



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE SAÚDE E BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO ORTODONTIA

GABRIELA COSTA MARIN

INFLUÊNCIA DA FLUOXETINA NO MOVIMENTO ORTODÔNTICO EM RATOS

CURITIBA
2015

GABRIELA COSTA MARIN

**INFLUÊNCIA DA FLUOXETINA NO MOVIMENTO ORTODÔNTICO EM
RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Ortodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Souza Camargo.

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Trindade Grégio.

CURITIBA

2015

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Luci Eduarda Wielganczuk – CRB 9/1118

M337i
2015 Marin, Gabriela Costa
Influência da fluoxetina no movimento ortodôntico em ratos / Gabriela Costa
Marin ; orientadora: Elisa Souza Camargo ; coorientadora: Ana Maria Trindade
Grégio. – 2015.
48 f. ; il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2015

Bibliografia: p. 35-38

1. Ortodontia. 2. Fluoxetina. 3. Técnicas de movimentação dentária.
4. Reabsorção da raiz (Dentes). I. Camargo, Elisa Souza. II. Grégio, Ana Maria
Trindade. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de
Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

CDD 20. ed. – 617.643



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola Saúde e Biociências
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

TERMO DE APROVAÇÃO

GABRIELA COSTA MARIN

INFLUÊNCIA DA FLUOXETINA NO MOVIMENTO ORTODÔNTICO EM RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de **Mestre em Odontologia**, Área de Concentração em **Ortodontia**.

Orientador(a):

Prof. Dr.ª Elisa Souza Camargo
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Prof. Dr. Rui Fernando Mazur
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Prof. Dr. Cassius Carvalho Torres Pereira
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFPR

Curitiba, 14 de julho de 2015.

Dedicatória

A Deus,

Pela presença constante, pela aproximação, pelo perdão e por sempre ter me dado força para superar os obstáculos que surgem durante o caminho. A Ele minha eterna gratidão.

Aos meus pais, Natal e Vanda,

Pelo carinho e incentivo durante toda a minha vida e por nunca medir esforços para a minha educação. Obrigada pelo apoio nos momentos em que eu mais precisei. Vocês foram muito mais que alicerces para que eu conseguisse seguir em frente e concretizasse esse grande sonho.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Elisa Souza Camargo,

Por muitas vezes deixar sua família para dedicar seu tempo em me orientar durante esse trabalho. Obrigada pelos grandes ensinamentos na Ortodontia e formação pessoal, pelas palavras de incentivo e compreensão sempre que precisei e pela confiança depositada. Para mim, você é muito mais que um exemplo de profissional dedicada, o qual levarei para sempre comigo.

Agradecimentos Especiais

Aos meus irmãos, Gustavo e Guilherme por serem sempre tão amáveis, atenciosos e preocupados comigo. Espelho-me em vocês.

Ao meu namorado, Leandro, pelo amor dedicado, pelo incentivo, respeito e compreensão nos momentos mais difíceis, por me ajudar a tornar-me uma pessoa melhor e por acreditar na minha capacidade profissional. Obrigada por compartilhar os meus sonhos.

Ao Prof. Dr. Odilon Guariza Filho, pelo exemplo de alegria e entusiasmo ao nos ensinar uma Ortodontia de excelência. Obrigada por todos os conhecimentos transmitidos, pela confiança depositada e por nunca deixar que os momentos difíceis se prolongassem. O dom da docência está estampado em você.

Ao Prof. Dr. Orlando Motohiro Tanaka, pelo tempo investido e grande exemplo de dedicação na coordenação do nosso curso de Ortodontia. Admiro-o pela sua competência, incentivo e preocupação em orientar. Obrigada por todas as oportunidades que confiou a mim e contribuições na minha formação ortodôntica, profissional e pessoal, jamais esquecerei.

Agradecimentos

A Pontifícia Universidade Católica do Paraná, excelente instituição de ensino que me acolheu e concedeu a oportunidade de cursar o curso de Mestrado em Odontologia – área de concentração Ortodontia.

A CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior que conferiu a mim uma bolsa integral de estudos. Foi de fundamental importância para a realização desta pesquisa.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Prof. Dr. Sérgio Vieira, pela dedicação prestada a este programa.

Ao Senhor Cândido José Thomaz Pereira, Rafael Zoez e demais funcionários do Biotério da PUCPR.

Aos animais que doaram sua vida para o avanço da ciência.

Aos auxiliares do Laboratório da Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da PUCPR, Misael Gomes Barbosa e Álvaro Roberto Gonçalves Machado, pela dedicação e imensa colaboração destinadas à fase experimental desta pesquisa. Vocês foram imprescindíveis.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Experimental Ana Paula Martins, Marina Azevedo e Seigo Nagashima pelo esforço e competência, que foi de suma importância na realização desse trabalho.

À Profa. Dra. Ana Maria Trindade Grégio, pela co-orientação deste trabalho. Obrigada pelos preciosos conhecimentos desde o início do projeto.

À Profa. Dra. Aline Cristina Batista Rodrigues Johann, pelo tempo destinado, preocupação constante com este trabalho e por todas as excelentes considerações.

Ao Prof. Dr. Sérgio Aparecido Ignácio, por ser sempre tão querido e atencioso comigo e pela análise estatística dos dados desta dissertação. Obrigada por toda a sua dedicação com o Programa de Pós-Graduação de Odontologia dessa instituição.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Couto Souza, por ter aceitado prontamente o convite para a participação da banca de qualificação deste trabalho e pelas ótimas sugestões.

Aos alunos do programa de iniciação científica, Isteicy Cortêz Silva e Maycon Fernando da Silva Cortarelli, pela imensa ajuda dispensada neste trabalho e por serem sempre tão dedicados e solícitos. Espero que a Ortodontia tenha conquistado vocês.

Às funcionárias da clínica de Odontologia e laboratório de Ortodontia da PUCPR, em especial Maria Nilce Silva Reis e Rosana Cordeiro da Cunha por serem sempre tão prestativas com os alunos.

Aos pacientes da clínica de Ortodontia, sem os quais nada poderia ter sido aprendido e praticado com tanta sabedoria. Obrigada pela confiança.

Às secretárias Neide Reis Borges e Flávia Beuting pelo primor em realizar o seu trabalho junto ao Programa de Pós – Graduação em Odontologia da PUCPR.

Agradeço aos meus colegas da 9ª turma de Mestrado em Ortodontia da PUCPR, Ariel Adriano Reyes Pacheco, Joana Estephany Gordillo Yépez, Cyro Pellizzari II, Marlon Borges, Neblyssa Agatha Schneider, Pâmela Garcia Trannin e Renata Machado Marangon por compartilharem seus conhecimentos e por toda a ajuda nesses dois anos intensos de estudos e em especial a Adriana Cristina Rocha por me ajudar e ser sempre prestativa durante a fase experimental desse trabalho.

Ao doutorando Cristiano Miranda de Araújo, por me ensinar tão bem como lidar com os animais e pela ajuda sempre que necessário.

À Profa. Dra. Maura Scandelari Milczewski Martelli, da qual tive o prazer de ser aluna durante o aperfeiçoamento em Ortodontia Interceptativa na ABO-PR. Obrigada pela carta de recomendação, pelos ensinamentos, palavras de incentivo, por me orientar sempre tão bem e pela oportunidade de tornar-me pesquisadora em parceria com a UTFPR.

Aos meus professores de Ortodontia da UFPR, Prof. Marco Antônio Lopes Feres, pela oportunidade de estágio continuado na disciplina de Ortodontia da UFPR e pelo convite para ministrar aula na Especialização em Ortodontia da UFPR. Ao Prof. Ademir Roberto Brunetto, pela carta de recomendação e por sempre me

aconselhar a cursar um curso de excelência em Ortodontia. Obrigada por sempre me receberem tão bem.

Ao meu querido professor e tutor durante minha graduação na UFPR, Prof. Dr. Cassius Carvalho Torres Pereira, por ter despertado em mim a vontade de seguir a carreira acadêmica. Admiro-o muito.

À minha querida amiga, Alessandra Emy Hamasaki, recém Mestre em Biologia Celular e Molecular, pelos 15 anos de amizade, pelas palavras de incentivo, pelos dias e noites de estudo comigo desde a prova de seleção do Mestrado e pelo ombro amigo quando precisei. Consequimos.

À todos que participaram direta ou indiretamente desse trabalho.

*“Se pude enxergar mais longe,
foi por me erguer em ombros de gigantes.”*

Isaac Newton

SUMÁRIO

ARTIGO EM PORTUGUÊS	1
Página título	2
Resumo	3
Introdução	4
Material e Métodos	5
Resultados	9
Discussão	12
Conclusões	15
Referências	16
ARTIGO EM INGLÊS.....	19
Title page.....	20
Abstract	21
Introduction.....	22
Material and Methods	23
Results	26
Discussion	30
Conclusions.....	33
References	34
ANEXOS	37
Anexo I - Parecer do comitê de ética no uso de animais	38
Anexo II - Metodologia complementar	39
Anexo III - Análise estatística	41
Anexo IV - Normas para publicação - American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics	43

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14 **ARTIGO EM PORTUGUÊS**

PÁGINA TÍTULO

INFLUÊNCIA DA FLUOXETINA NO MOVIMENTO ORTODÔNTICO EM RATOS

Gabriela Costa Marin, CD

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil

Escola de Saúde e Biociências

Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Ortodontia

E-mail: gabrielacostamarin@gmail.com

Ana Maria Trindade Grégio, CD, PhD

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil

Escola de Saúde e Biociências

Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Estomatologia e Biociências

E-mail: ana.gregio@pucpr.br

Elisa Souza Camargo, CD, PhD

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil

Escola de Saúde e Biociências

Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Ortodontia

E-mail: escamargo@uol.com.br

Endereço para correspondência

Elisa Souza Camargo

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil

Escola de Saúde e Biociências

Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Ortodontia

Rua: Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho

CEP: 80215-901 Curitiba, Paraná, Brasil

Fone: 41 3271-1637/Fax 41 3271-1405

E-mail: escamargo@uol.com.br

RESUMO

Introdução: Avaliar a taxa de deslocamento dentário e as alterações teciduais decorrentes do uso crônico de fluoxetina no movimento ortodôntico em ratos.

Métodos: Utilizaram-se 192 ratos *Wistar*, divididos em quatro grupos: S (n=48) - solução salina a 0,9%; F (n=48) - 20mg/kg de fluoxetina; SM (n=48) - solução salina a 0,9% e movimento ortodôntico e FM (n=48) - 20mg/kg de fluoxetina e movimento ortodôntico. Após o 30º dia de aplicação das soluções, instalou-se dispositivo ortodôntico que movimentou o primeiro molar superior direito para mesial (25cN) em SM e FM. Os animais foram sacrificados 2, 7, 14 e 28 dias após a colocação dos dispositivos. Os animais dos grupos S e F não foram submetidos a movimentação ortodôntica, mas foram mortos nos mesmos intervalos de tempo. Avaliou-se a taxa de deslocamento dentário em modelos de gesso, neoformação de colágeno tipo I pelo método Picrosírius, reabsorção óssea e radicular por Fosfatase Ácida Tartarato-Resistente e presença de áreas hialinas por Hematoxilina e Eosina.

Resultados: A ação da fluoxetina não influenciou a taxa de deslocamento dentário, a porcentagem de colágeno tipo I, o número de osteoclastos e a presença de áreas hialinas ($p>0,05$). Observou-se maior frequência de áreas de reabsorção radicular no grupo FM no 2º dia comparado ao SM ($p<0,05$).

Conclusões: O uso crônico de fluoxetina 20mg/kg não interferiu no movimento dentário, na neoformação e reabsorção óssea e na presença de áreas hialinas. Aumentou a presença de reabsorção radicular.

Palavras-chave: Fluoxetina; Movimentação dentária; Reabsorção da Raiz

1 INTRODUÇÃO

2

3 Cerca de 350 milhões de pessoas no mundo sofrem de transtornos
4 depressivos.¹ A prevalência dessa doença é de 4,45% na população norte-
5 americana.² Dentre os fármacos antidepressivos, a fluoxetina, popularizada nos
6 Estados Unidos sob o nome de Prozac®, tornou-se um dos medicamentos mais
7 consumidos a partir de 2004.³ Pertencente à classe dos inibidores seletivos da
8 recaptação da serotonina (ISRS), representam um grande avanço terapêutico sobre
9 os antidepressivos tricíclicos, pela sua baixa toxicidade e boa tolerabilidade.⁴

10 Os ISRS inibem a recaptação da serotonina (5-HT) para dentro do neurônio
11 pré-sináptico no sistema nervoso central através do bloqueio do seu transportador
12 (5-HTT). Assim, em curto prazo, a administração de ISRS, como a fluoxetina, resulta
13 em níveis sistêmicos de serotonina elevados no espaço interneuronal, aliviando os
14 sintomas dos transtornos mentais como depressão, ansiedade, esquizofrenia,
15 transtornos alimentares, obsessivo-compulsivo, enxaqueca e síndrome do pânico.^{5,6}

16 A serotonina faz parte de um grupo de neurotransmissores que regulam
17 importantes vias do metabolismo ósseo.^{5,7,8} Estudos prévios identificaram a
18 presença de receptores 5-HT e de transportadores (5-HTT) em osteócitos,
19 osteoblastos e osteoclastos.^{9,10} A função destes receptores e transportadores
20 serotoninérgicos nas células ósseas não está bem estabelecida, mas sabe-se que
21 está associada à formação e remodelação óssea.^{7,8,11}

22 Estudos *in vitro*, ao analisar a influência da fluoxetina em células ósseas,
23 observaram efeitos positivos na redução da diferenciação de osteoclastos⁷ e
24 aumento da proliferação de osteoblastos.¹² No entanto, muitos estudos *in vivo*
25 indicam efeitos negativos dos ISRS na qualidade e quantidade óssea, ocasionando
26 maiores riscos de fraturas e osteoporose.^{6,9,13-16}

27 A movimentação dentária é um processo biológico ósseo-dependente e
28 ativado por forças biomecânicas que provocam alterações no tecido periodontal,
29 gerando reabsorção óssea alveolar, mediada por osteoclastos no lado de pressão, e
30 consequente aposição óssea mediada por osteoblastos no lado de tração.¹⁷ Embora
31 exista influência da fluoxetina no metabolismo ósseo e na produção de mediadores
32 inflamatórios, existem poucos estudos encontrados na literatura científica que
33 avaliaram o uso crônico de fluoxetina 10mg/kg/dia e o seu impacto sobre o
34 movimento ortodôntico.^{18,19} Até o momento, não há estudos que avaliaram as altas
35 doses de fluoxetina (20mg/kg/dia)²⁰, associada ao movimento ortodôntico.

Neste estudo, testou-se a hipótese de que a utilização da fluoxetina pode interferir no movimento ortodôntico quanto à taxa de deslocamento dentário, neoformação e reabsorção óssea, presença de reabsorção radicular e áreas de hialinização.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra

Esta pesquisa teve a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) e registrada sob parecer nº 795 (Anexo I, página 38).

Utilizaram-se 192 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) com 7 a 8 semanas de vida, pesando aproximadamente 170g, provenientes e mantidos pelo Biotério da PUCPR.

Com o objetivo de ajustar a dosagem do fármaco, os animais foram pesados no início do experimento e semanalmente até o dia da eutanásia por meio de uma balança eletrônica de precisão (Gehaka – BG 4001).

Dividiu-se os animais aleatoriamente em quatro grupos (Quadro I, página 6): S (n=48) - solução salina sem movimento ortodôntico; F (n=48) - fluoxetina sem movimento ortodôntico; SM (n=48) - solução salina com movimento ortodôntico e FM (n=48) - fluoxetina com movimento ortodôntico. Nos grupos S e SM, os animais receberam 1 ml de solução salina 0,9% via intramuscular (músculo quadríceps), diariamente. Nos grupos F e FM foram realizadas aplicações diárias de fluoxetina [20 mg/ml], na dosagem de 20 mg/Kg, diluída em propilenoglicol 53,3%, cloreto de sódio 0,9% e benzoato de sódio 0,1% (Laboratório Farmacêutico da PUCPR, Curitiba, Brasil), via intramuscular. A dosagem e a via de administração da fluoxetina foram escolhidas de acordo com estudo de Mattioli et al.,²¹ sendo compatível com altas dosagens de prescrição clínica em humanos.²⁰

Experimento

As administrações das soluções foram feitas em todos os grupos durante 30 dias para caracterizar o seu uso crônico. No 30º dia, os animais dos grupos SM e FM foram sedados com Tiletamina/Zolazepan (Zoletil, Virbac Brasil Indústria e Comércio LTDA, Jurubatuba, São Paulo, Brasil) 50 mg/kg, via intraperitoneal. Instalou-se o dispositivo ortodôntico para induzir a movimentação dentária de acordo

com o modelo utilizado por Ribeiro et al.,²² consistindo de uma mola fechada de níquel-titânio (G&H Wire, Franklin, IN), fixada no primeiro molar superior direito com fio de amarrilho inox 0,025" (Morelli, São Paulo, Brasil) e ligado aos incisivos centrais superiores, provocando o movimento mesial do primeiro molar (Fig 1 e 2, página 39). A força recíproca produzida pela mola era de 25cN,²³ padronizada através de um tensiômetro (Haag - Streit AG, Koeniz, Suíça). Para garantir maior estabilidade da mola, os incisivos inferiores foram desgastados e os incisivos superiores unidos com resina composta Charisma (Heraeus, Hanau, Alemanha) após o condicionamento com ácido fosfórico 37% (Condac 37; FGM, Joinville, SC, Brasil) e sistema adesivo (Adpter Single Bond; 3M ESPE, St Paul, Minn). Após a instalação, a mola não era reativada, no entanto, seu posicionamento foi conferido diariamente.

A administração das soluções continuou e os animais foram sacrificados por overdose anestésica (Ketamina/270mg/kg e Xilazina 30mg/kg), via intraperitoneal, em 2, 7, 14 e 28 dias após a colocação dos dispositivos. Os animais dos grupos S e F, os quais não foram submetidos a movimentação ortodôntica, foram eutanasiados nos mesmos intervalos de tempo.

Quadro I. Distribuição da amostra

192 ratos <i>Wistar</i>				
Grupos	S (n=48) (1ml solução salina 0,9%)	F (n=48) (Fluoxetina 20mg/kg)	SM (n=48) (1ml solução salina 0,9% e movimento dentário)	FM (n=48) (Fluoxetina 20mg/kg e movimento dentário)
Subgrupos/ Eutanásia	32, 37, 44 e 58 dias (n=12 por subgrupo)	32, 37, 44 e 58 dias (n=12 por subgrupo)	32, 37, 44 e 58 dias (n=12 por subgrupo)	32, 37, 44 e 58 dias (n=12 por subgrupo)

Taxa de deslocamento dentário

Os animais dos grupos SM e FM foram moldados com silicona de condensação à base de polidimetilsiloxano (Coltoflax - Vigodent Coltene SA Indústria e Comércio, Rio de Janeiro, Brasil) antes da instalação dos dispositivos ortodônticos e após a eutanásia (Fig 3, página 40). Os moldes das arcadas dentárias superiores foram vazados com gesso ortodôntico (PASOM, São Paulo, Brasil). O deslocamento dentário (Taxa de deslocamento dentário = medida final - medida inicial) foi aferido com paquímetro digital (Absolute; Mitutoyo, Kawasaki-Shi, Japão) da face palatina do incisivo central à superfície mesial do primeiro molar, ambos superiores e do lado direito, nos modelos de gesso (Fig 4, página 40).

Processamento laboratorial

As hemimaxilas direitas foram dissecadas e encaminhadas para o Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR para o processamento das lâminas histológicas. Foram obtidas 15 secções transversais a partir do terço cervical em direção apical da raiz méso-vestibular do primeiro molar superior, cortados em micrótomo com 4 µm de espessura e com intervalo de 60 µm entre cada secção. As secções foram coradas pelas técnicas Picrosírius, Fosfatase Ácida Tartarato-Resistente (TRAP) e Hematoxilina e Eosina (HE).

Análise histológica

Determinou-se a neoformação óssea por meio de microscopia de polarização Picrosírius. O osso adjacente ao ligamento periodontal (LP) na porção distal da raiz méso-vestibular foi selecionado para análise, pois durante o movimento ortodôntico, tecido ósseo é depositado na cortical alveolar no lado de tração.²⁴ Capturou-se uma imagem de cada secção transversal utilizando um microscópio de luz Olympus BX-50 (Olympus, Tóquio, Japão) e lente polarizada Olympus U-Pot (Olympus, Tóquio, Japão) acoplado à microcâmera Dinolite® AM 423X (AmMo Eletronics Corporation, New Taipei city 241, Taiwan) em magnificação de 200X. Com o auxílio do programa de morfometria Image Pro-Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD), avaliou-se a porcentagem da área de colágeno maduro e imaturo. A coloração esverdeada, com fibras menos organizadas e menos espessas indica presença de colágeno tipo III (imaturo), enquanto que a coloração avermelhada refere-se a presença de colágeno tipo I (maduro), mais organizado e com fibras mais espessas.²⁵

A coloração histoquímica TRAP foi realizada com o kit TRAP 387A (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO) seguindo as instruções do fabricante para identificar osteoclastos, bem como cementoclastos, determinando assim a reabsorção óssea e do cimento, respectivamente. Para cada uma das 5 secções, capturou-se imagens de todo o ligamento periodontal da raiz méso-vestibular do primeiro molar, utilizando o mesmo microscópio de luz e microcâmera em magnificação de 40x e 400x. Os parâmetros de aquisição da imagem foram fixados durante o processo de captura. Nas imagens com magnificação de 400x, a contagem do número de osteoclastos foi realizada com auxílio do programa Image Pro-Plus 4.5, onde foi criada uma grade para contagem. Foram considerados osteoclastos as células multinucleadas, TRAP-positivas e localizadas no ligamento periodontal adjacente ao osso alveolar.²⁶ Nas imagens com magnificação de 40x foi

1 mensurada a área do ligamento periodontal, utilizando-se a ferramenta "Create
2 polygon feature". Para a obtenção do número de osteoclastos/micrômetros
3 quadrados do LP, dividiu-se o número de osteoclastos pela área do ligamento
4 periodontal. Nas imagens com magnificação de 400x foi observada a presença de
5 áreas de reabsorção radicular, sendo considerados cementoclastos, células TRAP
6 positivas, multinucleadas em contato ou próximas às superfícies radiculares.²⁷

7 A presença de áreas de hialinização foi avaliada ao longo do ligamento
8 periodontal da raiz méso-vestibular do primeiro molar superior utilizando o mesmo
9 microscópio de luz e microcâmera em magnificação de 40x, pelo método de
10 coloração HE. As áreas de hialinização foram definidas como alterações
11 degenerativas do ligamento periodontal, homogêneas e livre de células.^{28,29}

12 A porcentagem média de colágeno tipo I e número de
13 osteoclastos/micrômetro quadrado do LP foram obtidos pela média das cinco
14 secções. A presença ou ausência de áreas hialinas e de reabsorção radicular foi
15 expressa em porcentagem.

17 **Análise Estatística**

18 A análise estatística foi realizada utilizando o SPSS 22.0 for Windows (SPSS,
19 Inc., Chicago, III) e Statistica 7 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK). (Anexo III, página 41)

20 O poder de reproducibilidade da contagem de osteoclastos, mensuração da
21 área do ligamento periodontal e hialina foi avaliado e o erro máximo de Dahlberg foi
22 de 5,94% para a variável osteoclastos, indicando que o examinador reproduziu as
23 medidas de forma confiável.^{30,31} O Teste *t* de Student revelou não haver erro
24 sistemático na contagem, ao nível de significância de 5%.

25 A verificação de normalidade e de homogeneidade de variâncias entre
26 tratamentos (grupo x tempo) foi realizada por meio do teste de normalidade de
27 Kolmogorov-Smirnov e do teste de homogeneidade de variâncias de Levene,
28 respectivamente, ambos ao nível de significância de 5%.

29 Para as variáveis contínuas, quando os testes acusaram distribuição normal,
30 ou distribuição simétrica e heterogeneidade de variâncias das variáveis segundo
31 grupo e tempo, utilizou-se ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas
32 Games-Howell para variâncias heterogêneas.

33 Para as variáveis com escala categórica dicotômica a análise de
34 independência segundo grupo, tempo e interação grupo e tempo foi realizada

empregando o teste Qui-quadrado. Quando houve dependência entre as variáveis ($p < 0,05$), foi aplicado o teste de diferença entre duas proporções.

A potência observada foi utilizada para calcular o poder dos testes com base no tamanho da amostra para aceitar a hipótese da diferença entre os valores médios das variáveis dependentes de acordo com grupo e tempo.

RESULTADOS

Taxa de deslocamento dentário

Não foi observada diferença ($p > 0,05$) avaliando a interação grupo x tempo quando comparados os grupos SM e FM (Tabela I, página 9), sendo o poder do teste de 99,45% obtido a partir do quadro de ANOVA.

Tabela I. Médias e desvios padrão na taxa de deslocamento dentário (mm) nos grupos solução salina e movimento dentário (SM) e fluoxetina e movimento dentário (FM)

Grupo/ Tempo		Comparações - Teste de Games-Howell				Potência observada
		SM (Média ± DP)	(n)	FM (Média ± DP)	SM X FM (p)	
2 dias	12	0,36 ± 0,2	10	0,4 ± 0,2	0,9999	0,9945
7 dias	11	0,5 ± 0,29	7	0,85 ± 0,12	0,0526	
14 dias	9	0,6 ± 0,28	7	0,7 ± 0,38	0,9986	
28 dias	9	1,06 ± 0,54	9	0,95 ± 0,59	0,9999	

* Nível de significância para o teste de Games-Howell: $p < 0,05$

Neoformação Óssea

Quando comparada a interação grupo x tempo, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). (Tabela II, página 10). O poder do teste foi de 99,99%.

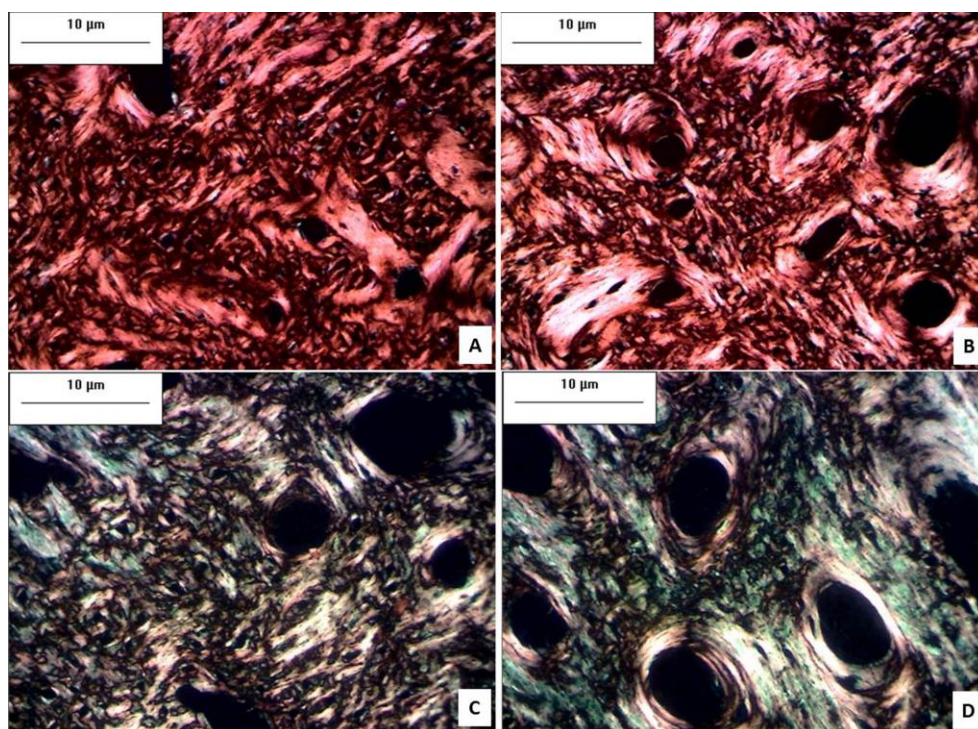


Fig 5. Fotomicrografia de lâmina com coloração Picrosírius (magnificação 200x), do lado distal do ligamento periodontal da raiz méso-vestibular do primeiro molar superior direito. Grupos S (A), F (B) com predominância de colágeno tipo I e SM (C) e FM (D) observamos substituição de colágeno tipo I por III, no 2º dia após instalação do dispositivo ortodôntico.

Reabsorção Óssea

Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) na interação grupo x tempo (Tabela II, página 10). O poder do teste foi de 99,99%.

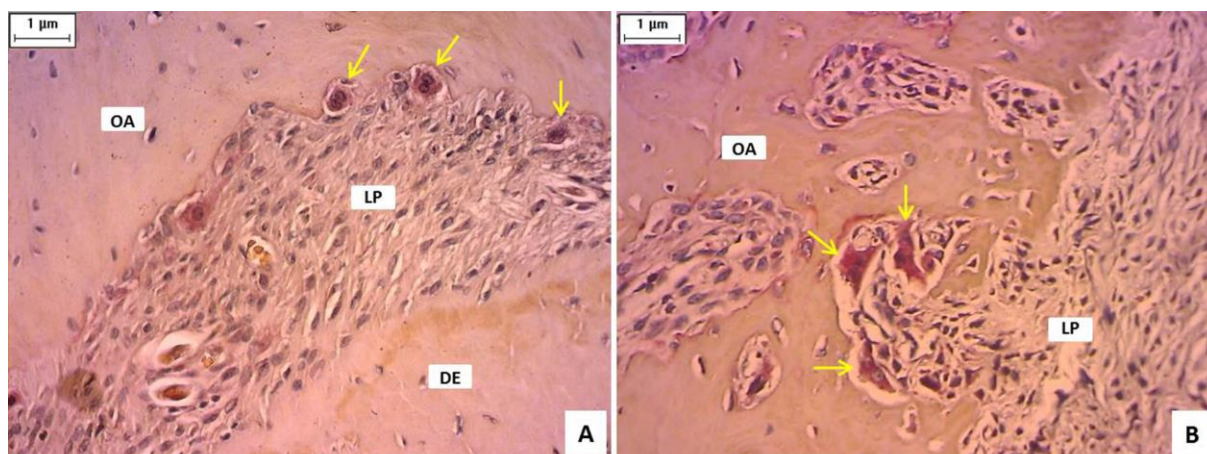


Fig 6. Fotomicrografia de lâmina com coloração TRAP (magnificação 400x), grupo SM (A) e grupo FM (B), no 28º dia após instalação do dispositivo ortodôntico. OA, osso alveolar; LP, ligamento periodontal; DE, dentina e setas amarelas indicando células TRAP positivas (osteoclastos).

Tabela II. Médias e desvios padrão do número de osteoclastos por μm^2 de LP e porcentagem do colágeno tipo I nos grupos solução salina (S), fluoxetina (F), solução salina e movimento dentário (SM) e fluoxetina e movimento dentário (FM)

Grupo/ Variáveis	Comparações - Teste de Games-Howell						
	S (Média ± DP)	F (Média ± DP)	SM (Média ± DP)	FM (Média ± DP)	S X F (p)	SM X FM (p)	Potência observada
% colágeno tipo I							
2 dias	94,18 ± 2,77	92,79 ± 5,1	64,24 ± 19,07	71,96 ± 14,39	0,9999	0,9986	0,9999
7 dias	92,38 ± 3,99	93,53 ± 3,58	98,57 ± 0,37	98,65 ± 0,76	1,0000	1,0000	
14 dias	95,53 ± 2,5	92,86 ± 3,58	97,91 ± 1,03	97,51 ± 1,97	0,8323	1,0000	
28 dias	30,86 ± 11,11	21,6 ± 11,84	20,75 ± 8,69	7,82 ± 5,72	0,8693	0,0922	
Nº de osteoclastos por µm² de LP							
2 dias	0,09 ± 0,04	0,06 ± 0,02	0,17 ± 0,08	0,17 ± 0,06	0,6327	1,0000	0,9999
7 dias	0,10 ± 0,03	0,10 ± 0,03	0,11 ± 0,03	0,11 ± 0,06	1,0000	1,0000	
14 dias	0,11 ± 0,04	0,16 ± 0,09	0,11 ± 0,05	0,15 ± 0,05	0,8505	0,9461	
28 dias	0,12 ± 0,05	0,17 ± 0,05	0,07 ± 0,03	0,16 ± 0,08	0,4292	0,2996	

* Nível de significância para o teste de Games-Howell: $p < 0,05$

Reabsorção radicular

Verificou-se presença de reabsorção radicular em todos os tempos nos grupos que receberam movimentação ortodôntica, exceto no grupo SM no 2º dia (Tabela III, página 12; Fig 7, página 11). Houve diferença estatisticamente significativa no 2º dia quando comparada a interação grupo x tempo ($p < 0,05$), havendo presença de reabsorção radicular apenas no grupo FM. Não foram observadas áreas de reabsorção radicular nos grupos S e F.

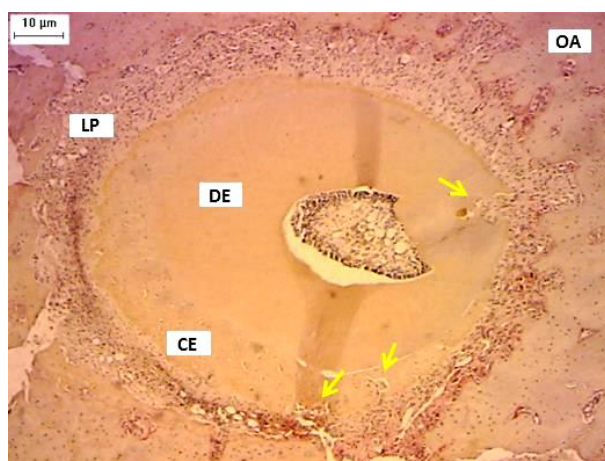


Fig 7. Fotomicrografia de lâmina com coloração TRAP, grupo FM no 2º dia após instalação do dispositivo ortodôntico. Magnificação 40x. OA, osso alveolar; LP, ligamento periodontal; DE, dentina; CE, cemento e setas amarelas indicando áreas de reabsorção radicular.

Área Hialina

Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparada a interação grupo x tempo ($p > 0,05$), havendo presença de área hialina apenas nos

grupos SM e FM nos 2º e 7º dias (Tabela III, página 12; Fig 8, página 11). Não foram observadas áreas de hialinização nos grupos S e F.



Fig 8. Fotomicrografia de lâmina com coloração HE (magnificação 40x), grupo FM no 2º dia após instalação do dispositivo ortodôntico. OA, osso alveolar; LP, ligamento periodontal; DE, dentina e AH, área de hialinização.

Tabela III. Frequência das variáveis reabsorção radicular e área hialina (%) nos grupos solução salina e movimento dentário (SM) e fluoxetina e movimento dentário (FM)

Grupo/ Variáveis	SM		FM		Teste de diferença entre duas proporções SM X FM (p)
	(n)	(%)	(n)	(%)	
Reabsorção radicular					
2 dias	12	0,0	10	50,0	0,0053
7 dias	11	36,4	7	57,1	0,3889
14 dias	9	44,4	7	14,3	0,1975
28 dias	9	44,4	9	22,2	0,3177
Área hialina					
2 dias	12	25,0	10	30,0	0,7932
7 dias	11	9,1	7	28,6	0,2794
14 dias	9	0,0	7	0,0	1,0000
28 dias	9	0,0	9	0,0	1,0000

*Nível de significância para o Teste de diferença entre duas proporções: $p < 0,05$

DISCUSSÃO

Dentre os fármacos mais utilizados no tratamento dos transtornos mentais, está a fluoxetina, principalmente em adultos mais jovens.⁴ Utilizou-se a dose de 20mg/kg/dia em ratos *Wistar* de 7-8 semanas de vida por resultar em níveis séricos compatíveis com os mais altos encontrados em adolescentes e adultos tratados com 40 a 80mg/dia.^{4,20,21} Evidências crescentes apontam o uso da fluoxetina em concentrações que vão de 5mg a 20mg/kg, por gavagem, aplicadas via intramuscular ou intraperitoneal e em períodos que vão de 4 a 24 semanas e suas alterações sobre o desenvolvimento de tecidos mineralizados em ratos.¹⁵

Na literatura científica ainda não há relato de estudos que avaliaram o deslocamento dentário em associação com o uso da fluoxetina 20mg/kg/dia em ratos. Os resultados do presente estudo (Tabela I) demonstraram que o medicamento utilizado não afetou a taxa de movimento ortodôntico em concordância com o estudo de Frigotto et al¹⁸ e Rafiei et al¹⁹, nos quais utilizaram fluoxetina 10mg/kg.

O colágeno tipo I, sintetizado e secretado pelos osteoblastos, compõe cerca de 95% da matriz orgânica do osso.³² Durante a reabsorção óssea, este colágeno é degradado, e no processo de reparo das fibras imaturas, o colágeno tipo III é depositado. Warden et al^{6,9,14} ao avaliarem o efeito da fluoxetina 20mg/kg no metabolismo ósseo observaram redução da atividade osteoblástica e menor formação óssea, além de menor densidade mineral óssea por meio de microscopia de fluorescência e análise histomorfométrica em diversos sítios esqueléticos. Bonnet et al¹⁶, através de método imunoenzimático – ELISA, observaram que doses de 10mg/kg de fluoxetina diminuem os níveis de osteocalcina, um marcador de formação óssea. Contudo, o efeito da fluoxetina no osso pode ser influenciado pela genética, uma vez que existem relatos de diferentes respostas desses animais às vias de atuação desses antidepressivos.³³ Nossos resultados (Tabela II) corroboram com os de Westbroek et al¹³, que também não verificaram alterações na deposição de matriz óssea no fêmur de ratos *Sprague-Dawley* aplicando fluoxetina 5mg/kg por gavagem, e com os de Frigotto et al¹⁸ e Rafiei et al¹⁹, que aplicaram fluoxetina 10mg/kg via intraperitoneal. Dessa forma, podemos sugerir que a fluoxetina não influenciou no processo de deposição de fibras colágenas no tecido ósseo.

O metabolismo ósseo, sob efeito da fluoxetina, não foi completamente elucidado.^{7,8,11,12} A maioria das evidências *in vivo*, indicam que a fluoxetina pode promover efeitos negativos no osso pelo aumento do número de osteoclastos^{6,15,16}, diminuição da densidade mineral óssea levando ao aumento do risco de fraturas^{6,9,14,15} e também menor volume ósseo trabecular e menor espessura das trabéculas, indicativo de baixa qualidade óssea.¹⁶ Existe relato na literatura de que a administração desse fármaco é dose-dependente, ou seja doses menores produzem efeitos negativos de menor intensidade porém, o tempo máximo de aplicação utilizado foi de 4 semanas.⁶ Contrastando com esses resultados, efeitos positivos foram observados por Battaglini et al³³ como aumento do volume ósseo trabecular e maior formação óssea em ratos sob o uso crônico de fluoxetina 10mg/kg, porém após a ovariectomia a fluoxetina não protegeu contra a perda óssea. Para Mortazavi

et al³⁴, efeitos positivos foram vistos em calvárias de ratos em que a administração de fluoxetina 15mg/kg provocou aumento do volume ósseo trabecular. Branco-de-Almeida et al³⁵, ao induzirem doença periodontal em ratos tratados com fluoxetina 20mg/kg observaram na análise por PCR que a fluoxetina suprimiu respostas pró-inflamatórias e protegeu contra a reabsorção óssea.

No presente estudo, observou-se que a administração de fluoxetina 20mg/kg associada ou não ao movimento ortodôntico não influenciou no processo de reabsorção óssea (Tabela II). Estas alterações sugerem que a fluoxetina não influenciou na atividade osteoclástica, em concordância com Westbroek et al.¹³ Em estudo associando fluoxetina 10mg/kg e movimento ortodontico, Frigotto et al¹⁸, não observaram alterações significantes no processo de reabsorção óssea e também não verificaram alterações na microarquitetura do osso trabecular. Tantos resultados conflitantes podem ser explicados em parte pelo fato de existirem outros mecanismos de bloqueio para 5-HTT,³⁶⁻³⁸ ou acumulação elevada de fluoxetina na medula óssea e sua interferência a longo prazo, diferenças genéticas e o tipo de osso estudado.¹⁵

Observou-se, no presente estudo, presença de áreas hialinas nos 2º e 7º dias de movimentação ortodôntica, independente da solução administrada, no entanto não houve diferença estatisticamente significante entres estes grupos (Tabela III). Conforme o trabalho de Hamaya et al,³⁹ que avaliaram o movimento ortodôntico sem administração de fármacos, após o 7º dia as áreas hialinas também diminuíram. Normalmente, quando há presença de áreas hialinas, a manifestação ocorre de 1 a 2 dias após o início da movimentação ortodôntica e desde que a força aplicada não seja reativada, a tendência é de reparação tecidual na região e tendem a cessar após o 7º dia.³⁹

Reabsorção radicular foi observada nos grupos SM e FM em todos os intervalos de tempo, exceto no 2º dia para SM (Tabela III). Esta alteração é comumente presente durante o tratamento ortodôntico e está associada à aplicação de forças de alta magnitude.²⁸ Em nosso estudo observou-se maior presença de áreas de reabsorção radicular no grupo FM no 2º dia de movimento ortodôntico, possivelmente causada pela fluoxetina. Rafiei et al¹⁹, observaram menor presença de áreas de reabsorção radicular externa no grupo controle que recebeu fluoxetina 10mg/kg, no entanto, a força aplicada foi de 50g/f, a administração da fluoxetina era apenas 5 dias na semana e não foi considerada estaticamente significante.

Não foram observadas áreas de hialinização e de reabsorção radicular nos grupos S e F, o que era esperado, visto que os grupos não foram submetidos a aplicação de forças para que ocorressem esses eventos. Apenas a administração da fluoxetina não foi capaz de causar áreas hialinas e de reabsorção radicular.

O efeito da fluoxetina sobre o metabolismo ósseo ainda é controverso, no entanto, evidências crescentes sugerem o aumento do risco de fraturas ósseas em pacientes que tomam ISRS.¹⁶ Diferenças nas concentrações das dosagens, via e tempo de administração do fármaco, linhagem, idade, peso e fatores genéticos dos animais e diferentes metodologias podem ser uma das explicações para estas divergências nos resultados da literatura. Também no presente estudo algumas limitações puderam ser observadas como a perda de peso e morte dos animais que eram tratados com fluoxetina e dificuldades técnicas relacionadas à manutenção da estabilidade dos dispositivos ortodônticos, o que levou a perda de alguns animais da amostra.

Mais investigações são necessárias para compreender os mecanismos de ação exatos da serotonina e dos ISRS, pois estes podem produzir efeitos antagônicos e parecem atuar por vias distintas, entretanto, no presente estudo foi observado que a fluoxetina 20mg/kg associada ao tratamento ortodôntico pode levar ao aumento do processo de reabsorção radicular. Dessa forma, podemos inferir que ao aplicar uma mecânica ortodôntica em indivíduos que fazem o uso deste fármaco deve-se ter cuidado, pois pode oferecer riscos à integridade das raízes dos dentes.

CONCLUSÕES

O uso crônico de fluoxetina 20mg/kg não interferiu no movimento dentário, na neoformação e reabsorção óssea e na presença de áreas hialinas. Causou maior frequência de reabsorção radicular no início da movimentação ortodôntica.

Agradecemos a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior), pela concessão de bolsa de estudo ao pesquisador, a qual contribuiu para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Smith K. Mental health: a world of depression. *Nature* 2014;515:181.
2. Ferrari AJ, Charlson FJ, Norman RE, Patten SB, Freedman G, Murray CJ et al. Burden of depressive disorders by country, sex, age, and year: findings from the global burden of disease study 2010. *PLoS Med* 2013;10:e1001547.
3. Machado LV, Ferreira RR. A indústria farmacêutica e psicanálise diante da "epidemia de depressão": respostas possíveis. *Psicologia em Estudo* 2014;19:135-144.
4. Gourion D, Perrin E, Quintin P. [Fluoxetine: an update of its use in major depressive disorder in adults]. *Encephale* 2004;30:392-399.
5. Galli C, Macaluso G, Passeri G. Serotonin: a novel bone mass controller may have implications for alveolar bone. *J Negat Results Biomed* 2013;12:12.
6. Warden SJ, Nelson IR, Fuchs RK, Bliziotes MM, Turner CH. Serotonin (5-hydroxytryptamine) transporter inhibition causes bone loss in adult mice independently of estrogen deficiency. *Menopause* 2008;15:1176-1183.
7. Battaglini R, Fu J, Spate U, Ersoy U, Joe M, Sedaghat L et al. Serotonin regulates osteoclast differentiation through its transporter. *J Bone Miner Res* 2004;19:1420-1431.
8. Bliziotes M, Eshleman A, Burt-Pichat B, Zhang XW, Hashimoto J, Wiren K et al. Serotonin transporter and receptor expression in osteocytic MLO-Y4 cells. *Bone* 2006;39:1313-1321.
9. Warden SJ, Robling AG, Sanders MS, Bliziotes MM, Turner CH. Inhibition of the serotonin (5-hydroxytryptamine) transporter reduces bone accrual during growth. *Endocrinology* 2005;146:685-693.
10. Hodge JM, Wang Y, Berk M, Collier FM, Fernandes TJ, Constable MJ et al. Selective serotonin reuptake inhibitors inhibit human osteoclast and osteoblast formation and function. *Biol Psychiatry* 2013;74:32-39.
11. Bliziotes MM, Eshleman AJ, Zhang XW, Wiren KM. Neurotransmitter action in osteoblasts: expression of a functional system for serotonin receptor activation and reuptake. *Bone* 2001;29:477-486.
12. Gustafsson BI, Thommesen L, Stunes AK, Tommeras K, Westbroek I, Waldum HL et al. Serotonin and fluoxetine modulate bone cell function in vitro. *J Cell Biochem* 2006;98:139-151.

- 1 13. Westbroek I, Waarsing JH, van Leeuwen JP, Waldum H, Reseland JE, Weinans
2 H et al. Long-term fluoxetine administration does not result in major changes in bone
3 architecture and strength in growing rats. *J Cell Biochem* 2007;101:360-368.
- 4 14. Warden SJ, Hassett SM, Bond JL, Rydberg J, Grogg JD, Hilles EL et al.
5 Psychotropic drugs have contrasting skeletal effects that are independent of their
6 effects on physical activity levels. *Bone* 2010;46:985-992.
- 7 15. Tsapakis EM, Gamie Z, Tran GT, Adshead S, Lampard A, Mantalaris A et al. The
8 adverse skeletal effects of selective serotonin reuptake inhibitors. *Eur Psychiatry*
9 2012;27:156-169.
- 10 16. Bonnet N, Bernard P, Beaupied H, Bizot JC, Trovero F, Courteix D et al. Various
11 effects of antidepressant drugs on bone microarchitecture, mechanical properties
12 and bone remodeling. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;221:111-118.
- 13 17. Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to
14 orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;129:469 e461-432.
- 15 18. Frigotto GCF, Araujo CM, Guariza-Filho O, Tanaka OM, Johann ACBR, Camargo
16 ES. Effect of fluoxetine on induced tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial*
17 *Orthop* 2015;148:450-456.
- 18 19. Rafiei M, Sadeghian S, Torabinia N, Hajhashemi V. Systemic effects of fluoxetine
19 on the amount of tooth movement, root resorption, and alveolar bone remodeling
20 during orthodontic force application in rat. *Dent Res J (Isfahan)* 2015;12:482-487.
- 21 20. Koran LM, Cain JW, Dominguez RA, Rush AJ, Thiemann S. Are fluoxetine
22 plasma levels related to outcome in obsessive-compulsive disorder? *Am J Psychiatry*
23 1996;153:1450-1454.
- 24 21. Mattioli TM, Silva S, Gregio AM, Machado MA, Lima AA, Alanis LR. The effects of
25 antidepressants and pilocarpine on rat parotid glands: an immunohistochemical
26 study. *Clinics (Sao Paulo)* 2011;66:1605-1610.
- 27 22. Ribeiro JS, Maciel JV, Knop LA, Machado MA, Gregio AM, Camargo ES. Effect
28 of growth hormone in experimental tooth movement. *Braz Dent J* 2013;24:503-507.
- 29 23. Verna C, Dalstra M, Melsen B. The rate and the type of orthodontic tooth
30 movement is influenced by bone turnover in a rat model. *Eur J Orthod* 2000;22:343-
31 352.
- 32 24. Retamoso L, Knop L, Shintcovsk R, Maciel JV, Machado MA, Tanaka O.
33 Influence of anti-inflammatory administration in collagen maturation process during
34 orthodontic tooth movement. *Microsc Res Tech* 2011;74:709-713.

- 1 25. Borges LF, Gutierrez PS, Marana HR, Taboga SR. Picrosirius-polarization
2 staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in
3 vesical prolapse lesions. *Micron* 2007;38:580-583.
- 4 26. Marquezan M, Bolognese AM, Araujo MT. Effects of two low-intensity laser
5 therapy protocols on experimental tooth movement. *Photomed Laser Surg*
6 2010;28:757-762.
- 7 27. Saygin NE, Giannobile WV, Somerman MJ. Molecular and cell biology of
8 cementum. *Periodontol* 2000 2000;24:73-98.
- 9 28. Tomizuka R, Shimizu Y, Kanetaka H, Suzuki A, Urayama S, Kikuchi M et al.
10 Histological evaluation of the effects of initially light and gradually increasing force on
11 orthodontic tooth movement. *Angle Orthod* 2007;77:410-416.
- 12 29. Miyoshi K, Igarashi K, Saeki S, Shinoda H, Mitani H. Tooth movement and
13 changes in periodontal tissue in response to orthodontic force in rats vary depending
14 on the time of day the force is applied. *Eur J Orthod* 2001;23:329-338.
- 15 30. Midtgard J, Bjork G, Linder-Aronson S. Reproducibility of cephalometric
16 landmarks and errors of measurements of cephalometric cranial distances. *Angle*
17 *Orthod* 1974;44:56-61.
- 18 31. Houston WJ. The analysis of errors in orthodontic measurements. *Am J Orthod*
19 1983;83:382-390.
- 20 32. Stange R, Kronenberg D, Timmen M, Everding J, Hidding H, Eckes B et al. Age-
21 related bone deterioration is diminished by disrupted collagen sensing in integrin
22 $\alpha 2\beta 1$ deficient mice. *Bone* 2013;56:48-54.
- 23 33. Battaglini R, Vokes M, Schulze-Spate U, Sharma A, Graves D, Kohler T et al.
24 Fluoxetine treatment increases trabecular bone formation in mice. *J Cell Biochem*
25 2007;100:1387-1394.
- 26 34. Mortazavi SH, Khojasteh A, Vaziri H, Khoshzaban A, Roudsari MV, Razavi SH.
27 The effect of fluoxetine on bone regeneration in rat calvarial bone defects. *Oral Surg*
28 *Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108:22-27.
- 29 35. Branco-de-Almeida LS, Franco GC, Castro ML, Dos Santos JG, Anbinder AL,
30 Cortelli SC et al. Fluoxetine inhibits inflammatory response and bone loss in a rat
31 model of ligature-induced periodontitis. *J Periodontol* 2012;83:664-671.
- 32 36. Garcia-Colunga J, Awad JN, Miledi R. Blockage of muscle and neuronal nicotinic
33 acetylcholine receptors by fluoxetine (Prozac). *Proc Natl Acad Sci U S A*
34 1997;94:2041-2044.

- 1 37. Maggi L, Palma E, Miledi R, Eusebi F. Effects of fluoxetine on wild and mutant
2 neuronal alpha 7 nicotinic receptors. *Mol Psychiatry* 1998;3:350-355.
- 3 38. Bliziotis M. Update in serotonin and bone. *J Clin Endocrinol Metab*
4 2010;95:4124-4132.
- 5 39. Hamaya M, Mizoguchi I, Sakakura Y, Yajima T, Abiko Y. Cell death of osteocytes
6 occurs in rat alveolar bone during experimental tooth movement. *Calcif Tissue Int*
7 2002;70:117-126.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

ARTIGO EM INGLÊS

TITLE PAGE

**THE INFLUENCE OF FLUOXETINE ON ORTHODONTIC TOOTH
MOVEMENT IN RATS**

Gabriela Costa Marin, DDS, MSD

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil

School of Health and Biosciences

Graduate Program in Dentistry - Orthodontics

Email : gabrielacostamarin@gmail.com

Ana Maria Trindade Grégio, DDS, MSD, PhD

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil.

School of Health and Biosciences

Graduate Program in Dentistry – Biosciences and Stomatology

Email: ana.gregio@pucpr.br

Elisa Souza Camargo, DDS, MSD, PhD

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil

School of Health and Biosciences

Graduate Program in Dentistry - Orthodontics

Email : escamargo@uol.com.br

Corresponding author

Elisa Souza Camargo

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil

School of Health and Biosciences

Graduate Program in Dentistry - Orthodontics

Adress: Rua Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho

80215-901 Curitiba, Paraná, Brazil

Fone: 55 41 3271-1637/Fax 55 41 3271-1405

Email: escamargo@uol.com.br

ABSTRACT

Introduction: To evaluate the rate of orthodontic tooth movement and the tissue changes caused by chronic use of fluoxetine in rats. **Methods:** We divided 192 Wistar rats in groups: S (n = 48), 0.9% saline solution; F (n = 48), 20 mg/kg of fluoxetine; SM (n = 48), 0.9% saline solution with orthodontic movement; and FM (n = 48), 20 mg/kg of fluoxetine with orthodontic movement. After 30 days of daily saline or fluoxetine administration, an orthodontic device (25cN) was used to displace the first molar mesially in groups SM and the FM. The animals were killed 2, 7, 14 and 28 days after placement of the orthodontic appliances. The animals in groups S and F were killed at the same time. We evaluated the tooth movement rate in gypsum castings, the collagen neoformation rate by polarization microscopy, bone and root resorption using tartrate-resistant acid phosphatase, and presence of hyalinized areas by hematoxylin–eosin staining. **Results:** We found that fluoxetine did not affect the tooth displacement rate, the percentage of type I collagen, the number of osteoclasts, and the presence of hyalinized areas ($P>0.05$). However, we did see a higher frequency of root resorption areas in the FM group than in the SM group on the second day ($P<0.05$). **Conclusions:** Chronic use of fluoxetine 20 mg/kg does not affect tooth movement, collagen neoformation, bone resorption, or the presence of hyalinized areas. However, it does increase root resorption.

1 INTRODUCTION

2
3 About 350 million people worldwide suffer from depressive disorders,¹ with a
4 prevalence of 4.45% in the North American population alone.² In terms of treatment,
5 the antidepressant fluoxetine, popularized in the United States under the name of
6 Prozac®, became one of the most consumed drugs from 2004 onward.³ Belonging to
7 the class of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), fluoxetine represents a
8 major therapeutic advance over tricyclic antidepressants, due to its low toxicity and
9 good tolerability.⁴

10 SSRIs inhibit the reuptake of serotonin (5-HT) by the presynaptic neuron in the
11 central nervous system by blocking its transporter (5-HTT). Thus, in the short-term,
12 SSRIs, such as fluoxetine, result in high systemic levels of serotonin in the
13 interneuronal space, which relieves the symptoms of mental disorders, including
14 depression, anxiety, schizophrenia, eating disorders, obsessive-compulsive disorder,
15 migraine, and panic disorder.^{5,6}

16 Serotonin is also one of a group of neurotransmitters that regulate important
17 pathways of bone metabolism.^{5,7,8} Previous studies have identified the presence of
18 serotonin receptors and 5-HTT in osteocytes, osteoblasts, and osteoclasts.^{9,10} The
19 function of these receptors and serotonin transporters in bone cells is not well
20 established, but it is known to be associated with bone formation and
21 remodeling.^{7,8,11}

22 Using in vitro studies, to analyze the influence of fluoxetine on bone cells, it
23 was observed that fluoxetine positively affects bone quality and quantity by reducing
24 osteoclast differentiation⁷ and increasing osteoblast proliferation.¹² However, many in
25 vivo studies have indicated adverse effects of SSRIs on bone quality and quantity,
26 causing higher risk of both fractures and osteoporosis.^{6,10,13-16}

27 The tooth movement is a bone-dependent biological and biomechanical
28 process enabled by causing changes in the periodontal tissue, which involve alveolar
29 bone resorption mediated by osteoclasts on the pressure side, and subsequent bone
30 apposition mediated by osteoblasts on the side where the traction is applied.¹⁷
31 Although there is some evidence of fluoxetine's influence on bone metabolism and
32 the production of inflammatory mediators, there are few studies in the scientific
33 literature that evaluated the chronic use of fluoxetine 10mg/kg/day and its impact on
34 tooth movement.^{18,19} Until now, we have found no studies evaluating high doses of
35 fluoxetine (20mg/kg/day)²⁰ associate the orthodontic movement.

We tested the hypothesis that the use of fluoxetine can interfere with orthodontic tooth movement and the rates of bone resorption and formation, as well as the presence of areas of root resorption and hyalinization.

MATERIAL AND METHODS

Sample

This research was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) and registered under protocol number 795. We used 192 Wistar rats (*Rattus norvegicus* albinos) aged 7 to 8 weeks, weighing approximately 170 g, and housed at the university's animal facility. In order to adjust the drug dose, the animals were weighed at the beginning of the experiment, and weekly thereafter (until euthanasia) using an electronic precision scale (Gehaka-BG 4001, São Paulo, Brazil).

Animals were randomly divided into 4 groups: S (n = 48), saline solution without orthodontic movement; F (n = 48): fluoxetine without orthodontic movement; SM (n = 48), saline solution with orthodontic movement; and FM (n = 48), fluoxetine with orthodontic movement. In the S and the SM groups, the animals received 1 ml of 0.9% saline solution intramuscularly (quadriceps) daily, and in the F and the FM groups, daily intramuscular applications of fluoxetine at a dose of 20 mg/kg diluted in 53.3% propylene glycol, 0.9% sodium chloride, and 0.1% sodium benzoate (Pharmaceutical Laboratory of PUCPR, Curitiba, Brazil). The dosage and route of fluoxetine administration were chosen according the guidelines, set forth by Mattioli et al.,²¹ as being compatible with the high dosages in human clinical prescriptions.²⁰

Experiment

The solutions were administered daily in all groups for 30 days, in order to characterize chronic use. On the 30th day, the animals in the SM and the FM groups were sedated with an intraperitoneal injection of 50 mg/kg of tiletamine/zolazepam (Zoletil®; Virbac Brasil Indústria e Comércio Ltda., Jurubatuba, São Paulo, Brazil). We then installed a device for inducing orthodontic tooth movement, according to the model used by Ribeiro et al.,²² consisting of a closed-spring nickel-titanium (G&H Wire, Franklin, IN) attached to the first upper right molar with a 0.010" stainless steel ligature wire (Morelli, São Paulo, Brazil) and connected to the upper central incisors, causing the molar mesial movement. Mutual force produced by the spring was 25 cN,²³ standardized through a tensiometer (Haag-Streit AG, Koeniz, Switzerland). To

ensure greater spring stability, the lower incisors were worn down and the upper incisors bonded together with the composite resin Charisma (Heraeus, Hanau, Germany) after conditioning with 37% phosphoric acid (Condac 37; FGM, Joinville, Brazil) and adhesive system (Adpter Single Bond; 3M ESPE, St Paul, Minn). After installation, the spring was not reactivated; however, its position was checked daily.

The administration of solutions continued until the animals were euthanized by intraperitoneal injection of ketamine 270 mg/kg and xylazine 30 mg/kg, 2, 7, 14 and 28 days after placement of the orthodontic appliances. The animals belonging to groups S and F were sacrificed after 32, 37, 44 and 58 days of the start of drug administration.

Tooth movement rate analysis

The upper dental arches of the animals in the SM and the FM groups were molded with condensation silicone (Coltoflax–Vigodent; COLTÈNE SA Indústria e Comércio, Rio de Janeiro, Brazil), both before installation of the orthodontic devices and after euthanasia. The molds of the upper dental arches were poured with orthodontic plaster (PASOM, São Paulo, Brazil). The tooth displacement (final measure minus initial measure) was measured using a digital caliper (Absolute; Mitutoyo, Kawasaki-Shi, Japan), from the palatal face of the central incisor to the mesial surface of the first molar, both on the upper and the right side in the gypsum castings.

Laboratory processing

The right maxillaries were dissected and forwarded to the Experimental Pathology Laboratory of the PUCPR for processing of the histological slides. We obtained 15 cross-sections from the cervical third in the apical direction of the mesiobuccal maxillary first molar root, which were cut into 4 µm thick, with intervals of 60 µm between each section. The sections were stained using picosirius red, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), and hematoxylin-eosin (HE).

Histological analysis

Bone formation was determined using picosirius red polarization microscopy. The adjacent bone to the periodontal ligament (PDL) in the distal portion of the mesiobuccal root was selected for analysis, because during orthodontic movement, bone is deposited in the alveolar cortical on the traction side.²⁴ An image of each

cross section was captured using an Olympus BX-50 light microscope (Olympus, Tokyo, Japan), and an Olympus U-Pot polarized lens (Olympus) coupled to a Dinolite® AM 423X micro-camera (AmMo Electronics Corporation, New Taipei City, Taiwan) at 200X magnification. With the help of the morphometry program in the Image Pro-Plus 4.5 software (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD), we evaluated the percentage of mature and immature collagen areas. Green less organized and thinner fibers indicated the presence of collagen type III (immature), while red referred to the presence of type I collagen (mature), with more organized and thicker fibers.²⁵

The TRAP staining was performed using the TRAP 387A kit (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) following the manufacturer's instructions for identifying osteoclasts and cementoclasts, thus determining bone and cementum resorption, respectively. For each of the 5 sections, we captured images from around the periodontal ligament of the mesiobuccal root of the first molar, using the same microscope and micro-camera as above with a magnification of 40x and 400x. The image acquisition parameters were set during the capture process. For the images with 400x magnification, the osteoclast number count was performed using the Image Pro-Plus 4.5 program, which created a grid to score. The osteoclasts were considered as multinuclear TRAP-positive cells, located in the periodontal ligament adjacent to the alveolar bone.²⁶ In the images with a magnification of 40x, we measured the area of the periodontal ligament, using the "create polygon feature" tool. To obtain the number of osteoclasts per square micrometers PDL, we divided the number of osteoclasts by the periodontal ligament area. For the images with magnifications of 400x, we observed the presence of root resorption areas considering to be cementoclasts, TRAP-positive multinucleated cells in contact or close-to radicular surfaces.²⁷

The presence of hyalinization areas was evaluated along the periodontal ligament of the mesiobuccal maxillary first molar root, using the same microscope and miniature camera at 40x magnification and the HE staining method. Areas of hyalinization were defined as degenerative changes in the periodontal ligament, homogeneous and free of cells.^{28,29}

The mean percentage of type I collagen and the number of osteoclasts per square micrometer PDL were obtained by averaging the 5 sections. The presence or absence of hyalinized areas and root resorption was expressed as a percentage.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS 22.0 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, Ill) and Statistica 7 (Statsoft, Inc., Tulsa, Okla).

We assessed the power reproducibility of the osteoclast counts, the measurements of the periodontal ligament, and the hyalinized area. The maximum error Dahlberg was 5.94% for the osteoclasts variable, indicating that the reproduced examiner measures were compatible.^{30,31} The Student *t* test revealed no systematic error in the counts, at a significance level of 5%.

Verification of normality and homogeneity of variance between the treatments (group x time) was performed using the Kolmogorov-Smirnov normality test and the Levene variance homogeneity test, respectively, both of which showed significance levels of 5%.

For continuous variables, when the tests have accrued normal distribution, or for symmetrical distribution and heterogeneity of variances of variables by group and time, we used analysis of variance (ANOVA) followed by the Games-Howell multiple comparisons test for heterogeneous variances. For variables with dichotomous categorical scales, a second group consisting of independence of analysis, time and group interaction, and time was performed using the chi-square test. When there was dependence between variables ($P < 0.05$), the difference test was applied between the 2 proportions.

The observed power was used to calculate the power of tests based on the sample size to accept the possibility of the difference between the average values of the dependent variables, according to group and time.

RESULTS

Tooth movement rate analysis

In comparing the SM and the FM groups, there was no statistically significant difference ($P > 0.05$) found when evaluating the interaction group x time (Table I). The power of 99.45% was obtained from the test-frame ANOVA.

Table I. Means and standard deviations of the tooth displacement rate (mm) in saline with tooth movement group (SM) and fluoxetine with tooth movement group (FM)

Group/ Time		Comparisons - Games-Howell Test				Power test
		SM (mean $\pm$ SD)	(n)	FM (mean $\pm$ SD)	SM X FM (p)	
2 days	12	0.36 $\pm$ 0.2	10	0.4 $\pm$ 0.2	0.9999	0.9945
7 days	11	0.5 $\pm$ 0.29	7	0.85 $\pm$ 0.12	0.0526	
14 days	9	0.6 $\pm$ 0.28	7	0.7 $\pm$ 0.38	0.9986	
28 days	9	1.06 $\pm$ 0.54	9	0.95 $\pm$ 0.59	0.9999	

* Significance level for Games-Howell test: $p < 0.05$

Neoformation of Bone

When we compared the interaction group $\times$ time, we found no statistically significant difference ($P > 0.05$) (Table II; Fig 1). The power of the test was 99.99%.

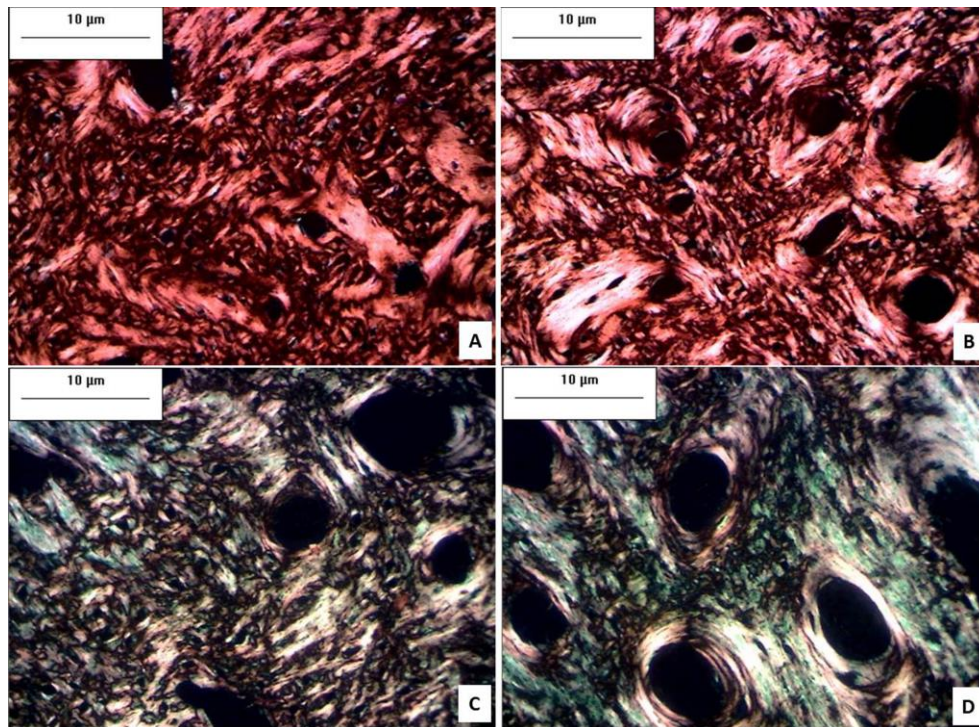


Fig 1. Photomicrography of picosirius red stain (200x magnification), showing the distal side of the periodontal ligament of the mesiobuccal root of the maxillary right first molar. In groups S (A) and F (B), we observed a predominance of type I collagen (mature); in groups SM (C) and FM (D), we observed replacement of collagen type I (mature) for collagen III (immature), on the second day after installation of the orthodontic appliance.

Bone Resorption

There was no statistically significant difference ($P > 0.05$) in the interaction group $\times$ time (Table II; Fig 2). The power of the test was 99.99%.

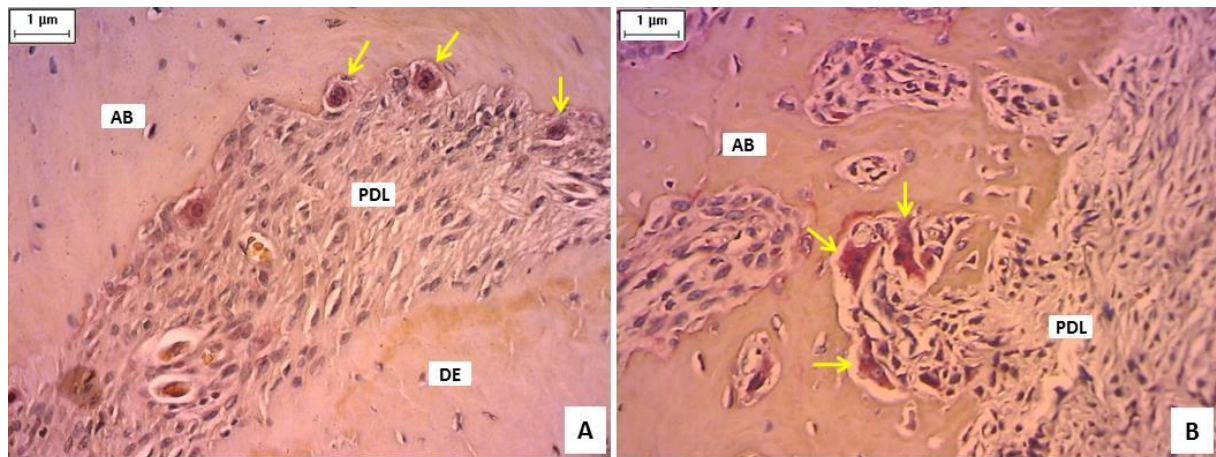


Fig 2. Photomicrography with tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining (400x magnification), in the SM group (A) and the FM group (B), on day 28 after installation of the orthodontic appliance. AB, alveolar bone; PDL, periodontal ligament; DE, dentin. The yellow arrows indicate TRAP-positive cells (osteoclasts).

Table II. Means and standard deviations of number of osteoclasts/ μm^2 and percentage of type I collagen in the saline (S), fluoxetine (F), saline with tooth movement (SM) and fluoxetine with tooth movement (FM) groups

Group/ Variables	Comparisons - Games-Howell Test						
	S	F	SM	FM	S X F	SM X FM	Power test
	(mean ± SD)	(mean ± SD)	(mean ± SD)	(mean ± SD)	(p)	(p)	
% collagen type I							
2 days	94.18 ± 2.77	92.79 ± 5.1	64.24 ± 19.07	71.96 ± 14.39	0.9999	0.9986	0.9999
7 days	92.38 ± 3.99	93.53 ± 3.58	98.57 ± 0.37	98.65 ± 0.76	1.0000	1.0000	
14 days	95.53 ± 2.5	92.86 ± 3.58	97.91 ± 1.03	97.51 ± 1.97	0.8323	1.0000	
28 days	30.86 ± 11.11	21.6 ± 11.84	20.75 ± 8.69	7.82 ± 5.72	0.8693	0.0922	
Nº osteoclasts by µm² of PDL							
2 days	0.09 ± 0.04	0.06 ± 0.02	0.17 ± 0.08	0.17 ± 0.06	0.6327	1.0000	0.9999
7 days	0.10 ± 0.03	0.10 ± 0.03	0.11 ± 0.03	0.11 ± 0.06	1.0000	1.0000	
14 days	0.11 ± 0.04	0.16 ± 0.09	0.11 ± 0.05	0.15 ± 0.05	0.8505	0.9461	
28 days	0.12 ± 0.05	0.17 ± 0.05	0.07 ± 0.03	0.16 ± 0.08	0.43	0.30	

* Significance level for Games-Howell test: $p < 0.05$

Root Resorption

Root resorption was observed at all times in the groups receiving orthodontic movement, except in the SM group on day 2 (Table III; Fig 3). There was a statistically significant difference between groups SM and FM on day 2 ($P < 0.05$), with root resorption present only in the FM group. There were no areas of root resorption in the S and the F groups.

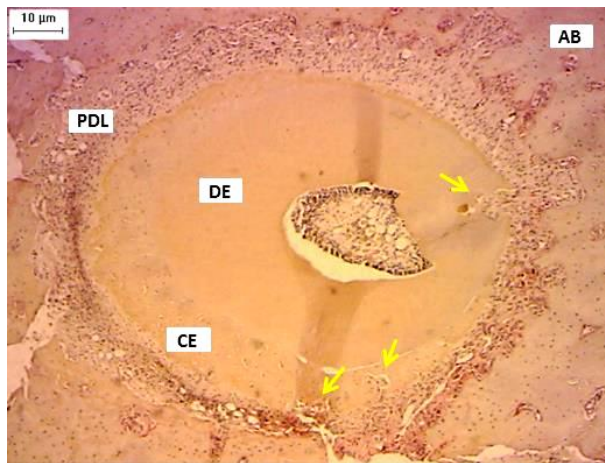


Fig 3. Photomicrography with tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining, in the FM group on day 7 after installation of the orthodontic appliance (40x magnification). AB, alveolar bone; PDL, periodontal ligament; DE, dentin; CE, cement. The yellow arrows indicate areas of root resorption.

Hyalinized Area

The hyalinized area showed no statistically significant difference when compared to the group x time interaction ($P > 0.05$); it was present only in the SM and the FM groups on days 2 and 7 (Table III; Fig 4). There were no areas of hyalinization in the S and the F groups.

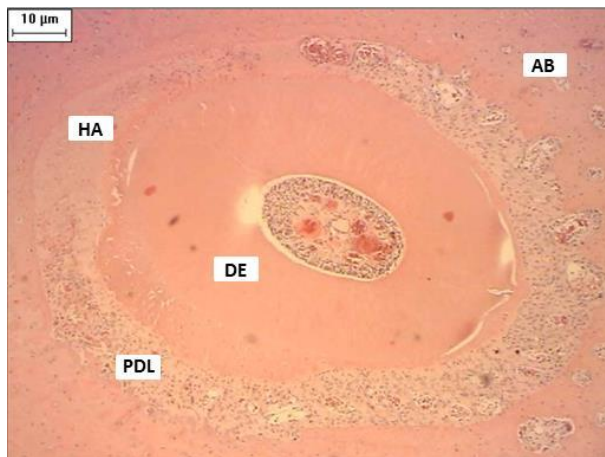


Fig 4. Photomicrography with hematoxylin-eosin (HE) staining (40x magnification), for the FM group on day 2 after installation of the orthodontic appliance. AB, alveolar bone; PDL, periodontal ligament; DE, dentin; HA, hyalinization area.

Table III. Percentage of root resorption and hyalinized areas in saline with tooth movement (SM) and fluoxetine with tooth movement (FM) groups

Group	SM		FM		Difference between two proportions test
Variables	(n)	(%)	(n)	(%)	SM X FM (p)
Root resorption					
2 days	12	0.00	10	50.0	0.01
7 days	11	36.40	7	57.10	0.39
14days	9	44.40	7	14.30	0.20
28 days	9	44.40	9	22.20	0.32
Hyalinized area					
2 days	12	25.00	10	30.00	0.79
7 days	11	9.10	7	28.60	0.28
14 days	9	0.00	7	0.00	1.00
28 days	9	0.00	9	0.00	1.00

* Significance level for the difference between two proportions test: $p < 0.05$

DISCUSSION

Fluoxetine is among the most commonly used drugs for treatment of mental disorders, mainly in young adults.⁴ Thus, we used a daily dose of 20 mg/kg in rats aged 7 to 8 weeks to produce serum levels comparable to those found in adolescent and adult humans treated with 40 to 80 mg/day of fluoxetine.^{4,20,21} Increasing evidence suggests that daily use of fluoxetine at concentrations ranging from 5 to 20 mg/kg, taken orally, intramuscularly, or intraperitoneally, for periods ranging from 4 to 24 weeks, may have an effect on the development of mineralized tissues in rats.¹⁵

In the scientific literature, there are no reports of studies evaluating the association between the use of fluoxetine 20mg/kg/day and rate of orthodontic tooth movement in rats. Our results (Table I) showed that the drug used did not affect orthodontic movement rate in accordance with Frigotto et al¹⁸ and Rafiei et al¹⁹, in which they used fluoxetine 10 mg/kg/day.

Type I collagen, synthesized and secreted by osteoblasts, makes up about 95% of the organic matrix of the bone.³² During bone resorption, this collagen is degraded, and in the repair process of immature fibers, type III collagen is deposited. Warden et al,^{6,9,14} in assessing the effect of 20 mg/kg of fluoxetine on bone metabolism through histomorphometric analysis and fluorescence microscopy at various skeletal sites, observed reductions in osteoblastic bone formation activity and lower bone mineral density. Bonnet et al,¹⁶ via enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), observed that doses of 10 mg/kg of fluoxetine decreased the levels of osteocalcin, a marker of bone formation. However, the effect of fluoxetine on bone

can be influenced by genetics, since there are reports of different responses to antidepressants in different animals.³³ Our results (Table II) confirm those of Westbroek et al,¹³ who also found no changes in bone matrix deposition in the femurs of Sprague-Dawley rats upon administration of 5 mg/kg of fluoxetine by gavage and with the studies of Frigotto et al¹⁸ and Rafiei et al¹⁹, who administered fluoxetine 10mg/kg intraperitoneally. Thus, we suggest that fluoxetine has no effect on the collagen deposition process in bone tissue.

The effect of fluoxetine on bone metabolism, however, has not been completely elucidated.^{7,8,11,12} Most *in vivo* evidence indicates that fluoxetine can negatively affect bone quality and quantity by increasing the number of osteoclasts,^{6,15,16} and by decreasing bone mineral density, leading to increased risk of fractures.^{6,9,14,15} It has also been found to lower trabecular bone volume, although trabecular thickness is less indicative of low-quality bone.¹⁶ There is a report in the literature that the adverse effects of this drug are dose-dependent (lower doses producing less severe adverse effects); however, the maximum time of application used was 4 weeks.⁶ In contrast to these results, positive effects of fluoxetine on bone were observed by Battaglini et al,³³ who found increased trabecular bone volume and increased bone formation with the chronic use of 10 mg/kg of fluoxetine; however, after ovariectomy, fluoxetine did not protect against bone loss. Mortazavi et al³⁴ saw positive effects of fluoxetine in rat skulls, indicating that fluoxetine administration of 15 mg/kg caused increased trabecular bone volume. Branco-de-Almeida et al,³⁵ by inducing periodontal disease in rats treated with 20 mg/kg of fluoxetine, observed through polymerase chain reaction analysis that fluoxetine suppressed pro-inflammatory responses and protected against bone resorption.

In the present study, we observed that 20 mg/kg of fluoxetine administration, with or without orthodontic movement, did not influence the process of bone resorption (Table II). These changes suggest that fluoxetine had no effect on osteoclast activity, in accordance with the findings of Westbroek et al.¹³ In a study associating fluoxetine 10mg/kg and orthodontic movement, Frigotto et al¹⁸ observed no significant changes in the bone resorption process and also found no differences in the microarchitecture of trabecular bone. The presence of so many conflicting results may be explained in part by other mechanisms of blocking 5-HTT,³⁴⁻³⁶ high accumulation of fluoxetine in the bone marrow, its interference in long-term genetic differences, and the type of bone studied.¹⁵

We observed the presence of hyalinized areas on days 2 and 7 after induction of orthodontic movement, independent of the administered solution; there was no statistically significant difference between the group administered saline and that administered fluoxetine (Table III). This is similar to the findings of Hamaya et al,³⁹ who evaluated orthodontic tooth movement without medication, and also found that hyalinized areas decreased after 7 days of onset of orthodontic movement. Usually, when hyalinized areas are present, the manifestation occurs in 1 to 2 days after the onset of orthodontic movement, and since the force applied is not reactivated, the tissue tends to repair so that the hyalinized areas decrease after day 7.³⁹

Root resorption was observed in the SM and the FM groups at all time points, except on day 2, when only FM showed root resorption (Table III). Root resorption is commonly present during orthodontic treatment, and is associated with the application of high-magnitude forces.²⁸ In our study, there was a higher percentage of areas with root resorption in the FM group than in the SM group on day 2 after induction of orthodontic movement; this was possibly an effect of fluoxetine. Rafiei et al¹⁹ observed lower areas of external root resorption in the control group that received fluoxetine 10mg/kg, however, the force applied was 50g/f, the administration of the drug was only 5 days a week and it was not considered statically significant.

There were no areas of hyalinization and root resorption in groups S and F, which was expected, as the groups were not exposed to forces that cause these events to occur, and fluoxetine administration was not able to cause hyalinization and root resorption.

The effect of fluoxetine on bone metabolism is still controversial; however, growing evidence suggests an increased risk of bone fractures in patients taking SSRIs.¹⁶ Differences in dose, drug administration time, lineage, age, weight, and genetic factors of different animals and different methodologies may be one explanation for these differences seen in the literature. Also, there were some limitations in this study, including weight loss and death in the animals treated with fluoxetine, as well as technical difficulties related to maintaining the stability of the orthodontic devices, which also led to the loss of some animals in the sample.

More research is needed to understand the exact mechanisms of action of serotonin and SSRIs, as they may produce antagonistic effects, and seem to act through distinct pathways. However, we observed that 20 mg/kg of fluoxetine associated with orthodontic treatment can lead to increased root resorption processes. Thus, we can infer that when applying orthodontic mechanics in

individuals who use this drug, caution should be taken to minimize the risks it can pose to the integrity of the roots of the teeth.

CONCLUSIONS

Chronic use of fluoxetine 20 mg/kg has no effect on the tooth movement rate, in collagen neoformation, in bone resorption and the presence of hyalinized areas. However, it does lead to a higher rate of root resorption after the onset of tooth movement.

Acknowledgements: We thank CAPES (Higher Education Improvement Coordination), for the scholarship provided to one of the contributing researchers in this work.

REFERENCES

1. Smith K. Mental health: a world of depression. *Nature* 2014;515:181.
2. Ferrari AJ, Charlson FJ, Norman RE, Patten SB, Freedman G, Murray CJ et al. Burden of depressive disorders by country, sex, age, and year: findings from the global burden of disease study 2010. *PLoS Med* 2013;10:e1001547.
3. Machado LV, Ferreira RR. A indústria farmacêutica e psicanálise diante da "epidemia de depressão": respostas possíveis. *Psicologia em Estudo* 2014;19:135-144.
4. Gourion D, Perrin E, Quintin P. [Fluoxetine: an update of its use in major depressive disorder in adults]. *Encephale* 2004;30:392-399.
5. Galli C, Macaluso G, Passeri G. Serotonin: a novel bone mass controller may have implications for alveolar bone. *J Negat Results Biomed* 2013;12:12.
6. Warden SJ, Nelson IR, Fuchs RK, Bliziotes MM, Turner CH. Serotonin (5-hydroxytryptamine) transporter inhibition causes bone loss in adult mice independently of estrogen deficiency. *Menopause* 2008;15:1176-1183.
7. Battaglini R, Fu J, Spate U, Ersoy U, Joe M, Sedaghat L et al. Serotonin regulates osteoclast differentiation through its transporter. *J Bone Miner Res* 2004;19:1420-1431.
8. Bliziotes M, Eshleman A, Burt-Pichat B, Zhang XW, Hashimoto J, Wiren K et al. Serotonin transporter and receptor expression in osteocytic MLO-Y4 cells. *Bone* 2006;39:1313-1321.
9. Warden SJ, Robling AG, Sanders MS, Bliziotes MM, Turner CH. Inhibition of the serotonin (5-hydroxytryptamine) transporter reduces bone accrual during growth. *Endocrinology* 2005;146:685-693.
10. Hodge JM, Wang Y, Berk M, Collier FM, Fernandes TJ, Constable MJ et al. Selective serotonin reuptake inhibitors inhibit human osteoclast and osteoblast formation and function. *Biol Psychiatry* 2013;74:32-39.
11. Bliziotes MM, Eshleman AJ, Zhang XW, Wiren KM. Neurotransmitter action in osteoblasts: expression of a functional system for serotonin receptor activation and reuptake. *Bone* 2001;29:477-486.
12. Gustafsson BI, Thommesen L, Stunes AK, Tommeras K, Westbroek I, Waldum HL et al. Serotonin and fluoxetine modulate bone cell function in vitro. *J Cell Biochem* 2006;98:139-151.

- 1 13. Westbroek I, Waarsing JH, van Leeuwen JP, Waldum H, Reseland JE, Weinans
2 H et al. Long-term fluoxetine administration does not result in major changes in bone
3 architecture and strength in growing rats. *J Cell Biochem* 2007;101:360-368.
- 4 14. Warden SJ, Hassett SM, Bond JL, Rydberg J, Grogg JD, Hilles EL et al.
5 Psychotropic drugs have contrasting skeletal effects that are independent of their
6 effects on physical activity levels. *Bone* 2010;46:985-992.
- 7 15. Tsapakis EM, Gamie Z, Tran GT, Adshead S, Lampard A, Mantalaris A et al. The
8 adverse skeletal effects of selective serotonin reuptake inhibitors. *Eur Psychiatry*
9 2012;27:156-169.
- 10 16. Bonnet N, Bernard P, Beaupied H, Bizot JC, Trovero F, Courteix D et al. Various
11 effects of antidepressant drugs on bone microarchitecture, mechanical properties
12 and bone remodeling. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;221:111-118.
- 13 17. Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to
14 orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;129:469 e461-432.
- 15 18. Frigotto GCF, Araujo CM, Guariza-Filho O, Tanaka OM, Johann ACBR, Camargo
16 ES. Effect of fluoxetine on induced tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial*
17 *Orthop* 2015;148:450-456.
- 18 19. Rafiei M, Sadeghian S, Torabinia N, Hajhashemi V. Systemic effects of fluoxetine
19 on the amount of tooth movement, root resorption, and alveolar bone remodeling
20 during orthodontic force application in rat. *Dent Res J (Isfahan)* 2015;12:482-487.
- 21 20. Koran LM, Cain JW, Dominguez RA, Rush AJ, Thiemann S. Are fluoxetine
22 plasma levels related to outcome in obsessive-compulsive disorder? *Am J Psychiatry*
23 1996;153:1450-1454.
- 24 21. Mattioli TM, Silva S, Gregio AM, Machado MA, Lima AA, Alanis LR. The effects of
25 antidepressants and pilocarpine on rat parotid glands: an immunohistochemical
26 study. *Clinics (Sao Paulo)* 2011;66:1605-1610.
- 27 22. Ribeiro JS, Maciel JV, Knop LA, Machado MA, Gregio AM, Camargo ES. Effect
28 of growth hormone in experimental tooth movement. *Braz Dent J* 2013;24:503-507.
- 29 23. Verna C, Dalstra M, Melsen B. The rate and the type of orthodontic tooth
30 movement is influenced by bone turnover in a rat model. *Eur J Orthod* 2000;22:343-
31 352.
- 32 24. Retamoso L, Knop L, Shintcovsk R, Maciel JV, Machado MA, Tanaka O.
33 Influence of anti-inflammatory administration in collagen maturation process during
34 orthodontic tooth movement. *Microsc Res Tech* 2011;74:709-713.

- 1 25. Borges LF, Gutierrez PS, Marana HR, Taboga SR. Picrosirius-polarization
2 staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in
3 vesical prolapse lesions. *Micron* 2007;38:580-583.
- 4 26. Marquezan M, Bolognese AM, Araujo MT. Effects of two low-intensity laser
5 therapy protocols on experimental tooth movement. *Photomed Laser Surg*
6 2010;28:757-762.
- 7 27. Saygin NE, Giannobile WV, Somerman MJ. Molecular and cell biology of
8 cementum. *Periodontol* 2000 2000;24:73-98.
- 9 28. Tomizuka R, Shimizu Y, Kanetaka H, Suzuki A, Urayama S, Kikuchi M et al.
10 Histological evaluation of the effects of initially light and gradually increasing force on
11 orthodontic tooth movement. *Angle Orthod* 2007;77:410-416.
- 12 29. Miyoshi K, Igarashi K, Saeki S, Shinoda H, Mitani H. Tooth movement and
13 changes in periodontal tissue in response to orthodontic force in rats vary depending
14 on the time of day the force is applied. *Eur J Orthod* 2001;23:329-338.
- 15 30. Midtgard J, Bjork G, Linder-Aronson S. Reproducibility of cephalometric
16 landmarks and errors of measurements of cephalometric cranial distances. *Angle*
17 *Orthod* 1974;44:56-61.
- 18 31. Houston WJ. The analysis of errors in orthodontic measurements. *Am J Orthod*
19 1983;83:382-390.
- 20 32. Stange R, Kronenberg D, Timmen M, Everding J, Hidding H, Eckes B et al. Age-
21 related bone deterioration is diminished by disrupted collagen sensing in integrin
22 $\alpha 2\beta 1$ deficient mice. *Bone* 2013;56:48-54.
- 23 33. Battaglini R, Vokes M, Schulze-Spate U, Sharma A, Graves D, Kohler T et al.
24 Fluoxetine treatment increases trabecular bone formation in mice. *J Cell Biochem*
25 2007;100:1387-1394.
- 26 34. Mortazavi SH, Khojasteh A, Vaziri H, Khoshzaban A, Roudsari MV, Razavi SH.
27 The effect of fluoxetine on bone regeneration in rat calvarial bone defects. *Oral Surg*
28 *Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108:22-27.
- 29 35. Branco-de-Almeida LS, Franco GC, Castro ML, Dos Santos JG, Anbinder AL,
30 Cortelli SC et al. Fluoxetine inhibits inflammatory response and bone loss in a rat
31 model of ligature-induced periodontitis. *J Periodontol* 2012;83:664-671.
- 32 36. Garcia-Colunga J, Awad JN, Miledi R. Blockage of muscle and neuronal nicotinic
33 acetylcholine receptors by fluoxetine (Prozac). *Proc Natl Acad Sci U S A*
34 1997;94:2041-2044.

- 1 37. Maggi L, Palma E, Miledi R, Eusebi F. Effects of fluoxetine on wild and mutant
2 neuronal alpha 7 nicotinic receptors. *Mol Psychiatry* 1998;3:350-355.
- 3 38. Bliziotis M. Update in serotonin and bone. *J Clin Endocrinol Metab*
4 2010;95:4124-4132.
- 5 39. Hamaya M, Mizoguchi I, Sakakura Y, Yajima T, Abiko Y. Cell death of osteocytes
6 occurs in rat alveolar bone during experimental tooth movement. *Calcif Tissue Int*
7 2002;70:117-126.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

ANEXOS

1 **Anexo I - Parecer do comitê de ética no uso de animais – PUCPR**
 2
 3



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
 Núcleo de Bioética
 Comitê de Ética no Uso de Animais

Curitiba, 01 de agosto de 2013.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 795 – 1ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Influência do uso crônico de Fluoxetina no movimento ortodôntico em ratos.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Gabriela Costa Marin

EQUIPE DE PESQUISA:

Gabriela Costa Marin, Elisa Souza Camargo.

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO:

Escola de Saúde e Biociências / Odontologia

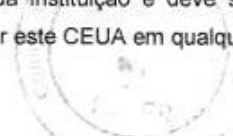
ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Ratos - <i>Rattus norvegicus</i>	Macho	7 a 8 semanas 150 a 200 kg	C	202

O colegiado do CEUA em reunião no dia 01/08/2013, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA-PUCPR descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer



4
 5
 6
 7

Anexo II – Metodologia complementar

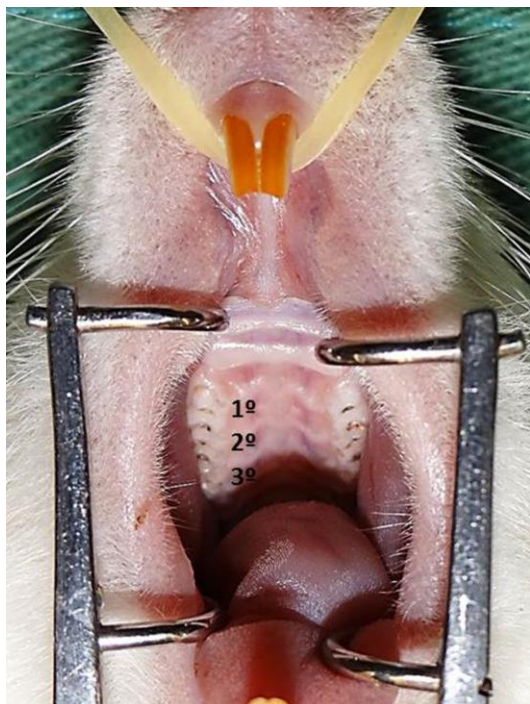


Fig 1. Arcada superior do animal da amostra indicando 1º, 2º e 3º molares superiores direitos.



Fig 2. (A) Padronização, com tensiômetro, da força de 25cN empregada na mola fechada. (B) Dispositivo ortodôntico instalado e reforço de resina composta nos incisivos superiores.

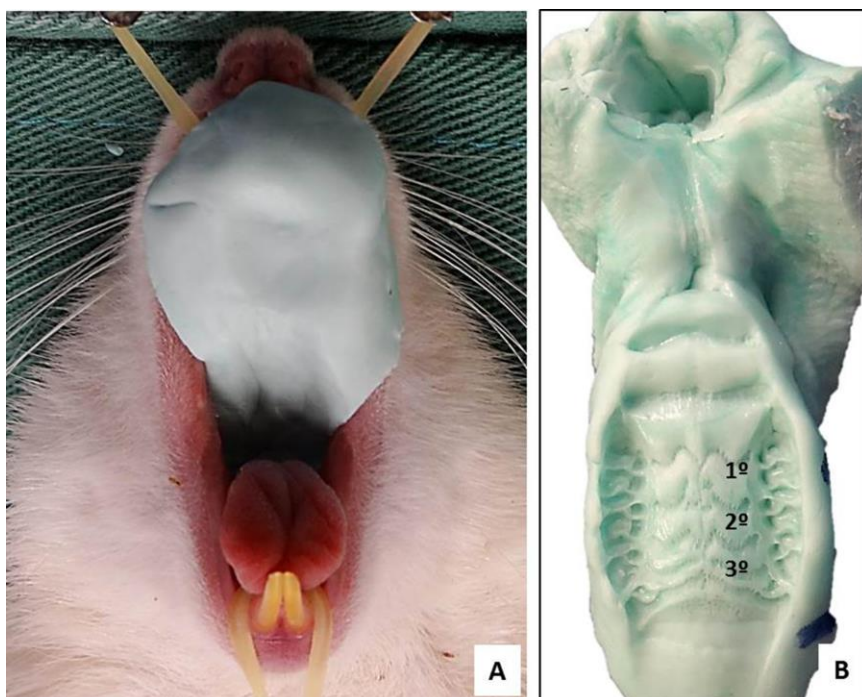


Fig 3. (A) Procedimento de moldagem da arcada superior do animal com silicona de condensação, apenas para os grupos SM e FM que iriam ser submetidos ao movimento ortodôntico. (B) Moldagem da arcada superior indicando 1º, 2º e 3º molares superiores direitos.

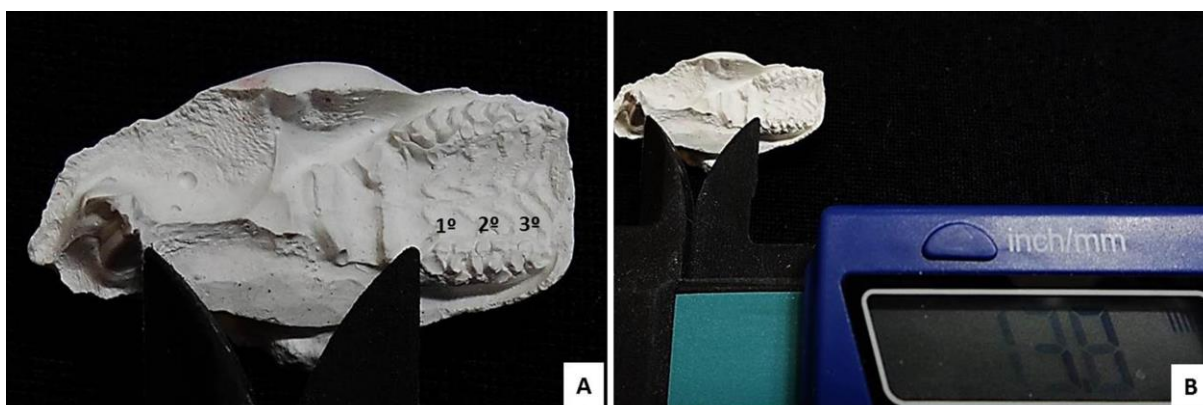


Fig 4. (A) Modelo de gesso da arcada superior do animal. (B) Mensuração da distância entre incisivo e primeiro molar superior direito com paquímetro digital.

1 Anexo III – Análise estatística

2

Tabela 1. Médias e desvios padrão na taxa de deslocamento dentário (mm) de acordo com os grupos SM e FM independente de tempos

Comparações - Teste de Games-Howell SM x FM			
Grupos	(n)	(Média ± DP)	(p)
SM	41	0,61 ± 0,42	0,2788
FM	33	0,71 ± 0,43	

3

* Nível de significância para o teste de Games-Howell: $p < 0,05$

4

Tabela2. Médias e desvios padrão na taxa de deslocamento dentário (mm) de acordo com os tempos 2, 7, 14 e 28 dias independente de grupos

Comparações - Teste de Games-Howell								
Tempo	(n)	(Média ± DP)	2 x 7 dias (p)	2 x 14 dias (p)	2 x 28 dias (p)	7 x 14 dias (p)	7 x 28 dias (p)	14 x 28 dias (p)
2 dias	22	0,38 ± 0,2						
7 dias	18	0,64 ± 0,29	0,0149	0,0417	0,0009	1,0000	0,0875	0,1039
14 dias	16	0,64 ± 0,32						
28 dias	18	1,01 ± 0,56						

5

* Nível de significância para o teste de Games-Howell: $p < 0,05$

Tabela 3. Médias e desvios padrão na taxa de deslocamento dentário (mm) nos grupos solução salina e movimento dentário (SM) e fluoxetina e movimento dentário (FM)

Comparações - Teste de Games-Howell					
Grupo/ Tempo	(n)	SM (Média ± DP)	(n)	FM (Média ± DP)	SM X FM (p)
2 dias	12	0,36 ± 0,2	10	0,4 ± 0,2	0,9999
7 dias	11	0,5 ± 0,29	7	0,85 ± 0,12	0,0526
14 dias	9	0,6 ± 0,28	7	0,7 ± 0,38	0,9986
28 dias	9	1,06 ± 0,54	9	0,95 ± 0,59	0,9999

6

* Nível de significância para o teste de Games-Howell: $p < 0,05$

7

Tabela 4. Médias e desvios padrão do número de osteoclastos por μm^2 de LP e porcentagem do colágeno tipo I de acordo com os grupos S, F, SM e FM independente de tempos

			Comparações - Teste de Games-Howell					
Grupo/ Variáveis	(n)	(Média ± DP)	S x F (p)	S x SM (p)	S x FM (p)	F x SM (p)	F x FM (p)	SM x FM (p)
% colágeno tipo I								
S	48	80,83 ± 26,52	0,7692	0,4452	0,2076	0,9596	0,6814	0,9033
F	43	74,81 ± 32,27						
SM	41	71,29 ± 32,69						
FM	33	65,54 ± 38,47						
Nº de osteoclastos por µm² de LP								
S	48	0,10 ± 0,04	0,2811	0,3828	0,0014	0,9962	0,2912	0,1827
F	43	0,12 ± 0,07						
SM	41	0,12± 0,07						
FM	33	0.15± 0.06						

8

* Nível de significância para o teste de Games-Howell: $p < 0,05$

9

Tabela 5. Médias e desvios padrão do número de osteoclastos por μm^2 de LP e porcentagem do colágeno tipo I de acordo com os tempos 2, 7, 14 e 28 dias independente de grupos

			Comparações - Teste de Games-Howell					
Tempo/ Variáveis	(n)	(Média ± DP)	2 x 7 dias (p)	2 x 14 dias (p)	2 x 28 dias (p)	7 x 14 dias (p)	7 x 28 dias (p)	14 x 28 dias (p)
% colágeno tipo I								
2 dias	45	80,94 ± 17,85						
7 dias	44	95,26 ± 4,02	0,0000	0,0000	0,0000	0,8906	0,0000	0,0000
14 dias	37	95,83 ± 3,08						
28 dias	39	20,59 ± 12,47						
Nº de osteoclastos por µm² de LP								
2 dias	45	0,12 ± 0,07						
7 dias	44	0,10 ± 0,03	0,5002	0,9262	0,9452	0,1129	0,1129	0,9999
14 dias	37	0,13 ± 0,06						
28 dias	39	0,12 ± 0,07						

* Nível de significância para o teste de Games-Howell: $p < 0,05$ **Tabela 6.** Médias e desvios padrão do número de osteoclastos por μm^2 de LP e porcentagem do colágeno tipo I nos grupos solução salina (S), fluoxetina (F), solução salina e movimento dentário (SM) e fluoxetina e movimento dentário (FM)

Colação salina (S); haversiana (F); Colação salina e movimento dentário (SM) e haversiana e movimento dentário (FM)					Comparações - Teste de Games-Howell		
Grupo/ Variáveis	S (Média ± DP)	F (Média ± DP)	SM (Média ± DP)	FM (Média ± DP)	S X F (p)	SM X FM (p)	Potência observada
% colágeno tipo I							
2 dias	94,18 ± 2,77	92,79 ± 5,1	64,24 ± 19,07	71,96 ± 14,39	0,9999	0,9986	0,9999
7 dias	92,38 ± 3,99	93,53 ± 3,58	98,57 ± 0,37	98,65 ± 0,76	1,0000	1,0000	
14 dias	95,53 ± 2,5	92,86 ± 3,58	97,91 ± 1,03	97,51 ± 1,97	0,8323	1,0000	
28 dias	30,86 ± 11,11	21,6 ± 11,84	20,75 ± 8,69	7,82 ± 5,72	0,8693	0,0922	
Nº de osteoclastos por µm² de LP							
2 dias	0,09 ± 0,04	0,06 ± 0,02	0,17 ± 0,08	0,17 ± 0,06	0,6327	1,0000	0,9999
7 dias	0,10 ± 0,03	0,10 ± 0,03	0,11 ± 0,03	0,11 ± 0,06	1,0000	1,0000	
14 dias	0,11 ± 0,04	0,16 ± 0,09	0,11 ± 0,05	0,15 ± 0,05	0,8505	0,9461	
28 dias	0,12 ± 0,05	0,17 ± 0,05	0,07 ± 0,03	0,16 ± 0,08	0,4292	0,2996	

* Nível de significância para o teste de Games-Howell: $p < 0,05$ **Tabela 7.** Frequência das variáveis reabsorção radicular e área hialina (%) nos grupos solução salina e movimento dentário (SM) e fluoxetina e movimento dentário (FM)

Grupo/ Variáveis	SM		FM		Teste de diferença entre duas proporções SM X FM (p)
	(n)	(%)	(n)	(%)	
Reabsorção radicular					
2 dias	12	0,0	10	50,0	0,0053
7 dias	11	36,4	7	57,1	0,3889
14 dias	9	44,4	7	14,3	0,1975
28 dias	9	44,4	9	22,2	0,3177
Área hialina					
2 dias	12	25,0	10	30,0	0,7932
7 dias	11	9,1	7	28,6	0,2794
14 dias	9	0,0	7	0,0	1,0000
28 dias	9	0,0	9	0,0	1,0000

*Nível de significância para o Teste de diferença entre duas proporções: $p < 0,05$

Anexo IV- Normas para publicação - American Journal of Orthodontics and
Dentofacial Orthopedics

Information for Authors

Electronic manuscript submission and review

The American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics uses the Elsevier Editorial System (EES), an online manuscript submission and review system.

To submit or review an article, please go to the AJO-DO EES website:

<http://ees.elsevier.com/ajodo>.

Send correspondence to:

Rolf G. Behrents, Editor-in-Chief

E-mail: behrents@slu.edu

Send other correspondence to:

Chris Burke, Managing Editor

American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics

University of Washington

Department of Orthodontics, D-569

HSC Box 357446

Seattle, WA 98195-7446

Telephone (206) 221-5413

E-mail: ckburke@aol.com

General Information

The American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics publishes original research, reviews, case reports, clinical material, and other material related to orthodontics and dentofacial orthopedics.

Submitted manuscripts must be original, written in English, and not published or under consideration elsewhere. Manuscripts will be reviewed by the editor and consultants and are subject to editorial revision. Authors should follow the guidelines below.

Statements and opinions expressed in the articles and communications herein are those of the author(s) and not necessarily those of the editor(s) or publisher, and the editor(s) and publisher disclaim any responsibility or liability for such material. Neither the editor(s) nor the publisher guarantees, warrants, or endorses any product or service advertised in this publication; neither do they guarantee any claim made by

the manufacturer of any product or service. Each reader must determine whether to act on the information in this publication, and neither the Journal nor its sponsoring organizations shall be liable for any injury due to the publication of erroneous information.

Guidelines for Original Articles

Submit Original Articles via EES: ees.elsevier.com/ajodo.

Before you begin, please review the guidelines below. To view a 7-minute video explaining how to prepare your article for submission, go to [Video on Manuscript Preparation](#).

1. *Title Page.* Put all information pertaining to the authors in a separate document. Include the title of the article, full name(s) of the author(s), academic degrees, and institutional affiliations and positions; identify the corresponding author and include an address, telephone and fax numbers, and an e-mail address. This information will not be available to the reviewers.

2. *Abstract.* Structured abstracts of 200 words or less are preferred. A structured abstract contains the following sections: Introduction, describing the problem; Methods, describing how the study was performed; Results, describing the primary results; and Conclusions, reporting what the authors conclude from the findings and any clinical implications.

3. *Manuscript.* The manuscript proper should be organized in the following sections: Introduction and literature review, Material and Methods, Results, Discussion, Conclusions, References, and figure captions. Express measurements in metric units, whenever practical. Refer to teeth by their full name or their FDI tooth number. For style questions, refer to the AMA Manual of Style, 9th edition. Cite references selectively, and number them in the order cited. Make sure that all references have been mentioned in the text. Follow the format for references in "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (Ann Intern Med 1997;126:36-47); <http://www.icmje.org>. Include the list of references with the manuscript proper. Submit figures and tables separately (see below); do not embed figures in the word processing document.

4. *Figures.* Digital images should be in TIF or EPS format, CMYK or grayscale, at least 5 inches wide and at least 300 pixels per inch (118 pixels per cm). Do not embed images in a word processing program. If published, images could be reduced

to 1 column width (about 3 inches), so authors should ensure that figures will remain legible at that scale. For best results, avoid screening, shading, and colored backgrounds; use the simplest patterns available to indicate differences in charts. If a figure has been previously published, the legend (included in the manuscript proper) must give full credit to the original source, and written permission from the original publisher must be included. Be sure you have mentioned each figure, in order, in the text.

5. *Tables.* Tables should be self-explanatory and should supplement, not duplicate, the text. Number them with Roman numerals, in the order they are mentioned in the text. Provide a brief title for each. If a table has been previously published, include a footnote in the table giving full credit to the original source and include written permission for its use from the copyright holder. Submit tables as text-based files (Word or Excel, for example) and not as graphic elements.

6. *Model release and permission forms.* Photographs of identifiable persons must be accompanied by a release signed by the person or both living parents or the guardian of minors. Illustrations or tables that have appeared in copyrighted material must be accompanied by written permission for their use from the copyright owner and original author, and the legend must properly credit the source. Permission also must be obtained to use modified tables or figures.

7. *Copyright release.* In accordance with the Copyright Act of 1976, which became effective February 1, 1978, all manuscripts must be accompanied by the following written statement, signed by all authors:

"The undersigned author(s) transfers all copyright ownership of the manuscript **[insert title of article here]** to the American Association of Orthodontists in the event the work is published. The undersigned author(s) warrants that the article is original, does not infringe upon any copyright or other proprietary right of any third party, is not under consideration by another journal, has not been previously published, and includes any product that may derive from the published journal, whether print or electronic media. I (we) sign for and accept responsibility for releasing this material." Scan the printed copyright release and submit it via EES.

8. *Use the International College of Medical Journal Editors Form for the Disclosure of Conflict of Interest (ICMJE Conflict of Interest Form).* If the manuscript is accepted, the disclosed information will be published with the article. The usual and customary listing of sources of support and institutional affiliations on the title page is proper and

does not imply a conflict of interest. Guest editorials, Letters, and Review articles may be rejected if a conflict of interest exists.

9. Institutional Review Board approval. For those articles that report on the results of experiments of treatments where patients or animals have been used as the sample, Institutional Review Board (IRB) approval is mandatory. No experimental studies will be sent out for review without an IRB approval accompanying the manuscript submission.

Checklist for authors

- Title page, including full name, academic degrees, and institutional affiliation and position of each author, and author to whom correspondence and reprint requests are to be sent, including address, business and home phone numbers, fax numbers, and e-mail address
- Abstract
- Article proper, including references and figure legends
- Figures, in TIF or EPS format
- Tables
- Copyright release statement, signed by all authors
- Photographic consent statement(s)
- ICMJE Conflict of interest statement
- Permissions to reproduce previously published material