

IGOR HENRIQUE MORAIS SILVA

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DO ÓRGÃO DO ESMALTE EM
PRIMEIROS MOLARES SUPERIORES DE RATOS TRATADOS COM
FLUOXETINA**

Dissertação apresentada ao Curso de mestrado em
Patologia da Universidade Federal de Pernambuco para
obtenção do Título de Mestre em Patologia.

Mestrando : Igor Henrique Moraes Silva

Orientador (a) : Profa. Dra. Liriane Baratella Evêncio

Co-orientador : Prof. Dr. Raul Manhães de Castro

RECIFE – PE

2007

Silva, Igor Henrique Moraes

Análise morfológica do órgão do esmalte em primeiros molares superiores de ratos tratados com fluoxetina / Igor Henrique Moraes Silva. – Recife: O Autor, 2007.

106 folhas : il., fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Patologia, 2007.

Inclui bibliografia.

1. Amelogênese – Fluoxetina - . 2. Odontogênese – Serotonina . 3. Amelogênese – Serotonina I. Título.

616.314.13
617.632

CDU (2.ed.)
CDD (20.ed.)

UFPE
CCS2007-29



Universidade Federal de Pernambuco
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE MESTRADO EM PATOLOGIA

AUTOR: IGOR HENRIQUE MORAIS SILVA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: MORFOLOGIA APLICADA

NOME DA TESE: "ANÁLISE MORFOLÓGICA DO ÓRGÃO DO ESMALTE EM PRIMEIROS MOLARES SUPERIORES DE RATOS TRATADOS COM FLUOXETINA".

ORIENTADORA: LIRIANE BARATELLA EVÊNCIO

TESE DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM PATOLOGIA

DATA: 28 DE FEVEREIRO DE 2007

BANCA EXAMINADORA:

PROFA. SILVIA REGINA ARRUDA DE MORAES

Sylvia

PROF. ETENILDO DANTAS CABRAL

Etencildo

PROF. JOAQUIM EVÊNCIO NETO

Joaquim

Dedico este trabalho

Ao meu pai **José Bartolomeu da Silva** cuja origem, inteligência, perseverança, competência e caráter me orgulham e servem de exemplo de como ser pai e amigo para sempre em minha vida.

A minha mãe **Luzineth Moraes Silva**, um exemplo de mulher simples, inteligente, sincera e batalhadora. A ela devo minha vida e por ela faço tudo em prol do seu bem e sua felicidade.

A minha avó **Letícia Siqueira Varejão** (in memoriam) cuja morte prematura ainda me entristece, porém a sua presença em meu coração me dá forças para dar-lhe alegrias com minhas conquistas onde ela estiver.

A todos os meus familiares que fizeram parte da minha trajetória na universidade e carreira profissional. O acolhimento, os conselhos, o carinho e a atenção foram muito importantes na ausência de meus pais.

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar pelas conquistas, amizades, família e oportunidades na minha vida.

A minha orientadora Profa. Dra. Liriane Baratella Evêncio pela paciência, compreensão, conselhos e dedicação em todos os estágios na realização deste trabalho. A esta que admiro pela inteligência e sabedoria, minha gratidão e reconhecimento.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Raul Manhães de Castro pela grande contribuição no trabalho, ao “seu Raul” agradeço ainda a oportunidade, confiança, orientação e conselhos.

A minha namorada Giselle Barbosa de Lira pelo amor, carinho e incentivo nas horas difíceis.

A coordenação do curso de mestrado em Patologia representada pelo prof. Dr. Roberto Viera de Melo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela bolsa de mestrado que nos concedeu.

Ao Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto pelo acolhimento e orientações na análise das lâminas.

A Sidcley Araújo e estagiários, Valdinéia e Hilton, do laboratório de histotecnologia do mestrado em Patologia pela dedicação na confecção das lâminas.

Ao veterinário Edeones Tenório de França pelos ensinamentos, palavras de incentivo e momentos de descontração com sua forma ímpar de tratar os animais no biotério.

Ao senhor José Paulino Ventura pelo auxílio e dedicação ao tratamento dos animais no biotério.

Aos meus estagiários Ézio, Érica, Emanuelle e Patrícia pela dedicação na realização das tarefas, amizade e respeito. Sem a ajuda de vocês a realização deste sonho não seria possível.

A Marina, Rafael e Ariana que fazem parte de outro grupo de estudo, mas me ajudaram bastante na realização deste trabalho.

A meus colegas de curso pela companhia, ajuda e momentos de descontração durante todo o curso.

Aos colegas de todos os dias no laboratório Wylla, Roberta, Renata e Marcos pelas orientações e companheirismo.

Aos que fazem o distrito sanitário II da Secretaria de Saúde do Recife. Em especial à Bernadete, Rita, Adriana, Zailde, Juliana e Brena. Obrigado pela ajuda e compreensão durante esses dois anos.

Aos companheiros de trabalho da Unidade de Saúde Alto do Maracanã: Jorge, Fernando, Otoniel, Cassiano, Diana, Virginia, Roseli. A paciência, compreensão, palavras de incentivo e cumplicidade de vocês foi fundamental para mais uma conquista minha.

Aos agentes comunitários de saúde: Jaqueline, Edvânia, Josiel, Ana, Leu, Ivanilda, Fia, Edna, Olga, Zezé, Neide e Valéria pela compreensão, cumplicidade e respeito.

Aos meus amigos Cristiane, Juca, Vladimir e sua esposa Patrícia pela forma atenciosa que me receberam em sua casa para formatar e organizar as fotomicrografias .

A todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para realização deste trabalho.

“ ... Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante. ”.

Chaplin

RESUMO

Estudos prévios avaliaram a presença de serotonina durante a odontogênese no interior do epitélio e mesênquima dentário sugerindo a sua participação no desenvolvimento dos dentes. A serotonina regula uma enorme variedade de processos do desenvolvimento durante a embriogênese. Assim sendo, no presente estudo utilizamos a fluoxetina, um inibidor seletivo de recaptação da serotonina, na dosagem de 10 mg/kg de peso administrada durante 20 dias em ratas grávidas para analisar o papel desta no desenvolvimento do órgão do esmalte em primeiros molares superiores de 36 ratos *Wistar*, totalizando 72 germes dentários, do 17º dia de V.I.U até o 10 º dia de vida. As ratas grávidas foram anestesiadas por xilazina a 10mg/kg e quetamina a 25 mg/kg. Os fetos foram retirados, decapitados, suas mandíbulas removidas e o maxilar superior exposto. As peças foram fixadas em Bouin, descalcificadas em ácido nítrico a 5% quando necessário, processadas convencionalmente para microscopia de rotina e incluídas em parafina. Secções de 5 µm foram obtidas e coradas em HE, PAS e tricrômico de Masson. A análise morfológica não revelou alterações estruturais no grupo tratado em relação ao controle, o que sugere que a fluoxetina, na dosagem utilizada não interfira no papel da serotonina durante o desenvolvimento do órgão do esmalte, e consequentemente no processo da amelogênese.

Palavras-Chaves : Órgão do Esmalte. Crescimento e Desenvolvimento. Fluoxetina. Germes Dentários. Serotonina.

ABSTRACT

Previous studies have stated the presence of serotonin during the odontogenesis within the epithelium and dental mesenchyme once that they contribute for the development of the teeth. Serotonin controls a great deal of developmental processes during the embryogenesis. That being so, the paper herein referred to made use of fluoxetine which is a selective inhibitor for serotonin recapture by the dose of 10 mg / Kg weight managed within the period of 20 days. Such an experiment was dosed in female pregnant rats in order to analyze the role of fluoxetine into the development of the enamel organ in the first upper molars of 36 *Wistar* rats in an overall of 72 dental germs from the 17th day of V.I.U. up to the 10th living day. The pregnant rats were anaesthetized by xilazyn at 10 mg / Kg and quetamyn at 25 mg / Kg. The fetuses were taken out, decapitated, and their jaws were removed so that their superior maxillary was exposed. Such pieces were put in Bouin and decalcified in nitric acid at 5% when necessary. Yet the pieces, they were conducted conventionally to a routine microscopic observation and yet included onto paraffin. Sittings of 5 µm were obtained, colored in HE, PAS and trichromy of Masson. The morphological and histochemical analysis did not reveal any structural changing in the referred group with respect to the control. That being so, one perceived that the fluoxetine, within the dose herein mentioned does not interfere in the role of the serotonin in the period of the development of the organ in charge of the enamel, and therefore in the process of the amelogenesis.

Keywords : Enamel Organ. Growth and Development. Fluoxetin. Tooth Germs. Serotonin.

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Ameloblastos
AC	Alça Cervical
EE	Epitélio Externo
EI	Epitélio Interno
ET	Extrato Intermediário
FD	Folículo Dental
FM	Figuras de Mitose
FT	Fibrilas de Thomes
H	Hemácias
M	Macrófagos
MB	Membrana Basal
MD	Matriz de Dentina
ME	Matriz de Esmalte
O	Odontoblastos
P	Pedículo
PA	Pré-Ameloblastos
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PD	Papila dentária
PT	Processo de Thomes
RE	Retículo Estrelado
TO	Tecido ósseo
VS	Vaso Sanguíneo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotomicrografia de germe dental de primeiro molar superior de rato com 17 dias de V.I.U., grupo experimental. Página 47.

Figura 2 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 17 dias de V.I.U., grupo experimental. Página 47.

Figura 3 – Fotomicrografia de germe dental de primeiro molar superior de rato com 17 dias de V.I.U., grupo controle. Página 49.

Figura 4 – Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 17 dias de V.I.U., grupo controle. Página 49.

Figura 5 – Fotomicrografia de germe dental de primeiro molar superior de rato com 17 dias de V.I.U., grupo experimental . Página 51.

Figura 6 – Fotomicrografia de germe dental de primeiro molar superior de rato com 17 dias de V.I.U., grupo controle. Página 51.

Figura 7 – Fotomicrografia de germe dental de primeiro molar superior de rato com 19 dias de V.I.U., grupo experimental. Página 54.

Figura 8 – Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 19 dias de V.I.U., grupo experimental. Página 54.

Figura 9 – Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 19 dias de V.I.U., grupo experimental. Página 56.

Figura 10 – Fotomicrografia de germe dental de primeiro molar superior de rato com 19 dias de V.I.U., grupo controle. Página 58.

Figura 11 – Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 19 dias de V.I.U., grupo controle. Página 58.

Figura 12 – Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 19 dias de V.I.U., grupo experimental. Página 60.

Figura 13 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 19 dias de V.I.U., grupo controle. Página 60.

Figura 14 – Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 01 dia de vida, grupo experimental. Página 64.

Figura 15 – Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 01 dia de vida, grupo experimental. Página 64.

Figura 16 – Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 01 dia de vida, grupo experimental. Página 66.

Figura 17 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 01 dia de vida, grupo controle. Página 68.

Figura 18 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 01 dia de vida, grupo controle. Página 68.

Figura 19 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 03 dias de vida, grupo experimental. Página 72.

Figura 20 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 03 dias de vida, grupo experimental. Página 72.

Figura 21 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 03 dias de vida, grupo controle. Página 74.

Figura 22 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 03 dias de vida, grupo controle. Página 74.

Figura 23 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 05 dias de vida, grupo experimental. Página 78.

Figura 24 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 05 dias de vida, grupo experimental. Página 78.

Figura 25 – Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 05 dias de vida, grupo experimental. Página 80.

Figura 26 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 05 dias de vida, grupo controle. Página 82.

Figura 27 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 05 dias de vida, grupo controle. Página 82.

Figura 28 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 05 dias de vida, grupo controle. Página 84.

Figura 29 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 05 dias de vida, grupo experimental. Página 86.

Figura 30 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 05 dias de vida, grupo controle. Página 86.

Figura 31 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 10 dias de vida, grupo experimental. Página 89.

Figura 32 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 10 dias de vida, grupo experimental. Página 89.

Figura 33 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 10 dias de vida, grupo controle. Página 91.

Figura 34 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 10 dias de vida, grupo controle. Página 91.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	16
REVISÃO DE LITERATURA.....	19
1 Fármacos antidepressivos.....	20
2 Papel da serotonina no crescimento e desenvolvimento.....	23
3 Odontogênese.....	26
3.1 Considerações gerais.....	26
3.2 Amelogênese.....	29
4 Papel da serotonina na odontogênese.....	33
OBJETIVOS	36
1 Geral.....	37
2 Específicos.....	37
METODOLOGIA.....	38

1	Animais.....	39
2	Grupos de estudo.....	40
	Grupo Tratado.....	40
	Grupo de Controle.....	40
3	Tratamento dos animais.....	41
4	Processamento laboratorial.....	41
5	Análise morfológica do órgão do Esmalte.....	42
	RESULTADOS.....	44
1	Animais com 17 dias de vida intra-uterina.....	45
2	Animais com 19 dias de vida intra-uterina.....	52
3	Animais com 01 dia de vida.....	61
4	Animais com 03 dias de vida.....	69
5	Animais com 05 dias de vida.....	75

5	Animais com 10 dias de vida.....	87
	DISCUSSÃO	92
	CONCLUSÃO.....	98
	REFÊRENCIAS.....	100

INTRODUÇÃO

A odontogênese é a consequência de um complexo de interações entre dois tecidos, o epitélio oral primitivo e o ectomesênquima o qual deriva das células da crista neural, dividida em diferentes fases: fase de botão, capuz, campânula, coroa e raiz. O órgão do esmalte representa a porção epitelial de germe dentário e durante seu desenvolvimento surgirão as células responsáveis pela deposição da matriz do esmalte: os ameloblastos. O esmalte dentário tem sido para a classe odontológica um ponto chave na busca do conhecimento, visto ser avital, avascular, não innervado e sem capacidade regenerativa. Ao mesmo tempo, é friável, constituído de aproximadamente 97% de matéria inorgânica, sem plasticidade e não resiliente. Com todo este grau de dureza, o esmalte torna-se importantíssimo para a cobertura da coroa dentária recobrando o complexo dentina-polpa coronário e fornecendo dureza e resistência suficientes para desempenhar atividade mastigatória. A formação do esmalte ou amelogênese ocorre inicialmente em vida intra-uterina para os dentes decíduos e durante a infância para os dentes permanentes (CARLSON, 1996; KATCHBURIAN ; ARANA, 2004).

A possibilidade dos neurotransmissores apresentarem uma função de não-transmissão durante o desenvolvimento decorre de sua presença precoce na embriogênese de diferentes tecidos (BUZNIKOV *et al.*, 1996; 2001). A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é uma indolamina produto da hidroxilação e carboxilação do aminoácido L-Triptofano. Trata-se de um neurotransmissor, cujas ações resultam de sua interação com estruturas moleculares específicas denominadas de receptores serotoninérgicos (HOYER *et al.*, 1994; MANHÃES DE CASTRO, 1995). O sistema serotoninérgico destaca-se entre os sistemas de neurotransmissores envolvidos na modulação do desenvolvimento e crescimento, promovendo a regulação das interações epitélio-mesenquimais, estimulando a migração e diferenciação celular durante a formação do tubo neural e arcos branquiais, possibilitando o surgimento de diferentes tecidos (BYRD *et al.*, 2000; MOISEIWITSCH, 2000) .

O avanço da farmacologia promoveu o surgimento de substâncias altamente seletivas que atuam especificamente em determinados sistemas de neurotransmissores. As substâncias inibidoras seletivas de recaptação da serotonina (ISRS), dentre elas a fluoxetina, constituem ferramentas farmacológicas que podem atuar a nível celular (BALLONE ; ORTOLANI, 2003). Baseado na habilidade dos ISRS em causar malformações em embriões, é possível que a serotonina module as interações epitélio – mesênquimais essenciais para o desenvolvimento normal de diferentes tecidos, incluindo os tecidos dentários. A aplicação da fluoxetina por via subcutânea em ratas gestantes permite alterações nos níveis de serotonina durante o período de gestação. Sendo assim, a utilização dessa substância consiste em uma ferramenta para estudar o papel da serotonina no desenvolvimento e crescimento de diferentes tecidos. Neste estudo a utilização da fluoxetina será realizada com o intuito de avaliar a influência desta no desenvolvimento do órgão do esmalte em primeiros molares superiores de ratos durante a odontogênese.

REVISÃO DE LITERATURA

1 Fármacos antidepressivos

Os distúrbios afetivos constituem um grupo de condições mentais caracterizadas fundamentalmente pelas alterações do humor. A depressão consiste num distúrbio de humor persistente, com predominância e sentimentos de desesperança, desvalia, culpa, desamparo associados a alterações de apetite e peso, insônia, fadiga, retardo ou agitação psicomotora, diminuição do desempenho sexual, dificuldade de concentração e raciocínio, pensamentos recorrentes sobre a morte, com ou sem tentativas de suicídio (GUIMARÃES ; WANNMACHER, 1998).

Os antidepressivos são drogas que aumentam o tônus psíquico melhorando o humor e, conseqüentemente, a psicomotricidade de maneira global. Acredita-se que o efeito antidepressivo se dê às custas de um aumento da disponibilidade de neurotransmissores no SNC, notadamente da serotonina (5-HT), da noradrenalina ou norepinefrina (NE) e da dopamina. Este aumento de neurotransmissores na fenda se dá através do bloqueio da recaptação da NE e da 5-HT, ou ainda, através da inibição da Monoaminoxidase (MAO) que é a enzima responsável pela inativação destes neurotransmissores (BALLONE, 2003). Os mecanismos responsáveis pela manipulação da disponibilidade dos neurotransmissores na fenda respondem pela classificação dos antidepressivos em quatro grupos: antidepressivos tricíclicos (ADT), inibidores seletivos de recaptação da serotonina (ISRS), inibidores da monoaminoxidase (IMAO) e os antidepressivos atípicos (BALLONE ; ORTOLANI, 2003).

Os antidepressivos tricíclicos agem sobre o sistema límbico aumentando a NE e a 5-HT na fenda sináptica. Este aumento da disponibilidade dos neurotransmissores na fenda sináptica é conseguido através da inibição na recaptação destas aminas pelos receptores pré-sinápticos. Os ADTs são potentes anticolinérgicos provocando efeitos colaterais no sistema nervoso central como a síndrome anticolinérgica central caracterizada por agitação, confusão

mental, delírios e alucinações. Alterações do tipo cardiocirculatórias, endocrinológicas, genitourinárias, sudorese excessiva e tremores nas mãos também são relatadas (BALLONE, 2003; BALLONE ; ORTOLANI, 2003).

Os diversos efeitos colaterais provocados pela utilização dos ADTs culminou com o surgimento de novos fármacos que aumentam, predominantemente, o nível da serotonina e não da noradrenalina. Estas drogas são, a princípio, ferramentas farmacológicas que podem atuar a nível celular. Os antidepressivos chamados de inibidores seletivos da recaptação da serotonina são aqueles que não interferem ou interferem pouco nos demais neurotransmissores além da serotonina. Uma vez liberada, um eficiente mecanismo de recaptação é ativado para remoção da serotonina da fenda sináptica graças à ação de proteínas transportadoras presentes na membrana do neurônio pré-sináptico (SLOTKIN *et al.*, 1978; BALLONE ; ORTOLANI, 2003). Os ISRS são utilizados como antidepressivos que apresentam mecanismos comuns de ação, porém diferem em sua estrutura química, metabolismo e farmacocinética. Sua ação permite o aumento da disponibilidade de serotonina na fenda sináptica (HYTTEL, 1994).

A fluoxetina é um fármaco antidepressivo, pertencente ao grupo dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina. Age seletivamente não tendo afinidade pelos receptores adrenérgicos, muscarínicos, colinérgicos, H₁-histamínicos e dopamínicos. Sua ação decorre do aumento da concentração de serotonina pelo sistema nervoso central, devido ao bloqueio pré-sináptico dos receptores de serotonina 5-HT (5-hidroxitriptamina). É indicada no tratamento contra depressão, distúrbios compulsivos, automutilação, ansiedade e agressividade além de ter surgido como o primeiro representante da classe dos ISRS (BALLONE, 2003).

A serotonina é uma indolamina, produto da hidroxilação e carboxilação do aminoácido L-Triptofano. Trata-se de um neurotransmissor cujas ações resultam mais

precisamente de sua interação com estruturas moleculares específicas denominadas de receptores serotoninérgicos (HOYER *et al.*, 1994; MANHÃES DE CASTRO, 1995). Participa de regulação do humor, sono, atividade sexual, apetite, funções neuroendócrinas, temperatura corporal, sensibilidade à dor, atividade motora e funções cognitivas (FUCHS, 1998; BALLONE, 2001).

Embora os complexos efeitos observados com o uso prolongado de antidepressivos tenham levado alguns autores a questionar o envolvimento da serotonina na depressão, estudos apontam para sua importância. Algumas pesquisas que procuraram embasar a teoria da depressão como dependendo de baixos níveis de serotonina, tomaram como ponto de partida o fato de uma dieta suficientemente livre de triptofano, a ponto de produzir um pico plasmático muito baixo deste aminoácido, resultar em um estado depressivo moderado (CHARNEY *et al.*, 1984). Aminoácidos neutros, tais como a tirosina, fenilalanina, leucina, isoleucina e valina competem com o triptofano no transporte através da barreira hematoencefálica. Em pacientes com depressão grave se constata diminuição do triptofano plasmático livre e quanto mais deprimido menor a proporção deste em relação aos aminoácidos livres. Quando se tem uma baixa concentração de triptofano em relação a esses aminoácidos significa que, terapeuticamente, pode haver uma boa resposta à depressão quando se faz a administração de Triptofano por via oral (MOLLER, 1980 ; DE MEYER, 1981). Delgado *et al.*, 1990, demonstraram que o efeito terapêutico de drogas que potencializam a neurotransmissão serotoninérgica desaparece se os pacientes forem submetidos à depleção do aminoácido essencial Triptofano, precursor da serotonina.

2 Papel da serotonina no crescimento e desenvolvimento

O desenvolvimento de um organismo compreende a progressiva diferenciação de tecidos e órgãos, acompanhada da aquisição de funções específicas (KOLETZKO *et al.*, 1998). A hipótese de que os neurotransmissores apresentam funções de não-transmissão durante o desenvolvimento é decorrente da precoce presença dessas substâncias durante as fases da embriogênese regulando eventos como a primeira divisão celular após a fertilização, gametogênese, morfogênese, migração e diferenciação celular (BUZNIKOV *et al.*, 1996; 2001). Os neurotransmissores interagem com seus receptores, estes alteram o metabolismo celular, influenciando as diversas etapas do desenvolvimento orgânico (BUZNIKOV, 1996; LAUDER *et al.*, 1981).

Dados da literatura têm relatado casos de elevada prevalência de desordens psiquiátricas durante a gravidez (LAINE *et al.*, 2003). Tem sido uma constante na área médica a administração de drogas psicotrópicas a mulheres em fase de gestação. No entanto, segundo a Food and Drug Administration (FDA), os efeitos a longo prazo sobre o feto ainda são obscuros (SIMON *et al.*, 2002). Os efeitos verificados decorrentes da administração de drogas psicotrópicas durante a gestação variam desde partos prematuros até malformações congênitas (COHEN *et al.*, 2001). Shuey *et al.*, 1992, em estudos com embriões de ratos expostos a ISRS (sertralina, fluoxetina), relataram a presença de má formação craniofacial. Essas resultam do rompimento da regulação do crescimento em decorrência da alteração da função serotoninérgica nas interações epitélio-mesenquimais fundamentais para o desenvolvimento normal da região craniofacial.

O sistema de neurotransmissão serotoninérgico é composto pelos neurônios serotoninérgicos e seus receptores situados sobre as células. Existem cerca de 14 tipos e subtipos de receptores serotoninérgicos de localização pré e pós-sináptica que apresentam

heterogeneidade surpreendente. Os subtipos dos receptores serotoninérgicos atuam modulando a atividade de enzimas ou alterando a permeabilidade dos canais iônicos (HOYER *et al.*, 1994; MANHÃES DE CASTRO, 1995). Em cérebros humanos, os primeiros neurônios que liberam serotonina estão presentes a partir da 5ª semana (SUNDSTROM *et al.*, 1993) e aumentam rapidamente até a 10ª semana de gestação (SHEN *et al.*, 1989; KONTUR *et al.*, 1993; LEVALLOIS *et al.*, 1997). Por volta da 15ª semana gestacional, a organização típica dos neurônios serotoninérgicos pode ser vista nos núcleos da rafe (TAKAHASHI *et al.*, 1986).

A serotonina regula uma enorme variedade de processos do desenvolvimento durante a embriogênese como nos fenômenos de neurogênese, diferenciação neuronal, mielinização e sinaptogênese (LAUDER *et al.*, 2003). O sistema serotoninérgico destaca-se entre os sistemas de neurotransmissores envolvidos na modulação do desenvolvimento e crescimento promovendo a regulação das interações epitélio-mesenquimais, estimulando a migração e diferenciação celular durante a formação do tubo neural e arcos branquiais promovendo o surgimento de diferentes tecidos (TURLEJSKI, 1996; SHUEY *et al.*, 1992, 1993; BYRD *et al.*, 2000; MOISEWITSCH, 2000). Alterações nos níveis de serotonina durante a embriogênese pode resultar em distúrbios no crescimento e desenvolvimento de muitos tecidos (MENDES-DA-SILVA *et al.*, 2002). O tratamento crônico com citalopram, um ISRS, durante o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso, provocou, de forma duradoura, reduções do padrão de crescimento do encéfalo, crânio e eixo longitudinal de ratos neonatos (DEIRÓ, 1998).

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso a serotonina age possivelmente como um fator neuronal trófico atuando em seus múltiplos receptores promovendo a auto-regulação do desenvolvimento dos neurônios serotoninérgicos e participando do desenvolvimento dos seus tecidos-alvo (WHITAKER ; AZMITIA, 1986; HAMON ; EMERIT, 1989). Em ratos, os

primeiros neurônios serotoninérgicos aparecem entre 12º e 14º dias da gestação (LAUDER ; BLOOM, 1971). O sistema serotoninérgico atinge seu pico de funcionamento durante os estágios precoces do desenvolvimento diminuindo progressivamente na vida adulta (HEDNER *et al.*, 1986; TOTH, 1986; WHITAKER ; AZMITIA, 2001). O período de rápido crescimento do encéfalo constitui uma fase sensível às agressões, sendo, portanto, considerado um período crítico do desenvolvimento do SNC (WINICK *et al.*, 1972; MORGANE *et al.*, 1993). A influência da 5 – HT ocorre mais especificamente durante esse período, pois sua retirada durante o período fetal do desenvolvimento de ratos leva à redução permanente no número de neurônios no hipocampo e córtex cerebral quando adultos (LAUDER, 1976).

Por volta do 10º dia de vida a serotonina participa ativamente do desenvolvimento craniofacial modulando as interações epitélio–mesênquimais, essenciais para o desenvolvimento dessa região (SHUEY *et al.*, 1992). Na modulação do desenvolvimento craniofacial a serotonina poderia desempenhar seu papel através de uma ação direta ou indireta, esta realizada por meio da morforegulação de outras moléculas como a S-100 beta, uma proteína ligada ao cálcio, e a tenascina, proteína presente na matriz extracelular. A expressão dessas moléculas sofre regulação serotoninérgica, por sua vez a S-100 beta e a tenascina desempenham papel importante no desenvolvimento craniofacial (MOISEWITSCH *et al.*, 1998).

O papel do sistema serotoninérgico no desenvolvimento ósseo vem sendo estudado desde que receptores para serotonina foram encontrados em células ósseas. Um aumento da resposta proliferativa de fibroblastos periosteal mediada via receptor 5-HT_{2B} foi observado levantando a possibilidade de que um dos papéis da serotonina no osso seja a estimulação da proliferação de células precursoras de osteoblastos no reparo de fraturas (WESTBROEK *et al.*, 2001). Ainda no tecido ósseo, Bliziotis *et al.* (2001) verificaram que a serotonina promove,

de forma indireta, a produção de collagenase pelos osteoblastos, sugerindo que estes expressam tanto um mecanismo para responder como para regular a captação de 5-HT representando, portanto um sistema funcional serotoninérgico no osso.

3 Odontogênese

3.1 considerações gerais

A odontogênese é a consequência de um complexo de interações entre dois tecidos embrionários, o epitélio do primeiro arco branquial e o ectomesênquima, derivado das células da crista neural, responsáveis pela formação dos elementos dentários (BEEMAN ; KRONMILLER, 1994).

Durante o desenvolvimento facial o estomódeo ou cavidade oral primitiva encontra-se revestido por um epitélio formado por duas ou três camadas de células denominado epitélio oral primitivo. As células conjuntivas subjacentes originam-se da crista neural e constituem o ectomesênquima que é formado por células fusiformes separadas por abundante substância intercelular gelatinosa (CARLSON, 1996; JUNG, 2003).

Por volta da sexta semana de vida intra-uterina uma rápida proliferação de células epiteliais ao longo dos maxilares em desenvolvimento resulta em um espessamento deste epitélio dando origem à banda epitelial primária; primeiro sinal de desenvolvimento do germe dentário. O espessamento epitelial ocorre devido a sucessivas divisões mitóticas que promovem uma invaginação do epitélio em direção ao ectomesênquima. Posteriormente a banda epitelial dá lugar a duas subdivisões, uma em direção vestibular e outra em direção lingual. A primeira delas foi denominada de banda vestibular cujas células que a formam aumentam rapidamente de volume e depois degeneram pra formar o vestíbulo. A segunda

subdivisão expande-se para lingual formando a lâmina dentária ao longo dos futuros arcos dentários (OSMAN; RUCH, 1975; KATCHBURIAN; ARANA, 1999, 2004).

Embora seja um processo contínuo, a odontogênese costuma ser dividida em fases de acordo com a morfologia do germe dental em desenvolvimento a saber: fase de botão, fase de capuz, fase de campânula. Quando se inicia a deposição de tecido mineralizado temos a fase de desenvolvimento da coroa e o período correspondente à formação da raiz denominamos de fase de raiz (MILETICH; SHARPE, 2003 ; KATCHBURIAN; ARANA, 1999,2004).

Na fase de botão ou broto observa-se um crescimento em volume da borda livre da lâmina dentária para dentro do ectomesênquima dos maxilares que ocorre lingualmente em relação à lâmina dentária. Cada broto consiste de uma expansão de células epiteliais contínua com a lâmina dentária e circundada por células ectomesênquimais. Morfologicamente o botão apresenta uma parte mais larga denominada de corpo onde se encontram células arredondadas, cromóforas de fora para dentro e pobremente diferenciadas (BHASKAR, 1989; KATCHBURIAN; ARANA, 1999, 2004).

O broto dentário continua a crescer, mas não se expande uniformemente para se tornar em uma esfera maior. A porção epitelial do broto apresenta um crescimento desigual (maior nas extremidades), formando uma invaginação rasa na superfície profunda do mesmo. Esta porção epitelial do germe dentário passa a ser denominada de órgão do esmalte que será responsável pela formação do esmalte dentário. O ectomesênquima subjacente ao órgão do esmalte passa a se chamar papila dentária responsável pela formação da dentina e polpa. Circundando o germe em desenvolvimento observa-se uma condensação de células ectomesênquimais que constituem o saco ou folículo dental do qual irão surgir o cimento, osso alveolar e ligamento periodontal. O órgão do esmalte cresce mais rapidamente que a papila resultando numa expansão do mesmo sobre a papila caracterizando morfologicamente

a fase de capuz por assemelhar-se a um gorro (TEN CATE, 1998; KATCHBURIAN ; ARANA, 1999, 2004).

Na fase de capuz o órgão do esmalte encontra-se organizado da seguinte maneira: epitélio externo do órgão do esmalte que é formado por células cúbicas e está localizado na borda convexa do órgão do esmalte; epitélio interno do órgão do esmalte que é formado por células colunares de núcleo central e situadas na base côncava do órgão. São as células do epitélio interno que irão diferenciar-se em ameloblastos para deposição de matriz de esmalte. Entre o epitélio interno e externo começam a aparecer espaços intercelulares que conferem as células centrais do órgão do esmalte um aspecto estrelado, razão pela qual esta região é denominada de retículo estrelado. Na região onde os epitélios interno e externo se encontram forma-se a alça cervical onde se encontra células indiferenciadas e numerosas figuras de mitose (BHASKAR, 1989 ; TEN CATE, 1998 ; KATCHBURIAN ; ARANA, 1999, 2004).

A continuação do crescimento do germe dentário leva ao aprofundamento da superfície inferior do capuz até que a ação circundante e contínua do órgão do esmalte envolva uma grande parte da papila dentária garantindo ao germe dental a forma de um sino. Por esta razão umas das fases de desenvolvimento do dente é denominada de fase de campânula. Na fase de campânula, entre o epitélio interno e o retículo estrelado surge uma camada de epitélio escamoso composto por duas a Três células achatadas denominado de estrato intermediário (BHASKAR, 1989 ; TEN CATE, 1998). Estas células caracterizam-se por exercer uma alta atividade de fosfatase alcalina, sendo essenciais para o desenvolvimento do esmalte, provavelmente contribuindo para o processo de calcificação ou produzindo substâncias que sejam repassadas aos ameloblastos e destes para a matriz de esmalte durante a amelogênese. Durante a fase de campânula, graças a uma interação das células do órgão do esmalte e da papila dentária conhecida por indução recíproca, o epitélio interno do órgão do esmalte dobra-se permitindo visualizar a forma da coroa do futuro dente em desenvolvimento

e, por esta razão, esta fase pode ser conhecida como período de morfodiferenciação (KATCHBURIAN ; ARANA, 1999, 2004).

Na fase tardia de campânula, também chamada por alguns de fase de coroa, as células do epitélio interno cessam a atividade mitótica, inicialmente na região das cúspides do dente em formação. As células colunares baixas tornam-se colunares altas, depois de iniciado o processo de diferenciação, originando os pré-ameloblastos. A medida que estas modificações morfológicas se estabelecem o epitélio interno parece induzir modificações na papila onde as células periféricas tornam-se maiores e assumem uma forma colunar em paliçada, diferenciando-se em odontoblastos responsáveis pela deposição de dentina. O início da deposição da matriz de dentina caracteriza o fim da fase de campânula e o início da fase de coroa (KATCHBURIAN ; ARANA, 1999, 2004).

A fase de coroa corresponde o período em que os tecidos mineralizados da coroa do futuro dente estão se formando. Após a deposição da primeira camada de dentina do manto, os pré-ameloblastos terminam sua diferenciação para ameloblastos assumindo todas as características de uma célula secretora. O processo de diferenciação dos pré-ameloblastos e conseqüente produção do esmalte acompanha o sentido da diferenciação dos odontoblastos e sucessiva produção de dentina, iniciando na ponta das cúspides estendendo-se gradualmente em direção a área cervical do futuro dente (TEN CATE, 1998).

3.2 Amelogênese

Em sendo o órgão do esmalte a porção de origem epitelial do germe dentário, é função das células e estruturas que o formam dar origem ao esmalte dentário através de um processo conhecido por amelogênese. Embora seja um processo contínuo, a amelogênese pode ser dividida em estágios a depender das características assumidas pelos ameloblastos: estágio de

diferenciação, secretor, maturação e proteção. A diferenciação dos ameloblastos compreende o processo de especialização dessas células a partir do epitélio interno do órgão do esmalte, passando por um tipo celular intermediário, o pré-ameloblasto. A diferenciação de pré-ameloblasto para ameloblasto constitui um processo de preparação do primeiro para a síntese de esmalte (REITH, 1960,1961; KALLEMBACH, 1966; REITH, 1967; KALLEMBACH, 1968; REITH, 1970).

Durante a fase de campânula a porção da célula que pertence ao epitélio interno do órgão do esmalte voltada para membrana basal apresenta uma quantidade pequena de retículo endoplasmático rugoso (RER), grande quantidade de ribossomos livres e alguns sacos de Golgi rodeados de vesículas (KATCHBURIAN ; HOLT, 1972). A diferenciação para pré-ameloblasto começa com a mudança de polaridade celular (polarização invertida), migração do núcleo das células do epitélio interno do órgão do esmalte, inicialmente voltados para superfície dentinária, em direção ao pólo voltado para o estrato intermediário, constituindo o novo pólo proximal. Estas células aumentam de tamanho, o complexo de Golgi inicia uma migração para a porção distal da célula. Na fase final de diferenciação, os pré-ameloblastos tornam-se mais altos, colunares e polarizados passando a denominar-se de ameloblastos. O RER torna-se mais desenvolvido, o complexo de Golgi atinge a porção distal do citoplasma, o núcleo apresenta-se no terço proximal da célula (REITH, 1961; KALLENBACH, 1971; KATCHBURIAN ; HOLT 1972). Após a produção da dentina do manto, a membrana basal começa a desaparecer. Desse modo, os pré-ameloblastos poderão fazer contato com os odontoblastos secretores jovens e com elementos da matriz dentinária, tendo sido atribuído um papel indutor a estes contatos na diferenciação terminal dos pré-ameloblastos em ameloblastos (KATCHBURIAN ; BURGESS, 1977).

Embora ameloblastos jovens ou em fase final de diferenciação mostrem evidências de atividade sintética, a deposição de matriz de esmalte a partir de sua porção distal só ocorre

quando o citoplasma dessas células adquire o aparato secretor completamente desenvolvido. Durante o estágio secretor, as proteínas da matriz do esmalte são sintetizadas no RER, concentradas no complexo de Golgi, onde poderão receber glicosilação ou fosforilação para serem transportadas ao pólo distal dos ameloblastos. Dois tipos de glicoproteínas têm sido identificadas: enamelinas e amelogeninas. As amelogeninas são maiores, mais abundantes além de serem degradadas e absorvidas por processo de endocitose através do processo de Tomes. Os ameloblastos completamente diferenciados perdem a capacidade de se dividir e figuras mitóticas não são mais observadas (MARSLAND, 1951; KATCHBURIAN ; HOLT, 1972; ROBINSON *et al.*, 1983).

O início da secreção segue a remoção da lâmina basal e a mineralização inicial da dentina. A medida em que mais esmalte for depositado, os ameloblastos continuam se retraindo deixando para trás um processo citoplasmático em forma de cone, o processo de Tomes, imerso no esmalte recentemente depositado. Após a secreção do esmalte, o restante dos grânulos de secreção que estão contidos no citoplasma distal fundem-se com a superfície distal da célula produzindo uma fina camada de esmalte aprismático. As células perdem o processo de Tomes e iniciam um processo semelhante a um colapso intracelular (REITH, 1960, 1967; KATCHBURIAN ; HOLT, 1972; MATTHIESSEN ; ROMERT 1980; KATCHBURIAN ; BURGESS, 1983).

Assim que os ameloblastos iniciam o processo de síntese de matriz de esmalte, o retículo estrelado inicia um processo de involução (BARATELLA-EVÊNCIO, 1995) que é caracterizado por alterações que começam nas células localizadas nas adjacências do epitélio externo do órgão do esmalte avançando gradualmente em direção ao epitélio interno. Durante o processo involutivo as células do retículo estrelado aproximam-se cada vez mais umas das outras até começarem a desaparecer (PANNESE, 1961). O epitélio externo apresenta-se com sua superfície descontínua acomodando vasos sanguíneos nos espaços que surgem. No

interior do retículo estrelado surgem células semelhantes a macrófagos os quais poderiam estar envolvidos no englobamento ou remoção da matriz intercelular não degradada durante a involução do retículo estrelado (BARATELLA-EVÊNCIO, 1995).

Com o avançar da odontogênese a nutrição dos ameloblastos fica comprometida graças à deposição de matriz de dentina que cria uma barreira para passagem de nutrientes entre a papila dentária e o epitélio interno do órgão do esmalte. Desta maneira os vasos sanguíneos parecem invadir o órgão do esmalte pelo retículo estrelado para suprir as necessidades das células que compõem o epitélio interno (SISCA; PROVENZA ; FISCHLSCHWEIGER, 1967; LIAO, 1978 ; SASAKI ; GARANT, 1986).

Uma vez depositada toda a espessura de esmalte, os ameloblastos sofrem modificações ligadas a sua nova função na maturação deste tecido. Durante o estágio de maturação eles desenvolvem uma borda estriada na extremidade distal a qual compreende várias invaginações na superfície da membrana, contínuas umas as outras, delimitando vários canais dilatados e tubulares (SMITH, 1979). A maturação consiste na remoção do excesso de conteúdo orgânico e o influxo de sais minerais em relação a matriz de esmalte previamente depositada. Consiste na remoção de proteínas, principalmente as amelogeninas degradadas e a água do esmalte concomitantemente com o crescimento do cristal para formar o esmalte maduro. Dessa maneira, a matriz de esmalte no final da síntese contém aproximadamente 35% de sais minerais e o restante de água e material orgânico. No final do estágio de maturação o esmalte já maduro contém 96% de sais de cálcio e 2% de matéria orgânica (DEAKINS, 1942).

Uma vez completada a maturação do esmalte, os ameloblastos perdem as suas invaginações da superfície distal, a qual torna-se definitivamente lisa. A altura das células diminui transformando-se em células cúbicas que secretam um material semelhante à lâmina basal entre as células do epitélio externo e o folículo dental adjacente. O material é depositado

sobre o esmalte recém formado e hemidesmossomas surgem para ligar os ameloblastos a essa lâmina basal. Outros componentes do órgão do esmalte que na fase de maturação mostram-se francamente reduzidos perdem por completo sua identidade. Estabelece-se assim, com uma camada de ameloblastos protetores, o epitélio reduzido do órgão do esmalte, estrutura que reveste a coroa do dente até sua erupção na cavidade oral, separando-a do conjuntivo adjacente caracterizando a fase protetora e finalizando a amelogênese (KATCHBURIAN ; ARANA, 2004).

4 Papel da serotonina na odontogênese

A odontogênese em camundongos tem início a partir do 9º dia de vida fetal e o início da fase de botão começa por volta do 12º dia de vida fetal. Neste período a administração de drogas tem efeito teratogênico potencial (ROSLINDO *et al.* , 2002). Estudos realizados em animais revelam a presença de sítios de captação de serotonina na região craniofacial em sincronia com os principais eventos morfogênicos desta região, incluindo o desenvolvimento dos dentes (LAUDER ; ZIMMERMAN, 1988). A descoberta da presença de serotonina no interior do mesênquima dental (LAUDER ; ZIMMERMAN, 1988) e epitélio dental (MOISEWITSCH ; LAUDER, 1996) foi importante para a hipótese da participação da serotonina no desenvolvimento dos dentes. Esta possibilidade foi retomada quando se encontrou a expressão do RNAm do receptor serotoninérgico 5-HT₃ no epitélio dental de um germe na fase de botão (TECOTT *et al.*, 1995) e dentro da papila dentária no estágio de campânula (JOHNSON ; HEINEMANN, 1995). A presença de receptores nestes dois tecidos mostra que a serotonina está envolvida em interações epitélio-mesenchimais importantes (SHUEY *et al.*, 1993).

O papel da serotonina no desenvolvimento dos dentes foi estudado por Moiseiwitsch ; Lauder (1996) utilizando meios de cultura obtidos a partir de mandíbulas de ratos (Mandibular Explant Cultures) onde os tecidos em desenvolvimento, incluindo os do germe dental, foram expostos a diferentes concentrações de serotonina isoladamente ou combinada com fluoxetina. Em seus resultados os autores relatam que a 5-HT exerce um forte papel estimulador sobre o desenvolvimento do germe dental desempenhando as seguintes ações: (1) age sobre o órgão do esmalte induzindo a formação da papila dentária e originando o estágio de capuz; (2) age sobre a papila dentária induzindo o órgão do esmalte a se diferenciar em quatro estruturas distintas (epitélio externo e interno, retículo estrelado e estrato intermediário) originando o estágio de campânula e (3) indução de pré-ameloblastos e pré-odontoblastos constituindo o primeiro estágio de citodiferenciação que ocorre durante o desenvolvimento do germe dental. Ainda no presente trabalho relatam que a habilidade da fluoxetina em inibir o efeito estimulador da 5-HT sobre a odontogênese está relacionada a existência de sítios de captação de serotonina na papila dentária.

O efeito morforegulador da serotonina sobre determinado tecido pode ser exercido de forma direta ou indireta, através da ação sobre moléculas morforeguladoras como a proteína S-100 beta, uma proteína ligada ao cálcio, e a tenascina, molécula da matriz extracelular. Altas concentrações de 5-HT inibem a ação destas proteínas morforeguladoras (MOISEIWITSCH *et al.*, 1998). A ação indireta da serotonina no desenvolvimento dos dentes pela regulação destas moléculas se daria graças à presença da tenascina na junção do ectoderma com o mesênquima na embriogênese (VIANIO *et al.*, 1989), incluindo o mesênquima do germe dental nas fases de capuz e campânula, e da S-100 beta no mesênquima dental durante o estágio de campânula, no entanto esta possibilidade não foi comprovada por Moiseiwitsch *et al.* (1998) que comprovaram o efeito direto exercido pela serotonina sobre a morfogênese dental mediado pela captação intracelular e/ou ativação de

receptores 5-HT_{1A} e 5-HT₃. Os receptores do tipo 5-HT_{1A} foram encontrados tanto no estágio de botão quanto na fase de campânula. Na fase de botão 5-HT_{1A} foi encontrado no epitélio e mesênquima dental enquanto na fase de campânula foi observada a sua presença no interior do epitélio dental, desenvolvimento do osso alveolar, mas não foi visto no mesênquima dental (MOISEWITSCH *et al.*, 1998).

A pesquisa por receptores serotoninérgicos envolvidos no desenvolvimento de diferentes tecidos embrionários foi estudada por Lauder *et al.* (2000) utilizando para este fim anticorpos específicos. A descoberta de receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C} foi comprovada durante a morfogênese de uma variedade de tecidos embrionários como as células das cristas neurais, mesênquima e epitélio craniofacial, endocárdio, miocárdio, músculo esquelético, cartilagem e dentes. A presença dos receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C} é mais um achado que sustenta a participação da serotonina durante a odontogênese.

Baseado nas evidências de que o sistema serotoninérgico está associado ao desenvolvimento de diferentes tecidos mediando interações epitélio-mesenchimais importantes, justifica-se a realização deste trabalho com propósito de estudar o papel da fluoxetina no desenvolvimento do Órgão do Esmalte durante a Amelogênese.

OBJETIVOS

1 Objetivo geral

Observar os aspectos morfológicos do órgão do esmalte em ratos tratados com fluoxetina através da microscopia óptica de rotina.

2 Objetivos específicos

- Analisar os aspectos morfológicos do órgão do esmalte em germes dentários de primeiros molares de ratos tratados com fluoxetina desde a fase de capuz até a fase de maturação do esmalte.
- Avaliar a cronologia do desenvolvimento de germes dentários de primeiros molares superiores de ratos tratados com fluoxetina.
- Verificar a presença de agenesia dentária de germes dentários de primeiros molares superiores em ratos tratados com fluoxetina.

METODOLOGIA

1 Animais

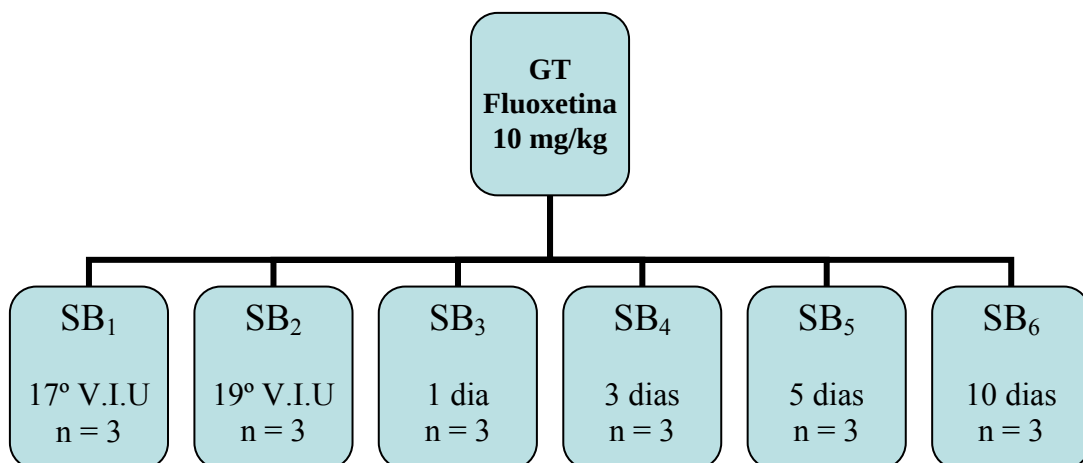
Foram utilizados ratos albinos da linhagem **Wistar** da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais receberam a dieta padrão do biotério (LABINA - Purina do Brasil S/A) e água **ad libitum**. Foram mantidos em sala com temperatura de 23 +/- 2° C e ciclo de claro e escuro de 12:12 (claro das 06 às 18 horas e escuro das 18 às 06 horas).

Para obtenção de neonatos, realizaram-se acasalamentos entre animais adultos na proporção de um macho para duas fêmeas. A gravidez foi diagnosticada através da realização de esfregaço vaginal e posterior observação da presença de espermatozóides, associada ao acompanhamento de ganho de peso corporal. Para a observação da presença ou não de espermatozóides as preparações foram coradas por uma solução de violeta de genciana (cloreto de metil-rosanilina) a 0,6% durante 01 minuto e analisadas em microscopia de luz. Uma vez detectada a presença de espermatozóides a fêmea era considerada prenhe sendo este dia considerado como dia zero de sua prenhez.

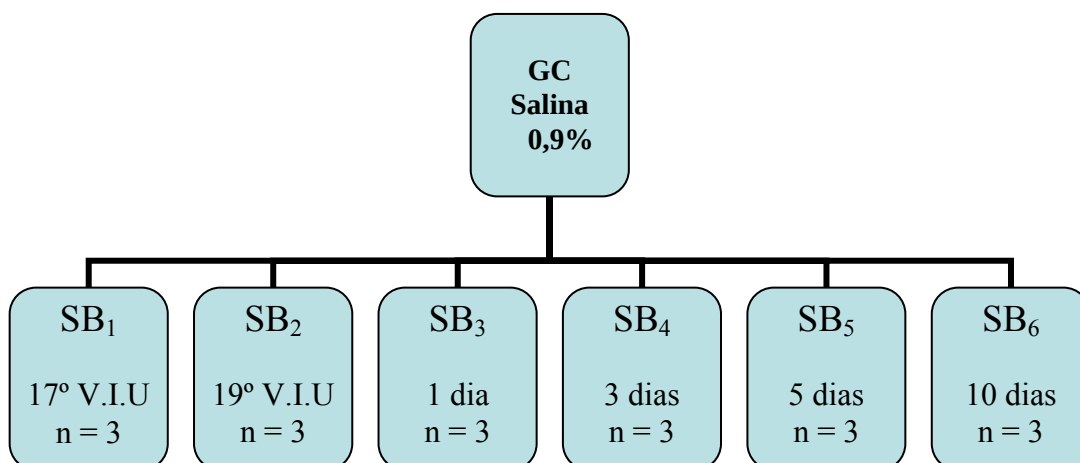
Foram utilizados 36 animais divididos em dois grupos: experimental e controle com 18 animais cada. Cada grupo de 18 animais foi dividido em 06 subgrupos (SB) com 03 animais de acordo com a idade de eutanásia. As idades de eutanásia foram estipuladas com o objetivo de observar o desenvolvimento do órgão do esmalte o mais cedo possível. Foram eutanasiados animais com 17 e 19 dias de vida intra-uterina (V.I.U.), primeiro, terceiro, quinto e décimo dia de vida pós-parto. Os animais de cada subgrupo foram obtidos de fêmeas tratadas com doses diárias de fluoxetina ou solução salina a partir do primeiro dia de gestação (primeiro dia após o dia zero de sua prenhez).

2 Grupos de estudo

- Grupo tratado (GT)



- Grupo controle (GC)



3 Tratamento dos animais

Uma vez verificada a prenhez, as fêmeas foram separadas e mantidas em gaiolas individuais para serem submetidas ao tratamento estabelecido de acordo com o grupo de estudo a que pertencer a partir do primeiro (dia 01) até o vigésimo dia de gestação. No grupo experimental as fêmeas foram tratadas diariamente com fluoxetina na dose de 10 mg/kg de peso em um volume de 10 µl/g de peso, injetados por via subcutânea sempre nos mesmos horários e períodos estabelecidos para o grupo controle. No grupo controle as fêmeas receberam diariamente solução fisiológica a 0,9% em aplicações subcutâneas no volume de 10µl/g de peso, em horários previamente estabelecidos (entre 07h e 08h).

4 Processamento laboratorial

Para obtenção de animais com 17 e 19 dias de V.I.U. as ratas prenhes foram eutanasiadas após anestesia por injeção intra-peritoneal de atropina (10 mg/kg) seguida, após 10 minutos, da associação de quetamina (25 mg/kg) e xilazina (10mg/kg) também por via intra-peritoneal. Para retirada dos fetos, as ratas gestantes foram colocadas em decúbito dorsal para realização de tricotomia e incisão abdominal. Uma vez retirados os animais foram imediatamente eutanasiados por decapitação e sua cabeça colocada no fixador. Animais com 1, 3, 5 e 10 dias de vida foram previamente anestesiados com éter sulfúrico, imediatamente eutanasiados por decapitação e sua cabeça colocada em solução fixadora.

Para obtenção da maxila do animal os animais foram decapitados através de incisão próxima a base do crânio, a mandíbula removida e a arcada dentária superior exposta. O material foi fixado em solução de Bouin, durante 48 horas à temperatura ambiente. A seguir

as peças foram descalcificadas em solução aquosa de ácido nítrico a 5% por um tempo estabelecido de acordo com a idade do animal. Em animais com 17 e 19 dias de V.I.U. e um dia de vida pós-parto não foi necessário realizar descalcificação. Os animais com três, cinco e dez dias de vida pós-parto foram submetidos a quatro, cinco e doze horas de descalcificação respectivamente. Após descalcificação o material foi processado convencionalmente para inclusão em parafina na seguinte sequência: desidratação em uma série crescente de etanol (70% a 100%, por 40 minutos cada); diafanização com xilol (dois banhos de 40 minutos cada); embebição em parafina (3 banhos de 40 minutos cada) e inclusão no mesmo material (MICHALANNY, 1990).

Cortes histológicos longitudinais (coronais) foram obtidos através de um micrótomo (LEICA RM 2125 RT) ajustado para 5 μ m , utilizando-se navalha (LEICA 818). Os cortes foram estirados em banho-maria histológico (ANCAP), dispostos em lâminas untadas com albumina de Mayer, colocados em estufa (J PROLAB 102) por aproximadamente 30 minutos a 37°C para secagem do material. Os espécimes foram corados pela hematoxilina e eosina (HE), tricrômico de Masson e ácido periódico de Schiff (P.A.S.), montados em Entellan (MICHALANNY, 1990), observados e fotografados em microscópio de luz (OLIMPUS BX 50).

5 Análise morfológica do órgão do esmalte

Para análise morfológica do órgão do esmalte foi obedecido um sentido único de análise do germe dentário em desenvolvimento. Todos os germes dentários foram analisados a partir da região próxima ao epitélio oral primitivo, região de pedúnculo ou adjacente ao mesmo, até a região do epitélio interno. Foram observados detalhes referentes aos

componentes celulares de cada região do órgão do esmalte além de suas características estruturais: fase de desenvolvimento, forma das células, coloração, continuidade celular, tipo celular, posição do núcleo, presença de figuras de mitose e vasos sanguíneos, lâmina basal, deposição de matriz de esmalte.

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEAA-UFPE) de onde recebeu parecer favorável a sua execução de acordo com ofício nº 38/05 de 05 de julho de 2005.

RESULTADOS

Em todas as amostras, tanto no grupo experimental quanto no controle, germes dentários se apresentam obedecendo à cronologia do desenvolvimento conforme dados descritos na literatura. Da mesma forma não foram observados casos de agenesia dentária em ambos os grupos de estudo. Para um melhor entendimento dos resultados morfológicos, cada idade será abordada separadamente através dos tópicos a seguir:

1 Animais com 17 dias de vida intra-uterina

Os germes dentários observados nesta idade, grupo experimental e controle, encontram-se na fase de capuz unidos ao epitélio oral pelo pedículo (figuras 1 e 3). Nítida condensação de ectomesênquima rodeando todo germe dentário e abaixo da concavidade do órgão do esmalte caracteriza a formação do folículo dentário e papila dentária respectivamente. O órgão do esmalte encontra-se bem definido formado pelo epitélio externo, retículo estrelado e epitélio interno delimitado do ectomesênquima por uma membrana basal bem evidente e contínua que circunda todo o órgão do esmalte desde a região de pedículo até sua concavidade característica como mostram as figuras 5 e 6 na coloração especial com ácido periódico de Schiff (P.A.S.), contra-corados com Hematoxilina. O epitélio externo apresenta-se como uma contínua camada de células prismáticas baixas com núcleos ovalados cujas características são mais nitidamente observadas na região próxima ao pedículo (figuras 1 e 3). O retículo estrelado encontra-se no início do desenvolvimento com o surgimento de espaços intercelulares, estes mais discretos na periferia e maiores na região central (figuras 1 e 3), apresentando células de morfologia variada e figuras de mitose (figuras 2 e 4). O epitélio externo continua-se com o epitélio interno que se caracteriza pela presença de uma contínua camada de células prismáticas baixas de núcleos ovalados. Figuras de mitose são observadas ao longo da trajetória dos epitélios do órgão do esmalte (figuras 2 e 4).

Figura 1 - Fotomicrografia de germe dental de primeiro molar superior de rato com 17 dias de V.I.U., grupo experimental. Observa-se germe dental na fase de capuz, mostrando sua concavidade característica. Pedículo (P); epitélio externo (EE); retículo estrelado (RE); epitélio interno (EI); papila dentária (PD); folículo dentário (FD); figuras de mitose (FM). Coloração H.E. +/- 100X.

Figura 2 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 17 dias de V.I.U., grupo experimental. Em maior aumento observa-se parte do órgão do esmalte do germe dental na fase de capuz. Epitélio externo (EE); retículo estrelado (RE); figuras de mitose (FM); epitélio interno (EI). Coloração H.E. +/- 200X.

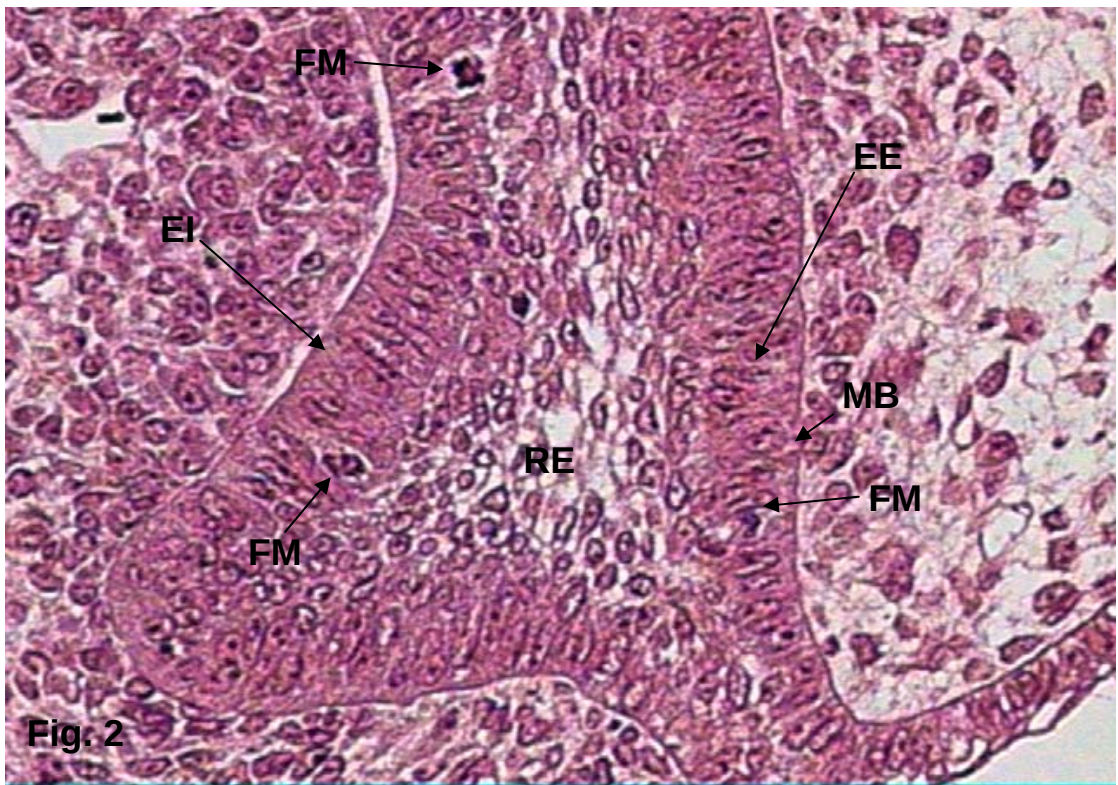
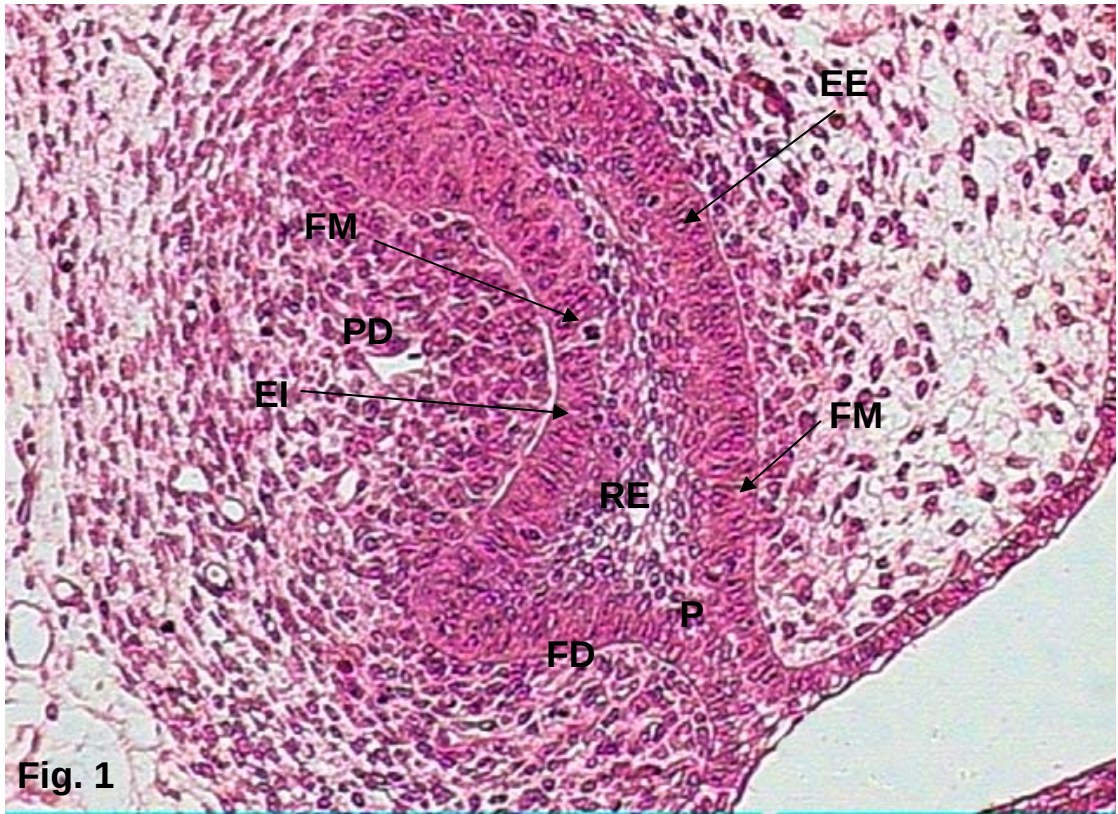


Figura 3 - Fotomicrografia de germe dental de primeiro molar superior de rato com 17 dias de V.I.U., grupo controle. Observa-se germe dental na fase de capuz, mostrando sua concavidade característica. Pedículo (P); epitélio externo (EE); retículo estrelado (RE); epitélio interno (EI); papila dentária (PD); folículo dentário (FD); figuras de mitose (FM). Coloração H.E. +/- 100X.

Figura 4 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 17 dias de V.I.U., grupo controle. Em maior aumento observa-se parte do órgão do esmalte do germe dental na fase de capuz. Epitélio externo (EE); figuras de mitose (FM); retículo estrelado (RE); epitélio interno (EI); papila dentária (PD). Coloração H.E. +/- 200X.

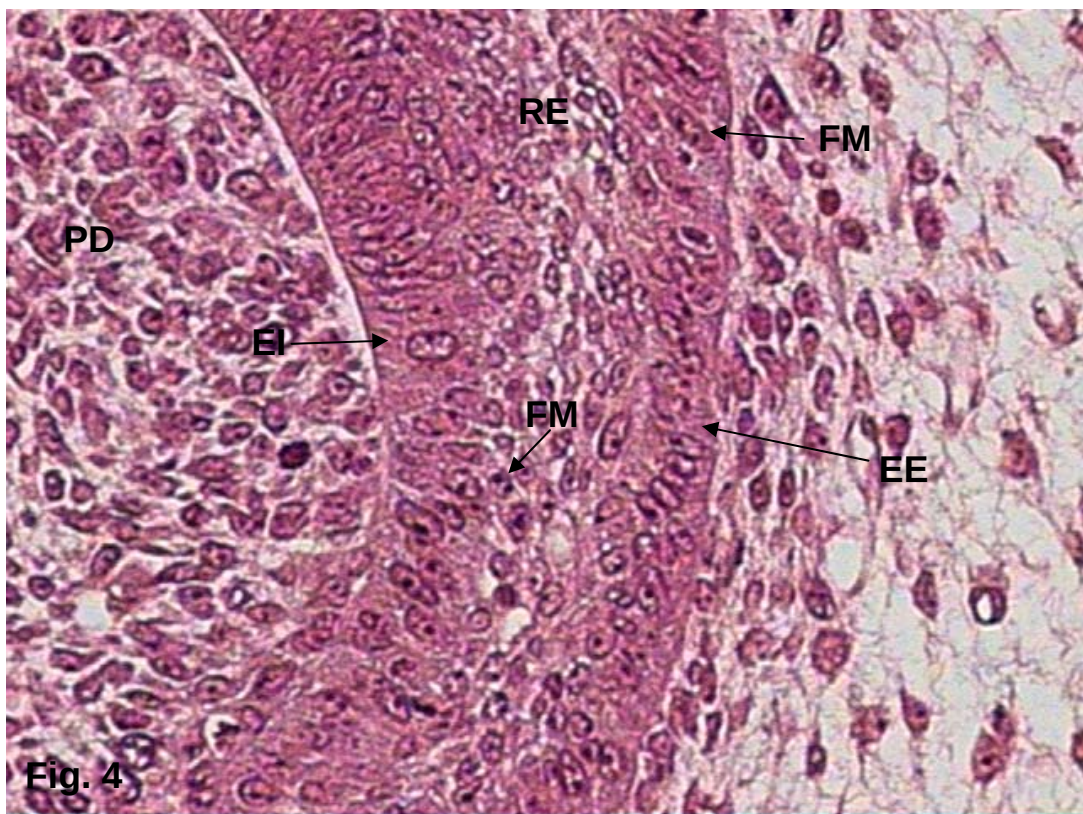
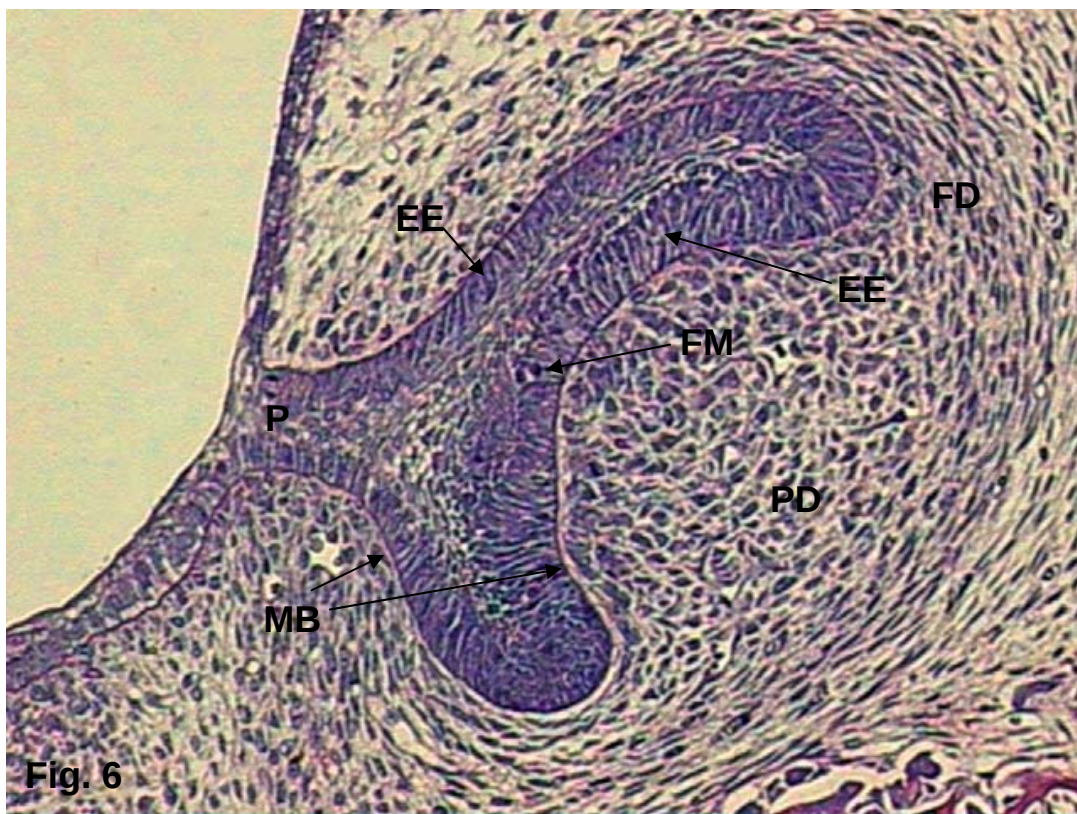
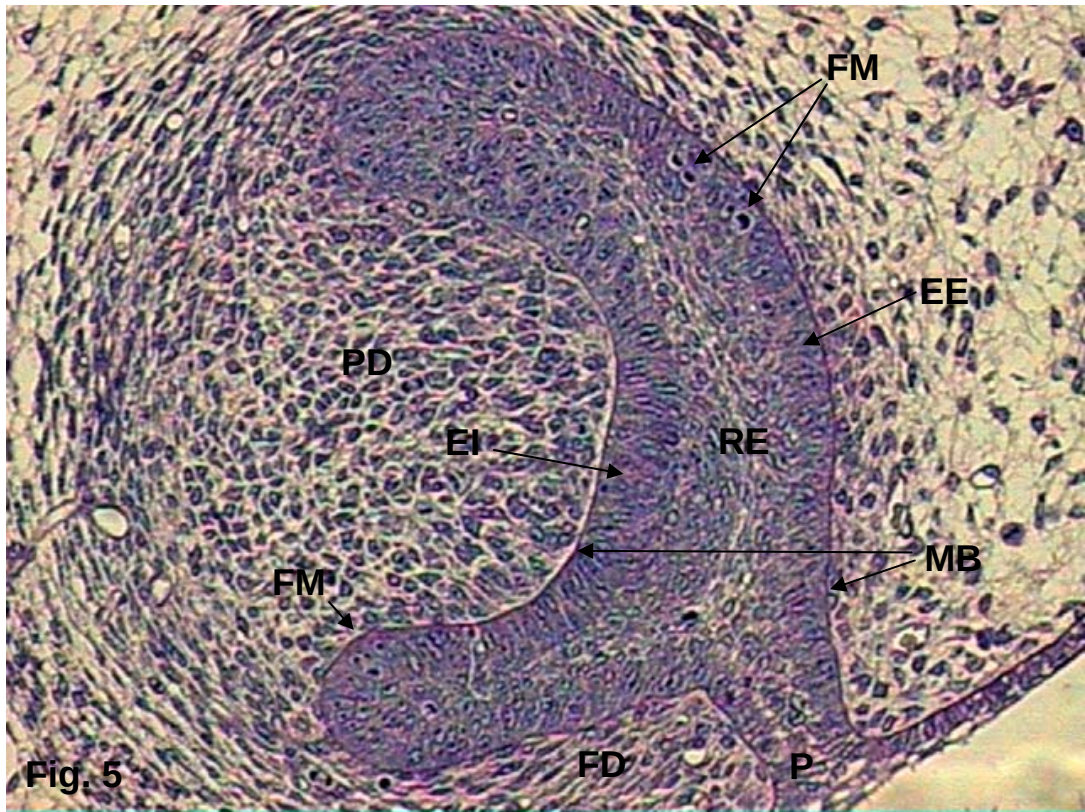


Figura 5 - Fotomicrografia de germe dental de primeiro molar superior de rato com 17 dias de V.I.U., grupo experimental. Observa-se germe dental na fase de capuz, mostrando-se com concavidade característica. Membrana basal (MB); pedículo (P); epitélio externo (EE); figuras de mitose (FM); retículo estrelado (RE); epitélio interno (EI); papila dentária (PD); folículo dentário (FD). Coloração P.A.S. contra-corado com Hematoxilina +/- 100X.

Figura 6 - Fotomicrografia de germe dental de primeiro molar superior de rato com 17 dias de V.I.U., grupo controle. Observa-se germe dental na fase de capuz, mostrando-se com concavidade característica. Membrana basal (MB); pedículo (P); epitélio externo (EE); retículo estrelado (RE); epitélio interno (EI); papila dentária (PD); folículo dentário (FD); figuras de mitose (FM). Coloração P.A.S. contra-corado com Hematoxilina +/- 100X.



2 Animais com 19 dias de vida intra-uterina

Os germes nesta idade, grupo experimental e controle, encontram-se na fase de capuz, unidos ao epitélio oral primitivo pelo pedículo. O órgão do esmalte apresenta-se bem definido formado pelo epitélio externo, retículo estrelado e epitélio interno envolvendo um aglomerado de células abaixo de sua concavidade que compõem a papila dentária (figuras 7 e 10). Em maior aumento observa-se o epitélio externo formado por uma contínua camada de células que se continua com o epitélio interno na região da futura alça cervical (figuras 8 e 11). Figuras de mitose e vasos sanguíneos, com hemácias em seu interior, aparecem em íntimo contato com o epitélio externo (figura 9). O retículo estrelado encontra-se em desenvolvimento composto por células estreladas (figuras 12 e 13), apresentando figuras de mitose em seu interior (figuras 9 e 11). O epitélio interno é formado por uma contínua camada de células prismáticas que se continua com o epitélio externo na região da futura alça cervical (figuras 8 e 11).

Quando corados pelo P.A.S. e contra-corados com Hematoxilina os germes dentários de ambos os grupos de estudo apresentam o órgão do esmalte bem delimitado do ectomesênquima por uma membrana basal bem evidente e contínua que circunda todo o órgão do esmalte desde a região do pedículo até a sua concavidade característica (figuras 12 e 13).

Figura 7 - Fotomicrografia de germe dental de primeiro molar superior de rato com 19 dias de V.I.U., grupo experimental. Observa-se germe dental na fase de capuz, mostrando sua concavidade característica mais acentuada. Tecido ósseo (TO); Pedículo (P); epitélio externo (EE); retículo estrelado (RE); epitélio interno (EI); papila dentária (PD); folículo dentário (FD). Coloração H.E. +/- 40X.

Figura 8 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 19 dias de V.I.U., grupo experimental. Em maior aumento observa-se parte do germe dental na fase de capuz e sua concavidade. Pedículo (P); epitélio externo (EE); retículo estrelado (RE); epitélio interno (EI); figuras de mitose (FM); papila dentária (PD); vaso sanguíneo (VS). Coloração H.E. +/- 100X.

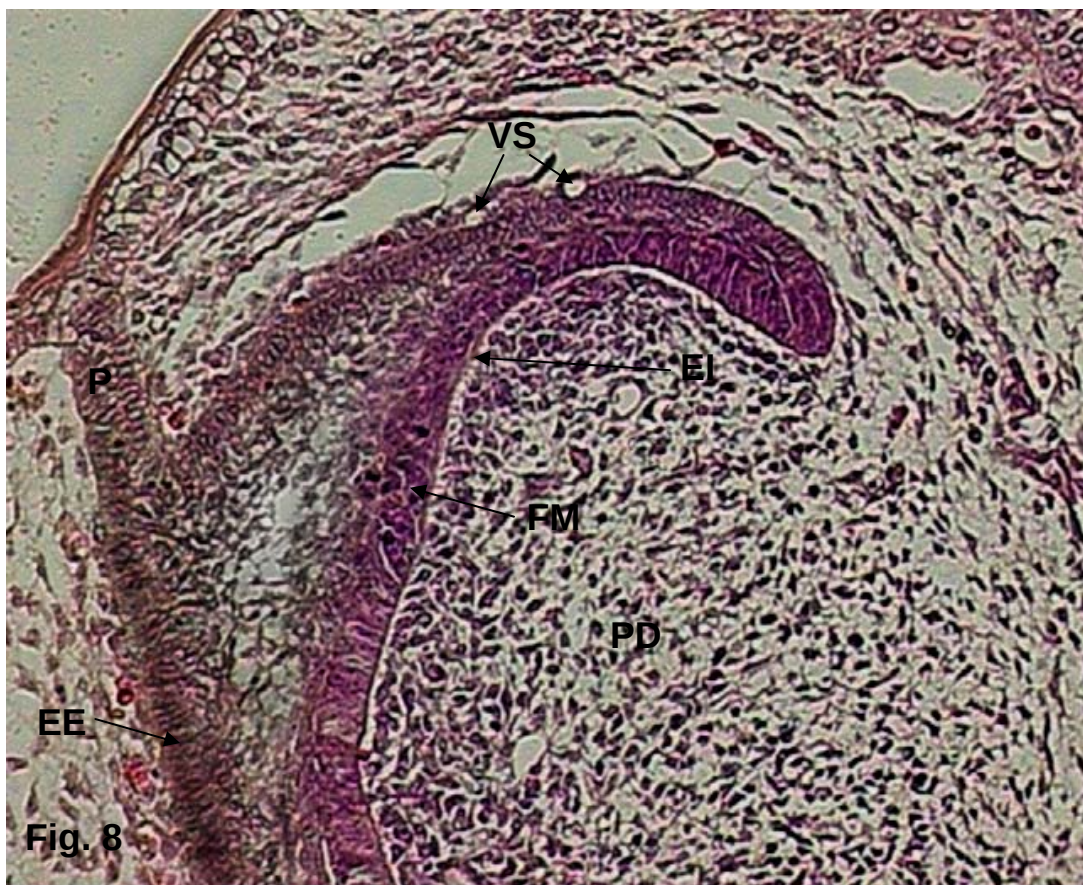
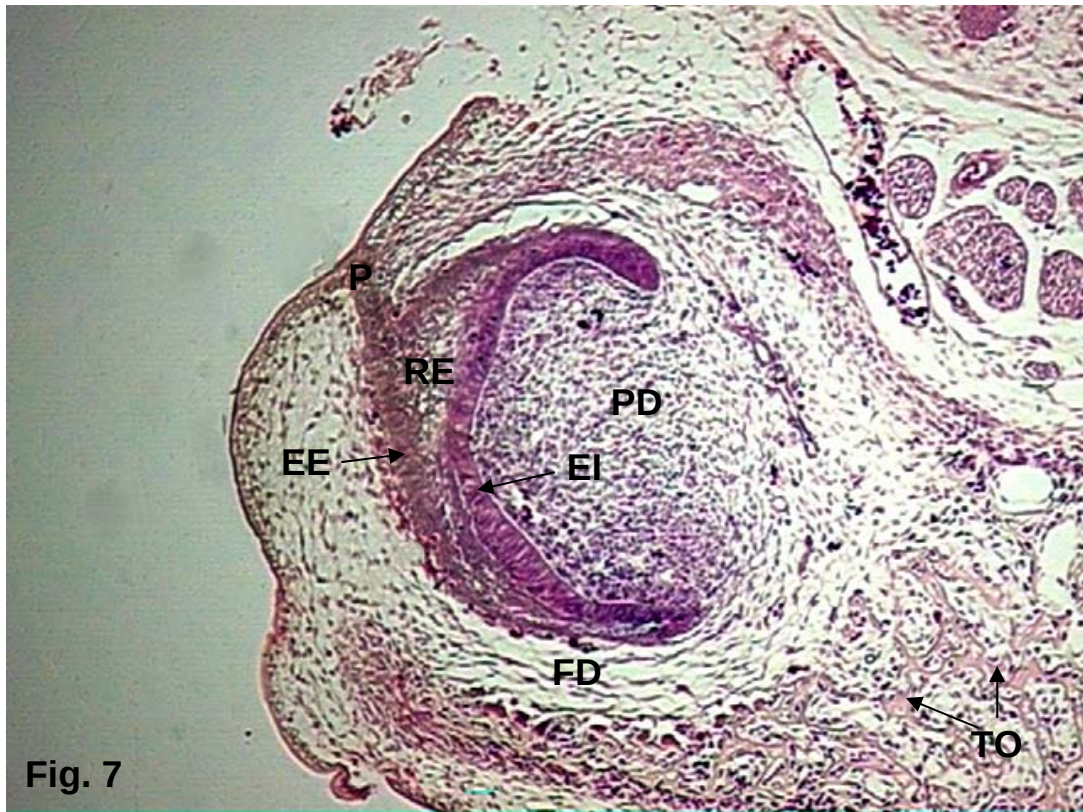


Figura 9 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 19 dias de V.I.U., grupo experimental. Observa-se parte do órgão do esmalte do germe dental na fase de capuz. Epitélio externo (EE); retículo estrelado (RE); epitélio interno (EI); figuras de mitose (FM); papila dentária (PD); vasos sanguíneos (VS) e hemácias (H). Coloração H.E. +/- 200X.

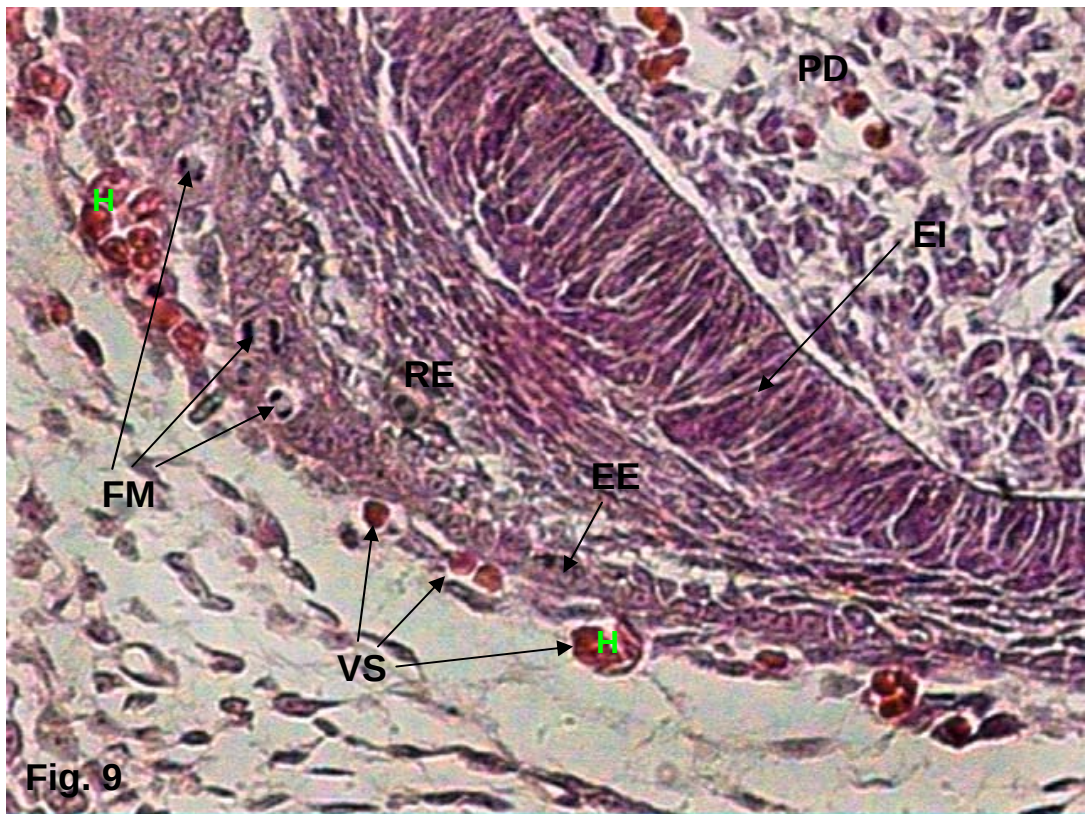


Figura 10 - Fotomicrografia de germe dental de primeiro molar superior de rato com 19 dias de V.I.U., grupo controle. Observa-se germe dental na fase de capuz com concavidade característica. Pedículo (P); epitélio externo (EE); retículo estrelado (RE); epitélio interno (EI); papila dentária (PD); folículo dentário (FD). Coloração H.E. +/- 100X.

Figura 11 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 19 dias de V.I.U., grupo controle. Em maior aumento observa-se parte do órgão do esmalte do germe dental na fase de capuz. Pedículo (P); epitélio externo (EE); retículo estrelado (RE); figuras de mitose (FM); epitélio interno (EI); papila dentária (PD); vaso sangüíneo (VS). Coloração H.E. +/- 200X.

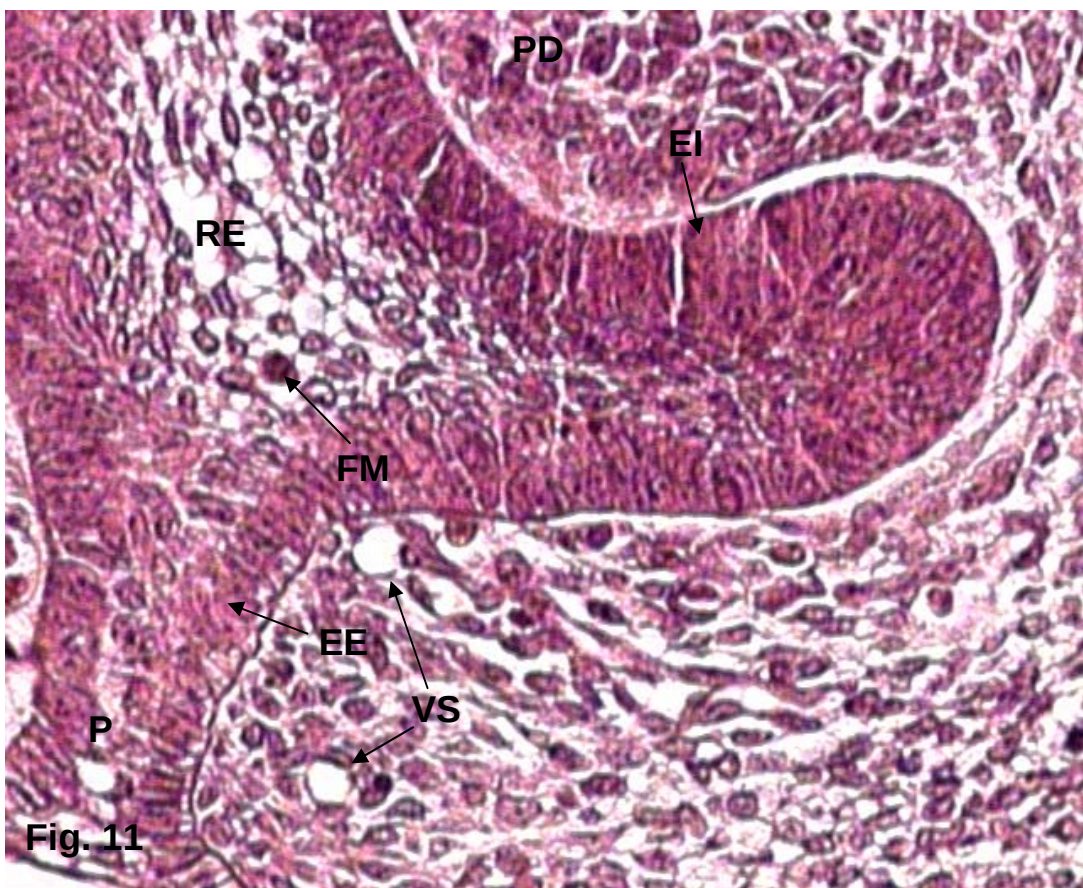
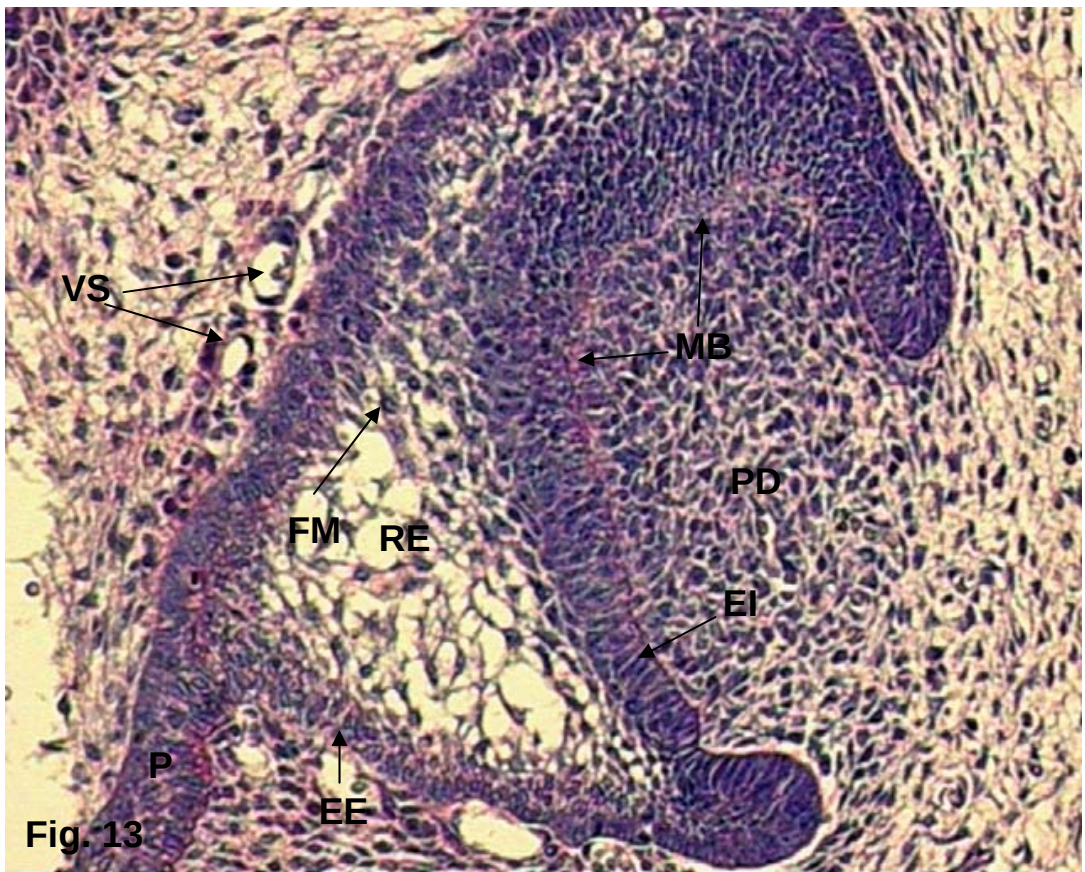
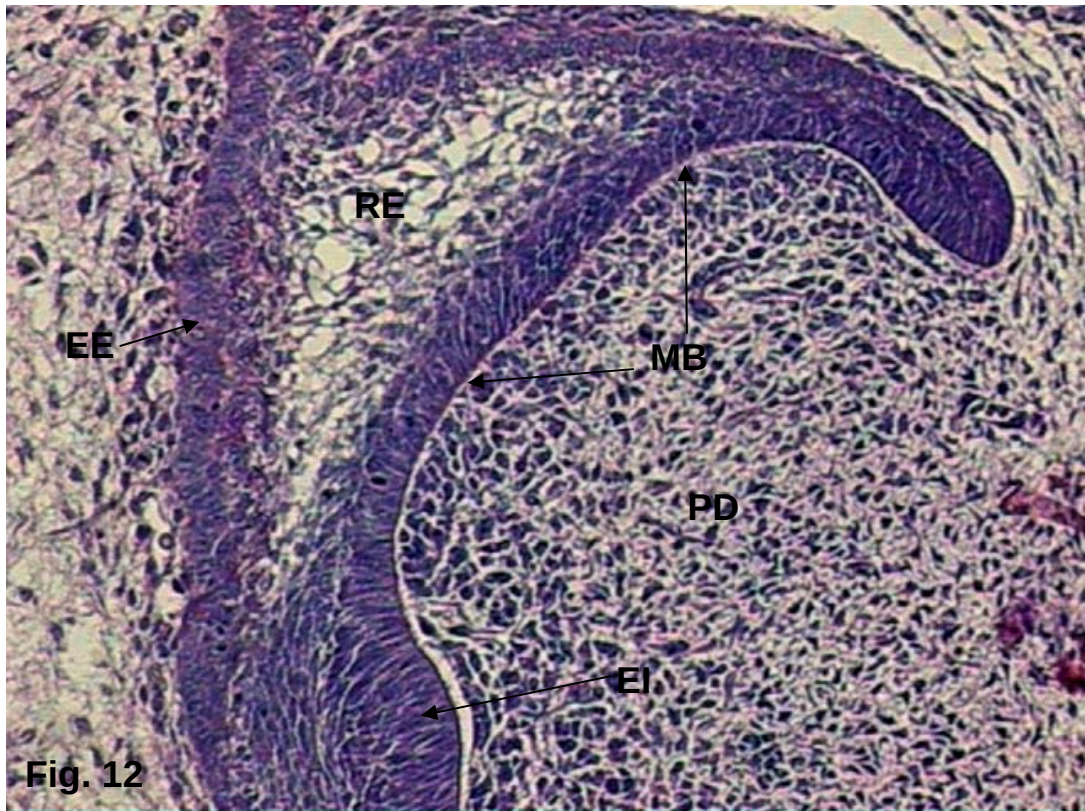


Figura 12 – Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 19 dias de V.I.U., grupo experimental. Observa-se parte do germe dental na fase de capuz com sua concavidade característica. Membrana basal (MB); epitélio externo (EE); retículo estrelado (RE); epitélio interno (EI); papila dentária (PD). Coloração P.A.S. contra-corado com Hematoxilina +/- 100X.

Figura 13 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 19 dias de V.I.U., grupo controle. Observa-se parte do germe dental na fase de capuz, mostrando-se com concavidade característica. Membrana basal (MB); pedículo (P); epitélio externo (EE); figura de mitose (FM); retículo estrelado (RE); epitélio interno (EI); papila dentária (PD); vasos sangüíneos (VS). Coloração P.A.S. contra-corado com Hematoxilina +/- 100X.



3 Animais com 1 dia de vida

Os germes observados nesta idade, grupo experimental e controle, encontram-se na fase de coroa. Observa-se a formação de tecido ósseo ao redor dos germes em desenvolvimento caracterizando a formação da cripta óssea (figuras 14 e 17). Observa-se uma diferença entre os grupos de estudo com relação à presença do pedículo e o fechamento da cripta óssea. Nos animais do grupo experimental os germes encontram-se unidos ao epitélio oral pelo pedículo e a cripta óssea ainda não se fechou. No grupo controle observa-se o fechamento da cripta com ausência de pedículo (figuras 14 e 17).

O órgão do esmalte encontra-se bem delimitado formado pelo epitélio externo, retículo estrelado, epitélio interno (figuras 14 e 17). O epitélio externo encontra-se formado por uma camada de células prismáticas descontínuas bem delimitadas do retículo estrelado na região do pedículo (região de futura cúspide). Vasos sangüíneos do folículo dentário são encontrados adjacentes ao epitélio externo em determinadas regiões (figuras 15 e 18). O retículo estrelado mostra-se bem definido formado por células de aspecto estrelado e espaço intercelular amplo. Vasos sangüíneos com hemácias em seu interior e macrófagos podem ser observados nesta região (figuras 15 e 18). Adjacente ao retículo estrelado e em íntimo contato com as células do epitélio interno, observa-se uma delgada e contínua camada de células achatadas que compreende o estrato intermediário do órgão do esmalte (figuras 15 e 18).

O epitélio interno mostra-se formado por uma contínua camada de células com aspectos diferentes quando observadas na região da futura cúspide em direção a região de alça cervical (14 e 16; 17 e 18). Na região da futura cúspide os ameloblastos apresentam-se como células cilíndricas altas com núcleos voltados para o estrato intermediário, além de estarem sobre uma fina camada de matriz de esmalte já depositada (figura 15 e 17). A medida que se caminha em direção a alça cervical, pelas vertentes da futura coroa, observa-se os pré-

ameloblastos que preservam a morfologia de células prismáticas altas de núcleos com polarização invertida compondo o epitélio interno sobre uma matriz de dentina (figuras 16 e 18). Mais adiante, ainda em direção a região de alça cervical, as células do epitélio interno apresentam-se como prismáticas baixas (cubóides) de núcleo basal, voltado para as células da papila dentária (figuras 16 e 18).

Na região equivalente a futura cúspide a matriz de dentina se interpõe entre as células da papila dentária e a matriz de esmalte. Logo abaixo da matriz de dentina observam-se os odontoblastos com aspecto prismático alto e dispostos em paliçada mais superficialmente na papila dentária (figura 14 e 17).

Figura 14 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 01 dia de vida, grupo experimental. Observa-se parte do germe dental na fase de coroa com presença da alça cervical. Pedículo (P); tecido ósseo (TO); epitélio externo (EE); retículo estrelado (RE); epitélio interno (EI); ameloblastos (A); matriz de esmalte (ME); matriz de dentina (MD); odontoblastos (O); alça cervical (AC); papila dentária (PD). Coloração H.E. +/- 40X.

Figura 15 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 01 dia de vida, grupo experimental. Observa-se parte do germe dental na fase de coroa na região de ponta de futura cúspide. Epitélio externo (EE); retículo estrelado (RE); macrófago (M); estrato intermediário (ET); epitélio interno (EI); ameloblastos (A); matriz de esmalte (ME); matriz de dentina (MD); odontoblastos (O) Coloração H.E. +/- 100X.

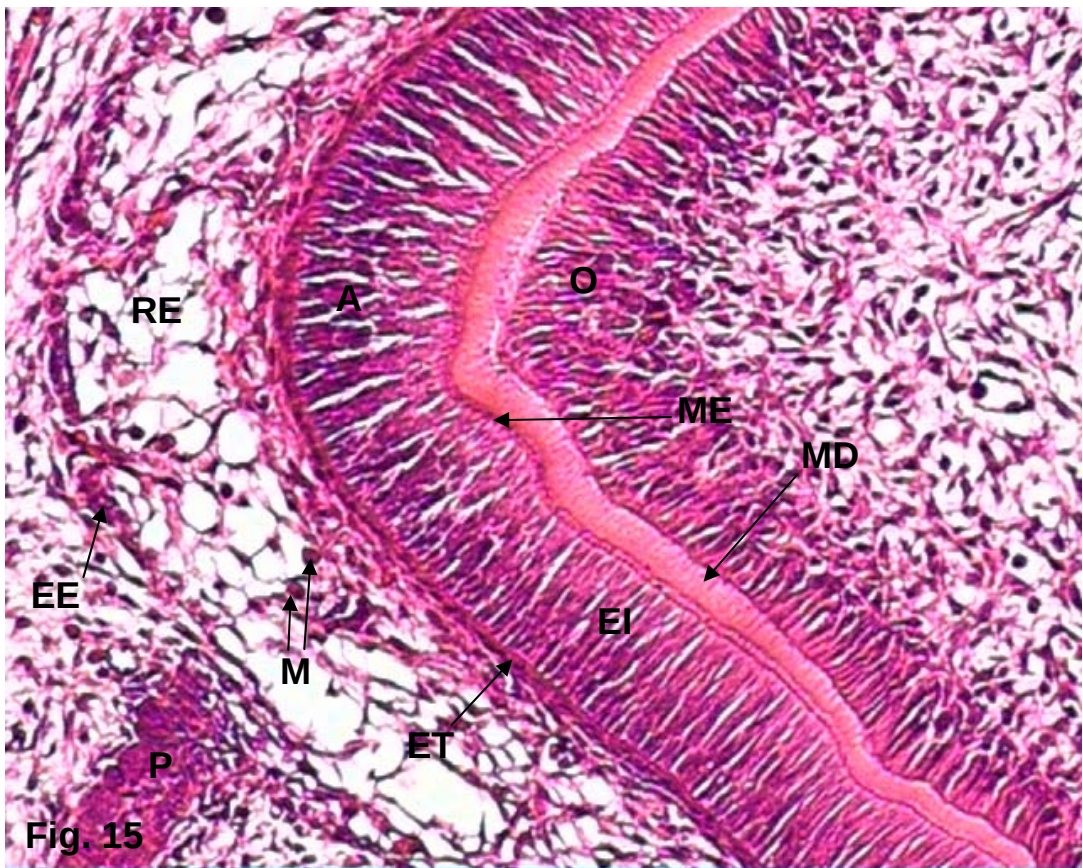


Figura 16 – Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 01 dia de vida, grupo experimental. Observa-se parte do germe dental na fase de coroa na região próxima a alça cervical. Epitélio externo (EE); retículo estrelado (RE); estrato intermediário (ET); pré-ameloblastos (PA); matriz de dentina (MD); odontoblastos (O) Coloração H.E. +/- 100X.

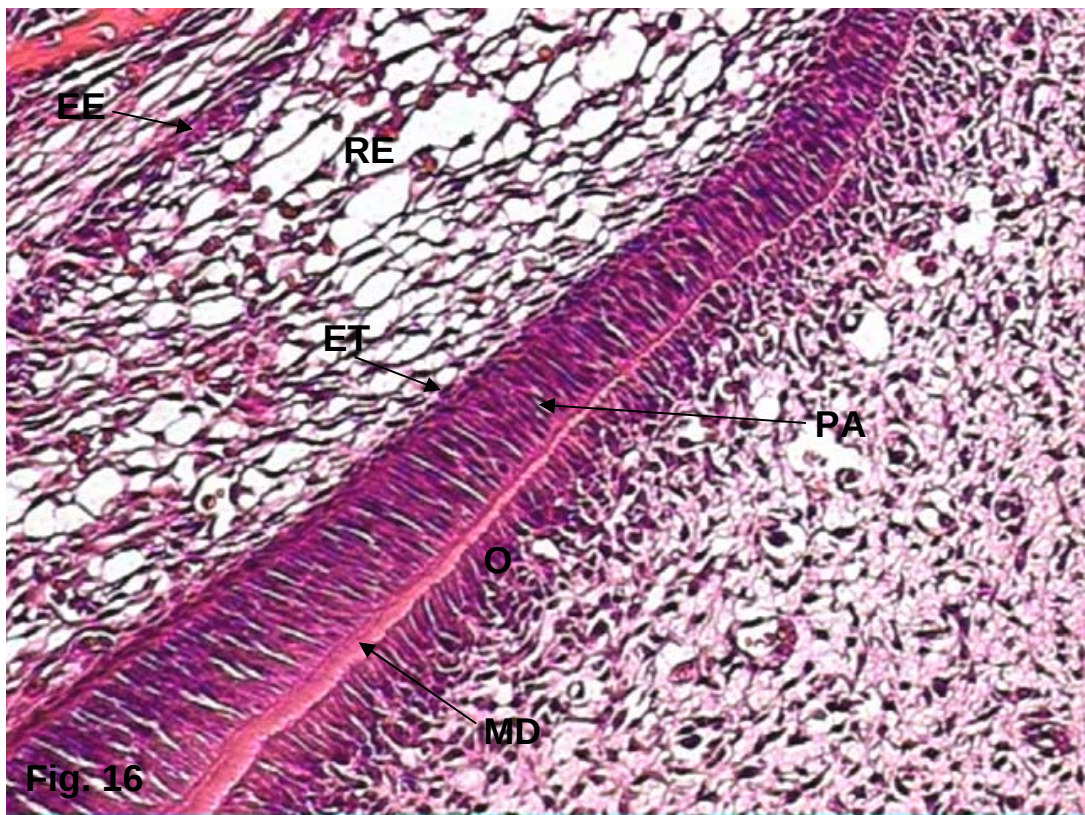
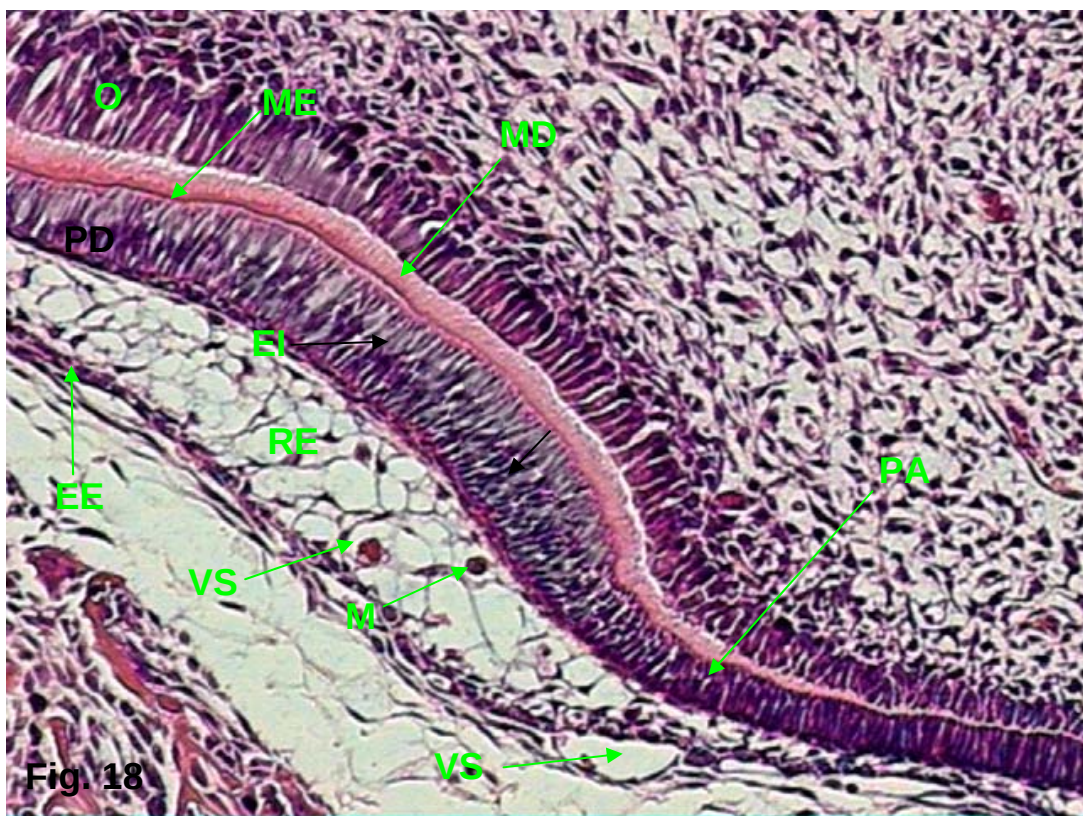


Figura 17 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 01 dia de vida, grupo controle. Observa-se parte do germe dental na fase de coroa. Tecido ósseo (TO); epitélio externo (EE); retículo estrelado (RE); epitélio interno (EI); ameloblastos (A); matriz de esmalte (ME); matriz de dentina (MD); odontoblastos (O); papila dentária (PD); vaso sangüíneo (VS). Coloração H.E. +/- 40X.

Figura 18 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 01 dia de vida, grupo controle. Em maior aumento observa-se parte do germe dental na fase de coroa na região próxima a alça cervical. Epitélio externo (EE); macrófago (M); ameloblastos (A); matriz de esmalte (ME); matriz de dentina (MD); odontoblastos (O); pré-ameloblastos (PA); vaso sangüíneo (VS). Coloração H.E. +/- 100X.



4 Animais com 3 dias de vida

Os germes dentários nesta idade, grupo experimental e controle, encontram-se na fase de coroa. Observa-se a formação de tecido ósseo ao redor dos germes em desenvolvimento caracterizando a formação da cripta óssea (figuras 19 e 21). Também nesta idade observa-se uma diferença entre os grupos de estudo com relação à presença do pedículo e o fechamento da cripta óssea. Nos animais do grupo experimental os germes encontram-se unidos ao epitélio oral pelo pedículo e a cripta óssea ainda não se fechou. No grupo controle observa-se o fechamento da cripta com ausência de pedículo (figuras 19 e 21).

As características do órgão do esmalte apresentadas pelos germes dentais em desenvolvimento são semelhantes as da idade anterior, porém mais evidentes e desenvolvidas. O órgão do esmalte encontra-se bem definido, formado pelo epitélio interno, externo e retículo estrelado (figuras 19 e 21). O epitélio externo mostra-se formado por uma camada descontínua de células prismáticas baixas bem delimitadas do retículo estrelado na região do pedículo (figuras 20 e 22). O retículo estrelado mostra-se formado por células de morfologia estrelada e espaço intercelular amplo podendo apresentar alguns macrófagos no seu interior. Nestes espaços descontínuos observam-se muitas vezes vasos sanguíneos provenientes do folículo dentário em direção ao retículo estrelado (figuras 20 e 25). Adjacente ao retículo estrelado e em íntimo contato com as células do epitélio interno, observa-se uma delgada e contínua camada de células achatadas que compreende o estrato intermediário (figuras 20 e 22).

No epitélio interno observa-se uma contínua camada de células com características diferentes quando observadas da região da futura cúspide em direção a região de alça cervical (figuras 19 e 21). Na futura cúspide os ameloblastos apresentam-se como células prismáticas altas de núcleos com polarização invertida. Observa-se uma maior quantidade de matriz de

esmalte depositada em relação à idade anterior representada por uma faixa de coloração vermelha escura (figura 19) ou roxa (figura 21) logo abaixo dos ameloblastos no epitélio interno. Conseqüentemente um número maior de ameloblastos também é observado no epitélio interno do órgão do esmalte. Observando do equivalente a região da futura cúspide em direção à alça cervical, apresentam-se os pré-ameloblastos de forma prismática e núcleos voltados para o estrato intermediário. Mais adiante as células do epitélio interno apresentam-se como células baixas de núcleo basal voltado para as células da papila dentária (figuras 19 e 20; 21 e 22).

Figura 19 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 03 dias de vida, grupo experimental. Observa-se parte do germe dental na fase de coroa com órgão do esmalte bem definido. Pedículo (P); tecido ósseo (TO); epitélio externo (EE); retículo estrelado (RE); matriz de esmalte (ME); matriz de dentina (MD); epitélio interno (EI); pré-ameloblastos (PA); odontoblastos (O); papila dentária (PD). Coloração H.E. +/- 40X.

Figura 20 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 03 dias de vida, grupo experimental. Em maior aumento observa-se o terço médio do órgão do esmalte no germe dental na fase de coroa. Epitélio externo (EE); retículo estrelado (RE); macrófagos (M); estrato intermediário (ET); matriz de esmalte (ME); matriz de dentina (MD); odontoblastos (O); vaso sanguíneo (VS). Coloração H.E. +/- 100X.

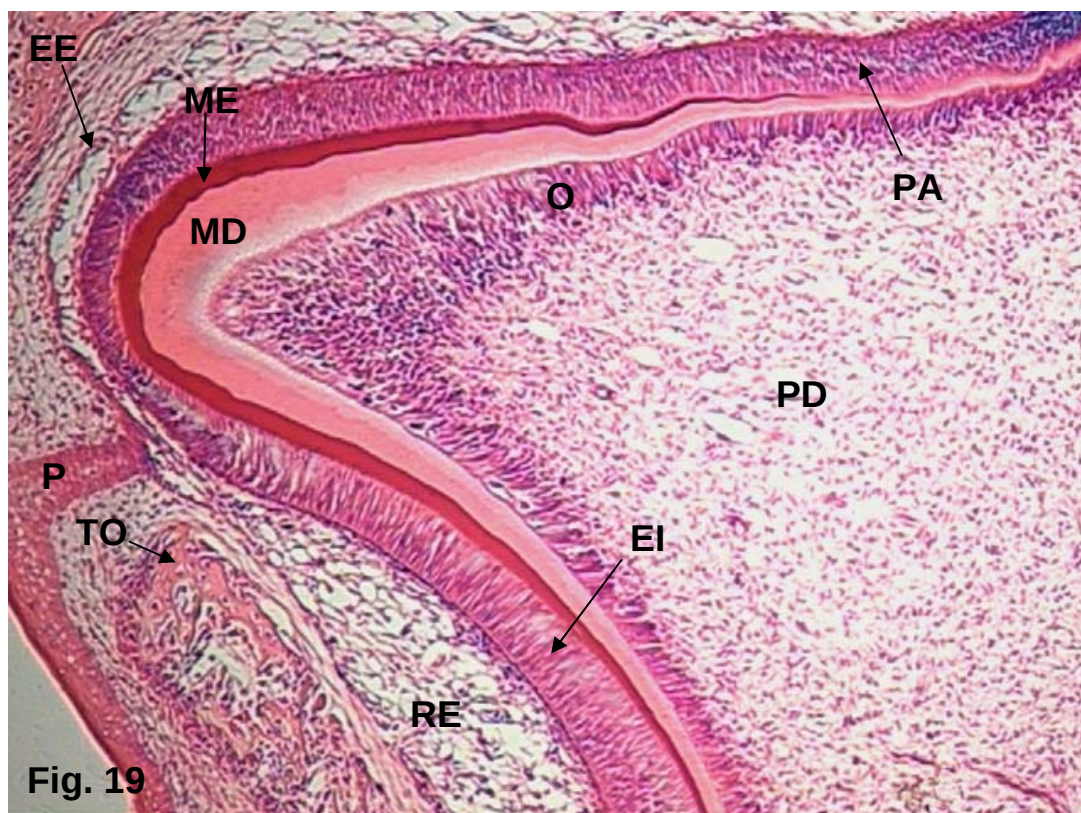
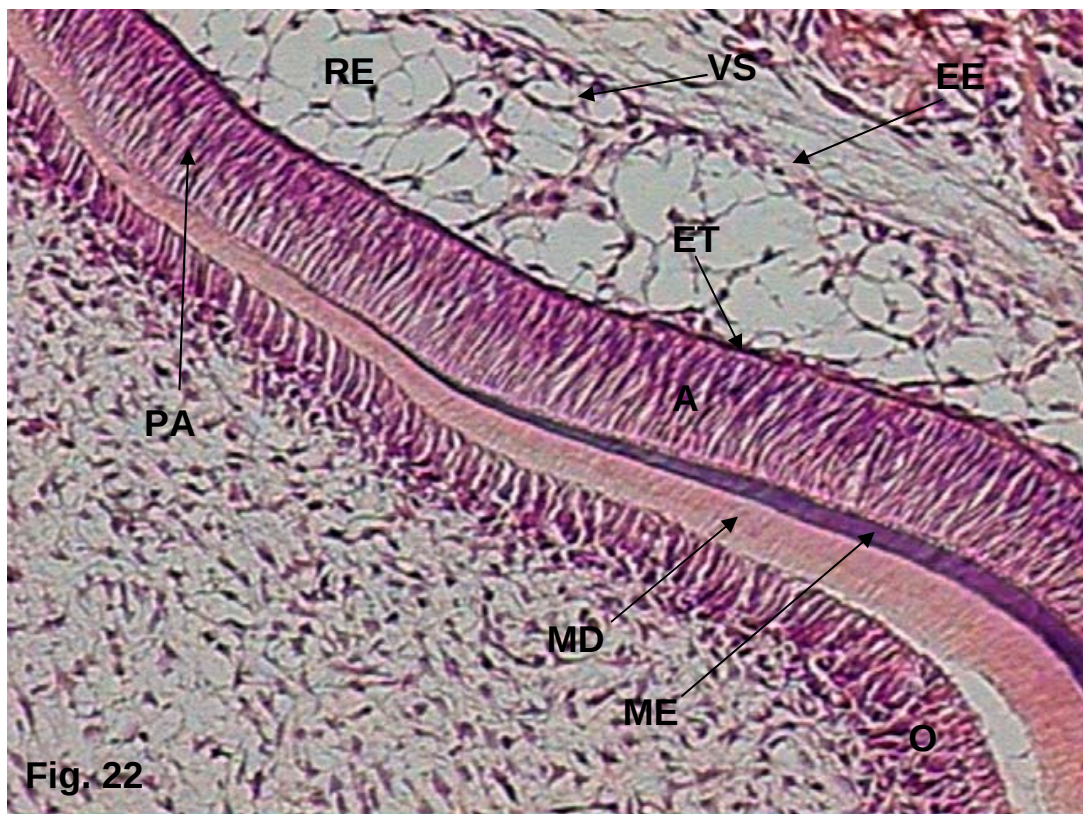


Figura 21 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 03 dias de vida, grupo controle. Observa-se parte do germe dental na fase de coroa com órgão do esmalte bem definido. Tecido ósseo (TO); epitélio externo (EE); retículo estrelado (RE); matriz de esmalte (ME); ameloblastos (A); matriz de dentina (MD); odontoblastos (O); vaso sanguíneo (VS); alça cervical (AC); papila dentária (PD). Coloração H.E. +/- 40X.

Figura 22 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 03 dias de vida, grupo controle. Em maior aumento observa-se o terço médio do órgão do esmalte no germe dental na fase de coroa. Epitélio externo (EE); retículo estrelado (RE); estrato intermediário (ET); pré-ameloblastos (PA); ameloblastos (A); matriz de esmalte (ME); odontoblastos (O); matriz de dentina (MD); vasos sanguíneos (VS). Coloração H.E. +/- 100X.



5 Animais com 5 dias de vida

Os germes observados nesta idade, grupo experimental e controle, encontram-se na fase de coroa. Observa-se a formação de tecido ósseo ao redor dos germes em desenvolvimento caracterizando a formação da cripta óssea (figuras 23 e 26). A partir desta idade não há diferença entre os grupos de estudo com relação à presença do pedículo e o fechamento da cripta óssea. Nos animais do grupo experimental e controle a cripta óssea encontra-se totalmente fechada não havendo a presença do pedículo unindo os germes ao epitélio. O órgão do esmalte encontra-se bem definido formado pelos epitélios interno e externo, retículo estrelado e estrato intermediário (figuras 23 e 26).

O epitélio externo apresenta-se como uma camada descontínua de células prismáticas baixas cuja delimitação em relação às células do retículo estrelado e vasos do folículo dentário não é bem evidente (figuras 25 e 27). O retículo estrelado mostra-se formado por células de aspecto estrelado e amplo espaço intercelular, embora apresente uma involução em relação à idade anterior, podendo apresentar alguns macrófagos e vasos sanguíneos com hemácias em seu interior (figuras 24 e 28). Adjacente ao retículo estrelado encontra-se o estrato intermediário do órgão do esmalte formado por uma delgada e contínua camada de 2 a 3 células achatadas (figuras 25 e 28).

O epitélio interno apresenta-se como uma contínua camada de células representada, do equivalente da futura cúspide para a alça cervical, pelos ameloblastos, pré-ameloblastos e células mais baixas de núcleo basal na região da alça cervical (figuras 23 e 26; 24 e 27). A deposição de matriz de esmalte ocorre respeitando a ordem de maior quantidade na região da futura cúspide em relação às demais regiões. Em algumas secções é possível observar os processos de Tomes emitidos pelos ameloblastos durante a deposição da matriz de esmalte (figura 28). A matriz de esmalte está representada por uma faixa vermelha logo abaixo dos

ameloblastos do epitélio interno e acima da matriz de dentina que se apresenta como uma faixa azul sobre os odontoblastos quando se utilizou coloração especial pelo tricrômico de Masson (figuras 29 e 30).

Figura 23 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 05 dias de vida, grupo experimental. Observa-se parte do germe dental na fase de coroa com órgão do esmalte bem definido em região de futura ponta de cúspide. Tecido ósseo (TO); epitélio externo (EE); retículo estrelado (RE); ameloblastos (A); matriz de esmalte (ME); matriz de dentina (MD); odontoblastos (O); alça cervical (AC); papila dentária (PD). Coloração H.E. +/- 40X.

Figura 24 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 05 dias de vida, grupo experimental. Em maior aumento observa-se parte do germe dental na fase de coroa na região próxima a alça cervical. Epitélio externo (EE); ameloblastos (A); pré-ameloblastos (PD); odontoblastos (O); alça cervical (AC); vasos sangüíneos (VS); macrófago (M); estrato intermediário (ET). Coloração H.E. +/- 100X.

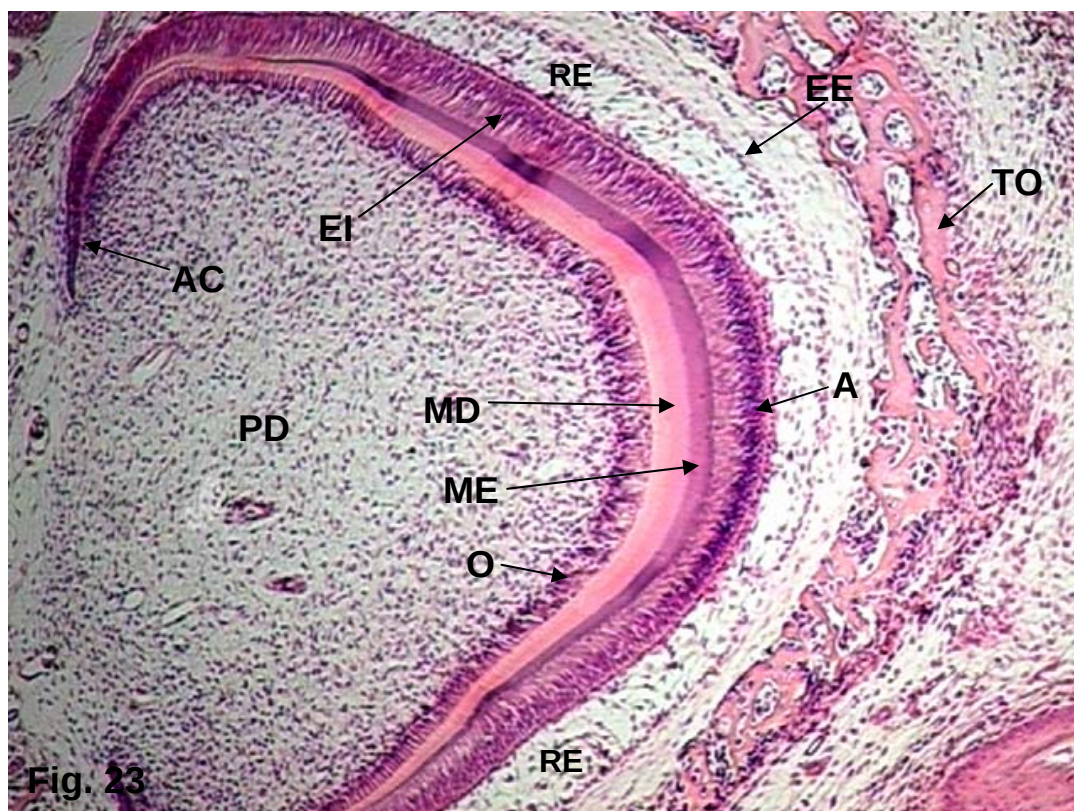


Figura 25 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 05 dias de vida, grupo experimental. Observa-se o terço médio do órgão do esmalte no germe dental na fase de coroa. Epitélio externo (EE); retículo estrelado (RE); estrato intermediário (ET); ameloblastos (A); matriz de esmalte (ME); odontoblastos (O); matriz de dentina (MD). Coloração H.E. +/- 100X.

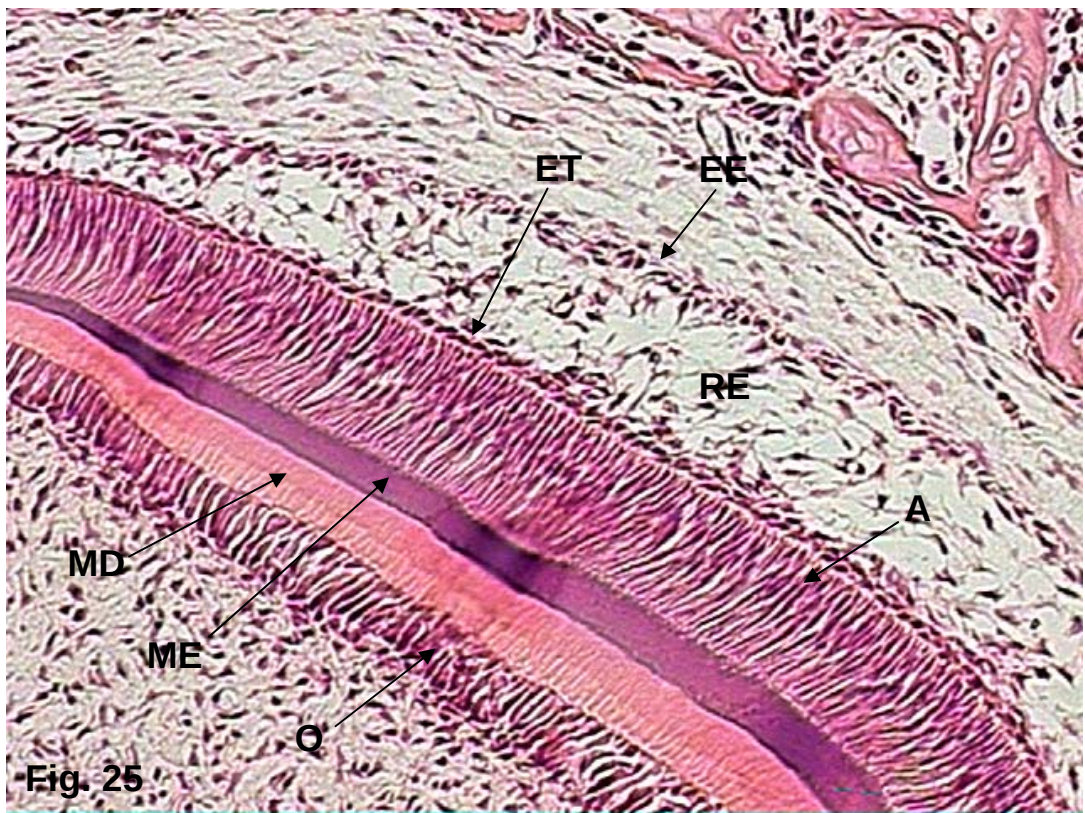


Figura 26 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 05 dias de vida, grupo controle. Observa-se parte do germe dental na fase de coroa com órgão do esmalte bem definido na região da futura cúspide. Tecido ósseo (TO); epitélio externo (EE); retículo estrelado (RE); ameloblastos (A); matriz de esmalte (ME); matriz de dentina (MD); odontoblastos (O); papila dentária (PD); vaso sangüíneo (VS). Coloração H.E. +/- 40X.

Figura 27 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 05 dias de vida, grupo controle. O Em maior aumento observa-se parte do germe dental na fase de coroa na região próxima a alça cervical. Epitélio externo (EE); ameloblastos (A); matriz de esmalte (ME); pré-ameloblastos (PA); odontoblastos (O); matriz de dentina (MD); vasos sangüíneos (VS); estrato intermediário (ET). Coloração H.E. +/- 100X.

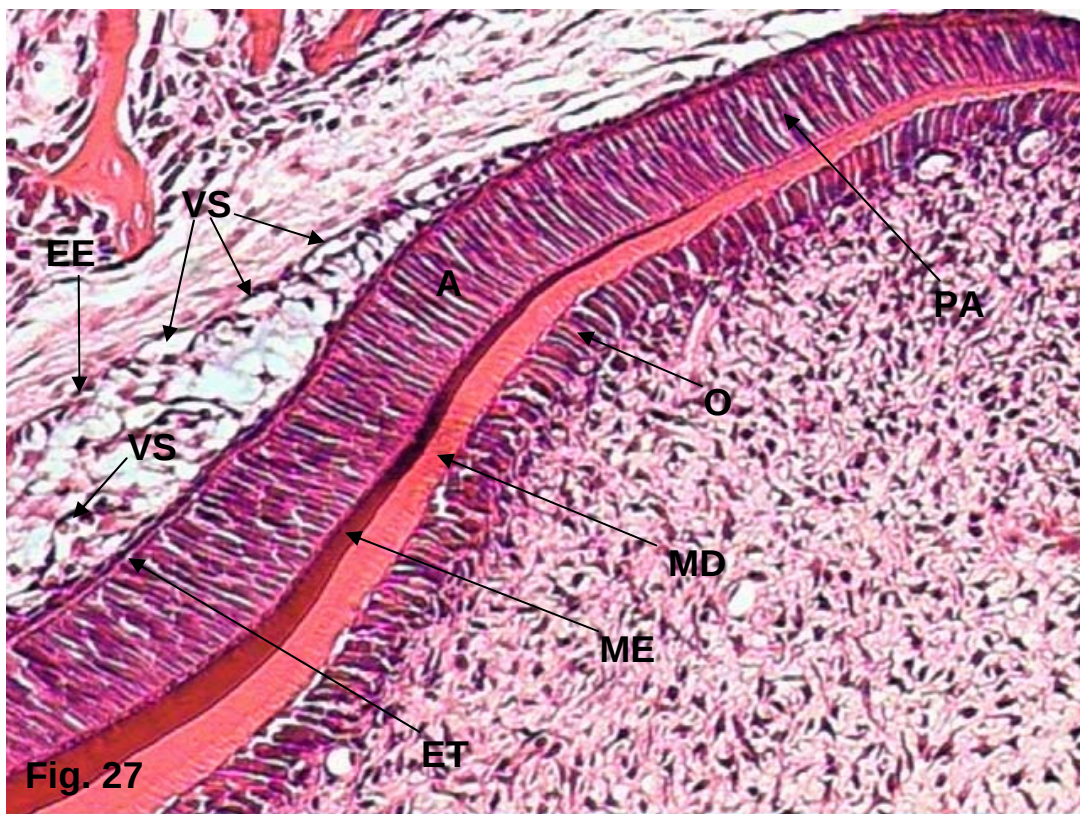
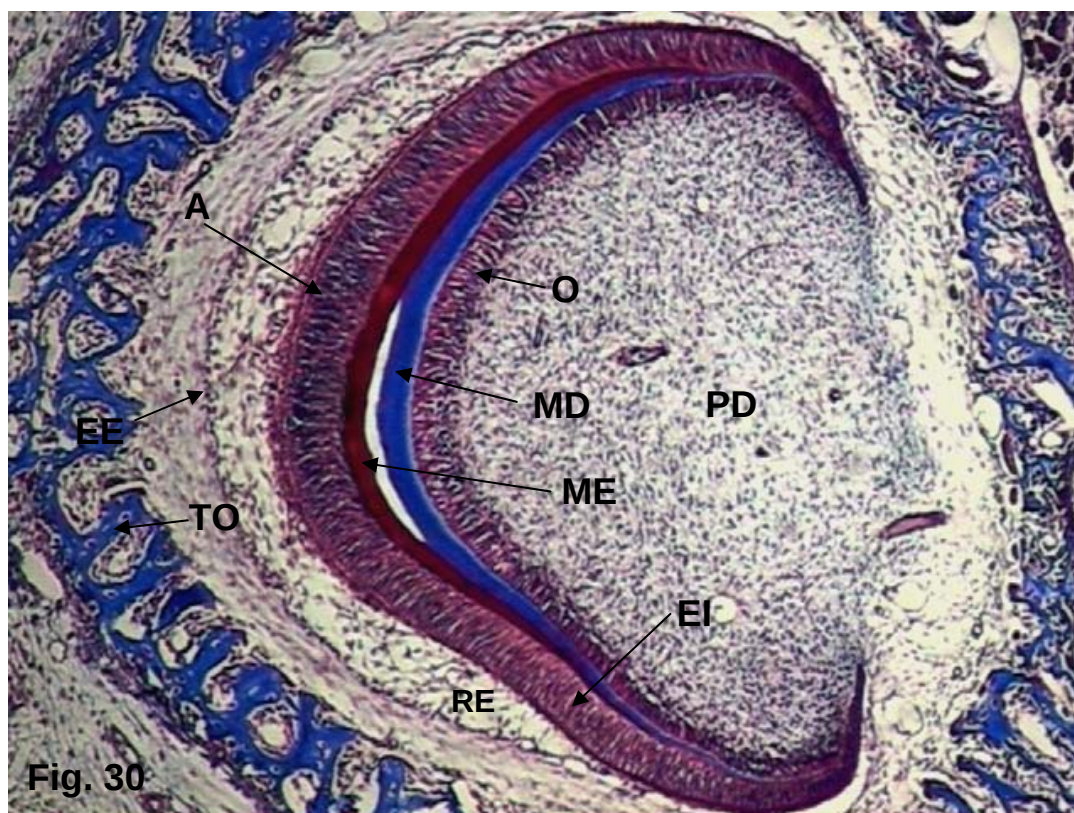
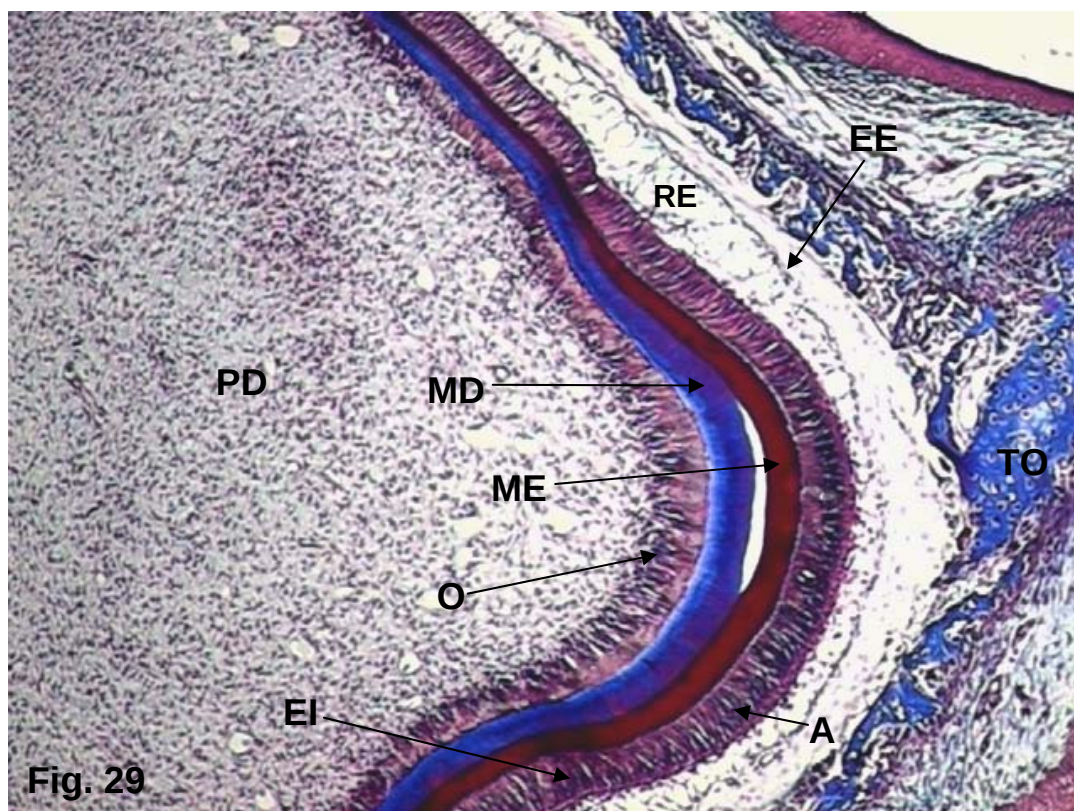


Figura 28 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 05 dias de vida, grupo controle. Em maior aumento observa-se parte do germe dental, terço médio, na fase de coroa. Epitélio externo (EE); retículo estrelado (RE); macrófago (M); ameloblastos (A); matriz de esmalte (ME); processos de Thomes (PT); vaso sanguíneo (VS); estrato intermediário (ET). Coloração H.E. +/- 200X.



Figura 29 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 05 dias de vida, grupo experimental. Observa-se parte do germe dental na fase de coroa com órgão do esmalte bem definido na região da futura cúspide. Tecido ósseo (TO); epitélio externo (EE); epitélio interno (EI); retículo estrelado (RE); ameloblastos (A); matriz de esmalte (ME); odontoblastos (O); matriz de dentina (MD); papila dentária (PD). Coloração tricrômico de Masson +/- 40X.

Figura 30 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 05 dias de vida, grupo controle. Observa-se parte do germe dental na fase de coroa com órgão do esmalte bem definido. Tecido ósseo (TO); epitélio externo (EE); epitélio interno (EI); retículo estrelado (RE); ameloblastos (A); matriz de esmalte (ME); odontoblastos (O); matriz de dentina (MD); papila dentária (PD); Coloração tricrômico de Masson +/- 40X.



6 Animais com 10 dias de vida

Os germes dentários nesta idade, grupo experimental e controle, encontram-se na fase final de coroa em transição para fase de raiz com a deposição de tecido mineralizado chegando até a região da alça cervical (figuras 31 e 33). O órgão do esmalte encontra-se bem definido, mas em virtude da evolução da amelogênese algumas alterações estruturais podem ser notadas. A delimitação do epitélio externo com o retículo estrelado mostra-se difícil pois o retículo involuiu em decorrência do desenvolvimento do germe dentário. O estrato intermediário continua formado por uma camada de 2 a 3 células achatadas em íntimo contato com epitélio interno adjacente. O epitélio interno é composto em quase toda sua extensão por ameloblastos que se apresentam como células prismáticas altas com núcleos de polarização invertida (figuras 31 e 32; 33 e 34). A quantidade de matriz de esmalte depositada envolve quase todo o germe dentário em desenvolvimento e, na região mais próxima aos ameloblastos, observa-se os processos de Thomes (figuras 32 e 34).

A quantidade de matriz de dentina depositada envolve todo o germe dentário chegando até a região de alça cervical. Abaixo da dentina observa-se os odontoblastos emitindo prolongamentos citoplasmáticos em direção a matriz de dentina conhecidos como fibrilas de Thomes (figuras 32 e 34).

Figura 31 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 10 dias de vida, grupo experimental. Observa-se parte do germe dental na fase final de coroa com órgão do esmalte bem definido. Tecido ósseo (TO); epitélio interno (EI); ameloblastos (A); matriz de esmalte (ME); odontoblastos (O); matriz de dentina (MD); papila dentária (PD); alça cervical (AC). Coloração H.E. +/- 40X.

Figura 32 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 10 dias de vida, grupo experimental. Em maior aumento observa-se parte do germe dental na fase final de coroa com órgão do esmalte bem definido na região de futura cúspide. Estrato intermediário (ET); ameloblastos (A) e processos de Thomes (PT); matriz de esmalte (ME); odontoblastos (O) e fibrilas de Thomes (FT); matriz de dentina (MD); papila dentária (PD); vaso sanguíneo (VS). Coloração H.E. +/- 100X.

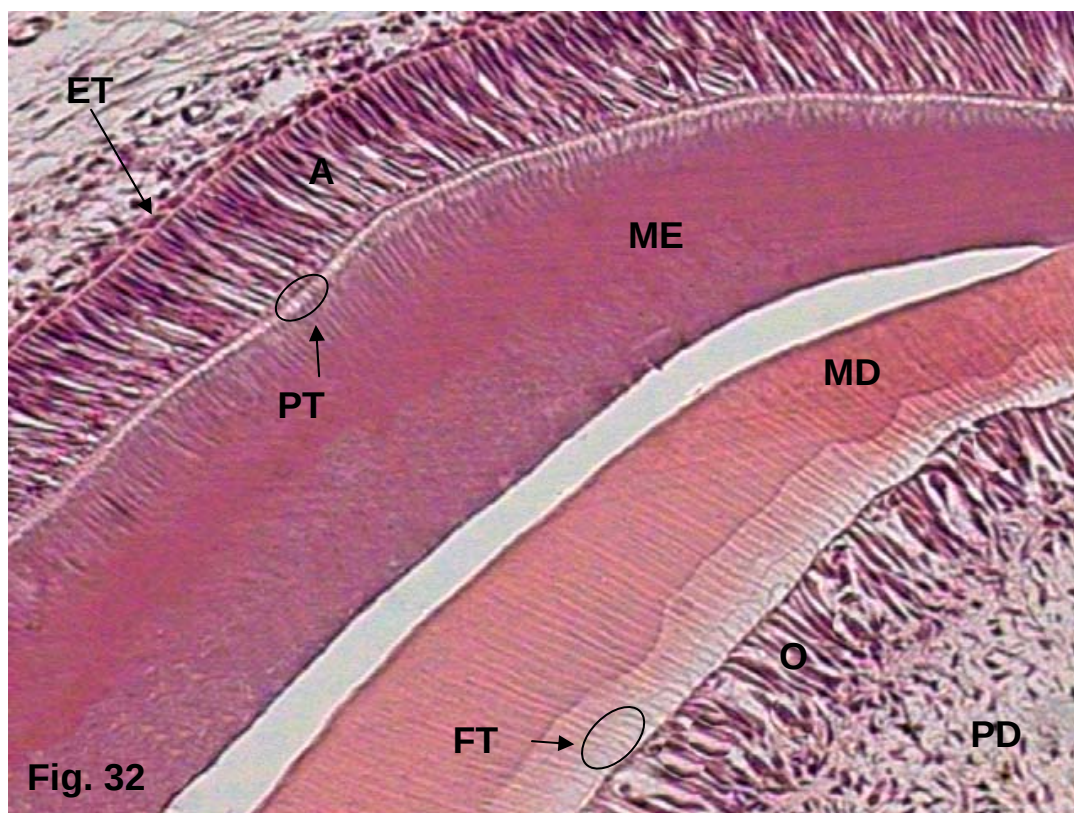
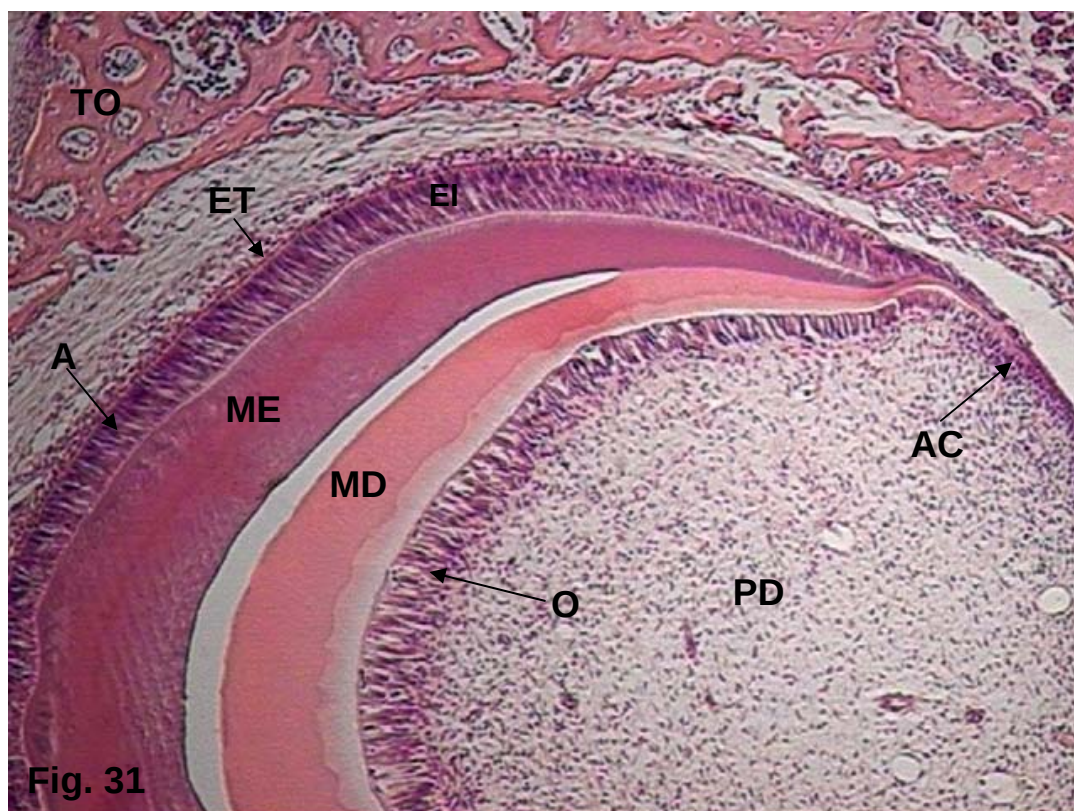
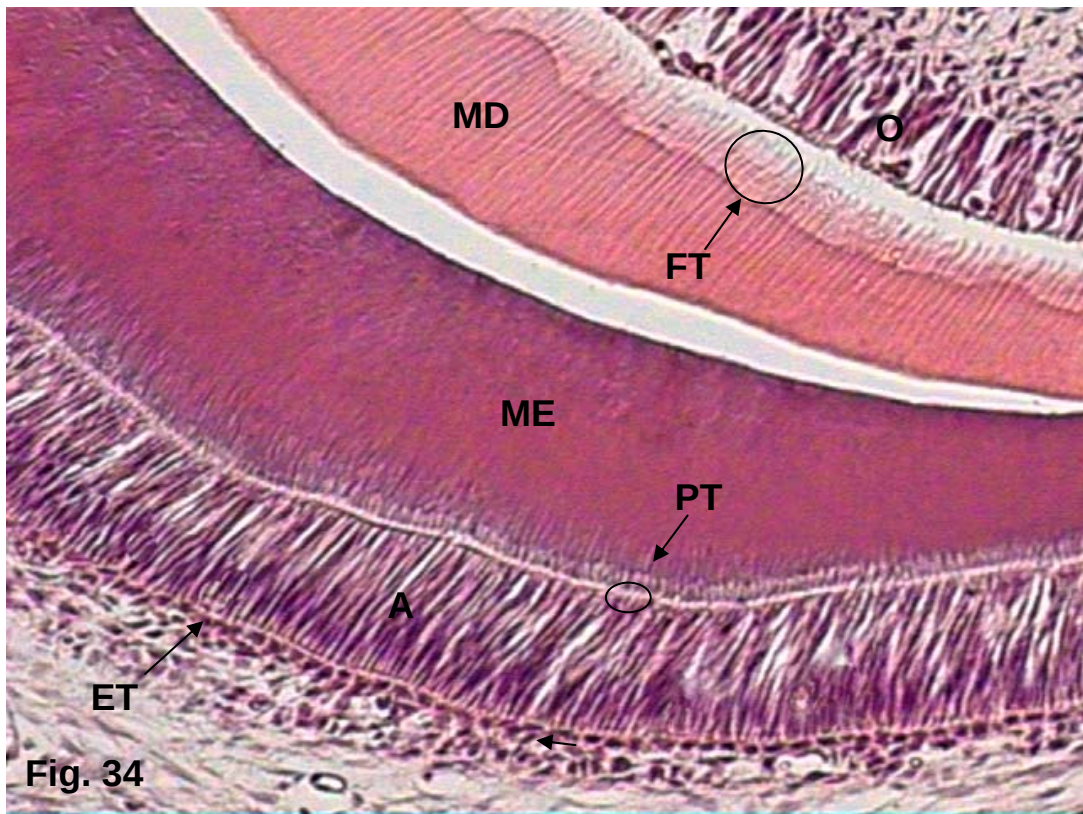
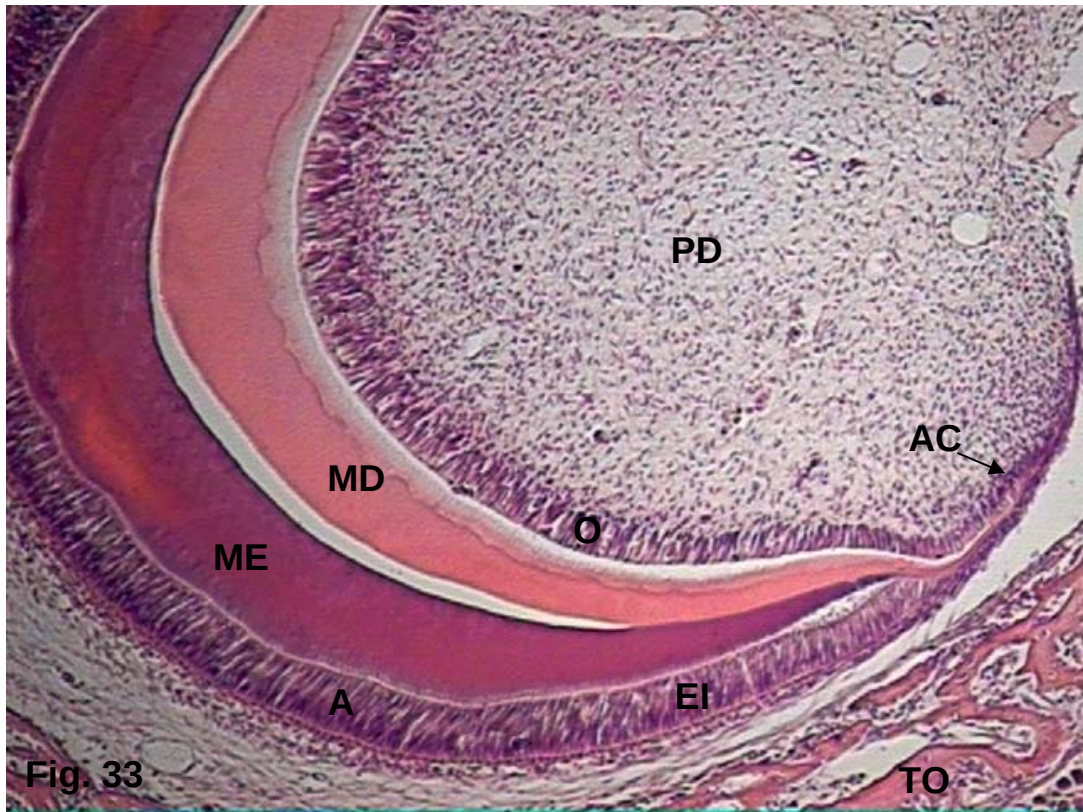


Figura 33 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 10 dias de vida, grupo controle. Observa-se parte do germe dental na fase final de coroa com órgão do esmalte bem definido. Tecido ósseo (TO); epitélio interno (EI); ameloblastos (A); matriz de esmalte (ME); odontoblastos (O); matriz de dentina (MD); papila dentária (PD); alça cervical (AC). Coloração H.E. +/- 40X.

Figura 34 - Fotomicrografia de parte do germe dental de primeiro molar superior de rato com 10 dias de vida, grupo controle. Em maior aumento observa-se parte do germe dental na fase final de coroa com órgão do esmalte bem definido na região da futura cúspide. Estrato intermediário (ET); ameloblastos (A) e processos de Thomes (PT); matriz de esmalte (ME); odontoblastos (O) e fibrilas de Thomes (FT); matriz de dentina (MD); papila dentária (PD). Coloração H.E. +/- 100X.



DISCUSSÃO

Observando-se a evolução do órgão do esmalte em cada idade estudada neste trabalho, verifica-se que o desenvolvimento do mesmo ocorre sem alterações morfológicas em relação ao grupo controle. A partir do 17º dia de V.I.U., observamos germes na fase de capuz com as regiões do órgão do esmalte bem delimitadas nos dois grupos de estudo, preservando suas principais características estruturais. Desde então o desenvolvimento do germe ocorre normalmente continuando no estágio de capuz em animais com 19 dias de V.I.U. passando ao estágio de coroa ou campânula avançada em animais com 01, 03, 05 e 10 dias de vida apresentando as características pertinentes a cada fase da odontogênese (BHASKAR, 1989 ; TEN CATE, 1998 ; MILETICH ; SHARPE, 2003 ; KATCHBURIAN ; ARANA, 2004).

A partir do primeiro dia de vida ocorre deposição de matriz de esmalte e dentina na região da futura cúspide do dente em desenvolvimento tanto no grupo experimental quanto no controle. É possível observar que a amelogênese esteja ocorrendo em ambos os grupos de estudo sem alterações morfológicas que possam comprometer a futura estrutura do esmalte dentário maduro. O fato de o germe dentário apresentar desenvolvimento comum entre os grupos, nas fases de capuz e campânula, sugere que os processos de morfodiferenciação e histodiferenciação estejam ocorrendo normalmente. O germe dentário desenvolve todo o contorno comum à coroa do futuro dente, bem como, apresenta toda histodiferenciação necessária para compor os tecidos dentários, principalmente o esmalte (REITH, 1960,1961; KALLEMBACH, 1966 ; REITH, 1967 ; KALLEMBACH, 1968 ; REITH, 1970). As células da concavidade do órgão do esmalte durante a diferenciação de epitélio interno para ameloblasto mantiveram as mesmas características estruturais indicando que a síntese e maturação do esmalte estejam ocorrendo normalmente.

Ao iniciar a deposição da matriz de dentina, por volta do primeiro dia de vida em ambos os grupos de estudo, o órgão do esmalte manteve o desenvolvimento do processo involutivo caracterizado pela descontinuidade do epitélio externo, invasão vascular e colapso

do retículo estrelado. O processo involutivo do órgão do esmalte ocorre simultaneamente à deposição da matriz de esmalte. Trata-se de mudanças nas características das regiões que compõem o órgão do esmalte em virtude da evolução da amelogênese (PANNESE, 1961; BARATELLA-EVÊNCIO, 1995). A descontinuidade do epitélio externo, a presença de vasos sanguíneos em contato com o mesmo além da observação de macrófagos no interior do retículo estrelado em animais com 01, 03 e 05 dias de vida, em ambos os grupos de estudo, caracteriza a existência do processo involutivo do retículo estrelado no órgão do esmalte nos germes dentários estudados. Desta forma não há alterações que comprometam a evolução da amelogênese nos animais dos dois grupos de estudo.

O início da secreção de matriz de esmalte inicia-se após a deposição da dentina do manto. Este fenômeno inicia-se após a retirada da membrana basal situada entre os pré-ameloblastos e os odontoblastos permitindo o contato da matriz de dentina com os pré-ameloblastos e a diferenciação destes em ameloblastos (KATCHBURIAN ; HOLT, 1972 ; KATCHBURIAN ; BURGESS, 1977). Em ambos os grupos de estudo foi possível observar a presença da membrana basal circundando o órgão do esmalte em animais até 19 dias de V.I.U. inclusive na sua concavidade característica quando se observou os cortes corados em P.A.S., contra-corados com Hematoxilina. Em animais a partir de 01 dia de vida não se observou a presença da membrana basal, característica atribuída à presença da matriz de esmalte e dentina. A existência da membrana basal em ambos os grupos de estudo em animais com 19 dias de V.I.U. e a sua ausência em animais a partir de 01 dia de vida sugere que não há diferenças quanto ao início da amelogênese entre os animais avaliados nos dois grupos de estudo. Desta forma o uso da fluoxetina não exerce influência sobre o início da amelogênese na dose utilizada neste trabalho.

Uma vez depositada toda a espessura de esmalte dentário inicia-se o estágio de maturação cujo processo culmina com o esmalte composto por 96% de sais de cálcio e 2% de

matéria orgânica (DEAKINS, 1942 ; SMITH, 1979). A coloração feita com tricrômico de Masson sugere que não existam alterações na composição orgânica da matriz de esmalte depositada pela mesma intensidade de coloração. Desta forma é possível que o processo da amelogênese esteja ocorrendo sem haver prejuízos para a composição do esmalte com o uso da fluoxetina. O uso desta coloração também não evidenciou a presença de matriz de esmalte em animais com 19 dias de V.I.U., fato que apenas ocorreu no primeiro dia de vida nos dois grupos de estudo. Esta observação reforça a idéia de que a fluoxetina não esteja exercendo influência sobre o desenvolvimento normal da amelogênese.

Diferenças com relação ao fechamento da cripta óssea e ausência do pedículo quando comparados grupo experimental e controle foram observadas. Nos animais do grupo controle a cripta óssea já se encontra formada a partir do primeiro dia de vida estando o germe dentário no interior de sua cripta óssea sem contato com o epitélio oral. No grupo experimental os animais no primeiro dia de vida ainda não apresentam suas criptas ósseas fechadas, fenômeno que só vai ser observado nos animais com cinco dias de vida em ambos os grupos de estudo. Por não ser objeto deste estudo uma análise do comportamento do tecido ósseo na formação da cripta óssea alveolar, fica apenas a observação de que houve um retardo no fechamento da cripta óssea nos animais tratados com fluoxetina em comparação ao grupo controle. Estes dados sugerem a interferência da fluoxetina no desenvolvimento ósseo da cripta óssea alveolar que, de alguma maneira pode influir no mecanismo de erupção dentária, entretanto nossa metodologia não permite nenhuma conclusão a respeito da influência da fluoxetina na fase de erupção do dente em desenvolvimento.

O fato de que os neurotransmissores apresentem funções de não-transmissão durante o desenvolvimento é decorrente da precoce presença dessas substâncias durante as fases da embriogênese (BUZNIKOV *et al.* 1996, 2001). O sistema serotoninérgico destaca-se entre os sistemas de neurotransmissores envolvidos na modulação do desenvolvimento e crescimento

promovendo a regulação de interações epitélio-mesenquimais importantes podendo provocar alterações de crescimento e desenvolvimento em muitos tecidos quando há alterações nos níveis de serotonina durante a embriogênese (TURLEJSKI, 1996 ; MENDES - DA - SILVA *et al.*, 2002).

A fluoxetina é um fármaco antidepressivo inibidor seletivo da recaptação de serotonina. Sua ação decorre do aumento da concentração de serotonina pelo sistema nervoso central, devido ao bloqueio pré-sináptico dos receptores de serotoninérgicos (BALLONE, 2003). Dados da literatura mostram uma elevada prevalência de desordens psiquiátricas durante a gravidez tratadas pela administração de drogas psicotrópicas durante a gestação (SIMON *et al.*, 2002; LAINE *et al.*, 2003). Estudos comprovam que a administração de drogas durante a gestação provoca malformações craniofaciais resultantes da alteração da função de regulação serotoninérgica nas interações epitélio-mesenquimais (SHUEY *et al.*, 1992).

No desenvolvimento dos dentes a serotonina aparece como estimuladora da odontogênese interagindo com diferentes receptores serotoninérgicos (LAUDER, *et al.*, 2000) expressos no epitélio e mesênquima dentário durante as diferentes fases da odontogênese (MOISEWITSCH ; LAUDER, 1996 ; LAUDER ; ZIMMERMAN, 1988) e através de sítios de captação de 5-HT também presentes no germe dentário durante seu desenvolvimento (MOISEWITSCH, *et al.*, 1998). A administração de fluoxetina em ratas gestantes permite alterar os níveis de serotonina disponíveis para que possamos estudar a influência desta no desenvolvimento dos dentes que, por sua vez, também resulta de interações epitélio-mesenquimais importantes (KATCHBURIAN ; ARANA, 1999, 2004). Neste estudo a administração de fluoxetina a 10 mg/kg de peso não mostrou alterações morfológicas no órgão do esmalte em primeiros molares superiores de ratos que pudessem prejudicar o desenvolvimento da amelogênese. Na literatura pouco há descrito sobre o papel da serotonina

no desenvolvimento dos dentes especificamente quando se trata de sua relação com o desenvolvimento do órgão do esmalte na amelogênese.

Partindo do princípio que a serotonina desempenha um papel estimulador sobre o desenvolvimento dos dentes (MOISEIWITSCH ; LAUDER, 1996 ; MOISEIWITSCH, *et al.*, 1998), é possível que a dose utilizada em nosso estudo tenha sido insuficiente para provocar alterações no desenvolvimento do órgão do esmalte. A amelogênese ocorreu sem alterações morfológicas no órgão do esmalte, portanto a ação estimuladora da serotonina está ocorrendo (MOISEIWITSCH ; LAUDER, 1996), mas as alterações nos seus níveis provocadas pela administração da droga não promoveram alterações morfológicas durante a amelogênese. Diferenças metodológicas também podem ser levadas em consideração, pois nosso trabalho é diferente de todos que tratam especificamente do papel da serotonina no desenvolvimento dos dentes. A utilização de um suprimento de serotonina oferecido a um germe dental que se desenvolve *in vitro* associado a 5-HT endógena proveniente da mãe (MOISEIWITSCH ; LAUDER, 1996) pode ser responsável pelos resultados diferentes. De qualquer forma nós não encontramos evidências de que a fluoxetina interfira no desenvolvimento do órgão do esmalte, porém estudos utilizando uma dose maior de fluoxetina são necessários para comprovar o uso seguro deste fármaco em ratas gestantes sem haver prejuízo para o desenvolvimento dos dentes, em particular para a amelogênese.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos a partir da metodologia empregada concluímos que na dose de fluoxetina utilizada:

- Não foram observadas alterações morfológicas no órgão do esmalte de germes dentários de primeiros molares superiores de ratos tratados com fluoxetina.
- O uso da fluoxetina não provoca agenesia dentária em nenhum animal nas idades estudadas.
- O uso da fluoxetina não provoca alterações na cronologia de desenvolvimento dos germes dentários de primeiros molares de ratos.

REFERÊNCIAS

BALLONE, G. J. Serotonina. In: **PsiquWeb Psiquiatria Geral**. Disponível em <http://www.psiqweb.med.br/farmacologia/serotonina.html>. Acesso em 04/10/2006.

BALLONE, G. J. Antidepressivos Tricíclicos, In : **PsiquWeb**. Disponível em <http://www.psiqweb.med.br/farmacologia/tricic.html> revisado em 2003. Acesso em 05/10/2006.

BALLONE, G. J.; ORTOLANI, I.V. Psicofarmacologia para Não Psiquiatras, Antidepressivos, In: **PsiquWeb**. Disponível em <http://sites.uol.com.br/gballone/cursos/farmacologia2.html> 2003. Acesso 05/10/2006.

BARATELLA-EVÊNCIO, L. **Características estruturais e funcionais do retículo estrellado de germes dentários de rato**. 1995. 93p. Tese (Mestrado em Morfologia). Departamento de Morfologia, Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina. São Paulo.

BEEMAN, C. S. ; KRONMILLER, J. E. Temporal distribution of endogenous retinoids in the embryonic mouse mandible. **Arch. Oral Biol.** 39, p. 733-739, 1994.

BHASKAR, S. N. **Histologia e embriologia oral de orban**. 10. ed. São Paulo: Artes Médicas, 1989.

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

BUZNIKOV, G. A. ; LAMBERT, H. W.; LAUDER, J. M. Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. **Review Cell Tissue Res.**305,n.2.p.177-86,Aug.2001.

BUZNIKOV, G. A.; SHMUKLER, Y. B.; LAUDER, J. M. From oocyte to neuron: do neurotransmitters function in the same way throughout development? **Review Cell Mol Neurobiol.**16, n.5. p.537-59, Oct.1996.

BYRD, K. E. ; YANG, L. ; YANCEY, K. W. ; TEOMIM, D.; DOMB, A. J. Increased *in vivo* levels of neurotransmitters to trigeminal motoneurons: effects on craniofacial bone and TMJ. **Anatom Rec.** 258, p. 369-383, 2000.

CARLSON, B. M. **Embriologia humana e biologia do desenvolvimento**. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1996.

CHARNEY, D. S.; HENINGER, G. R.; STEINBERG, D. E. Serotonergic function in depression. Prolactin response to intravenous tryptophan in depressed patients and healthy subjects. **Arch Gen Psychiatry.** 41, n.4, p. 398-402, Apr. 1984.

COHEN, L. S ; SOARES, C. N ; VIGUERA, C. Mood disturbance and pregnancy: pros and cons of pharmacologic treatment. **Rev Bras Psiquiatr.** 23, n. 1, p. 48-53, 2001.

DEAKINS, M. Changes in the ash, water and organic contents of pig enamel during calcification. **J. Dent. Res.** 21, p. 429-435, 1942.

DEIRÓ, T. C. B. J. **Desenvolvimento somático e sensorio-motor e do consumo alimentar em ratos : efeitos do tratamento com inibidor de recaptação de serotonina durante o período de rápido crescimento do encéfalo.** 1998. 106 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição). Departamento de Nutrição. Centro de Ciências da Saúde, UFPE, 1998.

DE MEYER, M. D.; SHEA, P. A.; HENDRIE, H. C.; YOSHIMURA, N. N. Plasma tryptophan and five other amino acids in depressed and normal subjects. **Arch Gen Psychiatry.** 38, n.6, p. 642-6, Jun. 1981.

DELGADO, P. L. ; CHARNEY, D. S. ; PRICE, L. H.; AGHAJANIAN, G. K.; LANDIS, H.; HENINGER, G. R. Serotonin function and the mechanism of antidepressant action. Reversal of antidepressant-induced remission by rapid depletion of plasma tryptophan. **Arch. Gen Psychiatry.** 47, n. 5, p. 411-8. May. 1990.

FUCHS, F. D.; WANNMANCHER, L. **Farmacologia Clínica: fundamentos da terapêutica racional.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

GUIMARÃES, F. S.; WANNMACHER, L. Fármacos usados nos distúrbios afetivos. In: FUCHS, F. D. WANNMACHER, L. **Farmacologia Clínica: fundamentos da terapêutica racional.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 379-391, 1998.

HAMON, M. ; EMERIT, M. B. Les facteurs chimiques impliqués dans la différenciation neuronale. In : RELIER, J. P.; LAUGIER, J. ; SALLE, B. L. **Médecine Périnatale (foetus et nouveau-né).** Eds. Paris- Flammarion : Médecine-Sciences. p. 194-200, 1989.

HEDNER, J; LUNDELL, K.H; BREESE, G.R; MUELLER, R.A; HEDNER, T. Developmental variations in CFS monoamine metabolites during childhood. **Biol Neonate** 49, p. 190-197, 1986.

HOYER, D. C. ; FOZARD, J. R. ; HARTIG, P.R.; MARTIN, G.R. MYLECHARANE, E. J. ; SAXENA, P. R. ; HUMPHREY, P. P. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). **Review Pharmacol Rev.** 46,n.2,p.157-203, Jun. 1994.

HYTTTEL, J. Pharmacological characterization of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). **International Journal of Psychopharmacology**, 9 (suppl.), p. 19-26, 1994.

JOHNSON, D. S.; HEINEMANN, S. F. Embryonic expression of the 5-HT₃ receptor subunit, 5-HT₃ R-A, in the rat: an in situ hybridization study. **Mol. Cell neurosci.** v. 6, p. 122-138, 1995.

JUNG, H. S.; HITOSHI, Y.; KIM, H. J. Study on tooth development, past, present, and future. **Microscopy research and technique**. 60, p. 480-482, 2003.

KALLENBACH, E. Electron Microscopy of the papillary layer of rat incisor enamel organ during enamel maturation. **J. Ultrastruct. Res.** 14, p. 518-533, 1966.

KALLENBACH, E. Fine structure of rat incisor ameloblasts during enamel maturation. **J. Ultrastruct. Res.** 22, p. 90-119, 1968.

KALLENBACH, E. Electron microscopy of the differentiating rat incisor ameloblast. **J. Ultrastruct. Res.** 35, p. 508-531, 1971.

KATCHBURIAN, E.; BURGESS, A. M. C. Fine structure of contacts and between ameloblasts in rat tooth germ. **Arch. Oral Biol.** 22, p. 551-553, 1977.

KATCHBURIAN, E. ; BURGESS, A. M. C. Lysosomes and removal of the basal lamina of ameloblasts in early stages of odontogenesis. **Cell boil. Int. Rep.** 7, 407-415, 1983.

KATCHBURIAN, E.; HOLT, S. J. Studies on the development of the ameloblasts. I- fine structure. **J. Cell Sci.** 11, p. 415-447, 1972.

KATCHBURIAN, E.; ARANA-CHAVEZ, V. E. **Histologia e embriologia oral**. São Paulo: Panamericana, 1999.

KATCHBURIAN, E.; ARANA-CHAVEZ, V. E. **Histologia e embriologia oral**. 2. ed. São Paulo: Panamericana, 2004.

KOLETZKO, B.; AGGETT, P. J.; BINDELS, J. G. ; BUNG, P.; FERRÉ, P.; GIL, A.; LENTZE, M. J.; ROBERFROID, M.; STROBEL, S. Growth, development and differentiation: a functional food science approach. **British Journal of Nutrition**. 80, s. 5- 45. 1998.

KONTUR, P. J.; LERANTH, C.; REDMOND, D. E. J. R; ROTH, R. H; ROBBINS, R. J. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity and monoamine and metabolite levels in cryopreserved human fetal ventral mesencephalon. **Exp. Neurol** 121, p. 172-180, 1993.

LAINE, K.; HEIKKINEN, T.; EKBLAD, U.; KERO, P. Effects of exposure to selective serotonin reuptake inhibitors during pregnancy on serotonergic symptoms in newborns and cord blood monoamine and prolactin concentrations. **Arch. Gen. Psychiatry**. 60, p. 720-726, 2003.

LAUDER, J. M. ; BLOOM, F. E. Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, raphe nuclei and substantia nigra of the rats 1, cell differentiation. **J. Comp. Neurol.** 155, p. 469-481, 1971.

LAUDER, J. M. ; KREBS, H. Effects of p – chlorophenylalanine on time of neuronal origin during embryogenesis in the rat. **Brain Res** 107, p. 638-644, 1976.

LAUDER, J. M.; LUO, X.; PERSICO, J. M. Serotonergic regulation of somatosensory cortical development: lessons from genetic mouse models. **Dev Neurosci.** 25, p. 173-183, 2003.

LAUDER, J. M.; WALLACE, J. A. ; KREBS, H. Roles for serotonin in neuroembryogenesis. **Adv Exp Med Biol.** 133, p. 477-506, 1981

LAUDER, J. M ; ZIMMERMAN, E. F. Sites of serotonin uptake in epithelia of the developing mouse palate, oral cavity and face: possible role in morphogenesis. **J. Craniofac Gen Dev Biol.** 8, p. 265-276, 1988.

LAUDER, J. M. ; WILKIE, M. B. ; WUB, C. ; SINGH, S. Expression of 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptors in the mouse embryo Int. **J. Devl Neuroscience** 18, p. 653-662, 2000.

LEVALLOIS, C.; VALENCE, C.; BALDER, P.; PRIVAT, A. Morphological and morphometric analysis of serotonin containing neurons in primary dissociated cultures of human rhombencephalon: a study of development. **Brain Res Dev Brain Res.** 99, p. 243-252, 1997.

LIAO, C. T.; TADA, I.; TAKAGI, M.; HIGASHI, Y.; ODA, M. The vascularity of the enamelorgan in the developing tooth germ of the albino mouse. **J. Osaka Dent.Univ.** 12, p.15-31, 1978.

MANHÃES DE CASTRO, R. **Etude de la participation des recepteurs centraux de la serotonine du type 5 – HT 1B dans les reactions cerebrales au stress et dans le mecanisme d' action des antidepresseurs.** 1995, 264p. Tese (doutorat), Université Pierre et Marie Curie, Paris.

MARSLAND, E. A. A histological investigation of amelogenesis in rats. I- matrix im formation. **Britsh. Dent. Journal**, 10, p. 251-261, 1951.

MATTIHSSEM, M. E.; ROMERT, P. Ultrasturcture of human enamel organ. I. External enamel epithelium, stellate reticulum and stratum intermedium. **Cell and Tissue Research** 205, p. 361-370, 1980.

MENDES-DA-SILVA, C. ; SOUZA, S. L. ; MEDEIROS, J. M. B. ; FREITAS-SILVA S. R. ; ANTUNES, D. E. C. ; CUNHA ; ADU, Ribas V. R. ; FRANÇA, M. F. S. ; NOGUEIRA , M. I. ; MANHÃES DE CASTRO, R. Neonatal treatment with fluoxetine reduces depressive behavior induced by forced swim in adult rats. **Arq Neuropsiquiatr.** 60, n.4, p. 928-931, 2002.

MICHALLANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica.** 2, ed. São Paulo: Gráfica e Editora Michalany, 1990.

MILETICH, I. ; SHARPE, P. T. Human Molecular Genetics, **Review** , vol. 12, n.1, 2003.

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

MOISEWITSCH, J. R.D. ; LAUDER, J. M. Stimulation of murine tooth development in organotypic culture by the neurotransmitter serotonin. **Arch Oral Biol.** 41, n.2, p. 161-165, 1996.

MOISEWITSCH, J. R. D.; RAYMOND, J. R.; TAMIR, H.; LAUDER, J. M. Regulation by serotonin of tooth-germ morphogenesis and gene expression in mouse mandibular explant cultures. **Arch. oral biology.** v. 43, p. 789-800, 1998.

MOLLER, S. E.; KIRK, L. ; HONOR, P. J. Relationship between plasma ratio of tryptophan to competing amino acids and the response to L-tryptophan treatment in endogenously depressed patients. **J. Affect Disord.**, n.1, p.47-59 , Mar.1980.

MORGANE, P. J. ; AUSTIN-LAFRANCE, R. J. ; BRONZINO, J. ; TONKISS, J. ; DIAZ-CINTRA, S; CINTRA, L. ; KEMPER, T. ; GALLER, J. R. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews.** 17, 91-128, 1993.

OSMAN, A.; RUCH, J. V. Réparation topographique des mitoses dans les territoires odontogènes de la machoire inférieure de l'embryon de souris. **J. Biol. Buccale.** 3, p. 117, 1975.

PANNESSE, E. Observations on the ultrastructure of the enamel organ. II- involution of the stellate reticulum. **J. Ultrastuct. Res.** 5 , p.328-342, 1961.

REITH, E. J. The ultrastructure of ameloblasts from the growing and of rats incisors. **Arch. Oral Biol.** 2, p. 253-262, 1960.

REITH, E. J. The ultrastructure of ameloblasts during matrix formation and the maturation of enamel. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, 9, p. 825-839, 1961.

REITH, E. J. The early stage of amelogenesis as observed in molar teeth of young rats. **J. Ultrastuct. Res.** 17, 503-526, 1967.

REITH, E. J. The stages of amelogenesis as observed in molar teeth of young rats. **J. Ultrastuct. Res.** 30, p. 111-151, 1970.

ROBINSON, C. ; BRIGGIS, H. D.; KIRKHAM, J. ; ATKINSON, P. J. Changes in the protein components of rat incisor enamel during tooth development. **Arch. Oral Biol.** 28, p. 993-1000, 1983.

ROSLINDO, E. B. ; SILVA, V. C. ; PERIS A. R. ; SILVERIO, K.G. Isotretinoin: action on mice tooth germs and palate. **Braz J Oral Sci.** 1, n.3, p. 121-125, 2002.

SASAKI, T. ; GARANT, P. R. An Ultrastructure study of the papillary layer and its vascular bed in the kitten enamel organ. **Anat. Rec.** 214, p. 653-364, 1986.

SHEN, W. Z ; LUO, Z. B.; ZHENG, D. R. ; YEW, D.T. Immunohistochemical studies on the development of 5 – HT (serotonin) neurons in the nuclei of the reticular formations of human fetuses. **Pediatric Neurosci.** 15, p. 291-295, 1989.

SHUEY, D. L.; SADLER, T. W.; TAMIR, H.; LAUDER, J. M. Serotonin as a regulator of morphogenesis: site specific malformations following exposure to serotonin uptake inhibitors. **Teratology**. 46, p. 367-378, 1992.

SHUEY, D. L.; SADLER, T. W.; TAMIR, H.; LAUDER, J. M. Serotonin and morphogenesis. Transient expression of serotonin uptake and binding protein during craniofacial morphogenesis in the mouse. **Anat.Embryol.** 187, p. 75-85, 1993.

SIMON, G.E.; CUNNINGHAM, M .L.; DAVIS R.L. Outcomes of prenatal antidepressant exposure. **Am J Psychiatry**. 159, p. 2055-2061, 2002.

SISCA, R. F.; PROVENZA, D.V.; FICHLSCHWEIGER, W. Ultrastructural characteristics of the human enamel organ in an early stages of development. **J. Baltimore coll. Dent. Surg.** 22, p. 8-27, 1967.

SLOTKIN, T. A. ; SEIDLER, F. J. ; WHITHMORE, W. L. Methadone inhibits serotonin and norepinephrine uptake into rat brain synaptosomes and synaptic vesicles in vitro but not in vivo. **Eur J Pharmacol**. 49, n . 4, p. 357-62, Jun 15, 1978.

SMITH, C. E. Ameloblasts: secretory and resorptive functions. **J. Dent. Res.** 58, p. 695-706, 1979.

SUNDSTROM, E.; KOLARE, S.; SOUVERBIE, F.; SAMUELSSON, E. B.; PSCHERA, H.; LUNELL, N.O; SEIGER. A. Neurochemical differentiation of human bulbospinal monoaminergic neurons during the first trimester. **Brain Res Dev Brain Res.** 75, p. 1-12, 1993.

TAKAHASHI, H.; NAKASHIMA, S.; OHAMA, E.; TAKEDA, S.; IKUTA, F. Distribution of serotonin – containing cell bodies in the brainstem of the human fetus determined with immunohistochemistry using antiserotonin serum. **Brain Dev.** 8, p. 355-356, 1986.

TECOTT, L. ; SHTRUM, S. ; JULIUS, D. Expression of a serotonin-gated ion channel in embryonic neural and nonneural tissues. **Mol. Cell neuroci.** v. 6, p. 43-55, 1995.

TEN CATE, A. R. **Oral Histology: development, structure and function.** 5. ed. St. Louis: Mosby Year book, 1998. 497p.

TOTH, G.; FEKETE, M. 5 – hydroxyndole acetic excretion in newborns, infants and children. **Acta Pediatric Hung.** 27, p. 221-226, 1986.

TURLEJSKY, K. Evolutionary ancient roles of serotonin: long-lasting regulation of activity and development. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, 56, p. 619-636, 1996.

VAINIO, S. JALKANEN, M.; THESLE, I. Syndecan and tenascin expression is induced by epithelial-mesenchymal interactions in embryonic tooth mesenchyme. **J. Cell Biol.** 108, entre [1945-1954].

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

WINICK, M; ROSSO, P.; BRASEL, J. A. Malnutrition and cellular growth in the brain: Existence of critical periods. In: **Lipids malnutrition and the developing brain**. Amsterdam-Elsevier: *CIBA* Foundation Symposium. p. 199-212, 1972

WHITAKER-AZMITIA, P. M. Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. **Brain Res Bull** .56 , n. 5, p. 479-485, 2001.

WHITAKER-AZMITIA, P. M.; AZMITIA, E. C. Autoregulation of fetal serotonergic neuronal development: role of high affinity serotonin receptors. **Neuroci.** v. 67, p. 307, 1986.