



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

GIOVANA CARLA FRANZON FRIGOTTO

**EFEITO DA FLUOXETINA NA MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA
INDUZIDA EM RATOS**

CURITIBA

2013

GIOVANA CARLA FRANZON FRIGOTTO

**EFEITO DA FLUOXETINA NA MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA INDUZIDA EM
RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná como requisito à obtenção parcial do Título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Ortodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Souza Camargo

Co-orientadora: Profa. Dra. Aline Cristina Batista Rodrigues Johann

CURITIBA

2013

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

F912e
2014 Frigotto, Giovana Carla Franzon
Efeito da fluoxetina na movimentação dentária induzida em ratos / Giovana
Carla Franzon Frigotto ; orientadora, Elisa Souza Camargo ; co-orientadora,
Aline Cristina Batista Rodrigues Johann. -- 2014
46 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2014.
Inclui bibliografias

1. Ortodontia. 2. Movimentação dentária. 3. Fluoxetina. 4. Densidade óssea.
5. Perda óssea alveolar. I. Camargo, Elisa Souza. II. Johann, Aline Cristina
Batista Rodrigues. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

CDD 20. ed. – 617.643



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia


TERMO DE APROVAÇÃO

GIOVANA CARLA FRANZON FRIGOTTO

O EFEITO DA FLUOXETINA NA MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA INDUZIDA 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^a Dr^a Elisa Souza Camargo
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof. Dr. Odilon Guariza Filho
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof. Dr. Robert Willer Farnazzo Vitral
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFJF

Curitiba, 28 de Fevereiro de 2013.

Aos meus pais, Jane Carla e Magdal,

Por todo amor dedicado a mim e incentivo para a realização deste mestrado. Obrigada por nunca medir esforços para minha educação, por ter me dado a oportunidade de crescer em uma família sólida e estar presente ativamente em minha vida (às vezes ativamente demais!), mas sempre me conduzindo para as escolhas certas.

À pequenina Julia,
por ser essa menina tão doce e carinhosa,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me permitido o dom da vida e de evoluir como ser humano, por se fazer presente em tantos momentos, ajudando-me a trilhar meus caminhos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Elisa Souza Camargo, por seus ensinamentos e contribuições para a concretização deste trabalho, por ser um exemplo de profissional e grande incentivadora na busca pela excelência. Obrigada por todo o cuidado e paciência, e pela confiança depositada.

Ao meu noivo Fábio, por partilhar esse sentimento de amor infinito, pela sua amizade e companheirismo, por acreditar na minha capacidade profissional e compreender minhas ausências. Obrigada por me fazer sentir tão amada e cuidada, e por despertar em mim a vontade de querer ser uma pessoa melhor.

Aos meus avós, Lourdes e Jaime, por exercerem esse papel como ninguém, por ser um exemplo de vida, de amor e união.

Aos meus tios Jefferson e Valéria, pelo exemplo como seres humanos e profissionais, e pela participação direta neste trabalho, na aquisição do fármaco e na compreensão dos artigos.

À minha tia Márcia, por ter me ajudado com presteza na elaboração da versão em inglês do artigo.

Aos meus colegas de turma, Bruno Borges de Castilhos, Jorge César Borges Leão Filho, José Guilherme Camargo Teixeira da Cunha, Regis Meller Santana, mas em especial à Ana Paula Lazzari Marques, Cristiano Miranda de Araujo, Luciana Trevisan Bittencourt Muniz, Marcel Durante Brunet e Viviane da Silva Kagy, por compartilharem dois anos intensos e harmoniosos comigo.

À minha colega de turma, mas hoje mais do que isso, minha amiga Camila Rychuv Santos, com a qual pude dividir alegrias e angústias, obrigada pela sua amizade.

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

À professora Aline Cristina Batista Rodrigues Johann, pela co-orientação deste trabalho, sem a qual ele jamais teria sido concluído. Obrigada pelos preciosos conhecimento e tempo destinados.

Ao Prof. Dr. Odilon Guariza Filho, pela transmissão de seus valiosos conhecimentos e por seu admirável entusiasmo e amor ao ensinar Ortodontia. Obrigada por tornar nossa convivência durante esses dois anos muito mais divertida.

Ao Prof. Dr. Orlando Motohiro Tanaka, por se fazer presente mesmo a longas distâncias, por contribuir imensamente na minha formação profissional, mostrando-me um universo de possibilidades; exemplo de dedicação e perseverança, admiro-o muito.

À Profa. Dra. Ana Maria Trindade Grégio, pelas considerações e sugestões para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Robert Willer Farinazzo Vitral, por ter aceitado prontamente o convite para a participação da banca desta dissertação.

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

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

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Experimental Ana Paula Martins, Marina Azevedo, Seigo Nagashima e estagiárias que foram de uma importância impar na realização desse trabalho.

Ao Professor Dr. Sérgio Aparecido Ignácio pela análise estatística dos dados da presente dissertação. Obrigada por toda a sua dedicação para com o Programa de Pós- Graduação de Odontologia dessa instituição.

À futura ortodontista Giovanna Simião Ferreira e a graduanda Débora Casagrande pela colaboração na fase prática e experimental.

Ao Instituto Lamir da Universidade Federal do Paraná, pela realização das micro-tomografias, e em especial à funcionária Clarice, pela sua paciência ao me ensinar a utilizar os softwares durante a análise destes exames.

À secretária Neide Reis Borges pelo primor em realizar o seu trabalho junto ao Programa de Pós – Graduação em Odontologia da PUCPR.

Aos funcionários da Clínica de Odontologia da PUCPR.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná, onde tive o prazer de estudar durante quase sete anos.

Ao CNPq, pela concessão de auxílio financeiro para a realização desta pesquisa.

À todos que participaram direta ou indiretamente desse trabalho.

*Os que se encantam com a prática sem a
ciência são como os timoneiros
que entram no navio sem timão nem bússola,
nunca tendo certeza do seu destino.*

Leonardo da Vinci

SUMÁRIO

1 ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	1
Página Título	2
Resumo	3
Introdução.....	4
Materiais e Método	5
Reultados	9
Discussão	11
Conclusões.....	15
Referências	16
2 ARTIGO EM INGLÊS	19
Title page.....	20
Abstract	21
Introduction.....	22
Materials and Method	23
Results.....	27
Discussion	29
Conclusions	33
References	34
3 ANEXOS	37
Aprovação do Comitê de Ética dos Animais.....	38
Certificado de pureza da Fluoxetina	40
Normas para publicação no American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics	42

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14

1 ARTIGO EM PORTUGUÊS

1 **EFEITO DA FLUOXETINA NA MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA**
2 **INDUZIDA EM RATOS**

3
4
5
6 **Giovana Carla Franzon Frigotto, CD**

7 Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil

8 Escola de Saúde e Biociências

9 Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Ortodontia

10 Email: gifrigotto@hotmail.com

11
12 **Aline Cristina Batista Rodrigues Johann, CD, PhD**

13 Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil.

14 Escola de Saúde e Biociências

15 Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Estomatologia

16 Email: aline.johann@pucpr.br

17
18 **Elisa Souza Camargo, CD, PhD**

19 Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil

20 Escola de Saúde e Biociências

21 Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Ortodontia

22 Email: escamargo@uol.com.br

23
24 **Endereço para correspondência**

25 **Elisa Souza Camargo**

26 Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil

27 Escola de Saúde e Biociências

28 Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Ortodontia

29 Endereço: Rua Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho

30 Cep 80215-901 Curitiba, Paraná, Brazil

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

32 Email: escamargo@uol.com.br

33

34

1 RESUMO

2

3 **Introdução:** A fluoxetina é um antidepressivo amplamente utilizado e está
4 relacionada a alterações na densidade mineral óssea. Este estudo objetivou avaliar
5 o seu efeito na movimentação dentária induzida. **Métodos:** Setenta e dois ratos
6 *Wistar* foram divididos nos grupos: M (n=24) – solução salina com movimento
7 dentário, FM (n=24) – fluoxetina com movimento dentário e F (n=24) – fluoxetina. O
8 grupo M recebeu solução salina 0,9% e os grupos FM e F receberam fluoxetina
9 10mg/Kg, diariamente, do início ao fim do experimento. No 30º dia de administração
10 de fluoxetina ou solução salina, instalou-se dispositivo ortodôntico que movimentou o
11 1º molar para mesial (30cN) nos grupos M e FM e depois de 3, 7 e 14 dias os
12 animais foram mortos. Os animais do grupo F não foram submetidos à
13 movimentação dentária mas foram mortos após os mesmos intervalos de tempo.
14 Avaliou-se a neoformação do colágeno por meio de microscopia de polarização, o
15 número de osteoclastos por Fosfatase Ácida Tartarato–Resistente (TRAP) e o
16 trabeculado ósseo por meio de micro-tomografia no fêmur. **Resultados:** Foi
17 observado padrão inverso na formação de colágeno entre os grupos FM e M nos
18 intervalos de tempo, porém não estatisticamente significante ($p>0,05$). Verificou-se
19 maior número de osteoclastos no grupo FM comparado ao grupo F no 3º dia ($p<0,01$);
20 e aumento na separação do trabeculado ósseo no grupo F comparado ao grupo M
21 no 14º dia ($p<0,05$). **Conclusões:** A fluoxetina não interferiu de forma significativa no
22 movimento dentário induzido e no trabeculado ósseo em ratos.

23

24

25

1 INTRODUÇÃO

2
3
4 A fluoxetina é um fármaco amplamente utilizado no tratamento de depressões
5 e outros distúrbios psicológicos.¹ Pertence à classe dos Inibidores Seletivos da
6 Recaptação da Serotonina (ISRS), e está envolvida no aumento da
7 neurotransmissão serotoninérgica em algumas áreas do cérebro por meio de
8 aumento da liberação de serotonina (5-hidroxitriptamina (5-HT)). A serotonina é uma
9 monoamina sintetizada em duas etapas a partir do aminoácido essencial triptofano e
10 da enzima triptofano hidroxilase (TPH), e sua liberação está relacionada a funções
11 comportamentais, psicológicas e cognitivas.² Esses efeitos são mediados por sete
12 famílias de receptores 5-HT (5-HT1 – 5-HT7), e regulados por meio do transportador
13 5-HTT, o qual é responsável pelo transporte de 5-HT para dentro da célula. Agentes
14 farmacológicos como a fluoxetina antagonizam o transportador 5-HTT, e por isso,
15 potencializam a atividade serotoninérgica, aliviando os sintomas da depressão.^{2,3}

16 Alguns estudos reportam a expressão de elementos do sistema
17 serotoninérgico em células ósseas, como a presença de receptores 5-HT e
18 transportadores 5-HTT em osteoclastos e osteoblastos.⁴⁻⁷ Estudos prévios
19 demonstram que 5-HT regula a proliferação, diferenciação e ativação de células
20 ósseas *in vitro*⁷, desta forma, a interferência no sistema serotoninérgico via bloqueio
21 do 5-HTT poderia alterar o metabolismo ósseo. Existem relatos indicativos da
22 interferência de ISRS tais como a fluoxetina no osso, causando a diminuição da
23 densidade mineral óssea e por conseqüência, aumento do risco de fraturas,¹ no
24 entanto, resultados de pesquisas são conflitantes em relação a esses efeitos.^{1,8,9}

25 A movimentação dentária induzida é um complexo processo ativado por
26 forças biomecânicas que provoca alterações teciduais caracterizadas por
27 reabsorção óssea mediada por osteoclastos no lado de compressão e aposição
28 óssea mediada por osteoblastos do lado de tração.¹⁰ Apesar de existirem indicativos
29 da interferência da fluoxetina no metabolismo ósseo, não é descrito na literatura o
30 seu impacto no movimento dentário induzido.

31 O objetivo do presente estudo foi, portanto, avaliar o efeito decorrente da
32 administração da fluoxetina na remodelação óssea durante a movimentação dentária
33 induzida, bem como avaliar alterações da micro-arquitetura do trabeculado ósseo
34 em ratos.

1 MATERIAL E MÉTODOS

2

3

4 Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
5 da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) e registrada sob parecer nº
6 633.

7 A amostra foi constituída por setenta e dois ratos Wistar (*Rattus norvegicus*
8 *albinus*) machos, com nove semanas de vida, pesando entre 300-350g, provenientes
9 do Biotério da PUCPR. Por meio de uma balança eletrônica de precisão (Gehaka –
10 BG 4001) os animais foram pesados no início do experimento e diariamente até o
11 dia da morte com o objetivo de ajustar a dosagem do fármaco.

12 Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos: M (n=24) - solução
13 salina com movimento dentário; FM (n=24) - fluoxetina com movimento dentário e F
14 (n=24) - fluoxetina sem movimento dentário. No grupo M, os animais receberam 1 ml
15 de solução salina 0,9% via intraperitoneal (LBS, Laborasa Indústria Farmacêutica
16 LTDA, São Paulo, SP, Brasil), diariamente. Nos grupos FM e F foram realizadas
17 aplicações diárias de fluoxetina [10 mg/ml], na dosagem de 10 mg/Kg, diluída em
18 propilenoglicol 53,3%, cloreto de sódio 0,9% e benzoato de sódio 0,1% (Laboratório
19 Farmacêutico da PUCPR, Curitiba, PR, Brasil), via intraperitoneal. A dosagem foi
20 escolhida de acordo com o estudo de Koran *et al* (1996)¹¹, sendo compatível com
21 uso clínico em humanos.

22 No 30º dia de aplicação do fármaco ou solução salina, foi instalado nos
23 grupos FM e M respectivamente, o dispositivo ortodôntico de acordo com o modelo
24 proposto por Choi *et al* (2010)¹², o qual consiste em uma mola *nickel titanium*
25 fechada (G&H Wire, Franklin, IN), e fio de amarrilho de aço inox 0,025” (Morelli, São
26 Paulo, Brasil). A mola foi fixada no primeiro molar superior direito e no incisivo
27 superior do mesmo lado. Para garantir maior estabilidade da mola, os incisivos
28 inferiores foram cortados e os incisivos superiores foram unidos por meio de resina
29 composta Charisma (Heraeus, Hanau, Alemanha) após condicionamento com ácido
30 fosfórico 37% (Condac 37, FGM, Joinville, SC, Brasil) e sistema adesivo (Adper
31 Single Bond, 3M ESPE, St. Paul, MN). A força recíproca produzida pela mola foi de
32 30 cN¹³, padronizada através de um tensiômetro (Haag-Streit AG, Koeniz, Suíça),
33 provocando o movimento mesial do molar. Para a instalação do dispositivo, os
34 animais foram sedados por meio de injeções intramusculares de

1 Tiletamina/Zolazepan 50 mg/Kg (Zoletil®, Virbac Brasil Indústria e Comércio LTDA,
2 Jurubatuba, SP, Brasil).

3 As aplicações de fluoxetina e solução salina continuaram a ser realizadas até
4 o dia da morte dos animais, que ocorreu no 3º, 7º e 14º dias após a instalação do
5 dispositivo ortodôntico, por overdose de Pentobarbital Sódico 100 mg/Kg (Syntec,
6 Cotia, SP, Brasil) via intraperitoneal. Os animais do grupo F, sem movimentação
7 dentária induzida, foram mortos após 33, 37 e 44 dias de aplicação do fármaco.
8 Foram coletados 9 ml de sangue dos animais dos grupos F e FM através de punção
9 cardíaca e inseridos em um tubo sem anticoagulante, com gel separador (Labor
10 Import, São Paulo, SP, Brasil). Com a finalidade de confirmar a administração da
11 fluoxetina, as amostras de sangue foram analisadas no Laboratório de Análises
12 Clínicas Lanac (Curitiba, PR, Brasil), sendo quantificado o nível plasmático do
13 fármaco através de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).

14 A hemi-maxila direita de cada animal foi removida, dissecada, fixada em
15 formol a 10% durante 24 horas e descalcificada em EDTA 5% por três meses. Os
16 espécimes foram processados e emblocados em parafina no Laboratório de
17 Patologia Experimental da PUCPR. Foram realizadas 10 secções transversais com 4
18 µm de espessura e 60 µm de intervalo na raiz méso-vestibular do primeiro molar, a
19 partir do terço cervical no sentido apical. As secções foram coradas pelas técnicas
20 histoquímicas Picrosírius (5 secções) e Fosfatase Ácida Tartarato-Resistente –
21 TRAP (5 secções).

22 Para avaliar e comparar a micro-arquitetura do osso trabecular, o fêmur
23 esquerdo dos animais foi removido, dissecado e congelado à temperatura de -20°C
24 e posteriormente avaliado por meio de micro-tomografia computadorizada.

25

26

27

28 **Análise Histológica**

29

30 Nas secções coradas com Picrosírius, a área distal da raiz méso-vestibular
31 (área de tração) foi selecionada para análise.¹³ Foi capturada uma imagem por meio
32 de microscópio de luz Olympus BX-50 (Olympus, Tóquio, Japão), aumento original
33 100x, com filtro polarizador Olympus® U-Pot (Olympus, Tóquio, Japão) acoplado à
34 microcâmera Dinolite® AM 423X (AmMo Electronics Corporation, New Taipei,

1 Taiwan). As imagens foram editadas através do programa Adobe Photoshop® CS6®
2 (Adobe Systems Incorporated, CA). O ligamento periodontal e a raiz foram excluídas
3 das imagens permitindo a análise do tecido ósseo. Para avaliar o colágeno, foi
4 utilizado o software Image Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD).
5 A coloração esverdeada indica presença de colágeno tipo III (imaturo), menos
6 organizado e com fibras menos espessas, enquanto que a coloração avermelhada
7 refere-se à presença de colágeno tipo I (maduro), com fibras mais espessas e
8 melhor organização, paralelas em relação à fonte de luz.^{14,15} A porcentagem média
9 de cada tipo de colágeno foi obtida pela média das cinco secções.

10 A coloração por TRAP foi realizada usando o kit TRAP 387 (Sigma-Aldrich
11 Co, St Louis, MO) seguindo as instruções do fabricante. De cada secção, foram
12 capturadas 5 imagens da região mesial (área de compressão) da raiz méso-
13 vestibular, compreendendo uma área total de 942.813,00 µm², utilizando um
14 microscópio Olympus BX-50 (Olympus, Tóquio, Japão) acoplado a microcâmera
15 Dinolite® AM 423X (AmMo Eletronics Corporation, New Taipei City, Taiwan) em
16 magnificação de 400x.¹⁶ O método de aquisição da imagem foi padronizado durante
17 o processo de captura. A contagem do número de osteoclastos foi realizada com
18 auxílio do programa Image Pro-Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring MD), no
19 qual foi criada uma grade para contagem. Foram considerados osteoclastos as
20 células multinucleadas, TRAP-positivas no ligamento periodontal adjacente ao osso
21 alveolar. Para obtenção do número de osteoclastos, calculou-se a média das cinco
22 secções.¹⁶

24 **Análise Micro-tomográfica**

25
26 A epífise distal do fêmur foi analisada utilizando sistema de micro-tomografia
27 computadorizada (SkyScan 1076, Kontich, Bélgica), com voltagem de 100kW,
28 corrente de 100µA e filtro de 1.0 mm de alumínio. As amostras foram mantidas em
29 um porta-amostras cilíndrico, que permitiu correto alinhamento axial e estabilidade
30 das mesmas durante a captura da imagem.⁹ Foram obtidos 200 cortes com
31 resolução de 9 µm/pixel, na área central da epífise distal de cada fêmur, através de
32 rotação de 180° e incrementos de 0,4°. Em seguida os dados brutos foram
33 reconstruídos através do *software* NRecon 1.4.4 (SkyScan 1076, Kontich, Bélgica), o
34 volume de interesse para análise foi selecionado (VOI) e binarizado. O osso cortical

1 foi excluído. A análise tridimensional foi efetuada por meio do software Analyser 1.12
2 (SkyScan 1076, Kontich, Bélgica) no qual foram calculados índices morfométricos
3 incluindo: volume trabecular (BV/TV%), que corresponde ao volume ocupado pelo
4 osso trabecular, mineralizado ou não, expresso como porcentagem do volume
5 ocupado pela medula e trabéculas ósseas; espessura trabecular (Tb.Th), que
6 determina a espessura das trabéculas ósseas; separação trabecular (Tb.Sp), que
7 corresponde à distância entre os pontos médios das trabéculas ósseas e número
8 trabecular (Tb.N), que corresponde ao número de trabéculas por milímetro de
9 tecido.^{17,18}

10

11 **Análise Estatística**

12

13 A análise estatística foi realizada utilizando o Statistical Package for the Social
14 Science 19.0 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL) e Statistica 7 (Statsoft, Inc.,
15 Tulsa, OK). A verificação de normalidade e de homogeneidade foi realizada por meio
16 do teste de Kolmogorov-Smirnov e do teste de Levene, respectivamente, ambos ao
17 nível de significância de 0,05.

18 Quando os testes acusaram distribuição normal, ou distribuição simétrica e
19 homogeneidade de variâncias das variáveis segundo grupo e tempo, utilizou-se
20 ANOVA e Tukey. Quando as variáveis apresentaram distribuição normal e variâncias
21 heterogêneas segundo grupo e tempo, utilizou-se o teste de comparações múltiplas
22 paramétricas de Games-Howell.

23

24

25

26

27

1 RESULTADOS

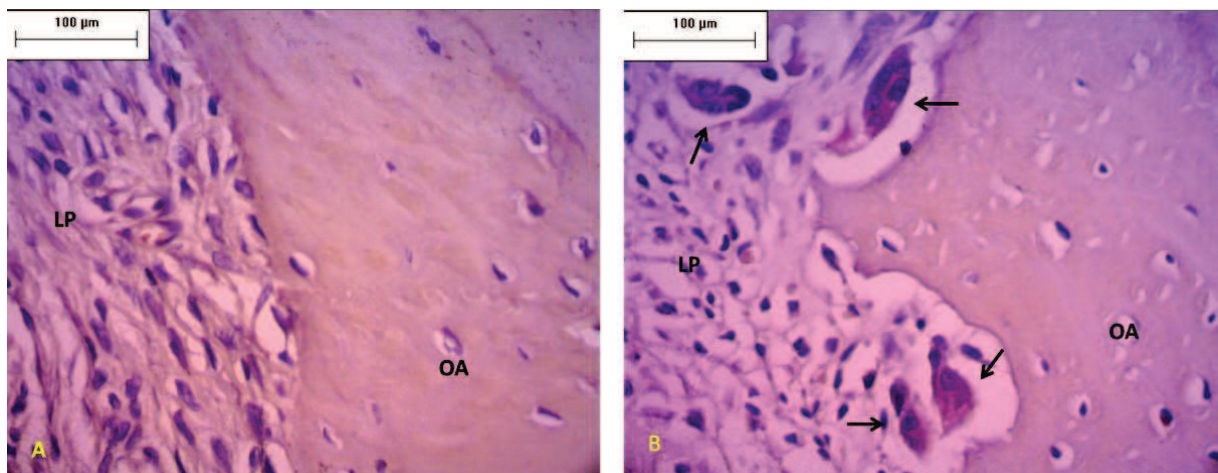
2
3
4 Não foi observada diferença significativa no nível plasmático da fluoxetina
5 entre os grupos FM e F ($p>0,05$). As médias dos valores foram 301,6 ug/L e 307,1
6 ug/L para os grupos FM e F respectivamente, mantendo-se dentro dos valores
7 compatíveis com o tratamento em humanos (100 – 700 ug/L).^{11,19} (Tabela I).

8
9 **Tabela I.** Médias e desvios padrão do nível plasmático de fluoxetina (ug/ml)

Grupo/ Tempo	FM (Média ± DP)	F (Média ± DP)	Comparações - Teste de Tukey	
			M (Média ± DP)	FM x F (P)
3 dias	273,8 ± 32,2	285,8 ± 42,8	0,000	0,9980
7 dias	282,5 ± 41,8	327,7 ± 42,6	0,000	0,5895
14 dias	348,6 ± 51,4	307,7 ± 97,9	0,000	0,6879

10
11 Nível de significância adotado para o Teste de Tukey: $p < 0,05$

12
13
14 Não foi verificada diferença significativa na quantificação de colágeno imaturo
15 entre grupos nos intervalos de tempo ($p>0,05$) (Tabela II). Foi observado maior
16 número de osteoclastos no grupo FM comparado ao grupo F no 3º dia ($p<0,01$) (Fig
17 1). Nos demais dias, não foram observadas diferenças entre grupos ($p>0,05$)
18 (Tabela II).



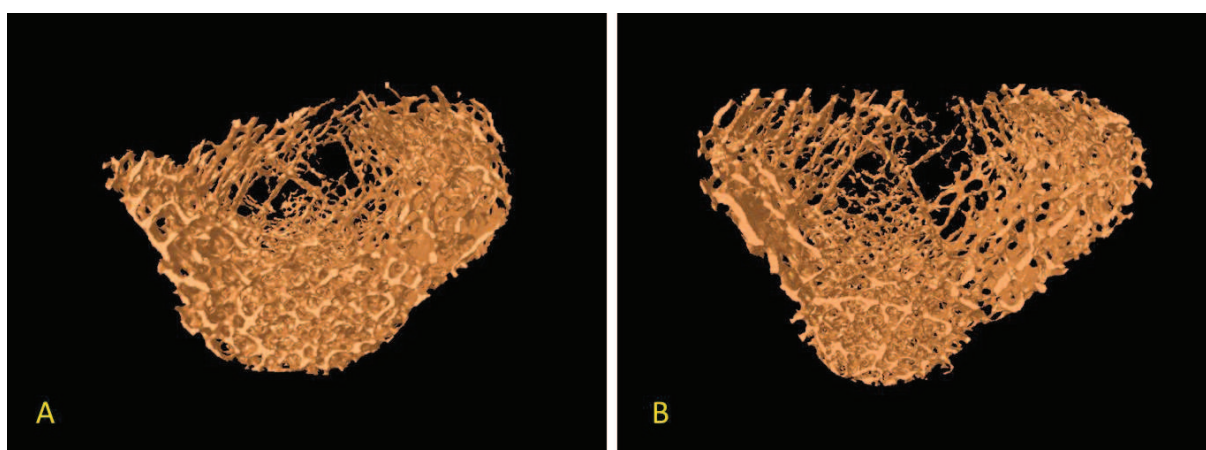
21 **Fig 1.** Avaliação da reabsorção óssea demonstrando maior número de osteoclastos (setas) no grupo
22 FM. **A**, grupo fluoxetina (F) e **B**, grupo fluoxetina e movimento dentário (FM). **LP**, ligamento
23 periodontal; **OA**, osso alveolar (TRAP – aumento 400x).

1 **Tabela II.** Médias e desvios padrão do número de osteoclastos e porcentagem do colágeno tipo III nos
 2 grupos fluoxetina e movimento dentário (FM), solução salina e movimento dentário (M) e fluoxetina
 3 (F)
 4

Grupo/ Variáveis	FM (Média ± DP)	M (Média ± DP)	F (Média ± DP)	Comparações-Teste de Games-Howell		
				FM X M (P)	FM X F (P)	M X F (P)
Osteoclastos						
3 dias	3,64 ± 1,68	3,01 ± 2,13	0,2 ± 0,27	0,9986	0,0093*	0,0891
7 dias	1,51 ± 1,38	1,26 ± 0,74	0,9 ± 1,0	0,9999	0,9837	0,9970
14 dias	3,2 ± 1,91	1,5 ± 0,77	0,67 ± 0,66	0,4266	0,0939	0,3742
Colágeno Tipo III						
3 dias	10,73 ± 3,92	17,37 ± 12,53	15,86 ± 7,08	0,8601	0,6870	1,0000
7 dias	12,2 ± 2,63	13,55 ± 13,57	15,89 ± 9,67	1,0000	0,9692	1,0000
14 dias	16,26 ± 6,49	10,44 ± 5,07	12,12 ± 8,80	0,5687	0,9692	0,9999

5
 6 * Nível de significância para o teste de Games-Howell: $p < 0,05$
 7
 8
 9

10 Verificou-se aumento na separação das trabéculas ósseas (Tb.Sp) no grupo F
 11 comparado ao grupo M, no 14º dia ($p < 0,05$) (Fig 2; Tabela III). Não houve diferenças
 12 significativas entre os grupos quanto aos outros parâmetros morfométricos
 13 relacionados à micro-arquitetura óssea em todos os períodos estudados ($p > 0,05$).
 14
 15



16
 17 **Fig 2.** Imagens representativas da reconstrução tridimensional do osso trabecular do fêmur dos ratos:
 18 **A**, grupo solução salina e movimento dentário (M), **B**, grupo fluoxetina (F) no 14º dia. Os animais do
 19 grupo F apresentaram maior separação das trabéculas ósseas (Tb.Sp).
 20
 21

1 **Tabela III.** Médias e desvios padrão das variáveis: volume trabecular (BV/TV %), separação
 2 trabecular (Tb.Sp mm), número do trabeculado (Tb.N 1/mm), e espessura do trabeculado (Tb.Th
 3 mm), nos grupos fluoxetina e movimento dentário (FM), solução salina e movimento dentário (M) e
 4 fluoxetina (F)

5
6

Grupo/ Variáveis	FM (Média + DP)	M (Média + DP)	F (Média + DP)	Comparações-Teste de Tukey		
				FM x M (P)	FM x F (P)	M x F (P)
BV/TV						
3 dias	33,5 ± 3,97	32,6 ± 3,06	32,9 ± 3,34	0,99	1,00	1,00
7 dias	32,6 ± 3,99	32,6 ± 1,73	31,03 ± 5,83	1,00	0,98	0,99
14 dias	30,4 ± 2,86	32,1 ± 2,43	34,03 ± 2,26	0,98	0,54	0,97
Tb.Sp						
3 dias	0,26 ± 0,73	0,25 ± 0,542	0,12 ± 0,007	1,00	0,66	0,38
7 dias	0,27 ± 0,64	0,28 ± 0,274	0,12 ± 0,008	1,00	0,37	0,98
14 dias	0,34 ± 0,64	0,25 ± 0,445	0,13 ± 0,009	0,08	1,00	0,008*
Tb.N						
3 dias	2,51 ± 0,10	2,63 ± 0,18	2,55 ± 0,19	1,00	0,99	0,99
7 dias	2,61 ± 0,18	2,65 ± 0,07	2,43 ± 0,31	0,99	0,70	0,39
14 dias	2,33 ± 0,19	2,52 ± 0,19	2,52 ± 0,15	0,64	0,64	1,00
Tb.Th						
3 dias	0,12 ± 0,006	0,12 ± 0,005	0,31 ± 0,04	0,95	1,00	0,90
7 dias	0,12 ± 0,005	0,12 ± 0,005	0,34 ± 0,074	0,99	1,00	0,98
14 dias	0,13 ± 0,006	0,12 ± 0,005	0,33 ± 0,04	0,99	0,95	0,47

7

8

*Nível de significância para o teste de comparações múltiplas de Tukey $p < 0,05$

9

10

11

12 DISCUSSÃO

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

No presente estudo, foram avaliadas as possíveis mudanças na remodelação óssea ao aplicar uma força ortodôntica em ratos tratados com fluoxetina. A neoformação óssea foi determinada por meio do método de Picrosírius e luz polarizada. Os resultados não demonstraram diferença estatisticamente significativa entre grupos no 3º, 7º e 14º dias, quanto à porcentagem de colágeno imaturo ($p > 0,05$), no entanto, observou-se padrão inverso nos valores do colágeno entre os grupos FM e M ao longo dos intervalos de tempo, sugerindo, desta forma, que a fluoxetina atrasou o processo de maturação das fibras colágenas presentes na matriz óssea neoformada.

1 Estudos prévios demonstram a presença de elementos do sistema
2 serotoninérgico em osteoblastos, como a expressão de receptores 5-HT e
3 transportadores 5-HTT.^{3,7} Existem diversas vias pelas quais receptores 5-HT
4 atuam nessas células, entre elas, através da inibição da AMP cíclica e da proteína
5 quinase A (PKA), precursora no processo de fosforilação, reduzindo desta forma a
6 transcrição do fator CREB e diminuindo a proliferação de osteoblastos.²²

7 No estudo de Warden *et al* (2008) foi demonstrado diminuição da formação
8 óssea por meio de injeções de calceína e microscopia de fluorescência, no fêmur de
9 ratos *Swiss-Webster* tratados com fluoxetina 20 mg/kg/dia.²³ Resultados
10 semelhantes foram verificados por Warden *et al* (2005): a mutação para a ausência
11 do transportador 5-HTT e administração de fluoxetina em ratos C57BL/6J resultaram
12 em menor taxa de formação óssea e densidade mineral óssea reduzida em vários
13 sítios esqueléticos, como consequência da redução da atividade osteoblástica.²⁴
14 Em contrapartida, Westbroek *et al* não verificaram alterações na deposição da matriz
15 óssea por meio de secções coradas por coloração de Goldner no fêmur de ratos
16 *Sprague-Dawley* tratados com fluoxetina.⁸

17 Existem evidências de que o efeito da fluoxetina é dose-dependente. Em
18 ratos tratados com 5 mg/kg/dia e 20 mg/kg/dia, a dosagem mais alta levou à
19 diminuição do conteúdo mineral ósseo.²⁴ Sabe-se que a dose utilizada em ratos no
20 presente estudo (10 mg/Kg) resulta em níveis séricos similares aos mais baixos
21 encontrados em humanos tratados com 20 a 80 mg/dia, enquanto que doses de 18
22 mg/kg resultam em níveis séricos compatíveis com os mais altos encontrados em
23 humanos tratados com 20 a 80 mg/dia.¹¹ Este fato, associado ao pequeno número
24 da amostra e alto desvio padrão, pode ter contribuído para a ausência de
25 significância estatística dos resultados encontrados.

26 Durante o movimento dentário induzido, deve existir um equilíbrio entre a
27 neoformação e a reabsorção óssea. Para avaliar a área de reabsorção, utilizou-se o
28 método histoquímico TRAP, que consiste em um marcador preciso de osteoclastos²⁵.
29 Nos três intervalos de tempo observados, houve tendência de aumento no número
30 de osteoclastos no grupo FM com relação aos demais grupos, principalmente no 14º
31 dia, em que o número destas células no grupo FM foi duas vezes maior do que no
32 grupo M (Tabela II), no entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa
33 ($p>0,05$). Somente no 3º dia, verificou-se maior número de osteoclastos no grupo
34 FM com relação ao grupo F ($p<0,01$), possivelmente devido à ausência do

1 movimento dentário induzido neste último grupo. Sabe-se que o maior recrutamento
2 de osteoclastos ocorre no período inicial do movimento dentário induzido.¹⁰

3 Diversos estudos apontam os efeitos negativos causados no osso através do
4 bloqueio de 5H-TT por meio do uso da fluoxetina, como o aumento do número de
5 células TRAP – positivas (osteoclastos),^{1,23,27} e um fenótipo esquelético
6 caracterizado por redução da massa óssea, arquitetura óssea alterada e
7 propriedades mecânicas reduzidas. Contraditoriamente, outros estudos mostram
8 que a fluoxetina possui propriedades antiinflamatórias, diminuindo o nível de
9 citocinas em doenças inflamatórias, como a artrite reumatóide²⁸ podendo, desta
10 forma, inibir a perda óssea.

11 No estudo de Battaglino *et al*⁹, foi investigado o efeito da administração
12 local de fluoxetina na perda óssea mediante desafio inflamatório com LPS na
13 calvária de ratos *Swiss-Webster*. A fluoxetina, quando administrada isoladamente,
14 não resultou em aumento significativo de osteoclastos, no entanto, a combinação de
15 fluoxetina com LPS aumentou o número dessas células, bem como a quantidade de
16 neoformação óssea, indicando maior remodelação óssea em um contexto
17 inflamatório. Resultados similares foram encontrados em um experimento no qual a
18 fluoxetina reduziu a reabsorção óssea na área de furca do 1º molar de ratos *Wistar*
19 com doença periodontal induzida por ligadura metálica.²⁹ Neste mesmo estudo, foi
20 demonstrada a redução da expressão do mRNA da IL-1beta e da COX-2 nos tecidos
21 gengivais, confirmando o potencial antiinflamatório e a influência positiva da
22 fluoxetina na reabsorção óssea. Embora a fase inicial do movimento dentário
23 induzido seja caracterizada por inflamação aguda, responsável por desencadear
24 mudanças vasculares, síntese e liberação de prostaglandinas, citocinas e fatores de
25 crescimento, os quais induzem a diferenciação e proliferação de osteoclastos e
26 osteoblastos,³⁰ não foram identificadas mudanças quanto ao comportamento dessas
27 células no presente trabalho. Nossos resultados corroboram com os do estudo de
28 Westbroek *et al*,⁸ no qual secções realizadas em fêmures de ratos tratados com
29 fluoxetina 5mg/Kg durante 6 meses mostraram-se similares ao grupo controle ao
30 serem analisadas por TRAP.

31 Para avaliar as possíveis mudanças ocasionadas pela fluoxetina na micro-
32 arquitetura do osso trabecular, foi realizada micro-tomografia nos fêmures dos ratos
33 estudados. A micro-tomografia é uma técnica que permite a análise quantitativa e
34 qualitativa das microestruturas ósseas, por esta razão, é considerada uma

1 ferramenta importante no diagnóstico de patologias, como a osteoporose.^{31,32} O
2 tratamento com fluoxetina não demonstrou efeitos relevantes sobre o osso
3 trabecular neste estudo. Observou-se aumento na separação das trabéculas ósseas
4 (Tb.Sp) no grupo F comparado ao grupo M no 14º dia ($p < 0,05$), bem como no grupo
5 FM comparado ao grupo M, mas que não mostrou-se estatisticamente significativa.
6 Todos os outros parâmetros determinados por meio da micro-tomografia não
7 indicaram mudanças significantes. O aumento na separação das trabéculas é
8 indicativo de diminuição da qualidade óssea, e sugere possível desequilíbrio no
9 *turnover* ósseo. Warden *et al*²³ observaram aumento de 48,4 – 65,3% na separação
10 das trabéculas ósseas em ratos com ausência do transportador 5-HTT. No entanto,
11 diferenças nos outros parâmetros também foram identificadas, como diminuição do
12 volume ósseo e do número do trabeculado. Bonnet *et al*³³ também identificaram
13 alterações na micro-arquitetura do osso em ratos tratados com fluoxetina,
14 caracterizadas por menor volume ósseo trabecular e menor espessura das
15 trabéculas. Em contraste, o estudo de Westbroek *et al*⁸ não indicou alterações
16 importantes no osso de ratos por meio do uso da fluoxetina.

17 Evidências crescentes suportam a serotonina como um agente modulador
18 importante no osso. No entanto, são necessárias maiores investigações quanto às
19 bases moleculares para a exata função da serotonina no metabolismo ósseo, bem
20 como os efeitos de ISRS, pois nota-se que estes podem produzir efeitos antagônicos
21 sobre o osso e parecem atuar por meio de vias distintas.² No presente estudo,
22 apresentou-se os efeitos da fluoxetina no movimento dentário induzido e não foram
23 identificadas alterações importantes na neoformação e reabsorção ósseas, e na
24 microarquitetura do osso trabecular em ratos.

25

26

27

28 **CONCLUSÕES**

29

30 Pode-se concluir que a administração de fluoxetina 10 mg/Kg associada à
31 movimentação dentária induzida em ratos *Wistar*:

32

- 33 • Não provocou alterações no processo de maturação do colágeno na matriz
34 óssea neoformada;

- 1 • Não alterou a reabsorção óssea;
- 2 • Não provocou alterações importantes na microarquitetura do osso trabecular.

3

4 Agradecemos ao CNPq, pela concessão de auxílio financeiro para a
5 realização desta pesquisa, e ao Instituto Lamir da Universidade Federal do
6 Paraná, pela realização das micro-tomografias.

7

8 REFERÊNCIAS

9

- 10 1. Tsapakis E.M., Z. Gamie, G.T. Tran, S. Adshead, A. Lampard, A. Mantalaris, E.
11 Tsiridis. The adverse skeletal effects of selective serotonin reuptake inhibitors.
12 European Psychiatry 2012;156-169.
- 13 2. Bliziotis M. Uptake in Serotonin and Bone. J Clin Endocrinol Metab
14 2010;95:4124–4132.
- 15 3. Warden S.J and Haney E.M. Skeletal effects of serotonin (5-hydroxytryptamine)
16 transporter inhibition: Evidence from *in vitro* and animal-based studies. J
17 Musculoskelet Neuronal Interact 2008;8:121-132.
- 18 4. Battaglini R, Fu J, Spate U, Ersoy U, Joe M, Sedaghat L et al. Serotonin regulates
19 osteoclast differentiation through its transporter. J Bone Miner Res 2004;19:1420-
20 1431.
- 21 5. Bliziotis M, Eshleman A, Burt-Pichat B, Zhang XW, Hashimoto J, Wiren K et al.
22 Serotonin transporter and receptor expression in osteocytic MLO-Y4 cells. Bone
23 2006;39:1313-1321.
- 24 6. Bliziotis MM, Eshleman AJ, Zhang XW, Wiren KM. Neurotransmitter action in
25 osteoblasts: expression of a functional system for serotonin receptor activation and
26 reuptake. Bone 2001;29:477-486.
- 27 7. Gustafsson BI, Thommesen L, Stunes AK, Tommeras K, Westbroek I, Waldum HL
28 et al. Serotonin and fluoxetine modulate bone cell function in vitro. J Cell Biochem
29 2006;98:139-151.
- 30 8. Westbroek I, Waarsing JH, Van Leeuwen JP, Waldum H, Reseland JE, Weinans H
31 et al. Long-term fluoxetine administration does not result in major changes in bone
32 architecture and strength in growing rats. J Cell Biochem 2007;101:360-368.

- 1 9. Battaglino R, Vokes M, Schulze-Spate U, Sharma A, Graves D, Kohler T et al.
2 Fluoxetine treatment increases trabecular bone formation in mice. *J Cell Biochem*
3 2007;100:1387-1394.
- 4 10. Reitan K. Tissue Behavior during orthodontic tooth movement. *Am J Orthod*
5 1960;46:881-900.
- 6 11. Koran LM CJ, Dominguez RA, Rush AJ, Thiemann S. Are fluoxetine plasma
7 levels related to outcome in obsessive-compulsive disorder? *AM J Psychiatry*
8 1996;153:1450-1454.
- 9 12. Choi J BS, Lee JI, Chang YI. Effects of clodronate on early alveolar bone
10 remodeling and root resorption related to orthodontic forces: a histomorphometric
11 analysis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010;138(5):548 e541-548; discussion
12 548-549.
- 13 13. Retamoso LB, Knop LAH, Shintcovsk RL, Tanaka OM. Organization and
14 quantification of the collagen fibers in bone formation during orthodontic tooth
15 movement. *Micron* 2009:827-830.
- 16 14. Montes GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic
17 systems. *Cell. Biol. Int.* 1996;20:15-27.
- 18 15. Retamoso LB, Montagner F, Camargo ES, RWFV, Tanaka OM. Polarized Light
19 Microscopic Analysis of Bone Formation After Inhibition of Cyclooxygenase 1 and 2.
20 *The Anatomical Record* 2010;293:195-199.
- 21 16. Braga SM, Taddei SR, Andrade I, Jr., Queiroz-Junior CM, Garlet GP, Repeke CE
22 et al. Effect of diabetes on orthodontic tooth movement in a mouse model. *Eur J Oral*
23 *Sci* 2011;119:7-14.
- 24 17. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ et al.
25 Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units.
26 Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner*
27 *Res* 1987;2:595-610.
- 28 18. Hildebrand T, Laib A, Muller R, Dequeker J, Ruegsegger P. Direct three-
29 dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data
30 from spine, femur, iliac crest, and calcaneus. *J Bone Miner Res* 1999;14:1167-1174.
- 31 19. Dulawa Stephanie C HKA, Gundersen Brigitta and Hen Rene Effects of Chronic
32 Fluoxetine in Animal Models of Anxiety and Depression. *Neuropsychopharmacology*
33 2004;29:1321–1330.
- 34 20. Mundy GR. *Bone Remodeling and Its Disorders* 1999;2nd edition.

- 1 21. Juqueira LCU BG, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization
2 microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. .
3 Histochemical Journal 1979;11: 447-55.
- 4 22. Vijay K. Yadav J-HR, Nina Suda, Kenji Tanaka, Jay A. Gingrich, Günther, Schütz
5 FHG, Cherie Y. Chiang, Jeffrey D Zajac, Karl L. Insogna, J. John, Mann RH, Patricia
6 Ducey, and Gerard Karsenty. Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin
7 synthesis in the duodenum: an entero-bone endocrine axis. Cell 2008;135:825-837.
- 8 23. Warden SJ, Nelson IR, Fuchs RK, Blizotes MM, Turner CH. Serotonin (5-
9 hydroxytryptamine) transporter inhibition causes bone loss in adult mice
10 independently of estrogen deficiency. Menopause 2008;15:1176-1183.
- 11 24. Warden SJ, Robling AG, Sanders MS, Blizotes MM, Turner CH. Inhibition of the
12 serotonin (5-hydroxytryptamine) transporter reduces bone accrual during growth.
13 Endocrinology 2005;146:685-693.
- 14 25. Halleen JM, Tiitinen SL, Ylipahkala H, Fagerlund KM, Vaananen HK. Tartrate-
15 resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption. Clin Lab
16 2006;52:499-509.
- 17 26. Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, Matsuzaki K, Tsurukai T, Itoh K et al.
18 Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of
19 osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor:
20 receptor activator of NF-kappa B ligand. Bone 1999;25:517-523.
- 21 27. N. Bonnet, P. Bernard, H Beaupied, J.C. Bizot, F. Trovero, D. Courteix CLB.
22 Various effects of antidepressant drugs on bone microarchitecture, mechanical
23 properties and bone remodeling. Toxicology and Applied Pharmacology
24 2007;221:111-118.
- 25 28. Roumestan C MA, Bichon F, Portet K, Detoc M, Henriquet C, Jaffuel D, Matthieu
26 M. Anti-inflammatory properties of desipramine and fluoxetine. Respir Res.
27 2007;3:8:35.
- 28 29. Branco-de-Almeida LS, Franco GC, Castro ML, Dos Santos JG, Anbinder AL,
29 Cortelli SC et al. Fluoxetine inhibits inflammatory response and bone loss in a rat
30 model of ligature-induced periodontitis. J Periodontol 2012;83:664-671.
- 31 30. Davidovitchb VKaZe. Cellular, molecular, and tissue-level reactions
32 to orthodontic force. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2006;129:1-460e.432.

- 1 31. E. Sales a lLa, J.T.de Assis, W.Gomez , W.C.A.Pereira, R.T.Lopes. Bone quality
2 analysis using X-raymicrotomography and microfluorescence. Applied Radiation and
3 Isotopes 2012;70:1272-1276.
- 4 32. I. Limaa, M.J. Anjos, M.L.F. Farias, N. Parcegoni, D. Rosenthal , R.T. Lopes.
5 Bone diagnosis by X-ray techniques. European Journal of Radiology 2008;68S:S100-
6 S103.
- 7 33. Bonnet N, Bernard P, Beaupied H, Bizot JC, Trovero F, Courteix D et al. Various
8 effects of antidepressant drugs on bone microarchitecture, mechanical properties
9 and bone remodeling. Toxicol Appl Pharmacol 2007;221:111-118.
- 10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

1

2

3

4

5

6

7 **2 ARTIGO EM INGLÊS**

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

1 **THE EFFECT OF FLUOXETINE ON INDUCED TOOTH MOVEMENT IN**
2 **RATS**

3

4

5 **Giovana Carla Franzon Frigotto**, DDS, MSD

6 Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil

7 School of Health and Biosciences

8 Graduate Program in Dentistry - Orthodontics

9 Email : gifrigotto@hotmail.com

10

11 **Elisa Souza Camargo**, DDS, MSD, PhD

12 Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil

13 School of Health and Biosciences

14 Graduate Program in Dentistry - Orthodontics

15 Email : escamargo@uol.com.br

16

17 **Aline Cristina Batista Rodrigues Johann**, DDS, MSD, PhD

18 Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil.

19 School of Health and Biosciences

20 Graduate Program in Dentistry – Histopathology

21 Email: aline.johann@pucpr.br

22

23 **Corresponding author**

24 **Elisa Souza Camargo**

25 Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil

26 School of Health and Biosciences

27 Graduate Program in Dentistry - Orthodontics

28 Adress: Rua Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho

29 80215-901 Curitiba, Paraná, Brazil

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

31 Email: escamargo@uol.com.br

32

33

1 ABSTRACT

2

3 **Introduction:** Fluoxetine is an antidepressant widely used and related to various
4 effects on bone mineral density. The aim of this study was to evaluate the effect of
5 fluoxetine on induced tooth movement. **Materials and Method:** Seventy two Wistar
6 rats were divided into groups: M (n=24) - saline solution with tooth movement, FM
7 (n=24) – fluoxetine with tooth movement and F (n=24) – fluoxetine. Group M received
8 saline solution 0,9 % and groups FM and F received fluoxetine 10 mg/kg, daily, from
9 the beginning to the end of the experiment. After 30 days of fluoxetine or saline
10 chronic administration, an orthodontic appliance (30 cN) moved the first molar to
11 mesial in M and FM groups. The animals were killed 3, 7 and 14 days after
12 orthodontic appliances placement. The animals of group F were not submitted to
13 induced tooth movement but were killed after the same time intervals. The collagen
14 neoformation was evaluated by polarization microscopy, the number of osteoclasts
15 by Tartar Resistent Acid Phosphatase (TRAP), and trabecular bone by femur micro-
16 computed tomography (Micro-Tc). **Results:** A reverse pattern was observed in newly
17 formed collagen among FM and M groups over the time intervals, that was not
18 statistically significant ($p>0,05$). A greater number of osteoclasts was observed in FM
19 group compared to F group on day 3 ($p<0,01$). An increase in trabecular spacing was
20 verified in group F compared to group M on day 14 ($p<0,05$). **Conclusions:**
21 Fluoxetine did not interfere on induced tooth movement and on trabecular bone in
22 rats.

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1 INTRODUCTION

2

3

4 Fluoxetine is a drug widely used in the treatment of depressions and other
5 psychological disturbances.¹ It belongs to the class of selective serotonin reuptake
6 inhibitors (SSRI), and it is involved in the increase of serotonergic neurotransmission
7 in some areas of the brain by increasing the release of serotonin (5-hydroxytryptamine
8 (5-HT)). The serotonin is a monoamine synthesized in two phases from the essential
9 tryptophan and the enzyme tryptophan hydroxylase (TPH), and its release is related
10 to behavioral, psychological and cognitive functions.² These effects are mediated by
11 seven families of receptors 5-HT (5-HT1 – 5-HT7), and regulated by the transporter
12 5-HTT, which is responsible for transporting 5-HT to inside the cell. Pharmacological
13 agents such as fluoxetine antagonize the transporter 5-HTT, and consequently
14 potentialize the serotonergic activity, relieving the symptoms of depression^{2,3}.

15 Some studies report the expression of elements of serotonergic system in
16 bone cells, such as the presence of receptors 5-HT and transporters 5-HTT in
17 osteoclasts and osteoblasts, and the influence of those in cellular bone activity.⁴⁻⁷
18 Earlier studies demonstrated that 5-HT regulates proliferation, differentiation and
19 activation of bone cells in vitro, thus, the interference in serotonergic system via
20 blockage of 5-HTT could alter bone metabolism. There are reports indicating the
21 interference of SSRI such as fluoxetine on bone, causing a decrease in bone mineral
22 density and, as a consequence, increased risk of fractures¹; however, researches
23 results are conflicting regarding these effects.^{1,8,9}

24 The induced tooth movement is a complex process activated by
25 biomechanical forces that causes tissue alterations characterized by bone resorption
26 mediated by osteoclasts on the compression side and bone apposition mediated by
27 osteoblasts on traction side¹⁰. Although there are indicating of fluoxetine interference
28 on bone metabolism, it is not described in the literature its impact on induced tooth
29 movement.

30 The aim of this study was therefore to evaluate the effect of fluoxetine
31 administration on bone remodeling during induced tooth movement, as well as
32 evaluate the changes of trabecular bone micro-architecture in rats.

33

34

1 MATERIALS AND METHOD

2

3

4 This research was approved by the Ethics Committee for Animals of Pontifícia
5 Universidade Católica do Paraná and registered under the protocol number 633.

6 The sample consisted of seventy two male Wistar rats (*Rattus norvegicus*
7 *albinus*), nine weeks old, weighing 300-350g, originally from the biotery of PUCPR.
8 The animals were weighted using a precision scale (Gehaka – BG 4001) on the first
9 day of the experiment and every day after that until their death in order to adjust drug
10 dose. The animals were randomly divided into three groups: M (n=24) – saline
11 solution with tooth movement; FM (n=24) – fluoxetine with tooth movement and F
12 (n=24) – fluoxetine without tooth movement. In group M, the rats received 1 ml of
13 saline solution 0,9 % via intraperitoneal (LBS, Laborasa Indústria Farmacêutica
14 LTDA, São Paulo, SP, Brasil), daily. Groups FM and F received daily applications of
15 fluoxetine [10 mg/ml], 10 mg/Kg, dilluted in propyleneglycol 53,3%, sodium chloride
16 0,9% and sodium benzoate 0,1% (Laboratório Farmacêutico da PUCPR, Curitiba,
17 PR, Brasil), via intraperitoneal. The dose was chosen in accordance to the study of
18 Koran et al (1996)¹¹, being compatible with clinical use in humans.

19 In the 30th day of the drug or saline solution administration, an orthodontic
20 appliance was installed in groups FM and M respectively. The orthodontic appliance
21 was in accordance with the model proposed by Choi et al (2010)¹², which consisted
22 of a closed nickel titanium coil spring (G&H Wire, Franklin, IN), and stainless steel
23 ligature wire 0,025” (Morelli, São Paulo, Brasil). The spring was fixed on the first
24 upper molar on the right and on the upper incisor on the right. In order to provide
25 more stability to the spring, the inferior incisors were abraded and the superior
26 incisors were tied up together using Charisma composite resin (Heraeus, Hanau,
27 Germany) after conditioning with phosphoric acid 37% (Condac 37, FGM, Joinville,
28 SC, Brazil) and adhesive system (Adper Single Bond, 3M ESPE, St. Paul, MN). The
29 reciprocal force produced by the spring was 30 cN¹³, standartized through a
30 tensioner (Haag-Streit AG, Koeniz, Switzerzlerland), causing mesial movement of the
31 molar. In order to install the devices, the animals were sedated using intramuscular
32 injections of Tiletamine/Zolazepam 50 mg/Kg (Zoletil®, Virbac Brasil Indústria e
33 Comércio LTDA., Jurubatuba ,SP, Brazil).

1 The applications of fluoxetine and saline solution continued to be administered
2 until the animals death, which happened on the 3th, 7th e 14th days after the
3 installation of the orthodontic appliance, by intraperitoneal injection of sodium
4 pentobarbital 100mg/Kg, (Cotia, SP, Brazil). The animals belonging to the F group,
5 without orthodontic movement, were killed after 33, 37 and 44 days of drug
6 application. A blood sample of 9ml was collected from groups F and FM through
7 cardiac puncture and inserted in a tube with separator gel (Labor Import, Sao Paulo,
8 Brazil) without anticoagulant. In order to confirm the administration of fluoxetine, the
9 blood samples were then analyzed at the Laboratório de Análises Clínicas Lanac
10 (Curitiba, PR, Brazil) where drug plasma level was quantified through High
11 Performance Liquid Chromatography (HPLC).

12 The right hemi-maxilla of each animal was removed, dissected, and fixed in
13 formaldehyde 10% during 24 hours and then decalcified in EDTA 5% during three
14 months. The specimens were processed and embedded in paraffin at the
15 Experimental Pathology Laboratory at PUCPR. After that, ten cross-sections in the
16 mesiobuccal root were performed. The sections had 4 µm thickness and 60 µm
17 interval, starting from the cervical third in apical direction. The sections were stained
18 through Picrosirius histochemical technique (5 sections) and Tartar Resistent Acid
19 Phosphatase - TRAP (5 sections).

20 In order to evaluate compare the micro architecture of trabecular bone of the
21 rats treated with fluoxetine, the left femur of the animals was removed, dissected and
22 frozen at a temperature of -20 °C and later evaluated through micro computed
23 tomography.

24

25

26 **Histological Analysis**

27

28 In sections stained with picrosirius, the distal area of the mesiobuccal root
29 (traction area) was selected for analysis.¹³ An image was captured using an Olympus
30 BX-50 microscope (Olympus, Tokyo, Japan), with an original magnification of 100x,
31 with U-Pot Olympus® polarizer filter (Olympus, Tokyo, Japan) coupled to a Dinolite®
32 AM 423X micro camera (AmMo Eletronica Corporation, New Taipei, Taiwan).

33 The images were edited through Adobe Photoshop® CS6® (Adobe Systems
34 Incorporated, CA). The periodontal ligature and the root were excluded from the

1 images permitting the analysis of the bone tissue. In order to evaluate the collagen,
2 the software Image Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD) was
3 used. A greenish coloration indicates the presence of collagen type III (immature),
4 less organized and with thinner fibers, whereas a reddish coloration indicates the
5 presence of collagen type I (mature), with thicker fibers and better organization,
6 parallel to the source of light.^{14,15} The average percentage of each kind of collagen
7 was obtained by the average of the five sections.

8 The TRAP coloration was performed using the TRAP 387 Kit (Sigma-Aldrich
9 Co, St Louis, MO) according to the manufacturer instructions. From each section, 5
10 images of the mesiobuccal root at the mesial region (compression area) were
11 captured comprehending a total area of 942.813,00 μm^2 , using an Olympus BX-50
12 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) coupled to a micro camera Dinolite® AM 423X
13 (AmMo Eletronics Corporation, New Taipei City, Taiwan) with magnification 423x.¹⁶
14 The image acquisition method was standardized during the capture process. The
15 number of osteoclasts was counted using the program Image Pro-Plus 4.5 (Media
16 Cybernetics, Silver Spring MD), into which was created a scale for counting. The
17 multi nucleated cells, TRAP-positive in the periodontal ligature adjacent to the
18 alveolar bone, were considered osteoclasts. In order to obtain the number of
19 osteoclasts, the average of the five sections was calculated.¹⁶

20

21

22 **Micro-CT Analysis**

23

24 The femur distal epiphysis was analyzed using computerized micro
25 tomography system (SkyScan 1076, Kontich, Belgian), with a voltage of 100kW,
26 100 μA current and 1.0mm aluminum filter. The samples were kept inside a cylindrical
27 sampler that allowed the correct axial alignment and sample stability during the
28 image capture.⁹As a result, 200 cuts with 9 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ resolution were obtained in the
29 central area of the distal epiphysis of each femur using 180° rotation and 0,4°
30 increments. After that, the raw data was reconstructed through the *software* NRecon
31 1.4.4 (SkyScan 1076, Kontich, Belgian), the volume of interest to the analysis was
32 selected (VOI) and put in a binary format. The cortical bone was excluded. Three-
33 dimensional analysis was performed using the software Analyser 1.12 (SkyScan
34 1076, Kontich, Belgian) with which the morphometric rates were calculated including:

1 trabecular volume (BV/TV%), which corresponds to the volume occupied by the
2 trabecular bone, mineralized or not, expressed as the percentage of the volume
3 occupied by the medulla and bone trabecula; trabecular thickness (Tb.Th), that
4 determines the thickness of bone trabecula; trabecular separation (Tb.Sp), which
5 corresponds to the distance between the medial points of bone trabeculas;
6 trabecular number (Tb.N), which corresponds to the number of trabeculas per tissue
7 millimeter.^{17,18}

8

9 **Statistical Analysis**

10

11 The statistical analysis was performed using the Statistical Package for the
12 Social Science 19.0 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL) and Statistica 7 (Statsoft,
13 Inc., Tulsa, OK). The verification of the normality and homogeneity was performed
14 using the Kolmogorov-Smirnov and Levene tests, respectively, both at a significance
15 level of 0,05.

16 When the tests accused a normal distribution, or symmetrical distribution and
17 variances homogeneity of the random variable per group and time, ANOVA and
18 Tukey were used. When the variables presented normal distribution and
19 heterogeneous variance according to group and time, the Games-Howell parametric
20 multiple comparisons test was used.

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

1 RESULTS

2

3

4

5

6

7

8

Table I. Means and standard deviations of fluoxetine plasma levels (ug/L)

Group/ Time	FM (Mean ± SD)	F (Mean ± SD)	Comparisons - Tukey Test	
			M (Mean ± SD)	FM x F (P)
3 days	273,8 ± 32,2	285,8 ± 42,8	0,000	0,9980
7 days	282,5 ± 41,8	327,7 ± 42,6	0,000	0,5895
14 days	348,6 ± 51,4	307,7 ± 97,9	0,000	0,6879

9

10

Level of significance adopted for Tukey test: $p < 0,05$

11

12

13

14

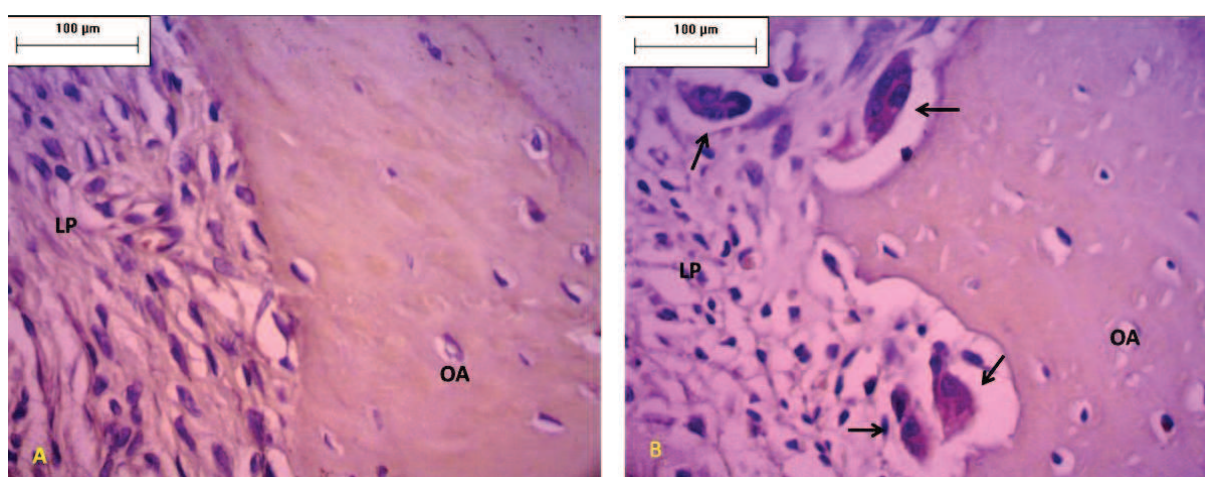
15

16

17

18

No significant difference was found in immature collagenous quantification among groups at time intervals ($p > 0,05$) (Table II). A greater number of osteoclasts was observed in group FM compared to group F on day 3 ($p < 0,01$) (Fig 1). On the subsequent days, there were no differences between groups ($p > 0,05$) (Table II).



19

20

21

22

23

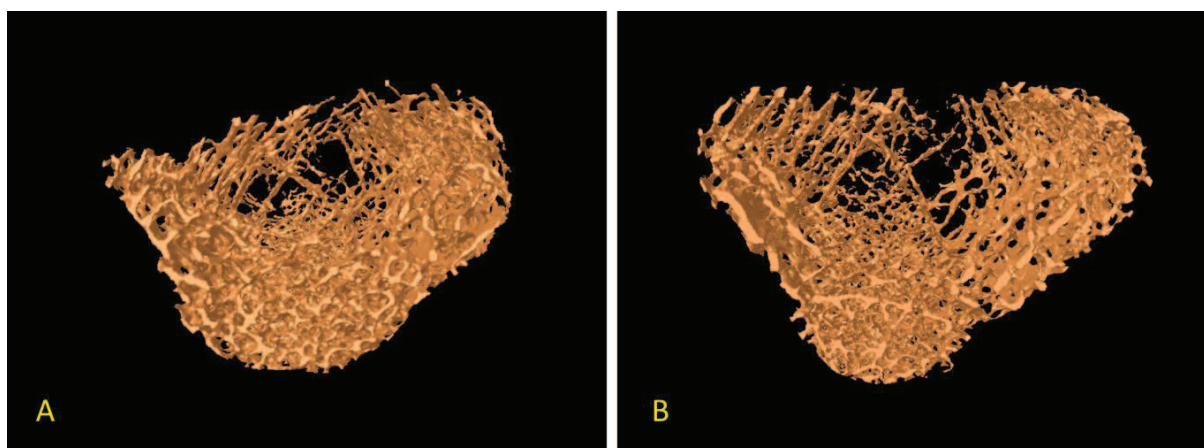
Fig 1. Evaluation of bone resorption showing a greater number of osteoclasts (arrows) in group FM. **A**, group fluoxetine (F). **B**, group fluoxetine and tooth movement (FM). **LP**, periodontal ligament; **OA**, alveolar bone.

1 **Table II.** Means and standard deviations of osteoclasts number and collagen type III percentage in the
 2 fluoxetine and tooth movement group (FM), saline solution and tooth movement group (M) and
 3 fluoxetine group (F)
 4

Group/ Variables	FM (Mean ± SD)	M (Mean ± SD)	F (Mean ± SD)	Comparisons-Games-Howell Test		
				FM X M (P)	FM X F (P)	M X F (P)
Osteoclasts						
3 days	3,64 ± 1,68	3,01 ± 2,13	0,2 ± 0,27	0,9986	0,0093*	0,0891
7 days	1,51 ± 1,38	1,26 ± 0,74	0,9 ± 1,0	0,9999	0,9837	0,9970
14 days	3,2 ± 1,91	1,5 ± 0,77	0,67 ± 0,66	0,4266	0,0939	0,3742
Collagen type III						
3 days	10,73 ± 3,92	17,37 ± 12,53	15,86 ± 7,08	0,8601	0,6870	1,0000
7 days	12,2 ± 2,63	13,55 ± 13,57	15,89 ± 9,67	1,0000	0,9692	1,0000
14 days	16,26 ± 6,49	10,44 ± 5,07	12,12 ± 8,80	0,5687	0,9692	0,9999

5
 6 * Significance level to Games-Howell test: $p < 0,05$
 7
 8

9 It was verified an increase in trabecular separation (Tb.Sp) in F group
 10 compared to M group on day 14 ($p < 0,05$) (Fig 2; Table III). There were no significant
 11 differences between FM and M groups in relation to other morphometric parameters
 12 concerning the bone micro architecture in any other periods studied ($p > 0,05$).
 13



14
 15
 16 **Fig 2.** Images representing the tridimensional reconstruction of trabecular bone of rats femur: A, with
 17 saline solution (M); B, with fluoxetine (F) on the 14 ° day. The animals from F group presented
 18 greater trabecular separation (Tb.Sp).
 19
 20
 21
 22

1 Table III. Means and standard deviations of the variables: trabecular volume (BV/TV %); trabecular
 2 separation (Tb.Sp mm); trabecular number (Tb.N 1/mm); trabecular thickness (Tb.Th mm), in
 3 fluoxetine with tooth movement group (FM) saline solution with tooth movement group (M) and
 4 fluoxetine group (F)
 5

Group/ Variables	FM (Mean + SD)	M (Mean + SD)	F (Mean+ SD)	Comparisons-Tukey Test		
				FM x M (P)	FM x F (P)	M x F (P)
BV/TV						
3 days	33,5 ± 3,97	32,6 ± 3,06	32,9 ± 3,34	0,99	1,00	1,00
7 days	32,6 ± 3,99	32,6 ± 1,73	31,03 ± 5,83	1,00	0,98	0,99
14 days	30,4 ± 2,86	32,1 ± 2,43	34,03 ± 2,26	0,98	0,54	0,97
Tb.Sp						
3 days	0,26 ± 0,73	0,25 ± 0,542	0,12 ± 0,007	1,00	0,66	0,38
7 days	0,27 ± 0,64	0,28 ± 0,274	0,12 ± 0,008	1,00	0,37	0,98
14 days	0,34 ± 0,64	0,25 ± 0,445	0,13 ± 0,009	0,08	1,00	0,008*
Tb.N						
3 days	2,51 ± 0,10	2,63 ± 0,18	2,55 ± 0,19	1,00	0,99	0,99
7 days	2,61 ± 0,18	2,65 ± 0,07	2,43 ± 0,31	0,99	0,70	0,39
14 days	2,33 ± 0,19	2,52 ± 0,19	2,52 ± 0,15	0,64	0,64	1,00
Tb.Th						
3 days	0,12 ± 0,006	0,12 ± 0,005	0,31 ± 0,04	0,95	1,00	0,90
7 days	0,12 ± 0,005	0,12 ± 0,005	0,34 ± 0,074	0,99	1,00	0,98
14 days	0,13 ± 0,006	0,12 ± 0,005	0,33 ± 0,04	0,99	0,95	0,47

6
 7 Level of significance for Tukey multiple comparisons test $p < 0,05$
 8
 9

10 11 DISCUSSION

12
 13 The objective of the present study was to evaluate possible changes in bone
 14 remodeling as a result of orthodontic force application in rats treated with fluoxetine.
 15 Bone formation was determined through Picrosirius polarization method. The results
 16 showed no statistical differences between groups regarding the collagen
 17 neoformation ($p > 0,05$), however there was an inverse pattern of collagen values
 18 between groups M and FM over time intervals, suggesting thereby that fluoxetine
 19 delayed maturation of collagen fibers present in the newly formed bone matrix.

20 Earlier studies demonstrated the presence of elements from the serotonergic
 21 system in osteoblasts, such as the expression of 5-HT receptors and 5-HTT
 22 transporters.^{3 7} There are several ways through which 5-HTR acts in these cells, one

1 of which is the AMPc and protein kinase A (PKA) inhibition, precursory in
2 phosphorylation process, reducing the transcription of CREB factor and reducing
3 osteoblast proliferation²².

4 Warden et al (2008) demonstrated reduction of bone formation through the
5 application of calcein injections and fluorescence microscopy in the femur of Swiss-
6 Webster rats treated with fluoxetine 20mg/kg/day.²³ Similar results were reported by
7 Warden (2005): mutation for the absence of the transporter 5-HTT and administration
8 of fluoxetine in rats C57BL/6J resulted in lower level of bone formation and reduced
9 bone mineral density in several skeletal sites, as a consequence of the reduction of
10 osteoblastic activity.²⁴

11 There are evidences supporting that the effect of the fluoxetine is dose-
12 dependent. In rats treated with 5mg/kg/day and 20/mg/kg/day, the higher dosage led
13 to reduction bone mineral content.²⁴ It is known that the dose used in rats in this
14 study (10mg/kg) results in serum levels similar to the lowest levels verified in human
15 treated with 20 to 80 mg/day, while doses of 18 mg/kg result in serum levels
16 compatible with the higher found in human treated with 20 to 80 mg/day.¹¹ This fact,
17 associated with the small sample size and high standard deviation may have
18 contributed to lack of statistical significance of results.

19 During induced tooth movement, there must be a balance between
20 neoformation and bone resorption. In order to evaluate resorption area, the
21 histochemical method TRAP, which is a precise osteoclast marker²⁵, was used.
22 During the three stages observed, there was a tendency for the number of
23 osteoclasts to increase in F group in relation to the other groups, however this
24 difference was not statistically significant ($p>0,05$). It was only on the 3^o day that an
25 increase in the number of osteoclasts was noted in FM group compared to F group
26 ($p<0,01$), possibly due to the lack of induced tooth movement in the latter. It is known
27 that the greater osteoclast recruitment happens in earlier stages of induced tooth
28 movement.¹⁰

29 Several studies point the negative effects caused in the bone by the blockage
30 of the 5H-TT through the use of fluoxetine, for example the increase in the number of
31 positive TRAP cells (osteoclasts)^{1,23,27}, and a skeletal phenotype characterized by the
32 reduction of the bone mass, altered bone architecture and reduced mechanical
33 properties. Contradictorily, other studies have shown that the fluoxetine has anti-

1 inflammatory properties that reduce the cytokine level in inflammatory diseases, such
2 as rheumatoid arthritis²⁸ helping to inhibit the bone loss.

3 In the study by Battaglino *et al*⁹, there was an investigation of the effect of the
4 local administration of fluoxetine in the bone loss by inflammatory challenge with LPS
5 in the calvarium of Swiss-Webster rats. The fluoxetine, when given alone, did not
6 result in significant increase of osteoclasts; however, combination of fluoxetine with
7 LPS increased the number of those cells, as well as the quantity of bone
8 neoformation indicating a greater bone remodeling in an inflammatory context.
9 Similar results were found in an experiment in which fluoxetine reduced bone
10 resorption in furcation area of the 1° molar in Wistar rats with periodontal disease
11 induced by metallic ligature.²⁹ At the same study there was a demonstration of
12 reduction of the mRNA expression of the IL-1beta and of the COX-2 in gingival
13 tissues confirming the anti-inflammatory potential and the positive influence of
14 fluoxetine in bone resorption. Although the initial phases of the induced dental
15 movement are characterized by acute inflammation, responsible for vascular
16 changes, synthesis and liberation of prostaglandins, cytokines, and growth factors,
17 which induce differentiation and proliferation of osteoclasts and osteoblasts,³⁰ there
18 was no evidence of changes related to the behavior of these cells in the present
19 study. The results found in our research corroborate results of the study by
20 Westbroek *et al*,⁸ in which femur sections performed in rats treated with fluoxetine
21 5mg/kg during 6 months were similar to those of the control group when analyzed by
22 TRAP.

23 In order to evaluate the changes caused by the fluoxetine in the micro
24 architecture of the trabecular bone, a micro-computed tomography was performed in
25 the femurs of the rats under study. The micro-CT is a technique that allows the
26 quantitative and qualitative analysis of the bone microstructures, being considered an
27 important tool in the diagnosis of pathologies such as osteoporosis.^{31,32} The
28 treatment with fluoxetine did not show any relevant effect on the trabecular bone on
29 this study. There was an increase in trabecular bone separation (Tb.Sp) in group F
30 compared to group M on the 14th day ($p < 0,05$), as well as in group FM compared to
31 group M, but that was not statistically significant. All other parameters determined by
32 micro-CT showed no significant changes. This result is indicative of bone quality
33 reduction and suggests possible unbalance in the bone turnover. Warden *et al*²³
34 observed an increase of 48,4 – 65,3% in trabecular bone separation in rats with

1 absence of the transporter 5-HTT. However, some differences in other parameters
2 were also identified, such as the reduction of the bone volume and decrease of the
3 trabecular number. Bonnet *et al*³³ also identified alterations in the micro architecture
4 of bone in rats treated with fluoxetine, characterized by lower trabecular bone volume
5 and lower trabecular thickness. In contrast, the study of Westbroek *et al*⁸ did not
6 indicate important alterations in bone of rats due to the use of fluoxetine.

7 There have been evidences supporting serotonin as an important modulator
8 agent in the bone. However, further investigations are necessary regarding the
9 molecular basis for the exact function of serotonin in bone metabolism, as well as
10 SSRI effects, as these seem to act distinctly.² In the present study, the effects of
11 fluoxetine in induced tooth movement were presented and no significant alterations
12 were identified in bone neoformation and resorption and in the trabecular bone micro-
13 architecture of rats.

17 CONCLUSIONS

20 It can be concluded that the administration of fluoxetine 10mg/Kg in
21 association with induced tooth movement in Wistar rats:

- 23 • Did not cause changes in the maturation of newly formed collagen in bone
24 matrix;
- 25 • Did not alter the bone resorption;
- 26 • Did not cause major changes in the microarchitecture of trabecular bone

29 We thank CNPq for provinding financial support for this research, and Lamir
30 Institute of Universidade Federal do Paraná, for performing the micro-CT analysis.

1 REFERENCES

- 2
- 3 1. Tsapakis E.M., Z. Gamie, G.T. Tran, S. Adshead, A. Lampard, A. Mantalaris, E.
4 Tsiridis. The adverse skeletal effects of selective serotonin reuptake inhibitors.
5 European Psychiatry 2012;156-169.
- 6 2. Bliziotis M. Uptake in Serotonin and Bone. J Clin Endocrinol Metab
7 2010;95:4124–4132.
- 8 3. Warden S.J and Haney E.M. Skeletal effects of serotonin (5-hydroxytryptamine)
9 transporter inhibition: Evidence from *in vitro* and animal-based studies. J
10 Musculoskelet Neuronal Interact 2008;8:121-132.
- 11 4. Battaglino R, Fu J, Spate U, Ersoy U, Joe M, Sedaghat L et al. Serotonin regulates
12 osteoclast differentiation through its transporter. J Bone Miner Res 2004;19:1420-
13 1431.
- 14 5. Bliziotis M, Eshleman A, Burt-Pichat B, Zhang XW, Hashimoto J, Wiren K et al.
15 Serotonin transporter and receptor expression in osteocytic MLO-Y4 cells. Bone
16 2006;39:1313-1321.
- 17 6. Bliziotis MM, Eshleman AJ, Zhang XW, Wiren KM. Neurotransmitter action in
18 osteoblasts: expression of a functional system for serotonin receptor activation and
19 reuptake. Bone 2001;29:477-486.
- 20 7. Gustafsson BI, Thommesen L, Stunes AK, Tommeras K, Westbroek I, Waldum HL
21 et al. Serotonin and fluoxetine modulate bone cell function in vitro. J Cell Biochem
22 2006;98:139-151.
- 23 8. Westbroek I, Waarsing JH, Van Leeuwen JP, Waldum H, Reseland JE, Weinans H
24 et al. Long-term fluoxetine administration does not result in major changes in bone
25 architecture and strength in growing rats. J Cell Biochem 2007;101:360-368.
- 26 9. Battaglino R, Vokes M, Schulze-Spate U, Sharma A, Graves D, Kohler T et al.
27 Fluoxetine treatment increases trabecular bone formation in mice. J Cell Biochem
28 2007;100:1387-1394.
- 29 10. Reitan K. Tissue Behavior during orthodontic tooth movement. Am J Orthod
30 1960;46:881-900.
- 31 11. Koran LM CJ, Dominguez RA, Rush AJ, Thiemann S. Are fluoxetine plasma
32 levels related to outcome in obsessive-compulsive disorder? AM J Psychiatry
33 1996;153:1450-1454.

- 1 12. Choi J BS, Lee JI, Chang YI. Effects of clodronate on early alveolar bone
2 remodeling and root resorption related to orthodontic forces: a histomorphometric
3 analysis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010;138(5):548 e541-548; discussion
4 548-549.
- 5 13. Retamoso LB, Knop LAH, Shintcovsk RL, Tanaka OM. Organization and
6 quantification of the collagen fibers in bone formation during orthodontic tooth
7 movement. *Micron* 2009:827-830.
- 8 14. Montes GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic
9 systems. *Cell. Biol. Int.* 1996;20:15-27.
- 10 15. Retamoso LB, Montagner F, Camargo ES, RWFV, Tanaka OM. Polarized Light
11 Microscopic Analysis of Bone Formation After Inhibition of Cyclooxygenase 1 and 2.
12 *The Anatomical Record* 2010;293:195-199.
- 13 16. Braga SM, Taddei SR, Andrade I, Jr., Queiroz-Junior CM, Garlet GP, Repeke CE
14 et al. Effect of diabetes on orthodontic tooth movement in a mouse model. *Eur J Oral*
15 *Sci* 2011;119:7-14.
- 16 17. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ et al.
17 Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units.
18 Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner*
19 *Res* 1987;2:595-610.
- 20 18. Hildebrand T, Laib A, Muller R, Dequeker J, Ruegsegger P. Direct three-
21 dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data
22 from spine, femur, iliac crest, and calcaneus. *J Bone Miner Res* 1999;14:1167-1174.
- 23 19. Dulawa Stephanie C HKA, Gundersen Brigitta and Hen Rene Effects of Chronic
24 Fluoxetine in Animal Models of Anxiety and Depression. *Neuropsychopharmacology*
25 2004;29:1321–1330.
- 26 20. Mundy GR. *Bone Remodeling and Its Disorders* 1999;2nd edition.
- 27 21. Junqueira LCU BG, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization
28 microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. .
29 *Histochemical Journal* 1979;11: 447-55.
- 30 22. Vijay K. Yadav J-HR, Nina Suda, Kenji Tanaka, Jay A. Gingrich, Günther, Schütz
31 FHG, Cherie Y. Chiang, Jeffrey D Zajac, Karl L. Insogna, J. John, Mann RH, Patricia
32 Ducy, and Gerard Karsenty. *Lrp5* controls bone formation by inhibiting serotonin
33 synthesis in the duodenum: an entero-bone endocrine axis. *Cell* 2008;135:825-837.

- 1 23. Warden SJ, Nelson IR, Fuchs RK, Bliziotis MM, Turner CH. Serotonin (5-
2 hydroxytryptamine) transporter inhibition causes bone loss in adult mice
3 independently of estrogen deficiency. *Menopause* 2008;15:1176-1183.
- 4 24. Warden SJ, Robling AG, Sanders MS, Bliziotis MM, Turner CH. Inhibition of the
5 serotonin (5-hydroxytryptamine) transporter reduces bone accrual during growth.
6 *Endocrinology* 2005;146:685-693.
- 7 25. Halleen JM, Tiitinen SL, Ylipahkala H, Fagerlund KM, Vaananen HK. Tartrate-
8 resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption. *Clin Lab*
9 2006;52:499-509.
- 10 26. Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, Matsuzaki K, Tsurukai T, Itoh K et al.
11 Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of
12 osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor:
13 receptor activator of NF-kappa B ligand. *Bone* 1999;25:517-523.
- 14 27. N. Bonnet, P. Bernard, H Beaupied, J.C. Bizot, F. Trovero, D. Courteix CLB.
15 Various effects of antidepressant drugs on bone microarchitecture, mechanical
16 properties and bone remodeling. *Toxicology and Applied Pharmacology*
17 2007;221:111-118.
- 18 28. Roumestan C MA, Bichon F, Portet K, Detoc M, Henriquet C, Jaffuel D, Matthieu
19 M. Anti-inflammatory properties of desipramine and fluoxetine. *Respir Res.*
20 2007;3:8:35.
- 21 29. Branco-de-Almeida LS, Franco GC, Castro ML, Dos Santos JG, Anbinder AL,
22 Cortelli SC et al. Fluoxetine inhibits inflammatory response and bone loss in a rat
23 model of ligature-induced periodontitis. *J Periodontol* 2012;83:664-671.
- 24 30. Davidovitchb VKaZe. Cellular, molecular, and tissue-level reactions
25 to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;129:1-460e.432.
- 26 31. E. Sales a ILa, J.T.de Assis, W.Gomez , W.C.A.Pereira, R.T.Lopes. Bone quality
27 analysis using X-raymicrotomography and microfluorescence. *Applied Radiation and*
28 *Isotopes* 2012;70:1272-1276.
- 29 32. I. Limaa, M.J. Anjos, M.L.F. Farias, N. Parcegoni, D. Rosenthal , R.T. Lopes.
30 Bone diagnosis by X-ray techniques. *European Journal of Radiology* 2008;68S:S100-
31 S103.
- 32 33. Bonnet N, Bernard P, Beaupied H, Bizot JC, Trovero F, Courteix D et al. Various
33 effects of antidepressant drugs on bone microarchitecture, mechanical properties
34 and bone remodeling. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;221:111-118.

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

3 ANEXOS



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

Curitiba, 11 de agosto de 2011.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 633 – 1ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Efeito da fluoxetina no movimento dentário induzido em ratos

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Giovana Carla Frazon Frigotto

EQUIPE DE PESQUISA:

Giovana Carla Frazon Frigotto

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

CENTRO / CURSO:

CCBS / Mestrado em Ortodontia

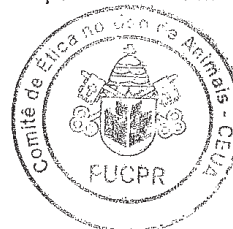
ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Ratos (<i>Ratus norvegicus</i>)	Machos	300-350g	B	90

O colegiado do CEUA em reunião no dia 11/08/2011, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

Obs.: Trinta animais são utilizados em conjunto com os projetos 628 e 631 (projeto piloto).


Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

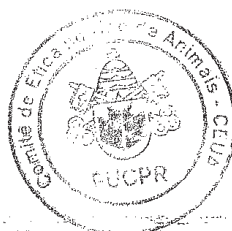
Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do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



Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,


Prof. Graziela Maria D'Almeida e Oliveira
Coordenadora Adjunta
Comitê de Ética no Uso de Animais





LAUDO DE ANÁLISE DE MATÉRIAS-PRIMAS

Matéria-prima: Fluoxetina HCl (C1 - P.344/98)		RE: 58 / 11
Validade: 1/12/2013	Fornecedor: Embrafarma	NF: 25422
Fabricante: BRASIL	DCB: 04177	CAS: 59333-67-4
Nº Lote: 13892	Quantidade: 0	Nº de Vol.: 1
Os dados do laudo estão coerentes com os dados do rótulo do produto? () Sim () Não		
INSPEÇÕES REALIZADAS		
ENSAIOS	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
pH	Entre 5,5 e 6,5 (solução 1,0% (p/v) em água isenta de dióxido de carbono)	
Solubilidade	Ligeiramente solúvel em água; facilmente solúvel em metanol e etanol; praticamente insolúvel em éter etílico e cloreto de metila	água: <i>lig solúvel</i> etanol: <i>solúvel</i> outros: <i>metanol solúvel</i> <i>álcool de metil. a. 95%</i> <i>éter insolúvel</i>
Densidade		
Ponto de fusão	Entre 158,4° e 158,9°C 158°C	
Características	Pó cristalino branco ou quase branco.	OK
Observações	Fator de Equivalência: 1,12 (anfarma)	
Ref. Utilizada:	Farmacopéia Brasileira, 2005. p.280, 4a.ed.	
Especificação:	373 Fluoxetina HCl (C1 - P.344/98)	Atualizada em: 6/10/2007
Doseamento:	99,50%	Fator:
Analizado por:	<i>[Assinatura]</i>	Data: 28/07/11
		PARECER FINAL:
		CONFORME
		NÃO CONFORME

Concluído R. D. Nequeto


EMBRAFARMA
 PHARMACEUTICAL EXHIBITS
Certificado de Análise
Produto de Uso farmacêutico

Produto: Fluoxetina HCl - Portaria 344 (C1) ✓	P.M.: 345,8
Sinonímia em inglês: Fluoxetine HCl	Lote Interno: 13892
Formula Molecular: C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO, HCl	Data Val: 12/2013
Lote Original: 0040109	Procedência: Brasil
Data Fab: 01/2009	DCB: 04177
Origem: Índia	CAS: 059333674
Fabricante: Divis Pharmaceuticals	
Data de Emissão: 30/06/2011	

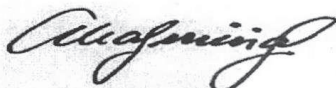
TESTES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
Aspecto Físico	Pó Cristalino Branco ou Quase Branco	De Acordo
Solubilidade	Fracamente Solúvel em água, cloreto de metileno, livremente solúvel em álcool, metanol, praticamente insolúvel em éter	De Acordo
Identificação	IR/ Cloretos	De Acordo
Água	Max. 0.5%	0.13%
Metais Pesados	Max. 0.003%	< 0.003%
Compostos Relacionados	Impureza A Max. 0.15%	0.013%
	Impureza B Max. 0.25%	0.045%
	Impureza Alfa[2-(Metil Amino) Ethyl]Benzeno	0.142%
	Metanol Max. 0.25%	0.04%
	Outras Impurezas Max. 0.1%	0.35%
Doseamento	Soma das Impurezas Max. 0.5%	
	98,0% a 102,0% (Base Anidra)	99.5%
Impurezas Org. Voláteis	Não foi usado no processo de manufatura	De Acordo

Referência Bibliográfica: USP 31

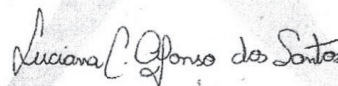
 Conservação: Conservar em recipiente hermético protegido de umidade, ao abrigo de luz e calor.
 Controle da Temperatura: 15 a 30°C. Controle da Umidade: Não mais que 70%.

Conclusão: Todos os resultados estão dentro das especificações.

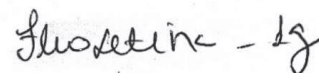
 OBS.: Transcrição do certificado do Fornecedor.
 Certificado Original se encontra à disposição de nossos clientes.
 Esse produto encontra-se na embalagem original do fornecedor. Não foi realizado o processo de fracionamento nas instalações da Embrafarma.

Resultado: (X) Aprovado


 Alexandre Antonio Ferreira
 CRQ-IV- 004245849
 Gerente Técnico



 Dra Luciana C. Afonso dos Santos
 CRF-SP 32798
 Unidade da Qualidade



 Embrafarma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda.
 Rua Carlo Carra, 66 - Vl. Sta. Catarina - São Paulo - SP
 Cep. 04367-000 Telefone/Fax: 0800 704 8303 / 11 2165-9255
 vendas@embrafarma.com.br www.embrafarma.com.br

1 NORMAS PARA PUBLICAÇÃO- AMERICAN JOURNAL OF ORTHODONTICS AND
2 DENTOFACIAL ORTHOPEDICS

3 *Information for Authors*

4 *Electronic manuscript submission and review*

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

7 *To submit or review an article, please go to the **AJO-DO** EES website:*
8 *ees.elsevier.com/ajodo*

9 *Send other correspondence to:*

10 *Dr. Vincent G. Kokich, DDS, MSD, Editor-in-Chief*

11 *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*

12 *University of Washington*

13 *Department of Orthodontics, D-569*

14 *HSC Box 357446*

15 *Seattle, WA 98195-7446*

16 *Telephone (206) 221-5413*

17 *E-mail: vgkokich@u.washington.edu*

18

19 **General Information**

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

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

27 *Statements and opinions expressed in the articles and communications herein*
28 *are those of the author(s) and not necessarily those of the editor(s) or publisher, and*
29 *the editor(s) and publisher disclaim any responsibility or liability for such material.*
30 *Neither the editor(s) nor the publisher guarantees, warrants, or endorses any product*
31 *or service advertised in this publication; neither do they guarantee any claim made by*
32 *themanufacturer of any product or service. Each reader must determine whether to*

1 act on the information in this publication, and neither the Journal nor its sponsoring
2 organizations shall be liable for any injury due to the publication of erroneous
3 information.

4

5 **Guidelines for Original Articles**

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

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

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

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

20 3. *Manuscript.* The manuscript proper should be organized in the following sections:
21 Introduction and literature review, Material and Methods, Results, Discussion,
22 Conclusions, References, and figure captions. Express measurements in metric
23 units, whenever practical. Refer to teeth by their full name or their FDI tooth number.
24 For style questions, refer to the AMA Manual of Style, 9th edition. Cite references
25 selectively, and number them in the order cited. Make sure that all references have
26 been mentioned in the text. Follow the format for references in "Uniform
27 Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (Ann Intern Med
28 1997;126:36-47); <http://www.icmje.org>. Include the list of references with the
29 manuscript proper. Submit figures and tables separately (see below); do not embed
30 figures in the word processing document.

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

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

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

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

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

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

30 Scan the printed [copyright release](#) and submit it via EES.

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

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

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

8 10. Systematic Reviews and Meta-Analyses must be accompanied by the current
9 PRISMA checklist and flow diagram (go to [Video on CONSORT and PRISMA](#)). For
10 complete instructions, see our [Guidelines for Systematic Reviews and Meta-](#)
11 [Analyses](#).

12 11. Randomized Clinical Trials must be accompanied by the current CONSORT
13 statement, checklist, and flow diagram (go to [Video on CONSORT and PRISMA](#)). For
14 complete instructions, see our [Guidelines for Randomized Clinical Trials](#).

15 **Other Articles**

16 Follow the guidelines above, with the following exceptions, and submit via EES.
17 Case Reports will be evaluated for completeness and quality of records, quality of
18 treatment, uniqueness of the case, and quality of the manuscript. A high quality
19 manuscript must include the following sections: introduction; diagnosis; etiology;
20 treatment objectives, treatment alternatives, treatment progress, and treatment
21 results; and discussion. The submitted figures must include extraoral and intraoral
22 photographs and dental casts, panoramic radiographs, cephalometric radiographs,
23 and tracings from both pretreatment and posttreatment, and progress or retention
24 figures as appropriate. Complete Case Report Guidelines can be downloaded from
25 [Case Report Guidelines](#).

26 Techno Bytes items report on emerging technological developments and products for
27 use by orthodontists.

28 **Miscellaneous Submissions**

29 Letters to the Editor and their responses appear in the Readers' Forum section and
30 are encouraged to stimulate healthy discourse between authors and our readers.
31 Letters to the Editor must refer to an article that was published within the previous six
32 (6) months and must be less than 500 words including references. Send letters or
33 questions directly to the editor, via e-mail: vgkokich@u.washington.edu. Submit a
34 signed copyright release with the letter.

1 *Brief, substantiated commentary on subjects of interest to the orthodontic profession*
2 *is published occasionally as a Special Article. Submit Guest Editorials and Special*
3 *Articles via the Web site.*

4 *Books and monographs (domestic and foreign) will be reviewed, depending upon*
5 *their interest and value to subscribers. Send books to the Editor in Chief, Dr. Vincent*
6 *G. Kokich, Department of Orthodontics, University of Washington D-569, HSC Box*
7 *357446, Seattle, WA 98195-7446. They will not be returned.*

8 **Checklist for authors**

- 9 • *Title page, including full name, academic degrees, and institutional affiliation*
10 *and position of each author, and author to whom correspondence and reprint*
11 *requests are to be sent, including address, business and home phone*
12 *numbers, fax numbers, and e-mail address*
- 13 • *Abstract*
- 14 • *Article proper, including references and figure legends*
- 15 • *Figures, in TIF or EPS format*
- 16 • *Tables*
- 17 • *[Copyright release statement](#), signed by all authors*
- 18 • *[Photographic consent statement\(s\)](#)*
- 19 • *[ICMJE Conflict of interest statement](#)*
- 20 • *Permissions to reproduce previously published material*

21