bone turnover. In: Favus, M.J., Primer on the Metabolic Bone Diseases of Mineral Metabolism. **American Society of Bone and Mineral Research** 2003:166-172.
16. MASON DJ. *et al.* Mechanically regulated expression of neural glutamate transporter in bone: a role of excitatory amino acids as osteotropic agents? **Bone** 1997; 20:199-205.
17. MOISEWITSCH JRD. The role of serotonin and neurotransmitters during craniofacial development. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.** 2000; 11(2):230-239.
18. MOTA DL, MANHÃES DE CASTRO R, BITTENCOURT AM. e cols. Tratamento neonatal com Inibidor Seletivo da Recaptação da Serotonina (ISRS): mudanças na morfologia intestinal, **Neurobiologia** 2000; 63: 55-59.
19. SCHÖNAU E, RAUCH F. Markers of bone and collagen metabolism – problems and perspectives in paediatrics. **Horm. Res.** 1997; 48 (Suppl 5): 50-59.
20. SERRE CM, FARLAY D, DELMAN PD, CHENU C. Evidence for a dense and Intimate Innervation of the bone tissue, including Glutamate –Containing fibers. **Bone.** 1999; 25(6):623-629.
21. SHUEI D, SADLER T, LAUDER J. Serotonin as a regulator of craniofacial morphogenesis: Site specific malformations following exposure to serotonin uptake inhibitors. **Teratology** 1992; 46:367-378.
22. SIGGELKOW H, REBENSTORFF K, KURRE W, NIEDHART C, ENGEL F, SCHULS H, ATKINSON MJ, HÜFNER M. Development of the osteoblast phenotype in primary human osteoblast culture: comparison with rat calvarial cells in osteoblast differentiation. **J Cell Biochem.** 1999; 75(1): 22-35
23. SIMANSKY, KJ. Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. **Behaviour Brain Research** 1996;73: 37-42
24. SIMON, GE, *et al.* Outcomes of prenatal antidepressant exposure. **Am. J. Psychiatry.** 2002; 159:2055-2061.
25. TURNER CH., ROBLING AG, DUNCAN RL, BURR DB. Do bone cells behave like a neuronal network? **Calcif Tissue Int.** 2002; 70: 435-442

26. WARDEN JS, ROBLING AG, SANDERS MS, BLIZIOTES MM, TURNER CH. Inhibition of the serotonin (5-Hydroxitriptamine) transporter reduces bone accrual during growth. **Endocrinology** 2005a; 146(2): 685-693.
27. WARDEN JS, BLIZIOTES MM, WIREN KM, ESHLEMAN AJ, TURNER CH, TURNER CH. Neural regulation of bone and the skeletal effects of serotonin (5-hydroxytryptamine). **Molecular and Cellular Endocrinology** 2005; 242 (1-2):1-9.
28. WEINTROB N, COHEN D, KLIPPER-AURBACH Y, ZADIK Z, DICKERMAN Z. Decrease growth during therapy with Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. **Arch. Pediatr. Adolesc. Md.** 2002; 156: 696-701.
29. WESTBROEK I.; *et al.* Expression of serotonin receptors in bone. **J. Biol. Chem** 2001; 276(31), Issue 3: 28961-28968.

Key words: serotonin, bone receptors, femur, alkaline phosphatase, growth

Figures and legends:

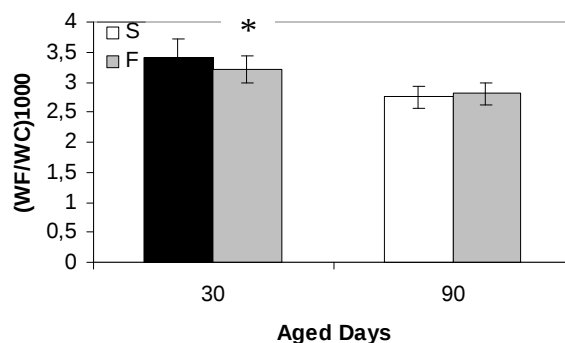


Figure 1: Relative weight of femur of mice treated with fluoxetine during breastfeeding period. The newborns received daily fluoxetine (F, n=15, 10 mg/Kg p.c., s.c.) or saline solution (S, n=15, NaCl 0,9%) from 1° to 21° day of life. At 30 and 90 days of life the animals were anaesthetized and sacrificed to extract femur. The femur of right thigh was extracted, dissected and weighed. The found data are represented in $X \pm DP$. * Indicates difference ($p < 0.05$) between the groups, test *t student*.

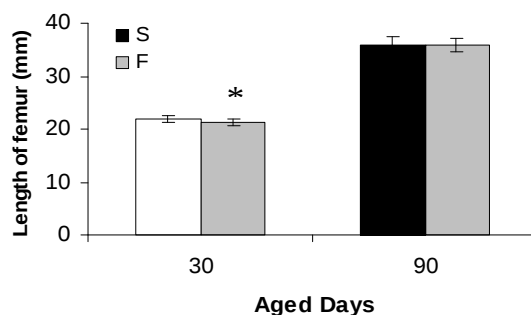


Figure 2: -Length of femur of mice treated with fluoxetine during breastfeeding period. The newborns received daily fluoxetine (F, n=15, 10 mg/Kg p.c., s.c.) or saline solution (S, n=15, NaCl 0,9%) from 1° to 21° day of life. At 30 and 90 days of life the animals were anaesthetized and sacrificed to extract femur. Femur was excised by a surgical procedure. Measurement was realized from the head up to the condyles with the use of a pachymeter. The found data are represented in $X \pm DP$. It was used the test *t student* to statistical analysis of data.

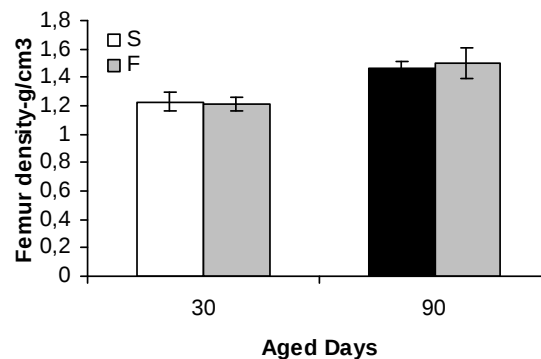


Figure 3: Femur density of mice treated with fluoxetine during breastfeeding period. The newborns received daily fluoxetine (F, n=15, 10 mg/Kg p.c., s.c.) or saline solution (S, n=15, NaCl 0,9%) from 1° to 21° day of life. At 30 and 90 days of life the animals were anaesthetized. Femur was excised by a surgical procedure. The density was measured with a hydrostatic scale. The found data are represented in $X \pm DP$. It was used the test *t student* to statistical analysis of data ($p < 0.05$).

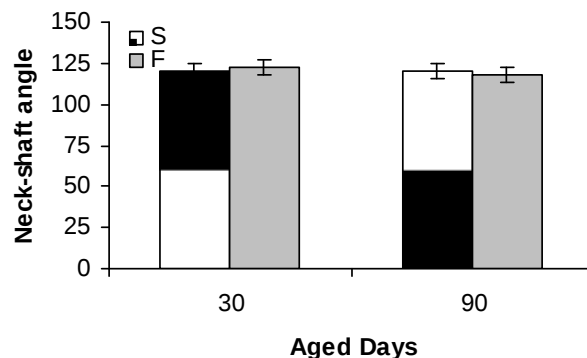


Figura 4: Femoral neck-shaft angle of mice treated with fluoxetine during breastfeeding period. The newborns received daily fluoxetine (F, n=15, 10 mg/Kg p.c., s.c.) or saline solution (S, n=15, NaCl 0,9%) from 1° to 21° day of life. At 30 and 90 days, after anaesthetized, femur was excised. The angle was measured with a protractor. The found data are represented in $X \pm DP$. It was used the test *t student* to statistical analysis of data ($p < 0.05$).

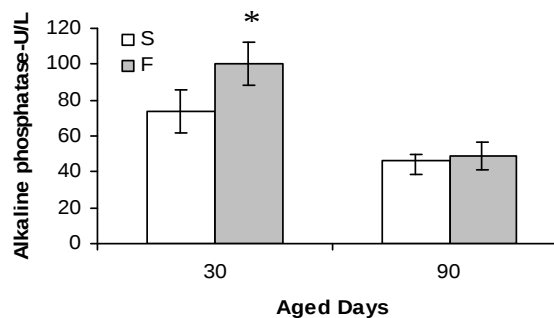


Figura 5: Serum alkaline phosphatase of mice treated with fluoxetine during breastfeeding period. The newborns received daily fluoxetine (F, n=15, 10 mg/Kg p.c., s.c.) or saline solution (S, n=15, NaCl 0,9%) from 1° to 21° day of life. At 30 and 90 days of life the femur was excised by a surgical procedure. Blood was collected by heart puncture and the alkaline phosphatase was measured by colorimeter method. The found data are represented in $X \pm DP$. * Indicates difference ($p < 0.05$) between the groups, test *t student*.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.