

MARIA DENISE MATOS SUASSUNA

A yellow scroll graphic with a black outline, featuring a vertical strip on the left and a horizontal strip on the right, both with rounded ends and a small circular detail at the top right corner.

**ESTUDO HISTOLÓGICO E MORFOMÉTRICO DO DISCO
EPIFISÁRIO DE RATOS NEONATOS TRATADOS COM
FLUOXETINA**

RECIFE

2004

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

ESTUDO HISTOLÓGICO E MORFOMÉTRICO DO DISCO
EPIFISÁRIO DE RATOS NEONATOS TRATADOS COM
FLUOXETINA

Dissertação apresentada ao
Mestrado de Anatomia Patológica do Centro
de Ciências da Saúde da Universidade
Federal de Pernambuco para obtenção do
título de Mestre em Anatomia Patológica.

AUTORA: MARIA DENISE MATOS SUASSUNA
ORIENTADOR: PROF^a. LIRIANE BARATELLA EVÊNCIO
CO-ORIENTADOR: PROF. RAUL MANHÃES DE CASTRO

2004



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

AUTOR: MARIA DENISE MATOS SUASSUNA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: MORFOLOGIA APLICADA

NOME DA TESE: : ESTUDO HISTOLÓGICO E MORFOMÉTRICO DO DISCO EPIFISÁRIO DE RATOS NEONATOS TRATADOS COM FLUOXETINA

ORIENTADOR: PROFa LIRIANE BARATELLA EVÊNCIO

TESE DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ANATOMIA PATOLÓGICA.

DATA: 30/07/2004

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Diógenes Luis da Mota

Prof. Alexandre Motta Bittencourt

Prof. Joaquim Evêncio Neto

Dedico

A minha querida mãe, **Maria José Matos**, que sempre acreditou e investiu em mim.

A meu adorado pai, **Edward Figueredo Matos**, que continua vivo em meu coração.

Ofereço

A meu marido, **Dantas**, e
aos meus filhos, **Mariana** e
Saulo, com todo meu amor...

Agradecimentos

A **Deus**, por iluminar o caminho.

À **Minha família**, por me nortear.

À **Zélia e Ariano Suassuna**, por serem como pais.

À **Etienne Fittipaldi**, minha amiga, por todos esses anos de convivência e apoio.

À minha orientadora, professora **Liriane**, pela paciência.

Ao meu co-orientador, professor **Raul**, pelo incentivo.

Ao professor **Diógenes**, pelos preciosos conselhos.

Ao professor **Tetsuo**, pela fundamental ajuda nesse trabalho.

À professora **Tereza Deiró**, por estar sempre pronta a ajudar.

Aos **professores do mestrado**, pelo apoio.

Aos **colegas do mestrado**, pelos alegres dias de estudante.

À **Kirlian**, e a todos que de uma forma ou de outra tornaram possível a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
OBJETIVOS	23
MATERIAL E MÉTODOS	24
RESULTADOS	28
<i>Aspectos morfológicos</i>	28
<i>Aspectos morfométricos</i>	36
Massa corporal	36
Massa femoral	37
Crescimento ponderal	37
Área por secção	39
Espessura total do disco epifisário	40
Espessura da zona de repouso	40
Espessura da zona seriada	41
Espessura da zona hipertrófica	41
DISCUSSÃO	42
CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	Adenosina Monofosfato
BMP-2	Proteína Morfogenética Óssea tipo 2
BMP-6	Proteína Morfogenética Óssea tipo 6
BMU	Unidade Multicelular Básica
CNP	Peptídeo Natriurético tipo-C
DAT	Depleção do Transportador de Dopamina
ecNOS	Células endoteliais Óxido Nítrico sintetase
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
FGF	Fator de Crescimento Fibroblasto
GC	Grupo Controle
GE	Grupo Experimental
GH	Hormônio do crescimento
GLAST	Glutamato/Aspartato
GLU	Glutamato
IGF	Fator de Crescimento Insulina
ISRS	Inibidor Seletivo da Recaptação de Serotonina
NO	Óxido Nítrico
OPN	Osteopontina
PGE2	Prostaglandina tipo 2
PTH	Hormônio Paratireoideano
PTHrP	Proteína ligada ao hormônio Paratireoideano
RNAM	Ácido Ribonucléico mensageiro
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Substância P
TGF	Fator de Crescimento e Transformação
VEG	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
VIP	Peptídeo Intestinal Vasoativo
5-HT	Serotonina ou 5-hidroxitriptamina
5-HTT	Transportador de Serotonina
5-HT2B	Receptor de Serotonina tipo 2B
5-HT2A	Receptor de serotonina tipo 2A

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotomicrografia da espessura total do disco epifisário do GC	30
Figura 2	Fotomicrografia da espessura total do disco epifisário do GE	30
Figura 3	Fotomicrografia da zona de repouso da cartilagem do GC	31
Figura 4	Fotomicrografia da zona de repouso da cartilagem do GE	31
Figura 5	Fotomicrografia da zona seriada do GC	32
Figura 6	Fotomicrografia da zona seriada do GE	32
Figura 7	Fotomicrografia da zona hipertrófica do GC	33
Figura 8	Fotomicrografia da zona hipertrófica do GE	33
Figura 9	Fotomicrografia da zona de erosão do GC	34
Figura 10	Fotomicrografia da zona de erosão do GE	34
Figura 11	Fotomicrografia da zona osteogênica do GE	35
Figura 12	Fotomicrografia da zona osteogênica do GC	35
Figura 13	Massa corporal média do GC e do GE	36
Figura 14	Massa femoral média do GC e do GE	37
Figura 15	Curva de crescimento ponderal do GC e do GE	37
Figura 16	Área por secção do disco epifisário do GC e do GE	39
Figura 17	Espessura total do disco epifisário do GC e do GE	40
Figura 18	Espessura da zona de repouso do grupo GC e do GE	40
Figura 19	Espessura da zona seriada do grupos controle GC e do GE	41
Figura 20	Espessura da zona hipertrófica do grupo GC e do GE	41

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 Estatística descritiva da massa corporal, e massa femoral do GC 36
E do GE
- Quadro 2 Estatística descritiva da área por secção, espessura total, 38
espessuras das zonas de repouso, seriada e hipertrófica do GC
- Quadro 3 Estatística descritiva da área por secção, espessura total, 39
espessuras das zonas de repouso, seriada e hipertrófica do GE

RESUMO

Os inibidores seletivos da recaptação da serotonina atuam aumentando a disponibilidade deste neurotransmissor na fenda sináptica. Estudos recentes demonstraram a presença de receptores da serotonina em células ósseas, sugerindo a participação desta substância no metabolismo ósseo. O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos da fluoxetina, um potente inibidor da recaptação seletiva da serotonina, sobre o crescimento de ratos neonatos e avaliar as possíveis alterações morfológicas e morfométricas no disco epifisário do fêmur desses animais. Foram utilizados 9 ratos albinos machos da linhagem Wistar com 1 dia de idade, divididos em 2 grupos: controle (n=3) e experimental (n=6). O grupo experimental recebeu diariamente injeção subcutânea com fluoxetina (10mg/Kg em 10 µl/g) e o grupo controle solução salina a 0,9% de NaCl, no volume de 10 µl/g. A massa corpórea dos animais foi verificada diariamente. No 22º dia os animais foram sacrificados, os fêmures direitos coletados, pesados, processados histologicamente pela técnica histológica convencional e analisados pela microscopia ótica. Foi realizada análise morfométrica do disco epifisário distal para avaliação da área por secção, espessura total, espessuras das camadas de repouso, seriada, e hipertrófica; e verificação da morfologia do tecido ósseo. Os resultados demonstraram que o grupo experimental apresentou crescimento ponderal, peso corporal e femoral inferior ao grupo controle ($p < 0,05$), bem como na área por secção. Não houve diferença significativa na espessura total, nem nas camadas de repouso, seriada e hipertrófica. Com base nesses resultados, conclui-se que o uso de fluoxetina em ratos em desenvolvimento provoca diminuição do peso corporal e femoral, diminuição do crescimento ponderal e diminuição na área por secção do disco epifisário. Os aspectos morfológicos sugerem que a serotonina provoca uma interferência no metabolismo dos condrócitos, com conseqüentes repercussões no processo de ossificação.

Palavras-chaves: serotonina, fluoxetina, crescimento, disco epifisário.

ABSTRACT

The selective inhibitors of the re-uptake of the serotonin acts increasing the availability of this neurotransmitter in the synaptic cleft. Recent studies demonstrated the presence of receptors of serotonin in bone cells, suggesting the participation of this substance in the bone metabolism. The aim of this study is to verify the effects of the use of fluoxetine, a potent inhibitor of the selective re-uptake of the serotonin, on the growth of neonate mice and evaluate the possible morphologic and morphometric alterations on epiphyseal disc of the femur of these animals. 9 male albino mice Wistar aged 1 day were divided into two groups: control (n=3) and treated (n=6). The treated group received, daily, a subcutaneous injection with fluoxetine (10mg/Kg em 10µl/g) and the control group received saline solution 0,9 % of NaCl in the volume of 10µl/g. The body mass of the animals was verified daily. In the twenty-second day the animals were sacrificed, the right femurs were collected, weighed, processed by the conventional histologic technique and analysed by light microscopy. The morphometric analysis of epiphyseal disc was realized to evaluate its section area, total thickness, thickness of rest zones, serial and hypertrophic and verification of the morphology of bone tissue. The results demonstrated that the treated group showed ponderous growth, body and femural weight inferior than the control group ($p < 0,05$), as in the section area, There was no difference significant in the total thickness, and in the rest zones, serial and hypertrophic. Based on these results, the study concluded that the use of fluoxetine in growing mice provokes decrease of body and femural weight, decrease of ponderous growth and decrease of the section area of epiphyseal disc. The morphologic alterations suggest that fluoxetine play a role in the chondrocytes metabolism and bone formation.

Key Words: serotonin, fluoxetine, growth, epiphyseal disc.

INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material intercelular denominado matriz óssea (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Os principais tipos de células presentes no tecido ósseo são as células osteoprogenitoras, os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos. Juntas estas células produzem, mantêm, adaptam ou reparam, se necessário, a matriz óssea mineralizada (WESTBROEK *et al.*, 2001).

As células osteoprogenitoras são células fusiformes, derivadas do mesênquima embrionário e possuem a potencialidade de se diferenciar em osteoblastos (GARTNER e HIATT, 2001).

Os osteoblastos, derivados de células osteoprogenitoras, estão localizados na superfície do osso, num arranjo semelhante a uma membrana de células, de forma cúbica à cilíndrica. São responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea, produzindo osso novo (BURGER e KLEIN-NULEND, 1999; GARTNER e HIATT, 2001). Os osteoblastos estendem seus processos que entram em contato com os osteoblastos vizinhos, formando junções comunicantes (SCHIRRMACHER e BINGMANN, 1998; GARTNER e HIATT, 2001).

Os osteócitos diferenciam-se a partir de osteoblastos. Ficam situados em lacunas no interior da matriz óssea calcificada. São as células mais abundantes do tecido ósseo, aproximadamente 95% no esqueleto adulto (BURGER e KLEIN-NULEND, 1999). Partindo das lacunas e se irradiando em todas as direções, existem os canalículos, onde se situam prolongamentos citoplasmáticos do osteócito, que por sua vez entram em contato com prolongamentos semelhantes dos osteócitos vizinhos, formando junções comunicantes (BURGER e KLEIN-NULEND, 1999;

GARTNER e HIATT, 2001; PARFITT, 2002). Os osteócitos são capazes de manter a matriz óssea e por causa de sua localização dentro da mesma, acredita-se que atuem como células sensoras que traduzem os estímulos mecânicos resultantes da força gravitacional e muscular, no esqueleto, em sinais bioquímicos. Estes sinais, por sua vez, ativam os efetores da transformação óssea, osteoblastos e osteoclastos, fundamentais para adaptação da massa e estrutura do osso (PARFITT, 2002; BURGER; KLEIN-NULEND; SMIT, 2003;).

Estudos recentes sugerem que a rede de osteócitos juntamente com a porosidade lacuno-canalicular é o local de mecano-sensibilidade no tecido ósseo e que a mecanotransdução inclui a tradução, pelos osteócitos, do fluxo canalicular em sinais celulares (KLEIN-NULEND *et al.*, 1995; AJUBI *et al.*, 1996; WESTBROEK *et al.*, 2000). You *et al.* (2001) ressaltam que durante o estímulo mecânico, o osso é deformado. Essa deformação causa fluxo do fluido intersticial para o espaço pericelular do sistema lacuno-canalicular e puxa as fibras da matriz, além de induzir um estresse de escoamento nos processos da membrana celular. Esses estudos demonstram que osteócitos produzem altos níveis de óxido nítrico (NO) e prostaglandina em resposta ao fluxo do fluido canalicular. A Produção de NO resulta da atividade de ecNOS (óxido nítrico sintetase endotelial), uma enzima da membrana plasmática que acreditava-se ser específica do endotélio, mas que depois foi demonstrada em osteócitos e osteoblastos (KLEIN-NULEND *et al.*, 1998). Interessante é que ecNOS produz NO especificamente na resposta celular ao estresse de escoamento de fluido, sugerindo que pode haver funções comuns para ecNOS no endotélio e nos osteócitos (BURGER; KLEIN-NULEND; SMIT, 2003). Regulação gênica osteocítica por estresse mecânico foi verificada e inclui expressão de IGF(fator de crescimento insulina) e osteopontina (OPN) (MIKUNI-TAKAGAKI *et*

al., 1996; MILES *et al.*, 1998). Assim, a carga mecânica ativa diversos processos celulares nos osteócitos, incluindo energia metabólica, ativação gênica, produção de fator de crescimento, e síntese da matriz (BURGER e KLEIN-NULEND, 1999).

Os osteoclastos são células multinucleadas, derivadas de células precursoras da linhagem monócito-macrófago e são altamente diferenciados para reabsorção óssea, por subsequente desmineralização e degradação colágena (BURGER e KLEIN-NULEND, 1999; TANAKA *et al.*, 2003). Os osteoclastos ocupam depressões rasas, chamadas lacunas de Howship, e quando ativos, eles podem ser subdivididos em quatro regiões morfológicamente identificadas: zona basal, borda pregueada, zona clara e zona vesicular (GARTNER e HIATT , 2001). Similar aos macrófagos, os osteoclastos são atraídos por células em apoptose, e, as células que os atraem são os osteócitos e os condrócitos hipertróficos do disco epifisário (BRONCKERS *et al.*, 2000).

A matriz óssea consiste de dois componentes fundamentalmente diferentes: um orgânico e outro inorgânico, tornando-se um material composto resistente com colágeno e fosfato de cálcio mineral como elementos estruturais (HAM, 1983; BURGER e KLEIN-NULEND,1999). O componente inorgânico, com cerca de 65% do peso seco do osso, é constituído, principalmente, de cálcio e fósforo, basicamente na forma de cristais de hidroxiapatita. Apresenta ainda outros componentes, incluindo bicarbonato, citrato, magnésio, sódio e potássio. O componente orgânico constitui aproximadamente 35% do peso seco do osso, inclui fibras que são exclusivamente de colágeno tipo 1 (90%) e glicosaminoglicanas e glicoproteínas (GARTNER e HIATT, 2001).

Embora seja um dos mais resistentes e rígidos tecidos do corpo humano, o tecido ósseo é muito plástico, sendo capaz de remodelar sua estrutura interna em

resposta a modificações nas forças a que está submetido normalmente. É o constituinte principal do esqueleto, serve de suporte para as partes moles e protege órgãos vitais. Aloja e protege a medula óssea, formadora das células do sangue. Proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis e constitui um sistema de alavancas que amplia as forças geradas na contração muscular. Além disso, funciona como depósito de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os de maneira controlada, para manter constante a concentração desses importantes íons nos líquidos corporais (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

O Desenvolvimento do tecido ósseo, no embrião, ocorre de duas maneiras: ossificação intramembranosa, que ocorre nos ossos chatos da abóbada craniana e na clavícula, e ossificação endocondral, que origina o restante do esqueleto (SNELL, 1985). Portanto, a maioria dos ossos longos e curtos do corpo se desenvolve por ossificação endocondral. Esse tipo de ossificação ocorre em duas etapas: (1) Forma-se um pequeno molde de cartilagem hialina; (2) O molde da cartilagem continua a crescer e serve como base para o desenvolvimento do osso, depois é reabsorvido e substituído por osso (GARTNER e HIATT, 2001; STREET *et al.*, 2002).

O centro de ossificação que surge na porção mediana de um modelo cartilaginoso é chamado de centro primário (ou diafisário) de ossificação. Entretanto, durante o desenvolvimento dos ossos longos, surgem posteriormente centros de ossificação nas extremidades cartilaginosas dos modelos, que são os centros secundários (ou epifisários) de ossificação (HAM, 1983). À medida que o crescimento e o desenvolvimento do osso progridem em direção às epífises de crescimento, a cartilagem vai sendo substituída por tecido ósseo, com exceção da superfície articular e do disco epifisário (GARTNER e HIATT, 2001). O disco

epifisário é o responsável pelo crescimento longitudinal do osso e persiste até que o crescimento ósseo, na vida pós-natal, esteja terminado. Só então é substituído por osso (HAM, 1983).

Anatomicamente, o disco epifisário se parece com um disco quase plano interposto entre a epífise e a metáfise dos ossos longos (HUNZIKER; SCHENK; CRUZ-ORIVELM, 1987).

Histologicamente, o disco epifisário é organizado em colunas de condrócitos e pode-se distinguir várias camadas ou zonas em toda sua altura, convencionalmente referidas como: zona de repouso da cartilagem, zona seriada ou de proliferação, zona de maturação e hipertrofia, zona de erosão ou calcificação, zona de osteogênese ou ossificação (HUNZIKER *et al.*, 1987; GARTNER e HIATT, 2001). Condrócitos do disco epifisário passam por proliferação, maturação, hipertrofia, biogênese da matriz e morte celular programada (apoptose) (GARIMELLA *et al.*, 2004). Durante o crescimento ósseo, há intensa atividade celular nessas zonas, e qualquer interferência, como deficiências dietéticas ou desequilíbrios hormonais, com alguns desses processos diferentes, se refletirá de imediato por uma alteração no quadro histológico da área (HAM, 1983).

No crescimento e desenvolvimento do tecido ósseo, a reabsorção óssea, realizada pelos osteoclastos, é tão importante quanto a deposição óssea, realizada pelos osteoblastos. Desta forma, o osso está sendo constantemente remodelado, de forma a acompanhar as modificações necessárias que nele ocorrem (GARTNER e HIATT, 2001; BURGER; KLEIN-NULEND; SMIT, 2003). Reabsorção e formação óssea são comumente descritas como processos independentes, mas na realidade estão intimamente ligadas dentro de discretas estruturas anatômicas temporárias

chamadas “unidades multicelulares básicas” usualmente abreviadas como BMU (PARFITT, 2002).

Uma BMU completamente desenvolvida consiste em um grupo de osteocastos na frente cavando um túnel através do osso compacto ou uma vala ao longo da superfície do osso trabecular, um grupo de osteoblastos atrás preenchendo o túnel ou vala, uma forma de suprimento sanguíneo, e tecidos conectivos associados (PARFITT, 2002; BURGER; KLEIN-NULEND; SMIT, 2003). O reconhecimento de um osso necessitando ser substituído, e o controle direcional da BMU provavelmente envolvem a rede onipresente de osteócitos (PARFITT, 2002).

As atividades dos osteoclastos, osteoblastos, e osteócitos, bem como sua proliferação e diferenciação a partir de células precursoras, são reguladas por vários fatores. Alguns desses fatores são de origem humoral (hormônios), enquanto outros são produzidos localmente (fatores de crescimento e citocinas), geralmente em resposta à ativação hormonal ou mecânica. Salvo a clara ligação do osso com os hormônios clássicos (GH, hormônio paratireoideano, 1,25-dihidroxitamina D₃, estrógeno, calcitonina) e bem estabelecidos ou recentemente descobertos fatores locais (fatores de crescimento insulina (IGFs), fatores de crescimento e transformação (TGFs), prostaglandinas (PGEs), fator de diferenciação osteoclástica, proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e outros) (WESTBROEK, 2001; IRIE *et al.*, 2003), um número de neurotransmissores que parecia improvável estar relacionado ao metabolismo ósseo, tem demonstrado exercer uma função no osso (KONTTINEN; IMAI; SUDA, 1996).

A participação de neurotransmissores na regulação do metabolismo ósseo tem sido tema de crescente interesse na investigação científica. Estudos anatômicos e *in vitro* sugerem que o metabolismo ósseo pode ser influenciado pelo sistema

nervoso (BLIZIOTES *et al.*, 2001). Estudos pioneiros, usando microscopia ótica, demonstraram que o osso era innervado. Contudo, a distribuição das fibras nervosas no osso não foi bem documentada e a discriminação de fibras representando o sistema nervoso sensorial, simpático e parassimpático não foi possível com a técnica histológica convencional (SERRE *et al.*, 1999).

Duncan e Shim (1997) *apud* Serre *et al.* (1999) demonstraram depois a presença de fibras nervosas simpáticas no tecido ósseo por visualização de noradrenalina.

Durante as últimas décadas, numerosos neuropeptídeos têm sido identificados no sistema nervoso de mamíferos pela imunohistoquímica. Contudo, a metodologia não tinha sido bem aplicada ao tecido mineralizado até Hohmann (1986) demonstrar polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) em nervos (BJURHOLM *et al.*, 1987).

Estudos relataram a presença de muitas fibras nervosas CGRP-Positivas e substância P (SP) ao longo das trabéculas epifisárias, em frente ao disco epifisário, em contato com osteoclastos e vasos sanguíneos, e no periósteo (BJURHOLM *et al.*, 1987; HARA-IRIE; AMIZUKA; OZAWA, 1996). Há referências também ao neuropeptídeo Y (NPY) e à amilina (KUNDU ; KHARE ; SINGH, 1999).

Mais recentemente, fibras nervosas imunorreativas para neuropeptídeos e tirosina hidroxilase (TH) tem sido demonstradas no osso, indicando a presença tanto de fibras simpáticas quanto de fibras sensoriais (HARA-IRIE, AMIZUKA; OZAWA 1996; GOTO, 1998).

Estes estudos têm demonstrado um alto grau de inervação peptidérgica no tecido ósseo em regiões de alta atividade osteogênica.

Schirrmacher e Bingmann (1998), demonstraram os efeitos do neurotransmissor peptídeo intestinal vasoativo e do aminoácido excitatório glutamato (GLU) nas junções comunicantes entre osteoblastos de ratos *in vitro*.

Serre *et al.* (1999) demonstraram a evidência de uma densa e íntima rede de processos nervosos no osso, caminhando profundamente com os sinusóides medulares, na metáfise e extremidade, em contato com células ósseas e medulares de ossos longos de ratos em crescimento, sugerindo inervação glutamatérgica no osso.

Fann e Patterson (1994), demonstraram que as proteínas morfogenéticas do osso (BMP-2 e BMP-6) estimulam RNAm para alguns neuropeptídeos e neurotransmissores, *in vitro*. Polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) estimulou a produção de prostaglandina (PGE2) e AMP cíclico em células osteoblásticas humanas (RAHMAN *et al.*, 1992; SCHIRRMACHER e BINGMANN, 1998).

Nos osteoblastos e osteócitos de ratos, a expressão e regulação de um transportador excitatório aminoácido glutamato/aspartato (GLAST) por carga mecânica também tem sido descrito (MASON *et al.*, 1997).

Estudos explorando os efeitos da depleção do transportador de dopamina (DAT) em ratos, demonstraram que DAT reduz a massa óssea esponjosa em vértebras e tíbia proximal, além de promover o menor comprimento do fêmur, bem como menor espessura cortical e área óssea na diáfise femural (BLIZIOTES *et al.*, 2000). Demonstrando com isso que rupturas nos genes DAT resultam em deficiência na estrutura e integridade do esqueleto.

DAT e 5-HTT são membros da principal família de transportadores de neurotransmissores por aminas bioativas, que promovem uma acumulação intracelular de neurotransmissores por recaptação do fluido extracelular, através de

um processo de co-transporte sódio/cloreto dependente, finalizando a transmissão sináptica (NELSON,1998).

O advento da imunohistoquímica com anticorpo para 5-HT fez possível o mapeamento detalhado do desenvolvimento do sistema 5-HT no embrião e fetos de ratos (LAUDER,1990).

Estudos com fetos de galinhas e ratos adultos demonstraram a expressão de receptores de serotonina (5-HT) em células ósseas, sugerindo que a serotonina está envolvida no metabolismo ósseo e sua mecano-regulação (WESTBROEK *et al.*, 2001). Nesse estudo, um aumento da resposta proliferativa de fibroblastos periosteal mediada via receptor 5-HT_{2B} foi observado, levantando a possibilidade de que um dos papéis de 5-HT no osso seja a estimulação da proliferação de células precursoras de osteoblastos no reparo de fraturas em conjunção com outros fatores locais. Outro importante achado desse mesmo estudo foi que alpha-methyl 5-HT, uma análoga à serotonina, provocou uma diminuição da liberação de NO em osteoblastos de ratos submetidos a estímulo mecânico.

Bliziotis *et al.* (2001) relataram a expressão de transportadores da serotonina (5-HTT) e de múltiplos receptores 5-HT em culturas de osteoblastos de ratos, como também a regulação de 5-HTT em osteoblastos. Verificaram também que a 5-HT potencializa o efeito do PTH, induzindo produção de colagenase em osteoblastos, sugerindo que os osteoblastos expressam tanto um mecanismo para responder, quanto regular a captação de 5-HT e, portanto, representa um sistema funcional serotoninérgico no osso.

Estes estudos bioquímicos e imunohistoquímicos dos componentes do sistema nervoso no osso podem refletir não somente função regulatória vascular e

sensorial pelos neurotransmissores, mas, possivelmente, também controle neurohormonal da atividade das células ósseas (BLIZIOTES *et al.*, 2001).

Depois de sua descoberta, no início dos anos 30, foram realizadas extensivas pesquisas para estabelecer a serotonina como um importante neurotransmissor, relacionado a um grande número de importantes funções fisiológicas e psicológicas (FELDMAN; MEYER; QUENZER, 1997).

Recentemente, este neurotransmissor tem sido proposto como sendo uma molécula regulatória morfogenética em algumas espécies (LAUDER; TAMIR; SADLER, 1988).

A idéia de que neurotransmissores clássicos como a 5-HT, as catecolaminas ou acetilcolina possam estar envolvidos no controle da morfogênese tem chegado de diversas linhas de evidências, iniciando com o trabalho de Buznikov e co-autores em 1960, que demonstraram a presença dessas substâncias no embrião de ouriço do mar, durante a clivagem e gastrulação (LAUDER, TAMIR; SADLER, 1988).

Shuei, Sadler e Lauder (1992), em estudos com embriões de ratos expostos a inibidores da captação seletiva de 5-HT (ISRS), tais como: sertralina, fluoxetina e amitriptilina, relataram a presença de mal-formação crânio-facial. Isso sugere que esses defeitos resultaram do rompimento da regulação do crescimento, secundário a alteração da função serotoninérgica nas interações epitélio-mesenquimais, fundamentais para o desenvolvimento normal da região crânio-facial.

No sistema nervoso periférico, receptor da 5-HT foi observado em gânglio sensorial de nervo cranial, neuroepitélio olfatório, no sistema simpatoadrenal e sistema nervoso entérico durante os estágios iniciais de suas formações; fora do sistema nervoso, notável expressão foi observada em associação a regiões de ativa

condrogênese na coluna vertebral, membros, e região crânio-facial (TECOTT; SHTROM; JULIUS, 1995).

Vignon *et al.* (1990) demonstraram a presença de receptores da 5-HT na cartilagem normal e osteoartrítica. Conrozier, Vignon e Mathieu (1989) ressaltam que a maioria das substâncias mediadoras no processo inflamatório da cartilagem atuam ou inibindo a síntese, ou estimulando as enzimas envolvidas na degradação. Essas substâncias são histamina, quinina, serotonina e radicais livres de oxigênio, entre outros.

Westbroek *et al.* (2001) ressaltam que 3 importantes áreas de atividade da serotonina têm sido descritas. O aspecto mais investigado é seu papel como neurotransmissor, que tem um grande número de atividade no SNC. Um segundo papel importante é sua função na regulação do tônus vascular. A 5-HT pode causar tanto vasoconstrição como vasodilatação. Vasoconstrição é causada pela ativação de receptores 5-HT_{1D} e 5-HT_{2A} nas células da musculatura vascular, ao passo que a vasodilatação tem sido atribuída à ativação de receptores 5-HT_{2B} nas células endoteliais, mediando a liberação de fatores relaxantes. A 3ª é aquela da regulação da proliferação de células de várias origens via receptor 5-HT_{2A} e 5-HT_{2B}.

Os ISRSs, citalopram, fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina e sertralina inibem de forma potente e seletiva a recaptação de serotonina, resultando em potencialização da neurotransmissão serotoninérgica. Embora compartilhem o principal mecanismo de ação, os ISRSs são estruturalmente distintos com marcadas diferenças no perfil farmacodinâmico e farmacocinético (MORENO; MORENO e SOARES, 1999).

Todos os ISRSs apresentam alta ligação protéica. A fluoxetina é a única que apresenta metabólito com atividade clínica significativa (inibição da recaptação de

serotonina e inibição de isoenzimas do citocromo P450), a norfluoxetina. A farmacocinética da fluoxetina não é linear, ou seja, aumentos na dosagem administrada, levam a aumentos desproporcionais nos níveis plasmáticos, meias-vidas e possivelmente efeitos colaterais (MORENO; MORENO e SOARES, 1999).

Os eventos do crescimento e desenvolvimento, são observados em todo organismo e podem ser modificados por fatores exógenos, tais como: alterações nutricionais e manipulações farmacológicas dos sistemas de neurotransmissores. Tanto estas, quanto outras agressões durante o período rápido de crescimento, podem acarretar deficiências permanentes no cérebro e em outros órgãos (MORGANE *et al.*, 1993).

Estudos realizados com ratos neonatos, tratados com ISRS, demonstraram uma redução no tamanho e peso dos animais bem como de seus órgãos, corroborando o importante papel trófico da serotonina no desenvolvimento de tecidos (DEIRÓ *et al.*, 2002; MAGALHÃES, 2000).

A histomorfometria se tornou um importante instrumento para documentação dos efeitos biológicos e possíveis efeitos colaterais de tratamentos envolvendo novas drogas (HAUGE *et al.*, 2001).

Embora os modelos animais espontâneos ou induzidos não possam ser réplicas exatas do que ocorrem nos humanos, seu uso abriu novos horizontes para pesquisa em diferentes áreas e pode ser de grande valor no estudo das condições fisiológicas em situações normais e/ou patológicas (DI MASSO; CELORIA; FONT, 1998). A facilidade de criação, combinada com sua relativa fecundidade, estabeleceu o rato como o melhor modelo animal para o estudo da fisiologia e genética dos mamíferos (KLEIN *et al.*, 1998).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

ESTUDAR OS ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS DO DISCO EPIFISÁRIO DISTAL DE FÊMUR DE RATOS NEONATOS TRATADOS COM FLUOXETINA, COM O INTUITO DE INVESTIGAR A POSSIBILIDADE DE ENVOLVIMENTO DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO NO DESENVOLVIMENTO DO TECIDO ÓSSEO.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- AVALIAR MASSA CORPÓREA DOS ANIMAIS DIARIAMENTE DURANTE O EXPERIMENTO.
- AFERIR A MASSA DO FÊMUR DIREITO DOS ANIMAIS.
- REALIZAR ANÁLISE HISTOLÓGICA DO DISCO EPIFISÁRIO DISTAL CORRESPONDENTE.
- MEDIR A ALTURA TOTAL DO DISCO EPIFISÁRIO NA EXTREMIDADE DISTAL DO FÊMUR.
- MENSURAR A ALTURA ESPECÍFICA DAS ZONAS DE REPOUSO, SERIADA, E HIPERTRÓFICA DO DISCO EPIFISÁRIO CORRESPONDENTE.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ratos neonatos, albinos, machos, da linhagem Wistar, com 1 dia de idade, pesando entre 5,7 a 9,2 g. Mantidos no biotério do Departamento de Nutrição - UFPE numa temperatura de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro e escuro de 12:12 horas (claro das 6 às 18 horas e escuro das 18 às 6 horas) com livre acesso à comida (LABINA – Purina do Brasil S/A) e água. Os animais foram divididos em dois grupos (seis filhotes por ninhada) 24 horas após o nascimento. Um grupo recebeu fluoxetina, e outro grupo recebeu um volume equivalente de água destilada. O tratamento foi administrado via subcutânea (s.c.) todos os dias, do 1º ao 21º dia pós-natal (período de amamentação). O peso corporal foi medido do 1º ao 22º dia (dia da coleta do fêmur).

GRUPOS DE ESTUDO

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos:

Grupo Controle (GC): (n = 3).

Grupo Experimental (GE): Tratados com Fluoxetina (n = 6).

TRATAMENTO DOS ANIMAIS

O grupo controle (GC) recebeu diariamente solução fisiológica a 0,9%, em aplicações subcutâneas na dose de $10\mu\text{l/g}$, em horários previamente estabelecidos (entre 12h e 14h), do 1º ao 21º dia de vida.

O grupo experimental (GE) foi tratado com fluoxetina, na dose de 10mg/Kg num volume de $10\mu\text{l/g}$ de peso corporal, injetados por via subcutânea nos mesmos horários e período estabelecido para o GC.

OBTENÇÃO DA MASSA CORPÓREA DOS ANIMAIS

A massa corpórea foi verificada diariamente, utilizando-se balança digital (Marte, modelo S-000 capacidade para 4Kg) até o dia do sacrifício.

COLETA DO MATERIAL

No 22º dia, os animais foram sacrificados com éter sulfúrico e posicionados em decúbito dorsal. No procedimento cirúrgico foi realizada uma incisão na região abdominal inferior direita até o joelho com bisturi (MED BLADE), rebateu-se o peritônio, órgãos e músculos desta região, até ser atingida a articulação coxo-femural. A seguir, foram desinseridos músculos e tendões da região anterior. Posteriormente, com os animais em decúbito lateral, foram removidos músculos e tendões posteriores, e o fêmur direito foi desarticulado proximal e distalmente com auxílio de uma tesoura cirúrgica.

VERIFICAÇÃO DA MASSA FEMURAL

Após a retirada inicial do fêmur, foi realizada uma maceração completa dos mesmos para remoção de tecidos moles. Em seguida, foram pesados em balança digital (precisão: 0,1mg, capacidade máxima 210g) (A&D Co., Japão).

PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DAS AMOSTRAS ÓSSEAS

O material foi fixado em solução de Bouin, durante 48 horas à temperatura ambiente. A seguir, foi descalcificado em torno de 15 dias em solução de EDTA (ácido etileno diamino tetracético) a 10%, neutralizado em solução de hidróxido de sódio a 30% (pH 7,2 – 7,4). Após a descalcificação, os espécimes foram seccionados transversalmente na metade da diáfise óssea. A seguir, processados

pela técnica histológica convencional na seguinte seqüência: desidratação em uma série crescente de etanol (70% a 100%, por 40 minutos cada); diafanização com xilol (2 banhos de 40 minutos cada); embebidas em parafina (3 banhos de 40 minutos cada) e incluídos no mesmo material.

Cortes histológicos longitudinais (coronais) foram obtidos com aproximadamente 4µm cada, através de um micrótomo (LEICA RM 2125 RT), utilizando-se navalha ((LEICA 818). A seguir, os cortes foram estirados em banho-maria histológico (ANCAP), dispostos em lâminas untadas com albumina de Mayer, colocados em estufa (J PROLAB 102) por aproximadamente 30 minutos a 37°C para secagem do material . Os espécimes foram corados pela hematoxilina e eosina (HE) e tricrômico de Gomori (BEHMER, 2003), montados em Entellan, observados em microscopia ótica.

ANÁLISE HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DO TECIDO ÓSSO

Foram confeccionadas 12 preparações de cada animal e selecionadas 3 para análise. De cada preparação foram capturadas imagens de 3 campos do disco epifisário. Para análise dos parâmetros morfométricos foi utilizado microscópio (OLYMPUS BX50), acoplado uma microcâmera (SAMSUNG COLOR DIGITAL SHC 410 NAD HL), conectado a um computador (PENTIUM II de 200Mhz) contendo uma placa de captura de imagem (ATI) e o software para morfometria (IMAGE-LAB 2000).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram analisadas massa corporal, massa femoral, crescimento ponderal, área por secção do disco epifisário, espessura total, espessuras das zonas de repouso, zona seriada, e zona hipertrófica. Na análise da espessura total foi

considerada a espessura da zona de repouso até a zona hipertrófica. Os dados foram demonstrados através de técnicas descritivas, tais como: quadros e figuras. Foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

RESULTADOS

ASPECTOS MORFOLÓGICOS

Neste estudo observamos que na ossificação endocondral da região distal do fêmur de ratos tratados com fluoxetina, o disco epifisário apresentou algumas alterações morfológicas quando comparado com o grupo controle. Nas imagens do disco epifisário onde se pôde ver todas as zonas simultaneamente ou seja, zona de repouso, zona de cartilagem seriada, zona de hipertrofia, zona de erosão e zona osteogênica, pudemos observar uma pequena diminuição da espessura do disco composta pelas 3 primeiras zonas (Fig. 1 e 2). Na zona de cartilagem em repouso notamos a presença de condrócitos arredondados com lacunas menores que as do grupo controle (Fig. 3 e 4). Na zona seriada, os condrócitos se apresentaram achatados e enfileirados de maneira a acompanhar o longo eixo do osso e separados por septos longitudinais e transversais de matriz cartilaginosa entre eles (Fig.6). Nesta região não foram observadas diferenças entre os grupos, o que pode ser notado nas figuras 5 e 6. Na zona de hipertrofia os condrócitos estavam mais aumentados em volume e separados entre si por finos septos de matriz cartilaginosa. Entretanto pudemos observar que os condrócitos se apresentaram um pouco menores e a matriz mais espessada quando comparado com o grupo controle (Fig. 7 e 8). A zona de erosão apresentou finos tabiques de matriz cartilaginosa entremeados por condrócitos altamente hipertrofiados e que logo a seguir entraram em processo de morte e deixaram lacunas que foram imediatamente preenchidas por áreas de invasão vascular. Nesta zona pôde-se verificar uma maior concentração de osteoclastos quando comparado ao grupo controle (Fig. 9 e 10) . A zona osteogênica apresenta tabiques ósseos que acompanham o longo eixo do osso e são revestidos por osteoblastos (Ob), apresentam osteócitos (O) no interior da matriz acidófila e núcleos de matriz cartilaginosa calcificada (Mc) são bem evidentes. Osteoclastos (Oc) são bem evidenciados principalmente nas proximidades trabeculares, formando lacunas de Howship (Fig.11 e 12). Nesta região não observamos diferenças entre os grupos.

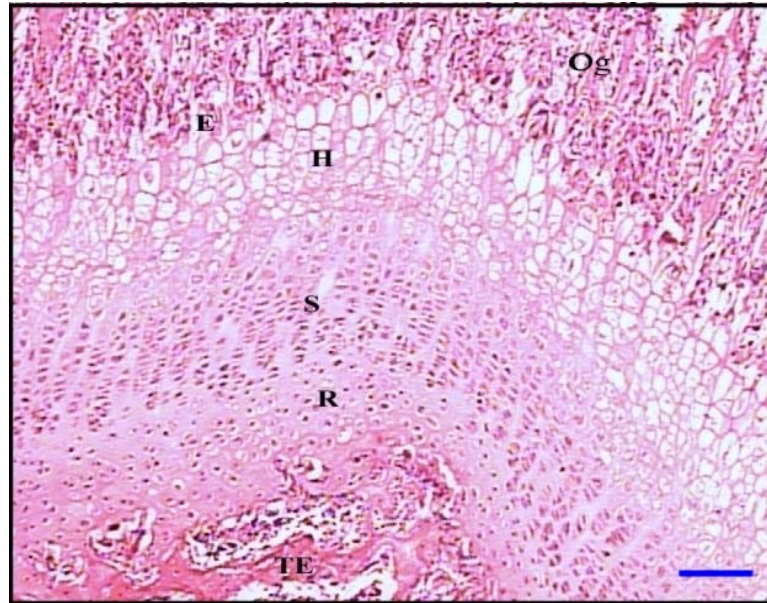


Fig.1- Fotomicrografia da região do disco epifisário distal de fêmur de rato mostrando as várias regiões: zona de repouso (R), zona de cartilagem seriada (S), zona de hipertrofia (H), zona de erosão (E), zona osteogênica (Og), trabéculas ósseas epifisárias (TE). Barra=100µm. Coloração HE.

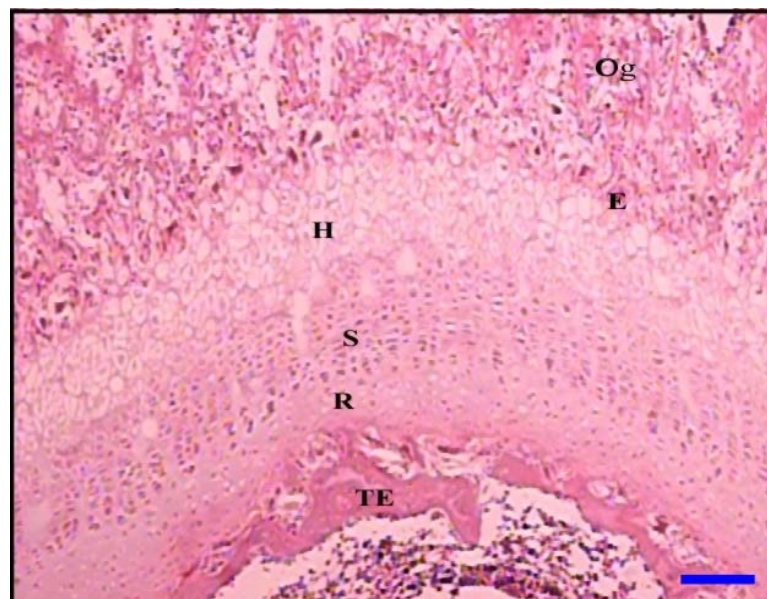


Fig. 2- Fotomicrografia de região do disco epifisário distal de fêmur de rato tratado com fluoxetina. Observar uma pequena diminuição da espessura total do disco. Zona de repouso (R), zona de cartilagem seriada (S), zona de hipertrofia (H), zona de erosão (E), zona osteogênica (Og), trabéculas ósseas epifisárias (TE). Barra=100µm. Coloração HE.

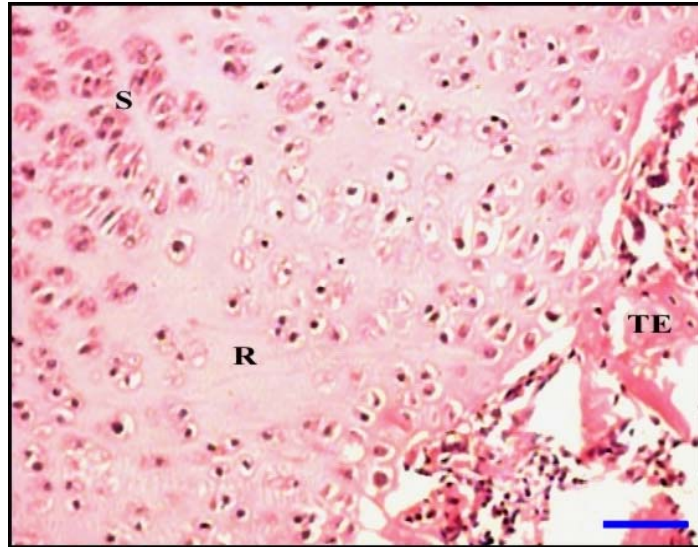


Fig. 3- Fotomicrografia de região do disco epifisário distal de fêmur de rato mostrando zona de cartilagem em repouso (R), cujas células arredondadas se encontram ainda individualizadas. No canto superior esquerdo observamos porção inicial da zona seriada (S), no canto inferior direito porção das trabéculas epifisárias (TE). Barra= 50µm Coloração HE.



Fig. 4- Fotomicrografia de região do disco epifisário distal de fêmur de rato tratado com fluoxetina. Observar região de cartilagem em repouso (R) mostrando condrócitos individualizados, porém menores que os do grupo controle. Condrócitos em repouso (C), matriz cartilaginosa (Mc), zona de cartilagem seriada (S), trabéculas epifisárias (TE). Barra=50µm. Coloração HE.

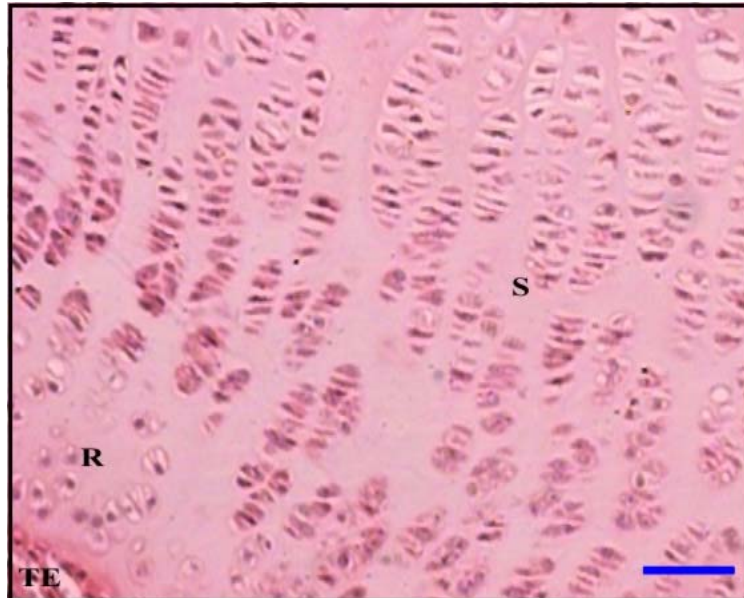


Fig.5- Fotomicrografia de região do disco epifisário distal de fêmur de ratos mostrando zona de cartilagem seriada (S), parte da zona de repouso (R), e da ossificação epifisária (TE). Barra= 50μm. Coloração HE.

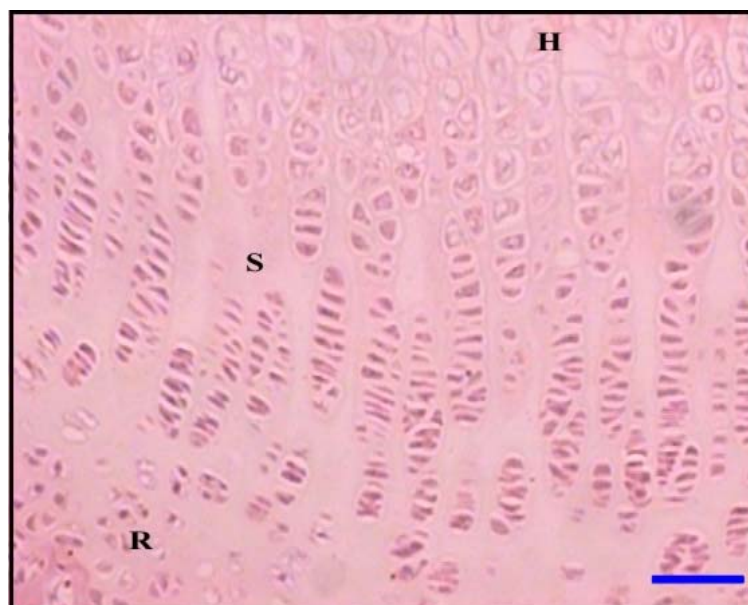


Fig. 6- Fotomicrografia de região do disco epifisário distal de fêmur de rato tratado com fluoxetina. Observar a zona de cartilagem seriada com condrócitos enfileirados, parte da zona de repouso (R), parte da zona hipertrófica (H). Barra= 50μm. Coloração HE.

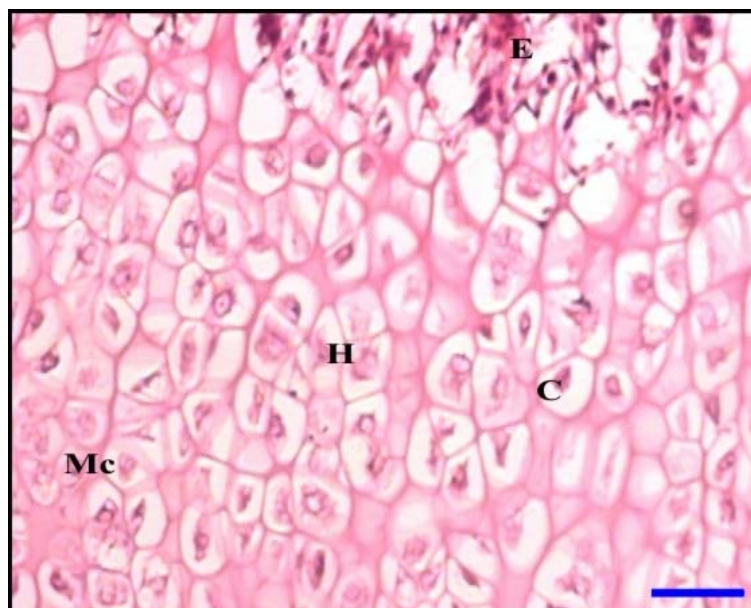


Fig. 7- Fotomicrografia de região do disco epifisário distal de fêmur de rato mostrando a zona de hipertrofia (H). Observar condrócitos (C) aumentados com finos septos de matriz (Mc) entre eles. Zona de erosão (E). Barra= 50μm. Col. HE.

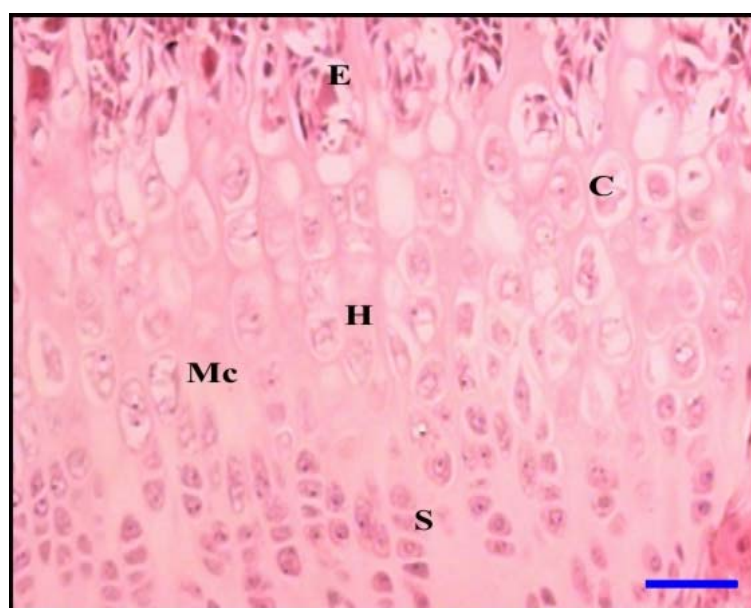


Fig. 8- Fotomicrografia de região do disco epifisário distal de fêmur de rato tratado com fluoxetina mostrando a zona de hipertrofia (H). Observar condrócitos (C) aumentados, porém menores que os do grupo controle. A matriz cartilaginosa (Mc) fica intercalada entre as fileiras de condrócitos e apresenta-se levemente mais espessada em comparação com a dos animais do grupo controle. Barra= 50μm. Col. HE.

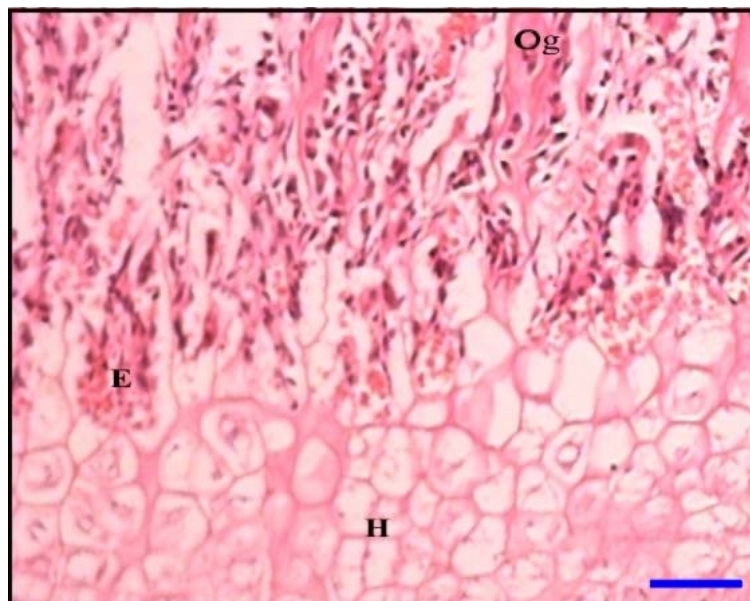


Figura 9 - Fotomicrografia de região do disco epifisário distal de fêmur de rato mostrando a zona de erosão (E). Abaixo se vê a zona hipertrófica (H); Acima, a zona osteogênica (Og). Barra= 50µm. Coloração HE.

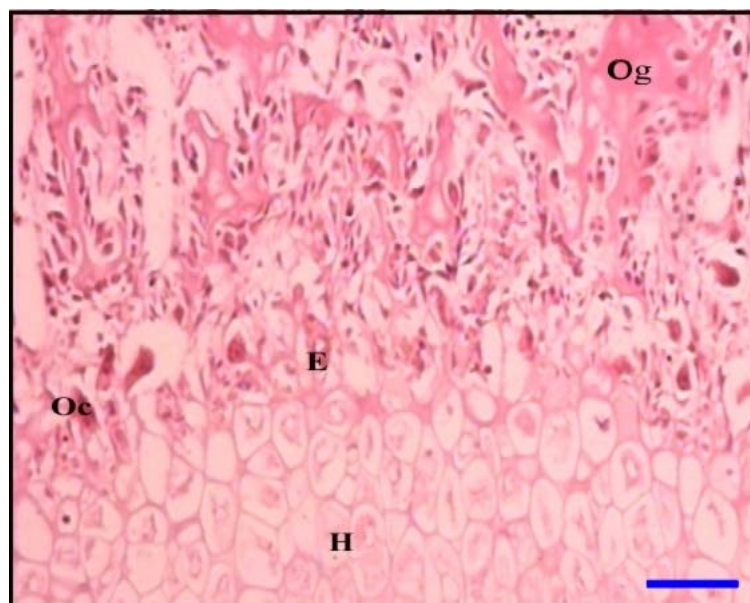


Fig. 10- Fotomicrografia de região do disco epifisário distal de fêmur de rato tratado com fluoxetina mostrando a zona de erosão (E). Nota-se a presença de vários osteoclastos (Oc). Abaixo, a zona hipertrófica (H); Acima, a zona osteogênica (Og). Barra= 50µm . Coloração HE.



Fig. 11- Fotomicrografia de espículas ósseas da zona osteogênica de fêmur de rato tratado com fluoxetina. Ob – osteoblastos; Mo – matriz óssea; Mc – matriz cartilaginosa calcificada ; O – osteócitos; Oc – osteoclastos; LH – lacuna de Howship; e Md – medula óssea. Barra= 10µm. Coloração HE.

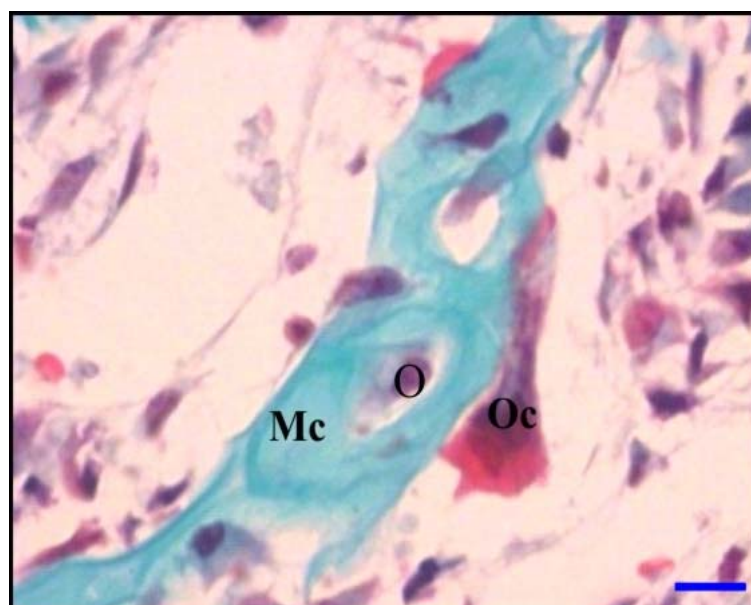


Fig. 12- Fotomicrografia da zona osteogênica da região metafisária distal de fêmur de rato do GC. Observar osteoclastos (Oc), matriz cartilaginosa calcificada (Mc), osteócitos (O). Barra= 10µm. Coloração Tricrômico de Gomori destacando as fibras colágenas e osteoclasto.

ASPECTOS MORFOMÉTRICOS

MASSA CORPORAL E MASSA FEMORAL

Nesse estudo foi observada uma maior massa corporal e femoral nos animais do grupo controle (GC), quando comparados com os animais do grupo experimental (GE). Observar a descrição estatística apresentada no quadro 1.

ESTATÍSTICA DESCRITIVA				
	GRUPO	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
M.CORPORAL	GC	3	60,67	11,55
	GE	6	43,50	7,15
M. FEMORAL	GC	3	,273000	6,85638E-02
	GE	6	,185500	2,45337E-02

Quadro 1-Valores em média e desvio padrão da massa corporal e da massa femoral dos grupos GC e GE, em gramas.

MASSA CORPORAL

A massa corporal média apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimental e controle. O grupo controle obteve peso médio de 60,67g. O grupo experimental 43,50g, conforme figura 13.

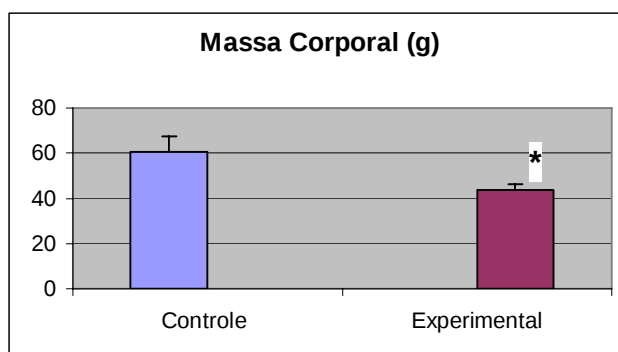


Figura 13 – Massa corporal média dos grupos experimental (GE) e controle (GC).
MASSA FEMORAL

Foi observada uma maior massa femoral no grupo controle, havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A massa femoral média do grupo GC foi de 0,273g e a do grupo GE foi de 0,185g. (Figura 14).

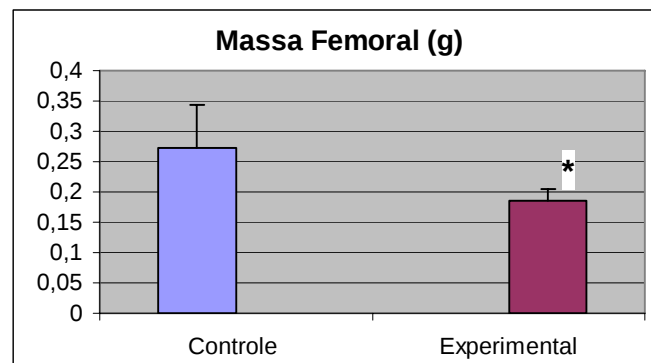


Figura 14 – Massa femoral média dos grupos experimental (GE) e controle (GC).

CRESCIMENTO PONDERAL

Verificou-se uma redução no crescimento ponderal dos animais do grupo tratado com fluoxetina (GE) em relação ao grupo controle (GC). Observar a diferença a partir do sexto dia. (Figura 15).

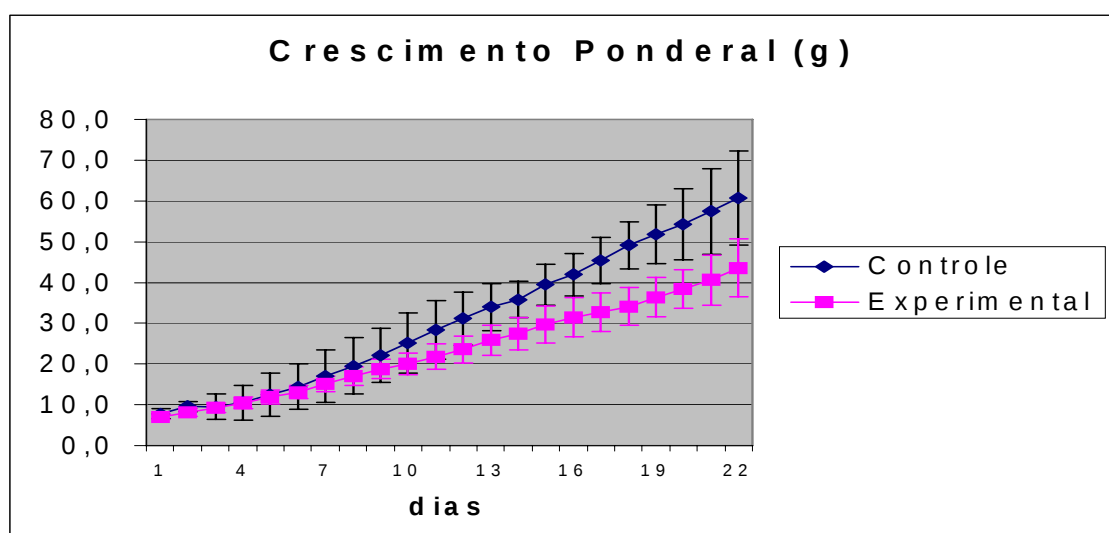


Figura 15 – Curva do crescimento ponderal dos grupos controle e experimental.

ÁREA POR SECÇÃO, ESPESSURA TOTAL E DAS ZONAS DE REPOUSO, SERIADA E HIPERTRÓFICA DO DISCO EPIFISÁRIO DO GRUPO CONTROLE E DO GRUPO EXPERIMENTAL.

Na morfometria da espessura total e das espessuras das zonas de repouso, seriada, e hipertrófica, pudemos observar um pequeno aumento nas medidas dos animais do grupo controle, em comparação com o grupo experimental, muito embora esse aumento não tenha sido estatisticamente relevante, conforme se pode comprovar no quadro 2 e 3. Já em relação a área por secção do disco epifisário, o aumento observado na morfometria do grupo controle foi estatisticamente significativo.

GRUPO CONTROLE

	N	Média	Desvio Padrão
Área por secção	3	70287,33	13995,91
Espessura repouso	3	94,5852100	19,1306516
Espessura seriada	3	170,8089600	42,1226762
Espessura hipertrófica	3	207,5004167	46,3071764
Espessura total	3	472,8945833	61,5994295
N Válido	3		

Quadro 2 - Média da área por secção, das espessuras das zonas de repouso, seriada, hipertrófica, espessura total e desvio padrão dos animais do grupo controle. Expressos em micrômetros.

GRUPO EXPERIMENTAL

	N	Média	Desvio Padrão
Área por secção	6	49033,00	12224,86
Espessura repouso	6	81,5804683	8,5789481
Espessura seriada	6	154,8871983	41,6605399
Espessura hipertrófica	6	145,3901183	42,9173224
Espessura total	6	381,8577833	74,2091147
N Válido	6		

Quadro 3 - Média da área por secção, das espessuras das zonas de repouso, seriada, hipertrófica, espessura total e desvio padrão dos animais do grupo experimental. Valores em micrômetros.

ÁREA POR SECÇÃO DO DISCO EPIFISÁRIO

Ao analisar a área por secção do disco epifisário do grupo controle, pôde-se verificar uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo experimental. A área média encontrada no grupo controle foi de 70.287 μm e no grupo experimental foi de 49.033 μm . (Fig.16).

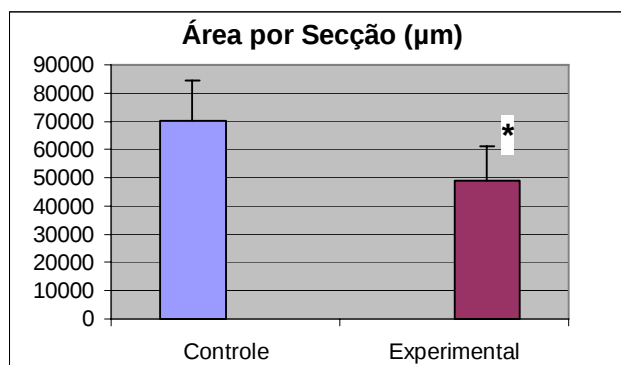


Figura 16 – Área por secção do disco epifisário.

ESPESSURA TOTAL DO DISCO EPIFISÁRIO

O grupo controle apresentou uma espessura total média de 472.89 μm e o grupo experimental de 381.85 μm . Embora haja diferença entre os grupos, essa diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 17).

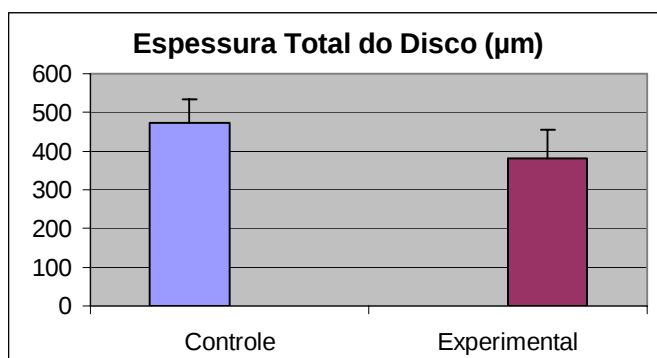


Figura 17 – Espessura total do disco epifisário dos grupos controle e experimental.

ESPESSURA DA ZONA DE REPOUSO

O grupo controle apresentou espessura média de 94,58 μm , e o grupo experimental de 81.58 μm . Não havendo diferença significativa entre os grupos, como se observa na Figura 18.

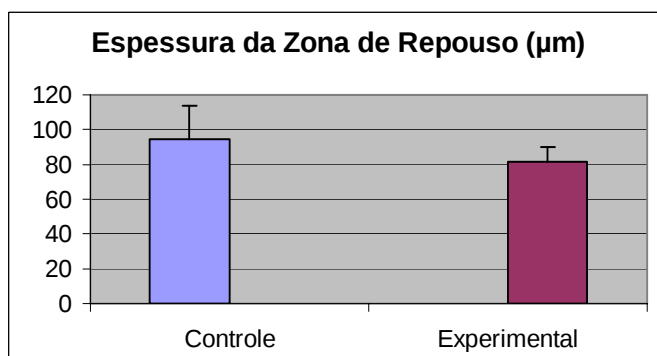


Figura 18 – Espessura média da zona de repouso da cartilagem do disco epifisário de ratos do grupo controle e do grupo experimental.

ESPESSURA DA ZONA SERIADA

Não foi observada diferença significativa entre os grupos experimental e controle nessa zona. O valor da espessura média do grupo controle foi de 170.80 μm e o do grupo experimental 154.88 μm (Figura 19).

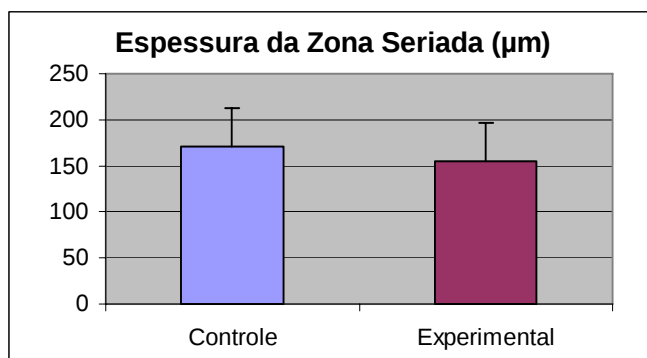


Figura 19 – Espessura média e desvio padrão da zona seriada da cartilagem do disco epifisário de ratos do grupo controle e do experimental.

ESPESSURA DA ZONA HIPERTRÓFICA

O grupo controle apresentou espessura média de 207.50 μm e o experimental 145.39 μm , não havendo diferença significativa entre os grupos estudados. (Figura 20).

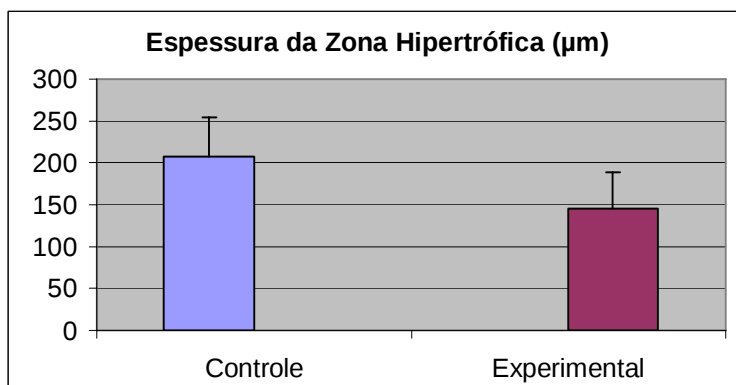


Figura 20 – Espessura média da zona hipertrófica da cartilagem do disco epifisário de fêmur de ratos do grupo controle e do grupo experimental

DISCUSSÃO:

A manipulação farmacológica dos sistemas específicos de neurotransmissores pode favorecer o esclarecimento do papel dessas substâncias nos diversos sistemas orgânicos e suas repercussões sobre o desenvolvimento dos animais.

Os ISRS atuam de forma potente, inibindo a recaptação da 5-HT, aumentando o período de disponibilidade dessa amina na fenda sináptica e sua conseqüente ação nos locais alvos (MORENO; MORENO; SOARES,1999).

No presente estudo, a utilização de fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina, provocou uma diminuição do crescimento ponderal, redução da massa corporal e da massa femoral em ratos neonatos.

Em termos gerais, foram avaliadas as repercussões da manipulação do sistema serotoninérgico durante o período crítico de crescimento sobre parâmetros histológicos.

Os achados deste estudo corroboram os encontrados no trabalho de Magalhães (2000), Silveira (2000) e Deiró (2002) , que verificaram uma redução no peso corporal e em outros órgãos de ratos em crescimento com o uso de ISRS.

Deiró *et al.* (2004) investigaram a maturação somática e ontogênese dos reflexos de ratos neonatos tratados durante o período de aleitamento com diferentes doses de fluoxetina, do 1º ao 21º dia de vida. Medidas indicadoras do crescimento tais como peso corporal, eixo cranial, comprimento longitudinal do corpo e comprimento caudal foram verificados diariamente nesse período. Redução no ganho de peso, retardo na maturação das características, bem como distorção

anatômica crânio-facial foram observados. Um retardo no desenvolvimento dos reflexos também foi observado. Esses achados sugerem que o sistema serotoninérgico tem um papel nos mecanismos do crescimento. Em um estudo semelhante, Deiró *et al.* (2003) utilizando outro ISRS, citalopram, encontraram alterações semelhantes nas características corporais e na ontogênese dos reflexos.

Alterações no comportamento alimentar também têm sido descritas com o uso de fluoxetina, provocando redução na ingesta alimentar em humanos e produzindo efeito hipofágico em ratos (LIGHTOWLER *et al.*, 1996; SILVA, 2003).

Esse efeito anoréxico causado pelo uso de ISRS poderia causar, em ratos na fase de aleitamento, uma desnutrição causada pela diminuição da ingesta de nutrientes essenciais ao seu desenvolvimento, provocando repercussões imediatas e, ou, tardias nesses animais, justificando a redução no ganho de peso. Entretanto, Silva *et al.* (2003) ressaltam que o efeito anoréxico da fluoxetina, descrito na literatura, parece não ser significativo em períodos precoces da lactação em ratos. Já no desmame, quando o comportamento alimentar do animal apresenta características daquele do adulto, observou-se redução da ingesta alimentar. No presente estudo foram utilizados ratos neonatos em fase precoce de aleitamento. Porém, não foram observados dados referentes ao comportamento alimentar dos animais.

Bick e Vandyke (1977) *apud* Bliziotis *et al.* (2000) já haviam descrito que o aumento da disponibilidade da dopamina por bloqueio de seu transportador também provoca modificação de hábitos dietéticos.

Trabalhos ressaltam a importância da 5-HT como molécula regulatória morfogenética em tecidos neurais e não neurais, bem como seus efeitos na regulação da proliferação, motilidade e forma das células do sistema nervoso e

sistema esquelético (SHUEI; SADLER; LAUDER, 1992; MOISEWITSCH e LAUDER, 1996; AZMITIA *et al.*, 1996). Assim sendo, possivelmente, estas mesmas interferências poderiam influenciar o processo de osteogênese, mineralização, e crescimento do disco epifisário nos animais. Observando por este aspecto, seria interessante investigar em trabalhos futuros possíveis alterações no disco epifisário de ratos, em um modelo animal de desnutrição, e compará-las com os dados obtidos neste estudo.

Recentemente, Westbroek *et al.* (2001) relataram a estimulação da proliferação de fibroblasto periosteal de galinhas, causada por um agonista de 5-HT_{2B} (receptor da serotonina tipo 2B). 5-HT_{2B} e 5HT_{2A} (receptor da serotonina tipo 2A) são os receptores da 5-HT envolvidos com sua atividade regulatória de proliferação celular. Assim sendo, acreditam que associado a fatores locais, um dos possíveis papéis da serotonina seria a estimulação de células precursoras de osteoblastos no reparo das fraturas. Além disso, estes autores (WESTBROEK *et al.*, 2001) verificaram uma diminuição da produção de NO em osteoblastos, em resposta ao estímulo mecânico, sugerindo envolvimento da serotonina com a mecano-regulação. Esse estudo e o de Bliziotis *et al.* (2001) foram os trabalhos pioneiros que associaram o sistema serotoninérgico às células ósseas, sugerindo um papel regulatório desse sistema no metabolismo ósseo.

A diversidade de ações da 5-HT é relatada pela existência de um grande número de subtipos de seus receptores encontrados no SNC e fora dele (BOESS e MARTIM, 1994; WESTBROEK *et al.*, 2001).

Esses trabalhos abrem um leque de possibilidades para a investigação científica sobre a atuação do sistema serotoninérgico nos diversos sistemas orgânicos.

Repercussões no tecido ósseo da atividade de outros neurotransmissores já haviam sido descritas em ratos. Bliziotis *et al.* (2000) avaliaram o envolvimento da dopamina com as propriedades biomecânicas e histológicas do fêmur, tíbia e vértebras dos animais com 3 a 5 meses de vida. Foi vista uma redução no comprimento femoral dos ratos com depleção do transportador da dopamina (DAT). Entretanto a maior diferença observada entre os grupos foi em relação ao peso corporal, que foi significativamente menor no grupo DAT do que no grupo controle.

Concordando com esses relatos, nosso estudo mostrou que apesar das diferenças de peso corporal e de peso femoral apresentadas serem bastante significantes, não foram observadas alterações morfométricas estatisticamente significativas entre os grupos.

Diversos relatos ressaltam que outros fatores, além do peso corporal, são determinantes para as características morfométricas do tecido ósseo, tais como, atividades físicas, fatores genéticos, hormônios esteróides, outros hormônios calciotrópicos como vitamina D, calcitonina, e GH (DI MASSO; CELORIA; FONT, 1998; WANG *et al.*, 2001; IWAMOTO *et al.*, 2004). Klein *et al.* (1998) ressaltam que os fatores conhecidos por influenciar acumulação de massa óssea durante o crescimento incluem hereditariedade, gênero, componentes dietéticos (cálcio e proteínas), fatores endócrinos, forças mecânicas, e que quantitativamente, o maior determinante parece ser a hereditariedade.

Embora prevaleça a visão de que o controle da remodelação seja um fenômeno autócrino/parácrino, a reabsorção óssea, que é um braço da remodelação óssea, está sob firme controle endócrino (hormônios sexuais, PTH). Ao passo que nenhum hormônio demonstrou controlar a formação óssea (TAKEDA e KARSENTY, 2001). Esses autores ressaltam que a falência gonadal favorece a perda óssea,

enquanto que a obesidade protege dela, dando uma indicação de que massa óssea, peso corporal, e reprodução poderiam ser regulados pelo mesmo hormônio. Nesse mesmo estudo, os autores fizeram infusão cerebral intra-ventricular, por um mês em ratos, de leptina, um hormônio produzido por adipócitos, que atua via ligação com receptores específicos localizados em quatro núcleos no hipotálamo. Eles observaram que, apesar desse período ser relativamente pequeno para se analisar a remodelação óssea, a leptina causou osteopenia nesses animais por inibição de osteoblastos através de controle central. Esse estudo vem reforçar a noção que o metabolismo ósseo pode estar sob controle neuroendócrino.

É importante referir a presença de grupos de neurônios serotoninérgicos no hipotálamo (NISHIMURA *et al.*, 1998) e que os neurônios serotoninérgicos do tronco cerebral parecem receber influências dos principais centros autonômicos deste mesmo local e do hipotálamo (RISOLD; THOMPSON; SWANSON, 1997). São também encontrados neurônios aferentes para os núcleos da rafe contendo peptídeos ou hormônios (YEW e CHAN, 1999), e aferências provenientes do prosencéfalo límbico que contém aminoácidos excitatórios como o glutamato (KALEN *et al.*, 1989). Essas aferências do sistema límbico mesenfálico colocam os neurônios serotoninérgicos em uma posição ideal para receber informações sobre as atividades das áreas motoras e límbicas (BRAAK *et al.*, 1996).

Um outro estudo com leptina, mostrou que esse hormônio esteve associado a um aumento na espessura do disco epifisário da tíbia, em ratos machos adultos submetidos à administração sistêmica dessa substância (CORNISH *et al.*, 2002). Esses autores, entretanto, não encontraram mudanças estatisticamente significativas na histomorfometria tibial. Nesse mesmo estudo, um aumento na proliferação de condrócitos isolados por leptina também foi observado e verificou-se

que tanto os osteoblastos quanto os condrócitos isolados de ratos expressam a forma sinalizadora de receptores de leptina.

A obesidade infantil freqüentemente está associada a um aumento na espessura, velocidade e aceleração da maturação do disco epifisário, a despeito de baixos níveis séricos do hormônio do crescimento (GH) (MAOR *et al.*, 2002). De forma análoga podemos raciocinar que o oposto, ou seja, baixo peso corporal, poderia estar associado a uma diminuição na espessura, velocidade e aceleração da maturação do disco epifisário.

No presente estudo, embora tenha havido diminuição no ganho de massa corporal em ratos neonatos tratados com fluoxetina, a diferença encontrada entre as espessuras do disco epifisário dos grupos GC e GE não teve importância estatística. Entretanto, as alterações morfológicas encontradas sugerem que poderia ter ocorrido alguma perturbação no processo de maturação dos condrócitos. Foi observado que os condrócitos hipertróficos eram comparativamente menores no GE que no GC. Na zona de erosão a presença de osteoclastos foi mais expressiva no GE do que no GC, o que poderia significar uma aceleração no processo de apoptose daqueles condrócitos e, conseqüentemente, aceleração da calcificação e ossificação do disco epifisário desses animais. Entretanto, futuros estudos seriam necessários onde fossem medidos a densidade das células por campo e seus perímetros, para que o estudo fosse conclusivo sob esse aspecto.

O crescimento, manutenção e ossificação da cartilagem são fundamentais para o desenvolvimento do esqueleto e são regulados ao longo da vida pelos estímulos mecânicos que são impostos pelas atividades físicas (CARTER e WONG, 2003). Estes autores observaram que a pressão hidrostática local intermitente promove a preservação da cartilagem enquanto que estiramento promove o

crescimento da cartilagem e ossificação. Isso pode sugerir que os condrócitos possuem mecanismos semelhantes aos osteócitos e osteoblastos de resposta aos estímulos mecânicos. Talvez, sejam capazes de liberar NO e prostaglandina como resposta sinalizadora, e que a 5-HT cause diminuição da produção de NO com conseqüente apoptose dos condrócitos. Isto explicaria a maior quantidade de osteoclastos encontrada na zona de erosão no GE, do presente estudo.

Condrócitos contidos no disco epifisário promovem rápido crescimento ósseo longitudinal (LEEM *et al.*, 2003). Para conseguir realizar o crescimento, células ativam o programa de maturação que resulta num aumento do número e do volume de condrócitos e elaboração da matriz mineralizada; subseqüentemente, a matriz é reabsorvida e as células diferenciadas são finalmente descartadas do osso por apoptose (ADAMS e SHAPIRO, 2002).

Vários fatores de crescimento e hormônios demonstraram estar implicados na regulação da proliferação e diferenciação dos condrócitos durante o processo de ossificação endocondral. Eles incluem fatores de crescimento do fibroblasto (FGFs), proteína ligada ao hormônio paratireoideano (PTHrP), TGFs (fatores de crescimento e transformação), fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGFs), BMPs, e peptídeo natriurético tipo-C (CNP) (STREET *et al.*, 2002; MIYAZAWA *et al.*, 2002 ; SHIMOAKA *et al.*, 2002).

Um grande número de fatores moleculares, celulares, e epidemiológicos estão envolvidos na regulação do desenvolvimento ósseo. O grande problema é como integrar esses fatores dentro de um conceito que explique o desenvolvimento ósseo como um todo. Frequentemente, eventos no nível orgânico são simplesmente apresentados como um efeito cumulativo de todos os fatores que individualmente são conhecidos por influenciar o desenvolvimento ósseo. Nesse modelo cumulativo

deve-se supor que cada célula óssea carrega o plano de construção da anatomia esquelética completa em seus genes. Schoenau; Fricke; Rauch (2003) consideram esse cenário implausível, porque requeriria uma quantidade astronômica de informação posicional, e propõem um modelo funcional de desenvolvimento ósseo que é baseado na teoria mecanostática de Frost. Nesse modelo, o genoma apenas provê informação posicional para o contorno básico do esqueleto como um molde cartilaginoso. Daí em diante, a ação das células ósseas é coordenada pela solicitação mecânica do osso.

Assim, a 5-HT poderia ser considerada um desses fatores, visto que estimula a imediata e precoce resposta gênica em vários tipos celulares e tecidos (BLIZIOTES *et al.*, 2001).

CONCLUSÕES

Baseados em nossos resultados concluímos que:

- O tratamento com fluoxetina durante o período neonatal reduz o crescimento ponderal de ratos durante a fase de desenvolvimento com conseqüente diminuição de massa corporal e massa femoral, bem como da área por secção do disco epifisiário.
- As alterações morfológicas observadas no disco epifisiário dos animais tratados com fluoxetina sugerem que a serotonina provoca uma interferência no metabolismo dos condrócitos, acelerando o processo de morte celular dessas células.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS C. S. ; SHAPIRO I. M. The fate of the terminally differentiated chondrocyte: evidence for microenvironmental regulation of chondrocyte apoptosis. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.** , [S.I.], v.13, n.6, p.465-473, 2002.

AJUBI N. E. ; KLEIN-NULEND J. ; NIJWEIDE P. J. ; VIJHEID-LAMMERS T. ; ALBLAS M. J. AND BURGER E.H. Pulsating fluid flow increases prostaglandin production by cultured chicken osteocytes-a cytoskeleton-dependent process. **Biochem. Biophys. Res. commun.** , Orlando, v.225, 62-68;1996.

AZMITIA P. M. W. ; DRUZE M. ; WALKER P. ; LAUDER J. Serotonin as a developmental signal. **Behav. Brain Res.** , Amsterdã, v.76, p.19-29, 1996.

BEHMER O. A. ; TOLOSA E. M. C. ; NETO A. G. F. ; RODRIGUES C. J. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica.** 2ª ed. – Barueri, SP: Manole, 2003.

BJURHOLM A. ; KREICBERGS A. ; BRODIN E. ; and SCHULTZBERG M. Substance P-and CGRP-Immunoreactive nerves in bone. **Peptides**, New York, v. 9, 165-171, 1987.

BLIZIOTES M. ; MCLOUGHLIN S. ; GUNNESS M. ; FUMAGALLI F. ; JONES S. ; AND CARON M. Bone histomorphometric and biomechanical abnormalities in mice homozygous for deletion of the dopamine transporter. **Bone**, New York, v.26, p.15-9; 2000.

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

BOESS F. G. ; MARTIN I. L. Molecular Biology of 5-HT receptors. Review. **Neuropharmacology**, Grã-Bretanha, v.33, n.374, p. 275-317, 1994.

BRAAK H. ; BRAAK E. ; YILMAZER D. ; BOHL J. Functional anatomy of human hippocampal formation and related structures. **J. Child. Neurol.**, [S.I.], v.11, n.4, p.265-75, 1996.

BRONCKERS A. L. J. J. ; GOEI W. ; VAN HEERDE W. L. ; DUMONT E. A. W. J. ; REUTELINGSPERGER C. P. M. ; VAN DEN EIJNDE S. M. Phagocytosis of dying chondrocytes by osteoclasts in the mouse growth plate as demonstrated by annexin-V labeling. **Cell. Tissue Res.**, New York, v.301, 267-272, 2000.

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

BURGER E. H. ; KLEIN-NULEND J. ; SMIT T. H. Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodelling osteon-a proposal. **Biomechanics J.**, [S.I.],v.36, p.1453-1459, 2003.

CARTER D. R. ; WONG M. Modelling cartilage mechanobiology. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, Londres, v.358, n.1437, p.1461-1471, 2003.

CONROZIER T. ; VIGNON E. ; MATHIEU P. Inflammation and cartilage. **Rev. Rhum Mal. Osteoartic.**, Paris, v.30, n.56 (5 Pt 2), p. 3 – 7, 1989.

CORNISH J. ; CALLON K. E. ; BAVA U. ; LIN C. ; NAOT D. ; HILL B. L. ; GREY A. B. ; BROOM N. ; MYERS D. E. ; NICHOLSON G. C. ; REID I. R. Leptin directly regulates bone cell function in vitro and reduces bone fragility in vivo. **J. Endocrinol.**, [S.I.], v.175, n.2, p. 405-15, 2002.

DEIRÓ T. C. B. J. ; MANHÃES DE CASTRO R. ; MANHÃES DE CASTRO F. M. ; SILVA JR. V.A. ; SOUZA MORAES S. R. A. Neonatal treatment with citalopram, a selective serotonin reuptake inhibitor, alters the growth of organs rats. **An.Fac.Med.Univ.Fed.Pernamb.** Recife, V.47 (2) , p.107-111, 2002.

DEIRÓ T. C. B. J. ; MANHÃES DE CASTRO R. ; CABRAL FILHO J. E. ; SOUZA S. L. ; FREITAS SILVA S. R. ; FERREIRA L. P. M. ; GUEDES R. C. A. ; CÂMARA C. R. V. ; BARROS K. M. F. T. Neonatal treatment with citalopram delays somatic maturation. In Press on: **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, 2003.

DEIRÓ T. C. B. J. ; MANHÃES DE CASTRO R. ; CABRAL FILHO J. E. ; SOUZA S. L. ; FREITAS SILVA S. R. ; FERREIRA L. P. M. ; GUEDES R. C. A. ; CÂMARA C. R. V. ; BARROS K. M. F. T. Neonatal treatment with fluoxetine delays the somatic maturation and reflex ontogeny. Submetido a **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 2004.

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

FANN M. ; AND PATTERSON P. Depolarization differentially regulates the effects of bone morphogenetic proteins (BMP-2, BMP-6) and activin A on sympathetic neuronal phenotype. **J. Neurochem.**, New York, v.63, p.2074-2079, 1994.

FELDMAN R. S. ; MEYER J. S. ; QUENZER L. F. **Principles of neuropsychopharmacology**, Sunderland: Sinauer Associates Inc, 1997.

GARIMELLA R. ; BI X. ; CAMACHO N. ; SIPE J. B. ; ANDERSON H. C. Primary culture of rat growth plate chondrocytes: an in vitro model of growth plate histotype, matrix vesicle biogenesis and mineralization. **Bone.**, New York, v.34, n.6, p.961-70, 2004.

GARTNER L. P. ; HIATT J. L. **Tratado de histologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2001.

GOTO T. ; YAMAZA T. ; KIDO M. A. ; AND TANAKA T. Light-and electron microscopic study of the distribution of axons containing substance P and the localization of neurokinin-1 receptor in bone. **Cell. Tissue. Res.**, [S. I.], v.293, p.87-93;1998.

HAM A. W. **Histologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1983.

HARA-IRIE F. ; AMIZUKA N. ; AND OZAWA H. Immunocytochemical and Ultrastructural localization of CGRP-positive nerve fibers at the epiphiseal trabecules facing the growth plate of rat femures. **Bone**, New York, v.18, p.29-39, 1996.

HAUGE E. M. ; MOSEKILDE L.E. ; MELSEN F. ; AND FRYDENBERG M. How many patients are needed? variation and design considerations in bone histomorphometry. **Bone**, New York, v.28, p.556-562, 2001.

HUNZIKER E. B. ; SCHENK R. K. ; AND CRUZ-ORIVELM. Quantitation of chondrocyte performance in growth-plate cartilage during longitudinal bone growth. **J. Bone Jt. Surg.**, Boston, v.69-A, n.2, p.162-173, 1987.

IRIE K. ; ALPASLAN C. ; TAKAHASHI K. ; KONDO Y. ; IZUMI N. ; SAKAKURA Y. ; TSURUGA E. ; NAKAJIMA T. ; EJIRI S. ; OZAWA H. ; YAJIMA T. Osteoclast differentiation in ectopic boné formation induced by recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2). **J. Bone Miner. Metab.**, [S.I.], v.21, p.363-369, 2003.

IWAMOTO M. ; HIGUCHI Y. ; ENOMOTO-IWAMOTO M. ; KURISU K. ; KOYAMA E. ; YE H. ; ROSENBLOOM J. ; PACIFICI M. The role of ERG (ets related gene) in cartilage development. **Osteoarthr. Cartilage**, [S.I.], 9 Suppl A: S41-7, 2001.

JUNQUEIRA L.C. ; CARNEIRO J. **Histologia básica**, texto/Atlas. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004.

KALEN P. ; STRECKER R. E. ; ROSENGREN E. ; BJORKLUND A. Regulation of estrial serotonin release by the lateral habendula-dorsal raphe pathway in the rat as demonstated by in vivo microdialysis: role of excitatory amino acids and GABA. **Brain Res.**, Amsterdã, v.492, p.197-202, 1989.

KLEIN-NULEND J. ; SEMEINS C. M. ; AJUBI N. E. ; NIJWEIDE P. J. ; AND BURGER E. H. Pulsating fluid flow increase nitric oxide (NO) synthesis by osteocytes but not periosteal fibroblasts-correlation with prostaglandin upregulation. **Biochem. Biophys. res. Commun.**, Orlando, v.216, p.640-648, 1995.

KLEIN-NULEND J. ; HELFRICH M. H. ; STERCK J. G. H. ; MACPHERSON H. ; JOLDERSMA M. ; RALSTON S. H. ; SEMEINS C. M. ; BURGER E. H. Nitic oxide response to shear stress by human bone cell cultures is endothelial nitric oxide syntetase dependent. **Biochem. Biophys. res. Commun.**, Orlando, v.250, p.108-114, 1998.

KLEIN R. F. ; MITCHELL S. R. ; PHILLIPS T. J. ; BELKNAP J. K. ; ORWOLL E. S. Quantitative trait loci affecting peak bone mineral density in mice. **J. Bone Miner. Res.**, Cambridge, v.13, n. 11, p.1648-1656, 1998.

KONTTINEN Y. ; IMAI S. ; AND SUDA A. Neuropeptides and the puzzle of bone remodeling. **Acta orthop. Scand.**, Copenhagen, v.67, p.632-639, 1996.

KUNDU B. ; KHARE K. ; SINGH G. Role of polypeptides in the treatment and diagnosis of osteoporosis. **Peptides**, New York, v.20, p.523-537, 1999.

LAUDER J. M. : H. TAMIR AND T. W. SADLER. Serotonin and morphogenesis. **Development** , Cambridge, v.102, p.709-720, 1988.

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

LEEM K. ; PARK S.Y. ; LEE D.H. ; BOO Y. M. ; CHO K.H. ; LIM J. ; JEON H. ; PARK H.J. ; CHUNG J. H. ; KIM H. Effects of Jaoga-Yukmiwon (R), a Korean herbal medicine, on chondrocyte proliferation and longitudinal bone growth in adolescent male rats. **Phytother. Res.**, [S.I.], v.17, n.9, p.1113-1116, 2003.

LIGHTOWLER S. ; WOOD M. ; BROWN T. ; GLEN A. ; BLACKBURN T. ; TULLOCH I. ; KENNETT G. Uma investigação do mecanismo responsável por hipofagia induzida por fluoxetina em ratos. **Eur. J. Pharm.**, [S.I.], v.296, p.137-141, 1996.

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

MAOR G. ; ROCHWERGER M. ; SEGEV Y. ; PHILLIP M. Leptin acts as a growth factor on the chondrocytes of skeletal growth centers. **J. Bone Miner. Res.**, Cambridge, v.17, n.6, p.1034-1043, 2002.

MASON D. J. ; SUVA L. J. ; GENEVER P. G. ; PATTON A. J. ; STUECKLE S. ; HILLAM R. A. ; SKERRY T. M. Mechanically regulated expression of a neural glutamate transporter in bone: A role for excitatory amino acids as osteotropic agents? **Bone**, New York, v.20, p.199-205, 1997.

MIKUNI-TAKAGAKI Y. ; SUZUKI Y. ; KAWASE T. ; and SATIO S. Distinct responses of different populations of bone cells to mechanical stress. **Endocrinol.**, Baltimore, v.137, p.2028-2035, 1996.

MILES R. R. ; TURNER C. H. ; SANTERRE R. ; TU Y. ; McCLELLAND P. ; ARGOT J. ; DeHOFF B. S. ; MUNDY C. W. ; ROSTECK P. J. Jr. ; BIDWELL J. ; SLUKA J. P. ; HOCK J. ; and ONYIA J. E. Analysis of differential gene expression in rat tibia after an osteogenic stimulus *in vivo*: mechanical loading regulates osteopontin and myeloperoxidase. **J. Cell. Biochem.**, v.68, p.355-365, 1998.

MIYAZAWA T. ; OGAWA Y. ; CHUSHO H. ; YASODA A. ; TAMURA N. ; KOMATSU Y. ; PFEIFER A. ; HOFMANN F. ; NAKAO K. Cyclic GMP-dependent protein kinase II play a critical role in C-type natriuretic peptide-mediated endochondral ossification. **Endocrinol.**, Baltimore, v.143, n.9, p.3604-3610, 2002.

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

MORENO R. A. ; MORENO D. H. ; SOARES M. B. M. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, São Paulo, V. 21, p. 24-40, 1999.

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

NELSON N. The family of Na⁺/Cl⁻ neurotransmitter transporters. **J. Neurochem.**, New York, v.71, p.1785-1803, 1998.

NISHIMURA A. ; UEDA S. ; TAKEUCHI Y. ; MATSUSHITA H. ; SAWADA T. ; KAWATA M. Vulnerability to aging in the rat serotonergic system. **Acta Neuropathol.**, Berlin, v.96, n.6, p.581-595, 1998.

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

RAHMAN S. ; DOBSON P. ; BUNNING R. ; RUSSEL R. ; AND BROWN B. The regulation of connective tissue metabolism by vasoactive intestinal polypeptide. **Reg.Peptides**, Amsterdã, v.37 p. 111-121, 1992.

RISOLD P. Y. ; THOMPSON R. H. ; SWANSON L. W. The structural organization of connections between hypothalamus and cerebral cortex. **Brain Res.**, Amsterdã, v.24, n.2-3, p.197-254, 1997.

SCHIRRMACHER K. ; BINGMANN D. Effects of vitamin D₃, 17 β -estradiol, vasoactive intestinal peptide, and glutamate on electric coupling between rat osteoblast-like cells in vitro, **Bone**, New York, v.23. p.521-526, 1998.

SCHOENAU E. ; FRICKE O. ; RAUCH F. The regulation of bone development as a biological system. **Homo**, Jena, v.54, n.2, p.113-118, 2003.

SERRE C. ; FARLAY D. ; DELMAS P. ; AND CHENU C. Evidence for a dense and intimate innervation of the bone tissue, including glutamate-containing fibers. **Bone**, New York, v.25, p.623-629, 1999.

SHIMOAKA T. ; OGASAWARA T. ; YONAMINE A. ; CHIKASU D. ; KAWANO H. ; NAKAMURA K. ; ITOH N. ; KAWAGUCHI H. Regulation of osteoblast, chondrocyte, and osteoclast functions by fibroblast growth factor (FGF)-18 in comparison with FGF-2 and FGF-10. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.277, n.9, Issue 1, p.7493-7500, 2002.

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

SILVA M.C.; SOUZA S.L.DE; OLIVEIRA DE LIRA L.; LEAL V. DE S.; DEIRÓ T.C.B.J.; NOGUEIRA M.L. ; MANHÃES DE CASTRO R. Comportamento alimentar Neonatal em ratos tratados com fluoxetina durante o período de lactação. **Resumo publicado nos anais da FeSBE**, 2003.

SILVEIRA, A. B. Estudo histológico e morfométrico de ratos com 14 e 21 dias de vida pós-natal, tratados com um inibidor seletivo da recaptação de serotonina. **Dissertação de mestrado**, Recife, Dept. de Anatomia, UFPE, 2000.

SNELL, R.S. **Histologia clínica**, 2. ed., Rio de Janeiro: Interamericana, 1985.

STREET J. ; BAO M. ; DEGUZMAN L. ; BUNTING S. ; PEALE F. V. JR. ; FERRARA N. ; STEINMETZ H. ; HOEFFEL J. ; CLELAND J. L. ; DAUGHERTY A. ; VAN BRUGGEN N. ; REDMOND H. P. ; CARANO R. A. D. ; AND FILVAROFF E. H. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. **PNAS**, [S.I.], vol.99 , p.9656-9661; 2002.

TANAKA S. ; NAKAMURA I. ; INOUE J. ; ODA H. ; NAKAMURA K. Signal transduction pathways regulating osteoclast differentiation and function. **J. Bone Miner. Metab.**, [S.I.], v.21, p.123-133, 2003.

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

TECOTT L. ; SHTROM S. ; JULIUS D. Expression of a serotonin-gated ion channel in embryonic neural and nonneural tissues. **Mol. Cell. Neurosci.**, [S.I.], v.6, n.1, p.43-55, 1995.

VIGNON E. ; BROQUET P. ; MATHIEU P. ; LOUISOT P. ; RICHARD M. Histaminergic H1, serotonergic, beta adrenergic and dopaminergic receptors in human osteoarthritic cartilage. **Biochem. Int.**, [S.I.], v.20, n. 2, p. 251 – 255, 1990.

WANG F. ; ZHANG B. ; YANG H. ; LI A. ; LI R. ; ZHOU D. Transforming growth factor-beta can induce differentiation of hypertrophic chondrocytes into osteoblast-like cells in epiphiseal plate. **Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao**, China, v.32, n.2, p. 243-6, 2001. Resumo.

WESTBROEK I. ; VAN DER PLAS A. ; ROOIJ K. E. ; KLEIN-NULEND J. AND NIJWEIDE P. J. Expression of serotonin receptors in bone. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.276, nº31, Issue 3, 28961-28968, 2001.

WESTBROEK I.; AJUBI N. E. ; ALBLAS M. J. ;SEMEINS C. M. ; KLEIN-NULEND J. ; BURGER E. H. ; and NIJWEIDE P. J. Differential stimulation of prostaglandin G/H synthase-2 in osteocytes and other osteogenic cells by pulsating fluid flow. **Biochem. Biophys. res. commun.**, Orlando, v.268, p. 414-419; 2000.

YEW D. T. ; CHAN W. Y. Early appearance of acetylcholinergic, serotonergic, and peptidergic neurons and fibers in the developing human central nervous system. **Microsc. Res. Tech.**, New york, v.45, n.6, p.389-400, 1999.

YOU L. ; COWIN S. C. ; SCHAFFLER M. B. ; WEINBAUM S. A model for strain amplification in the actin cytoskeleton of osteocytes due to fluid drag on pericellular matrix. **J. Biomech.**, [S.I.], v. 34, p.1375-1386, 2001.