



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

VIVIANE DA SILVA KAGY

**EFEITO DO USO CRÔNICO DE CARBONATO DE LÍTIO NA
MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA INDUZIDA EM RATOS WISTAR**

CURITIBA

2012

VIVIANE DA SILVA KAGY

**EFEITO DO USO CRÔNICO DE CARBONATO DE LÍTIO NA
MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA INDUZIDA EM RATOS WISTAR**

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

Orientadora: Profa. Dra. Aline
Cristina Batista Rodrigues Johann

Coorientadora: Profa Dra Elisa Souza
Camargo

CURITIBA

2012

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

K11e
2012

Kagy, Viviane da Silva

Efeito do uso de carbonato de lítio na movimentação dentária induzida em ratos Wistar / Viviane da Silva Kagy ; orientadora: Aline Cristina Batista Rodrigues Johann ; coorientadora: Elisa Souza Camargo. – 2012.
50 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2012

Bibliografia: f. 48-50

1. Ortodontia. 2. Carbonato de lítio. 3. Movimentação dentária. 4. Fosfatase alcalina. 5. Osteoclastos. 6. Aspartato aminotransferase. I. Joahann, Aline Cristina Batista Rodrigues. II. Camargo, Elisa Souza. III. Pontifícia Univesidade 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


VIVIANE DA SILVA KAGY

EFEITO DO USO CRÔNICO DE CARBONATO DE LÍTIO NA MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA INDUZIDA EM RATOS WISTAR

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 Aline Cristina Batista Johann
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


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


Prof. Dr. Henrique Pretti
Curso de Odontologia, UFMG

Curitiba, 13 de Dezembro de 2012.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Sou imensamente grata à minha querida orientadora, Professora Doutora Aline Cristina Batista Rodrigues Johann, por essa orientação que ultrapassa a dissertação. Muitas orientações feitas por ela ficarão para o resto da minha vida, como o seu exemplo de profissionalismo, caráter e amor ao que realiza. É gratificante trabalhar com seres humanos como você Professora Aline! Agradeço pela disponibilidade dispensada em todas as inúmeras situações durante esses dois anos trabalhando juntas, pelas suas sugestões que foram preciosas para a concretização deste projeto. Bem como o imenso carinho nos meus momentos de dificuldade. Agradeço, sobretudo, o privilégio de haver trabalhado sob sua orientação, muito obrigada de coração.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por nos proporcionar uma constante evolução, por ampliar a minha consciência como unidade criatura - Criador em todos os momentos dessa caminhada.

“Não há vida, realidade, inteligência senão pela vontade de Deus.”

(Leocádio J. Correia)

À minha mãe, Dôra, que abdica todos os dias da sua condição de aposentada pra trabalhar em prol do meu sonho e da minha profissão. Que abraçou junto comigo, há dois anos atrás, o sonho do mestrado.

Ao meu noivo, André Luis Geara Cardoso, que por muitas vezes foi meu colaborador, obrigada por ter sido meu incentivador em muitos momentos por acreditar na minha capacidade quando eu mesma não acreditava. Por ter renunciado junto comigo a férias, feriados e finais de semana desde que iniciei a construção desse sonho, agradeço pelo conforto nos momentos difíceis e pelo carinho de sempre.

Ao meu pai, Vivaldo Pinto Kagy, pelos ensinamentos que me foram passados na infância os quais levarei para a vida inteira e os chamo de princípios. Obrigada também pelo apoio financeiro na conquista desse título.

À Karina, minha irmã, em quem sempre encontrei incentivo para persistir. Agradeço pela ajuda com os animais do experimento, os quais ela mesma relata que são aqueles que mesmo sem falar a língua dos humanos nos ensinam a verdadeira arte de amar. Irmã, somente indivíduos de coração imenso e puro como o seu, são capazes de entender os animais a ponto de dedicar a sua vida a eles, como você faz.

Ao meu tio, Doutor Natal Santos da Silva, pela prontidão em me ajudar na prescrição e obtenção do fármaco utilizado nesse trabalho. E por ser exemplo de luta e força de vontade com sua história pessoal, te admiro imensamente tio.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná, instituição que me acolheu na graduação e no mestrado acadêmico, minha formação profissional é, em grande parte, obtida nesta casa.

Ao Diretor do programa de Pós- Graduação em Odontologia, Professor Doutor Sérgio Vieira por exercer de forma inigualável o sua árdua função.

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, colaboração e atenção destinada à fase experimental dessa pesquisa.

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

Aos animais que doaram a sua existência ao plano espiritual para servir a esse experimento e ao desenvolvimento da ciência.

À Professora Doutora Elisa Souza Camargo, pela sua colaboração neste trabalho. Admiro-a pela generosidade, elegância, educação e transparência que sempre transmite.

Ao Professor Doutor Orlando Motohiro Tanaka, pela organização com o Programa de Ortodontia dessa Universidade. Obrigada pela dedicação integral do seu tempo destinado à nós, alunos. Agradeço pelas palavras românticas e não românticas ditas ao longo desses dois anos, as quais foram de grande importância para a minha formação como ortodontista. Seus exemplos e ensinamentos ficarão guardados para a vida toda. Obrigada pela sua preciosa colaboração nesse trabalho.

Ao Professor Doutor Odilon Guariza Filho, pela sua paciência em transmitir seus conhecimentos.

Ao Professor Doutor Henrique Pretti, que aceitou gentilmente o convite para participar da minha banca de defesa. Agradeço por ter dedicado o seu precioso tempo para contribuir com esse trabalho.

À Professora Doutora Evelise Machado de Souza, pela atenção e tempo destinados à esse trabalho. Agradeço as suas considerações e a sua disponibilidade.

À Professora Doutora Ana Maria Trindade Grégio, colaboradora essencial na produção dessa pesquisa. Obrigada por ter sido sempre tão atenciosa e disposta a nos atender.

Ao Professor Doutor João Armando, que humildemente repassou seus conhecimentos de bioquímica os quais foram de grande importância. Obrigada pelo tempo destinado a esse trabalho.

Ao Professor Doutor Sérgio Aparecido Ignácio pela análise estatística dos dados da presente dissertação. Os agradecimentos sempre serão

insuficientes para retribuir toda a sua dedicação para com o Programa de Pós-Graduação de Odontologia dessa instituição.

Às queridas graduandas e alunas do programa de iniciação científica, Arieli Carini Michels e Suellen Teixeira, obrigada pela ajuda, cuidado e carinho destinado à essa pesquisa. Desejo de coração que o entusiasmo e o amor a profissão sempre estejam presentes na vida de vocês como é perceptível nos dias de hoje.

À Cirurgiã-Dentista e hoje futura ortodontista Giovanna Simião Ferreira pela colaboração na fase prática e experimental desta pesquisa.

Às funcionárias da Clínica Odontológica da PUCPR, Nilce e Rosana por acompanharem os alunos da Ortodontia com tanto zelo.

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

Aos meus estimados pacientes, que por inúmeras vezes se adaptaram à minha agenda restrita no consultório devido às horas dedicadas ao mestrado e à produção desse trabalho. Sem a compreensão deles nada disso seria possível.

Agradeço a todos os meus colegas da 8ª Turma de Mestrado em Ortodontia da PUCPR, Bruno Borges de Castilhos, Camila Rychuv Santos, Jorge César Borges Leão Filho, José Guilherme Camargo Teixeira da Cunha, Regis Meller Santana, em especial aos que colaboraram e vivenciaram a realização do meu experimento com os ratos Wistar: Ana Paula Lazzari Marques Peron, Cristiano Miranda de Araujo, Giovana Carla Franzon Frigotto, Luciana Trevisan Bittencourt Muniz e Marcel Durante Brunet, muito obrigada pelo carinho e disposição.

“O mais importante é a mudança,
o movimento, o dinamismo, a energia.
Só o que está morto não muda!
Repito por pura alegria de viver:
a salvação é pelo risco, sem o qual a vida não
vale a pena! ”

(Clarice Lispector)

SUMÁRIO

1 ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	9
RESUMO.....	11
INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	12
MATERIAL E MÉTODOS	14
RESULTADOS.....	18
DISCUSSÃO.....	20
CONCLUSÕES.....	23
REFERÊNCIAS.....	24
2 ARTIGO EM INGLÊS.....	29
REVIEW.....	
INTRODUCTION AND LITERATURE REVIEW.....	29
MATERIAL AND METHODS.....	30
RESULTS.....	34
DISCUSSION.....	36
CONCLUSIONS.....	38
REFERENCES.....	39
3 ANEXOS.....	43
ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS.....	43
ANEXO B - NORMAS PARA PUBLICAÇÃO- AMERICAN JOURNAL OF ORTHODONTICS AND DENTOFACIAL ORTHOPEDICS.....	44
ANEXO C- LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	50

1 ARTIGO EM PORTUGUÊS

EFEITO DO USO CRÔNICO DE CARBONATO DE LÍTIO NA MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA INDUZIDA EM RATOS WISTAR

VIVIANE DA SILVA KAGY, CD

Mestranda em Odontologia - Área de Concentração em Ortodontia
Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Concentração em
Ortodontia
Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil.
Escola de Saúde e Biociências
Email: vivianekagy@hotmail.com

ALINE CRISTINA BATISTA RODRIGUES JOHANN, CD,PhD

Professora Adjunta do Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de
Concentração em Estomatologia
Escola de Saúde e Biociências
Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil.
Email: aline.johann@pucpr.br

ELISA SOUZA CAMARGO, CD,PhD

Professora Titular do Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de
Concentração em Ortodontia
Escola de Saúde e Biociências
Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil.
Email: elisacamargo@pucpr.br

Endereço para Correspondência

Profa. Dra. Aline Cristina Batista Rodrigues Johann

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil.
Escola de Saúde e Biociências
Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Concentração em
Estomatologia
Rua Imaculada Conceição, 1155, Bairro Prado Velho, CEP 80215-901 –
Curitiba,PR. Fone: 55 41 3271-1637/Fax 55 41 3271-1405
Email: aline.johann@pucpr.br

RESUMO

Introdução: O objetivo foi avaliar a movimentação dentária induzida em ratos Wistar submetidos à administração de Carbonato de Lítio (CL). **Métodos:** Os ratos (n=192) foram divididos nos grupos: L- administração diária de 60mg/kg de CL, sem movimentação dentária e eutanasiados após 33, 37, 44 e 51 dias; LM- administração de CL por 30 dias e durante os dias subsequentes, 3, 7, 14 e 21 de movimentação dentária com 30g/F; SM- solução salina e movimentação dentária. Foram mensurados a taxa de movimentação dentária, o número de osteoclastos e os níveis séricos de lítio, fosfato (PO_4), AST, fosfatase alcalina (ALP) e creatinina e foram aplicados os testes estatísticos ANOVA, Kruskal-Wallis, Games-Howell e Dunn ($p < 0,05$). **Resultados:** A taxa de movimentação foi menor no LM aos 44 dias. O Lítio e o AST foram maiores no L e LM. O contrário foi observado para PO_4 . A AST foi maior no LM em relação ao L. Maior ALP foi verificado no L. A creatinina foi menor no LM. **Conclusões:** O CL inibiu a movimentação dentária aos 14 dias. Os pacientes que usam CL devem ser monitorados durante o tratamento ortodôntico.

Palavras-chave: Carbonato de Lítio; Movimentação Dentária; Osteoclastos; Fosfatase Alcalina; Aspartato Aminotransferases; Creatinina.

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A prevalência do transtorno de humor bipolar (THB)¹ na população em geral é estimada em 1% e o Carbonato de Lítio (CL) é o fármaco de escolha utilizado para o tratamento desse distúrbio. Este fármaco também é utilizado em outras desordens psicológicas como o transtorno de hiperatividade e depressão unipolar em crianças, adolescentes e adultos.²⁻⁴

O tratamento ortodôntico fundamenta-se na premissa de que uma força é aplicada a um dente e transmitida para os tecidos adjacentes, acarretando em eventos químicos, mecânicos e celulares.^{5,6} As mudanças específicas que ocorrem no tecido ósseo e na raiz de um dente ortodonticamente movimentado são a reabsorção do osso por osteoclastos no lado de pressão e a deposição óssea no lado de tensão.⁵⁻⁷ A mensuração da movimentação dentária induzida por meio do paquímetro digital⁸, a análise bioquímica do sangue^{9,10} e a coloração histoquímica pela fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP)¹¹⁻¹³ são métodos úteis para a avaliação da movimentação dentária induzida.

As alterações teciduais produzidas pela força ortodôntica podem ser influenciadas por fatores locais relacionados aos dentes, e também a fatores sistêmicos relacionados ao metabolismo ósseo. Alguns fármacos utilizados pelos pacientes durante o tratamento ortodôntico, também podem ser fator de influência sobre essas alterações teciduais. O efeito combinado das forças mecânicas com a ação dos fármacos pode ser aditiva, inibidora ou sinérgica.¹⁴⁻¹⁶

A avaliação do efeito do CL no tecido ósseo tem sido realizada em humanos e em ratos e revelou resultados conflitantes como inibição da formação ou perda óssea,^{17,18} nenhuma influência,¹⁹ ou aumento da formação óssea.^{20,21,22} Baran et. al verificaram que o tratamento com lítio inibe a síntese de osteóide, levando uma diminuição da mineralização óssea em ratos. Os resultados do estudo de Cohen et. al não detectaram qualquer efeito sobre a densidade óssea depois de curto ou longo prazo do tratamento com carbonato de lítio¹⁹ Por outro lado o estudo¹⁷ experimental de Clement-Lacroix et. al mostraram um efeito anabólico do lítio na massa óssea em ratos.²⁰

Durante a expansão da sutura palatina mediana, foi administrado em ratos, por meio de sonda, diariamente com lítio ou de cloreto de sódio, realizado por Tang et al²² verificaram que a administração de uma dose diária de lítio em ratos com 4 semanas de vida, administrada por gavagem de 200 mg/kg por 3, 7 e 14 dias aumenta a neoformação óssea na sutura palatina mediana, apesar de ter sido inicialmente retardada no terceiro dia de movimentação dentária induzida associada ao uso do CL nos ratos submetidos a expansão rápida da maxila. No entanto, não existem estudos que avaliem o efeito do uso crônico do CL na movimentação dentária induzida²².

Considerando os resultados controversos observados na literatura e a possível influência do CL sobre a movimentação dentária induzida, o objetivo deste estudo foi avaliar a movimentação dentária induzida em ratos submetidos ao uso crônico do Carbonato de Lítio.

MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), sob o número de registro 631/11.

Amostra

A amostra foi constituída de 192 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) com 9 semanas de vida, pesando aproximadamente 300 – 350 g, provenientes do Biotério da PUCPR.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos.

- Grupo L (n=64): administração intraperitoneal diária de 60mg/kg de CL em solução salina (Bioarte Farmácia de manipulação LTDA, Piracicaba, SP, Brasil), dose que resultou em níveis séricos de lítio de $1,30 \pm 0,55$ mmol/L, 90 minutos após a administração.¹⁷ O fármaco teve a sua pureza e potencial certificado pelo fabricante. A aplicação foi realizada por meio de seringas plásticas descartáveis agulhadas U-100 Insulin ½ cc 0,05 m (BD ultra-fineTM BD- Becton Driver, Franklin

Lakes). Esses animais não foram submetidos à movimentação dentária e foram eutanasiados após 33, 37, 44 e 51 dias (n=16 em cada período) de aplicação do fármaco. Um estudo prévio considerou o uso agudo de Lítio equivalente a uma dose única e uso crônico quando o fármaco foi administrado diariamente por três semanas.²³ Como no presente estudo os ratos foram submetidos à administração de Lítio por um período superior a três semanas (33, 37, 44 e 51 dias) esse uso foi considerado como crônico.

- Grupo LM (n=64): administração diária prévia de CL conforme acima descrito, o que resultou em níveis séricos de lítio de $1,34 \pm 0,53$ mmol/L. O fármaco foi administrado por 30 dias e durante os 3, 7, 14 e 21 dias subsequentes, correspondentes ao período de movimentação dentária induzida. A eutanásia ocorreu nos dias 33, 37,44 e 51.

- Grupo SM (n=64): administração de solução salina (LBS- Laborasa Indústria Farmacêutica LTDA, São Paulo, SP, Brasil) em igual volume e período utilizados para os grupos anteriores. A movimentação dentária e a eutanásia foram realizadas de acordo com os períodos supracitados.

Os animais foram pesados no início (pi) e no final (pf) do tempo experimental com o auxílio de balança eletrônica de precisão (Gehaka – BG 4001, São Paulo, SP, Brasil). A variação do peso (ΔP) em porcentagem foi calculada por meio da fórmula:

$$\Delta P(\%) = (pi/pf-1) \times 100$$

Protocolo experimental

Para a realização da movimentação dentária induzida, os animais foram sedados com injeção intramuscular de 50 mg/kg de Tiletamina/Zolazepan (Zoletil 50 ®, Brasil indústria e comércio Ltda, Jurubatuba, São Paulo, SP, Brasil). O dispositivo ortodôntico consistiu de uma mola fechada de *nickel titanium* (G&H® Wire Orthodontics, Franklin) e fio de amarrilho de aço inox (Dental Morelli Ltda, São Paulo, SP, Brasil) com 0,025 milímetros, para fixação da mola no primeiro molar superior direito e no incisivo superior do mesmo lado, que produziu força recíproca de 30g/F²³, entre esses dentes, aferido com um dinamômetro

(Haag-Streit AG, Koeniz, Switzerland). A extremidade do fio de amarrilho foi fixada no incisivo superior direito com resina composta e unido ao incisivo superior esquerdo para aumentar a estabilidade do dispositivo (4 seasons, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein, Luxemburgo) após condicionamento ácido fosfórico 37% (Total Etch, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein, Luxemburgo) e aplicação de adesivo fotopolimerizável (AdheSE, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein, Luxemburgo) (Fig1).



Fig 1. Dispositivo ortodôntico instalado.

Mensuração do movimento dentário

Utilizando um paquímetro digital (Absolute-Mitutoyo, Kawasaki-Shi, Japan) foi mensurada a distância entre o primeiro molar superior direito e o incisivo central superior do mesmo lado antes da colocação do dispositivo ortodôntico (medida inicial-mi) e após a eutanásia (medida final-mf). A taxa de movimentação dentária (ΔTM) foi calculada pela fórmula:

$$\Delta TM (\%) = (mi/mf - 1) \times 100$$

Análise bioquímica

Os animais foram eutanasiados por overdose de solução anestésica (100 mg/kg) de pentobarbital sódico (Syntec, Cotia, SP, Brasil), aplicado via intraperitoneal.

O sangue dos animais foi coletado por punção intracardiaca no momento da eutanásia. Foram colhidos 6 ml de sangue em tubo vacutainer com gel (BD-Becton Driver, Franklin Lakes, Nova Jersey), descartável sem anticoagulante.

A análise bioquímica do sangue foi realizada em Laboratório de Análises Clínicas LANAC (Curitiba, PR, Brasil), sendo quantificados: o nível plasmático de fosfato inorgânico (PO_4), fosfatase alcalina (ALP), aspartato amino transferase (AST), creatinina, cálcio por meio do sistema bioquímico automático Advia 1200/1800 (Medcorp-Siemens, Brasília, DF, Brasil). O nível sérico de lítio foi mensurado pelo analisador automático Dimension RXL (Medcorp-Siemens, Brasília, DF, Brasil) e a albumina pelo analisador automático Advia 1200 (Medcorp-Siemens, Brasília, DF, Brasil). A obtenção dos valores de cálcio sérico total corrigido (alb-adjCa) foi ajustada para albumina, calculado pela fórmula:

$$\text{alb-adjCa} = [(40 - \text{albumina}) \times 0,025 + \text{total cálcio}]^{21,24}$$

Análise histopatológica

Após a eutanásia, a maxila de cada animal foi removida, dissecada e seccionada na linha média. A hemi-maxila direita foi fixada em formol a 10% por 24 horas e desmineralizada com EDTA 5%, por 2 meses.

Após a desmineralização, os espécimes foram processados e emblocados em parafina, no Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR. Foram obtidas cinco secções transversais a partir do terço cervical da raiz mésio-vestibular do primeiro molar, cortados em micrótomo com 4 μm de espessura, com a superfície oclusal do molar paralela ao micrótomo e com intervalo de 60 μm entre cada secção. Estes cortes foram corados pela técnica histoquímica TRAP. A enzima TRAP é considerada marcador pontual de osteoclastos e pode ser utilizada para determinar quantitativamente, a reabsorção óssea.²⁵ A coloração por TRAP foi realizada usando o kit TRAP 387 (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO) seguindo as instruções do fabricante.

De cada secção, foram capturadas 5 imagens da região mesial da raiz mésio-vestibular do primeiro molar, compreendendo área total de 942.813,00 μm^2 utilizando microscópio Olympus BX-50 (Olympus, Tóquio, Japão) acoplado à microcâmera Dinolite® AM 423X (AmMo Eletronics Corporation, New Taipei city 241, Taiwan) em magnificação de 400X.¹¹ Os parâmetros de aquisição da imagem foram fixados durante o processo de captura. A contagem do número de

osteoclastos foi realizada com auxílio do programa de morfometria Image Pro-Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD), onde foi criada uma grade para contagem. Foram considerados osteoclastos as células multinucleadas, TRAP-positivas e localizadas no ligamento periodontal adjacente ao osso alveolar (Fig 2). Para a obtenção do número de osteoclastos calculou-se a média das cinco secções.¹¹

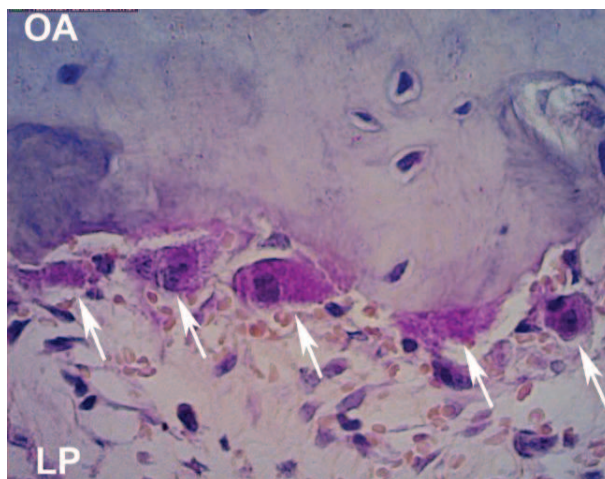


Fig 2- Osteoclastos (setas brancas) - Células multinucleadas, TRAP-positivas, localizadas no ligamento periodontal adjacente ao osso alveolar (TRAP, magnificação X 400)

Análise estatística

Na análise estatística foi utilizado o programa SPSS 19.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois). O teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov revelou que as variáveis taxa de deslocamento, variação do peso, Cálcio total corrigido, PO₄, ALP e creatinina apresentaram distribuição normal. Apesar das variáveis AST e número de osteoclastos não apresentarem distribuição normal, os valores de média e mediana são próximos, indicando distribuição simétrica. Para as variáveis acima se realizou o teste ANOVA a dois critérios modelo fatorial completo. Como o Lítio sérico é uma constante para o grupo SM em todos os tempos, optou-se pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. O teste de homogeneidade de variâncias de Levene revelou que as variáveis taxa de deslocamento, Cálcio total corrigido, PO₄ sérico, ALP, creatinina, AST e número de osteoclastos apresentaram

variâncias heterogêneas, optou-se então pelo teste de comparações múltiplas paramétricas de Games-Howell. Para o Lítio sérico foi utilizado o teste de comparações múltiplas não paramétricas de Dunn. O nível de significância adotado em todos os testes foi de 5% ($p < 0,05$). Foi avaliado o poder de reproducibilidade da contagem de osteoclastos e verificou-se que o erro de Dahlberg foi de 0,037%, indicando que o único avaliador reproduziu as medidas de forma confiável.^{26, 27}

RESULTADOS

A movimentação dentária no Grupo LM foi menor que a do grupo SM aos 44 dias (Tabela I).

Tabela I- Taxa de movimentação dentária induzida (%) no grupo Lítio e Movimentação (LM), comparado com o grupo Solução Salina e Movimentação (SM), nos tempos 33, 37, 44 e 51 dias

Grupo/ dias	SM (Média \pm DP)	LM (Média \pm DP)
33 dias	4,05 \pm 3,61 A	1,76 \pm 1,29 A
37 dias	5,23 \pm 3,23 A	3,02 \pm 2,00 A
44 dias	6,22 \pm 3,90 A	1,84 \pm 1,49 B
51 dias	6,13 \pm 3,53 A	3,14 \pm 2,10 A

Nota: Teste de ANOVA modelo fatorial completo a dois critérios, $p > 0,05$; Teste Games Howell: Letras diferentes em linha indicam diferenças estatisticamente significantes

Maior nível de lítio sérico foi observado nos grupos L e LM. No grupo SM observou-se maior nível de PO_4 sérico. Na análise de AST foi verificado maior nível nos grupos L e LM quando comparados com o grupo SM. Além disso, o grupo LM apresentou valor médio maior que o grupo L. O maior valor de ALP foi verificado no grupo L comparado com os grupos SM e LM. A variável creatinina mostrou menor nível no grupo LM em relação a L e SM. A variação do peso foi maior nos animais do grupo L e LM (Tabela II).

Tabela II - Médias e desvios padrão das variáveis: lítio sérico, cálcio total corrigido, PO_4 sérico, aspartato transaminase (AST), fosfatase alcalina sérica

(ALP), creatinina sérica e variação do peso, nos grupos Solução Salina e movimento (SM), Lítio (L) e Lítio e Movimento (LM)

Grupo/ Variáveis	Média ±DP		
	SM	L	LM
Lítio sérico intacto (mmol/L) ^{1a}	0,10±0,00 A	1,30± 0,55 B	1,34±0,53 B
Ca total corrigido (mg/dL) ^{2b}	9,92±0,40 A	10,06±0,33 A	9,96±0,43 A
Po4 sérico (mg/dL) ^{2 b}	9,94±1,92 ^a	7,59±1,17 B	7,08±1,48 B
AST sérica (U/L) ^{2b}	155,16±42,02 A	180,71±48,26 B	204,21±47,70 C
ALP sérica (U/L) ^{2b}	120,56±43,22 A	154,63±56,44 B	127,17±45,08 AB
Creatinina sérica (mg/dL) ^{2b}	0,34±0,08 A	0,31±0,05 A	0,27±0,05 B
Variação do peso (%) ^{2b}	8,01±7,24 A	23,34±11,59 B	24,55±12,37 B

Nota: ¹ Teste de Kruskal- Wallis $p < 0,05$; ² Teste de ANOVA modelo fatorial completo a dois critérios, $p < 0,05$; ^a Teste de Dunn; ^b Teste de Games- Howell; Letras diferentes em linha indicam diferenças estatisticamente significantes

O número de osteoclastos no grupo L manteve-se constante em todos os períodos. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos SM e LM em todos os períodos (Tabela III).

Tabela III - Média e desvio padrão da variável número de osteoclastos nos Grupos Lítio e Movimento (LM), Solução Salina e Movimento (SM) e Lítio (L) nos dias 33, 37,44 e 51.

Grupo/ Variáveis	SM (Média ±DP)	L (Média ±DP)	LM (Média ±DP)
Osteoclastos			
33 dias	1,54±0,93 A	0,23±0,25 B	1,13±0,48 A
37 dias	0,93±0,95 A	0,21±0,31 A	0,61±0,40 A
44 dias	2,56±1,26 A	0,17±0,30 B	1,60±1,32 A
51 dias	1,18±0,96 A	0,16±,28 B	0,96±0,98 AB

Nota: ANOVA a dois critérios modelo fatorial completo: $p < 0,05$, Teste de Games-Howell: Letras diferentes em linha indicam diferenças estatisticamente significativas.

DISCUSSÃO

O presente estudo experimental avaliou a movimentação dentária induzida em ratos submetidos ao uso crônico do Carbonato de Lítio por meio de administração diária de CL dentro de níveis terapêuticos (0,8 a 1,5 mmol/L) recomendados para humanos e também utilizados em ratos.^{18,24} Os níveis séricos de CL alcançados nessa pesquisa foram $1,30 \pm 0,55$ mmol/L para o grupo L e de $1,34 \pm 0,53$ mmol/L para o grupo LM.

Este foi o primeiro estudo que avaliou o movimento dentário associado ao uso crônico de CL e foi identificada a menor taxa de deslocamento dentário nos ratos aos 14 dias de movimentação dentária induzida. Os 14 dias correspondem aos animais que receberam lítio por 30 dias e nos 14 dias subsequentes à movimentação dentária, ou seja, eutanasiados aos 44 dias. A possível explicação para este fato foi a redução do número de osteoclastos, nesse período, que apesar de não ter apresentado significância estatística pode ter ocasionado menor reabsorção óssea, resultando na menor taxa de deslocamento dentário observada clinicamente. Em um estudo prévio, Spencer et al.²⁸ verificaram *in vitro* que o cloreto de lítio (LiCl) inibe a osteoclastogênese em co-culturas de osteoblastos de ratos e células mononucleares do baço. Além disso, em um estudo anterior, foi verificado que o lítio induz a apoptose em macrófagos.²⁹ Os osteoclastos são derivados de unidades formadoras de colônias de granulócitos macrófagos da medula óssea, células que se fusionam e diferenciam em osteoclastos maduros.³⁰ Entretanto, não existem estudos que avaliem a apoptose induzida pelo lítio em osteoclastos. Posteriores estudos *in vitro* poderão elucidar este possível efeito do lítio nos osteoclastos. O número de osteoclastos permaneceu constante no grupo L, como era esperado, pois nesse grupo não houve movimentação dentária.

Aos 21 dias observou-se que a taxa de deslocamento foi semelhante entre os grupos LM e SM, sugerindo a tendência à semelhança no comportamento entre os grupos. Entretanto essa observação foi verificada em apenas um único momento de ativação. Posteriores estudos deverão ser conduzidos com o intuito de verificar se após as reativações dos dispositivos ortodônticos essa redução do deslocamento dentário observada aos 14 dias pode ser acumulativa e representar

um atraso importante na movimentação dentária induzida, o que tornaria necessária a individualização no diagnóstico e no plano de tratamento ortodôntico.

Estudos bioquímicos podem ser úteis na avaliação da movimentação dentária induzida^{9,10} e na análise da citotoxicidade de fármacos.³¹ O aumento significativo do Cálcio e do PO_4 é considerado como resultado da desmineralização óssea.³¹ Entretanto, no presente estudo não verificamos alteração no Cálcio e observamos a diminuição do PO_4 em ratos submetidos ao uso crônico de CL, não indicando desmineralização óssea. O PO_4 é crítico para numerosas funções fisiológicas incluindo o desenvolvimento do esqueleto e o metabolismo mineral entre outros. Esta diminuição dos níveis de PO_4 poderia estar relacionada com a diarreia crônica.³² A diarreia, a polidipsia e a poliúria têm sido relatadas em associação ao uso desse fármaco.³³ Esses resultados também foram verificados no presente estudo. A diminuição do PO_4 não foi verificada em alguns estudos^{18,21} nos quais os níveis não se alteraram com a administração do CL, e contrária aos resultados observados por Sharman et al³¹ no qual o nível sérico aumentou. Essas divergências podem estar relacionadas a diferenças na metodologia, como estudo em animais ou em humanos, gênero, a realização ou não da movimentação dentária induzida, tempo e dose de tratamento com o CL e a sua forma de administração.

A aspartato amino transferase (AST) é uma enzima liberada no soro em resposta a danos celulares hepáticos e este aumento pode indicar a ocorrência de lesões hepáticas fármaco-induzidas.³⁴ Nesse estudo, verificou-se aumento dos níveis de AST nos grupos tratados com CL comparados com o grupo que não recebeu o fármaco, indicando hepatotoxicidade, em concordância com estudos prévios em ratos.^{31,34} Um resultado interessante foi que o grupo LM apresentou maior nível de AST quando comparado com o grupo L. Portanto possivelmente maior dano hepático pode estar ocorrendo nos animais nos quais o movimento foi associado à terapia com CL. Desta forma, no caso de pacientes que utilizam esse fármaco e são tratados ortodonticamente, é recomendável que seja realizado o monitoramento da AST e que os benefícios dessa associação sejam cuidadosamente avaliados. Estudos posteriores adicionais são necessários para

avaliar este possível efeito sinérgico da movimentação dentária e da terapia com o lítio.

A ALP é um marcador sistêmico para a formação de osso e tem sido utilizada para avaliar a formação óssea durante a movimentação dentária induzida.^{10,35} Nesse estudo, foi observado no grupo L maior valor de ALP quando comparado com LM. Isso sugere que o movimento ortodôntico diminui a ALP em pacientes que utilizam o CL. Neste mesmo sentido Milne et al,⁹ também verificaram diminuição nos níveis de ALP após a aplicação de forças ortodônticas, consistente com redução na massa óssea, observada histologicamente. Durante a movimentação dentária induzida ocorre reabsorção no lado de compressão e neoformação óssea no lado de tração.⁹ Possivelmente essa redução da massa óssea verificada frente a aplicação de forças ortodônticas, pode estar relacionada com a reabsorção óssea. O efeito do Carbonato de Lítio no osso e sua biologia ainda não foram completamente elucidados.^{18,36} No presente estudo, quando os animais foram submetidos ao uso de CL e à movimentação dentária observaram-se níveis de ALP semelhantes aos ratos do grupo SM, não alterando neste caso a deposição óssea.

A análise quantitativa dos níveis séricos de creatinina pode ser um indicativo de danos renais.³⁷ No presente estudo, foram verificados em todos os grupos níveis de creatinina abaixo do limite máximo da normalidade (0,65 mg/dL)³⁸ para ratos *Wistar*, indicando ausência de danos renais. Diferente do presente estudo, Allagui et al,³⁶ verificaram aumento significativo dos níveis de creatinina nos animais do grupo tratado com CL, indicando lesão renal, que possivelmente possa estar associada à alta dose do medicamento administrada na ração para se atingir os níveis séricos terapêuticos. Lesões renais são frequentemente observadas em pacientes submetidos à terapia de lítio com mais de um ano.³⁶ No presente estudo foi administrado o CL por 51 dias no período mais longo da terapia. Posteriores estudos por um período maior de tempo poderão avaliar o possível dano renal. Os pacientes que utilizam esse fármaco e são submetidos ao tratamento ortodôntico devem ser monitorados em relação aos possíveis danos renais.

Os animais em tratamento com CL apresentaram maior ganho de peso, em concordância com os resultados de Mcknigth et al ⁵ que relatam que a associação entre o lítio e o ganho de peso pode ser devido a possuir propriedade semelhante a insulina de aumentar a captação celular da glicose, aumentar a sede, estimulação direta do centro de apetite.⁵

Com o uso do Carbonato de Lítio verificou-se menor taxa de movimentação dentária aos 14 dias (não sendo alterada aos 21 dias). Observou-se também que o Carbonato de Lítio não alterou a deposição óssea quando associado à movimentação dentária, indicando que esse fármaco combinado com a movimentação dentária induzida parece não interferir na deposição óssea. Estudos em humanos são necessários a fim de monitorar os pacientes que usam Carbonato de Lítio e são submetidos ao tratamento ortodôntico, com relação à citotoxicidade hepática e renal, por todo período de tratamento ortodôntico.

CONCLUSÕES

A movimentação dentária induzida associada ao uso crônico do Carbonato de Lítio, em ratos Wistar resulta em:

- Menor taxa de movimentação dentária no período de 14 dias;
- Padrão de deposição óssea semelhante ao controle com movimento;
- Possível risco de dano hepático em associação da movimentação dentária e o uso crônico do Carbonato de Lítio.

REFERÊNCIAS

1. A I, Opin AEC. *Bipolar disorder and resembling special psychopathological manifestations in multiple sclerosis: a review. Psychiatry* 2011;24:336-340.
2. Young W. *Review of lithium effects on brain and blood. Cell Transplant* 2009;18:951-975.
3. Cipriani A, Pretty H, Hawton K, Geddes JR. *Lithium in the Prevention of Suicidal Behavior and All- Cause Mortality in Patients With Mood Disorders: A Systematic Review of Randomized Trials. Am J Psychiatry* 2005;162:1805–1819.
4. Geddes JR, Burgess S, Hawton K, Jamison K, Goodwin GM. *Long-Term Lithium Therapy for Bipolar Disorder: Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. Am J Psychiatry* 2004;161:217–222.

5. McKnight RF, Adida M, Budge K, Stockton S, Goodwin GM, Geddes JR. Lithium toxicity profile: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2012;379:721-728.
6. Talic NF, Evans CA, Daniel JC, Zaki AEM. Proliferation of epithelial rests of Malassez during experimental tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2003;123:527-533.
7. Meikle MC. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. *Eur J Orthod* 2006;28:221-240.
8. Marquezan M, Bolognese AM, Araújo MTdS. Effects of two Low-Intensity Laser Therapy Protocols on Experimental Tooth Movement. *Photomedicine and Laser Surgery* 2010;28:757-762.
9. Milne TJ, Ichim I, Patel B, McNaughton A, Meikle MC. Induction of osteopenia during experimental tooth movement in the rat: alveolar bone remodelling and the mechanostat theory. *Eur J Orthod* 2009;31:221-231.
10. Keeling SD, King GJ, McCoy EA, Valdez M. Serum and alveolar bone phosphatase changes reflect bone turnover during orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1993;103:320-326.
11. Braga SM, Taddei SR, Andrade I, Jr., Queiroz-Junior CM, Garlet GP, Repeke CE et al. Effect of diabetes on orthodontic tooth movement in a mouse model. *Eur J Oral Sci* 2011;119:7-14.
12. Yoshimatsu M, Shibata Y, Kitaura H, Chang X, Moriishi T, Hashimoto F et al. Experimental model of tooth movement by orthodontic force in mice and its application to tumor necrosis factor receptor-deficient mice. *J Bone Miner Metab* 2006;24:20-27.
13. Andrade I, Jr., Silva TA, Silva GA, Teixeira AL, Teixeira MM. The role of tumor necrosis factor receptor type 1 in orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 2007;86:1089-1094.
14. Gonzales C, Hotokezaka H, Matsuoc KI, Shibazakid T, Yozgatiana JH, Darendelilere MA et al. Effects of Steroidal and Nonsteroidal Drugs on Tooth Movement and Root Resorption in the Rat Molar. *Angle Orthodontist* 2009;79:715-726.
15. Wang Y, Wang XX, Zhang LN, Jin SM, Zhang J. Effects of traditional Chinese medicine on bone remodeling during orthodontic tooth movement. *J Ethnopharmacol* 2012;141:642-646.
16. Diravidamani K, Sivalingam SK, Agarwal V. Drugs influencing orthodontic tooth movement: An overall review. *J Pharm Bioallied Sci* 2012;4:S299-303.
17. Baran DT, Schwartz MP, Bergfeld MA, Teitelbaum SL, Slatopolsky E, Avioli LV. Lithium inhibition of bone mineralization and osteoid formation. *J Clin Invest* 1978;61:1691-1696.
18. Lewicki M, Paez H, Mandalunis PM. Effect of lithium carbonate on subchondral bone in sexually mature Wistar rats. *Exp Toxicol Pathol* 2006;58:197-201.
19. Cohen O, Rais T, Lepkifker E, Vered I. Lithium carbonate therapy is not a risk factor for osteoporosis. *Horm Metab Res* 1998;30:594-597.
20. Clement-Lacroix P, Ai M, Morvan F, Roman-Roman S, Vayssiere B, Belleville C et al. Lrp5-independent activation of Wnt signaling by lithium chloride increases bone formation and bone mass in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:17406-17411.

21. Zamani A, Omrani GR, Nasab MM. Lithium's effects on bone mineral density. *Bone* 2009;44:331-334.
22. Tang GH, Xu J, Chen RJ, Qian YF, Shen G. Lithium delivery enhances bone growth during midpalatal expansion. *J Dent Res* 2011;90:336-340.
23. Knop LA, Shintcovsk RL, Retamoso LB, Ribeiro JS, Tanaka OM. Non-steroidal and steroidal anti-inflammatory use in the context of orthodontic movement. *Eur J Orthod* 2012;34:531-535.
24. Mak TW, Shek CC, Chow CC, Wing YK, Lee S. Effects of lithium therapy on bone mineral metabolism: a two-year prospective longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3857-3859.
25. Galvao MJ, Santos A, Ribeiro MD, Ferreira A, Nolasco F. Optimization of the tartrate-resistant acid phosphatase detection by histochemical method. *Eur J Histochem* 2011;55:e1.
26. Houston WJ. The analysis of errors in orthodontic measurements. *Am J Orthod* 1983;83:382-390.
27. Midtgaard J, Bjork G, Linder-Aronson S. Reproducibility of cephalometric landmarks and errors of measurements of cephalometric cranial distances. *Angle Orthod* 1974;44:56-61.
28. Spencer GJ UJ, Etheridge SL, Arnett TR, Genever PG., . Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NFkB ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. *J Cell Sci* 2006:1283-1296.
29. Minying Zhang WJ, Xiaofei Zhou, Jiayi Yu, Andrew J. Lee, Shao-Cong, Sun HH. Deregulation of Tpl2 and NF-κB signaling and induction of macrophage apoptosis by the anti-depressant drug lithium. *Cell Signal* 2010;21:559-566.
30. Masato Tamura MMS, Masayuki Nashimoto. Regulation of CXCL12 expression by canonical Wnt signaling in bone marrow stromal cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2011: 760–767.
31. Sharma SD, Iqbal M. Lithium induced toxicity in rats: a hematological, biochemical and histopathological study. *Biol Pharm Bull* 2005;28:834-837.
32. Moe SM. Disorders Involving Calcium, Phosphorus, and Magnesium. *Prim Care* 2008;35:215–237, v-vi.
33. Davies NL. Lithium toxicity in two dogs. *J S Afr Vet Assoc* 1991;62:140-142.
34. Chadha VD, Bhalla P, Dhawan DK. Zinc modulates lithium-induced hepatotoxicity in rats. *Liver Int* 2008;28:558-565.
35. Alvarez L, Guanabens N, Peris P, Monegal A, Bedini JL, Deulofeu R et al. Discriminative value of biochemical markers of bone turnover in assessing the activity of Paget's disease. *J Bone Miner Res* 1995;10:458-465.
36. Allagui MS, Hfaiedh N, Croute F, Guermazi F, Vincent C, Soleilhavoup JP et al. [Side effects of low serum lithium concentrations on renal, thyroid, and sexual functions in male and female rats]. *C R Biol* 2005;328:900-911.
37. Prigent A. Monitoring Renal Function and Limitations of Renal Function Tests. *Seminars in Nuclear Medicine* 2008;38:32-46.
38. Tucker MJ. Diseases of the wistar rat. 1997.
39. Hillert M, Zimmermann M, Klein J. Uptake of lithium into rat brain after acute and chronic administration. *Neuroscience Letters* 2012;521:62– 66.

2 ARTIGO EM INGLÊS

ABSTRACT

Introduction: The aim of this study was to assess induced tooth movement in Wistar rats subjected to the administration of lithium carbonate (LC). **Methods:** The rats (n=192) were assigned to the groups: L - daily administration of 60mg/kg of LC, with no tooth movement and euthanized after 33, 37, 44 and 51 days; LM - administration of LC for 30 days and during the subsequent days 3, 7, 14 and 21 of tooth movement using 30g/F; SM - saline solution and tooth movement. The rate of tooth movement, the number of osteoclasts and serum levels of lithium, phosphate (PO₄), AST, alkaline phosphatase (ALP) and creatinine were measured. The ANOVA, Kruskal-Wallis, Games-Howell and Dunn (p<0.05) tests were performed. **Results:** the rate of tooth movement was significantly lower in the LM group on the 44th day and tending to a lower number of osteoclasts. Lithium and AST were higher in the L and LM groups. The opposite was observed for PO₄. AST was higher in the LM group than in the L group. A higher ALP was observed in the L group. Creatinine was lower in the LM group. **Conclusions:** LC inhibited tooth movement on the 14 day and may be related to a lower number of osteoclasts. Patients who use LC should be monitored during orthodontic treatment.

Keywords: Lithium Carbonate; Tooth Movement; Osteoclasts, Alkaline Phosphatase, Aspartate Aminotransferases, Creatinine.

INTRODUCTION AND LITERATURE REVIEW

The prevalence of bipolar mood disorder (BMD)¹ in the general population is estimated to be 1% and lithium carbonate (LC) is the drug of choice used in the treatment of this disorder. This drug is also used for other psychological disorders such as hyperactivity disorder and unipolar depression in children, adolescents and adults.²⁻⁴

Orthodontic treatment is based on the premise that a force is applied to a tooth and transmitted to the surrounding tissues, causing chemical, mechanical and cellular events.^{5,6} The specific changes that occur in the bone tissue and at the root of a tooth which has undergone orthodontic treatment are bone resorption by osteoclasts on the pressure side and bone deposition on the tension side.⁷⁻⁹ The measurement of induced tooth movement by digital caliper¹⁰, the biochemical analysis of blood^{11,12} and histochemical staining by tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)¹³⁻¹⁵ are useful methods for the evaluation of induced tooth movement.

The tissue changes produced by orthodontic force can be influenced by local factors related to the teeth, and also by systemic factors related to bone metabolism. Some drugs used by patients during orthodontic treatment can also influence these tissue changes. The combined effect of mechanical forces along with the action of the drugs can be additive, inhibiting or synergistic.¹⁶⁻¹⁸

Evaluation of the effect of LC on bone has been carried out in humans and in rats and showed conflicting results such as inhibiting bone formation or loss^{2,19}, no influence on bone,²⁰ or increased bone formation^{3,21,22}. Baran et. al verificaram que tratamento com lítio inibe a síntese de osteóide, levando uma diminuição da mineralização óssea em rato.¹⁷ Por outro lado o estudo experimental de Clement-Lacroix et. al mostraram um efeito anabólico do lítio na massa óssea em ratas.²⁰

Os resultados do estudo de Cohen et. al não detectaram qualquer efeito sobre a densidade óssea depois de curto ou longo prazo do tratamento com carbonato de lítio¹⁹ Por outro lado o estudo¹⁷ experimental de Clement-Lacroix et. al mostraram um efeito anabólico do lítio na massa óssea em ratos.²⁰

Durante a expansão da sutura palatina mediana, foi administrado em ratos, por meio de sonda, diariamente com lítio ou de cloreto de sódio, realizado por Tang et al²² found that the administration of a daily dose of Lithium in 4 week-old rats, administered by gavage of 200 mg/kg for 3, 7 and 14 days, increases new bone formation in the median palatine suture, despite having been initially delayed on day 3 of the rats subjected to rapid maxillary expansion. However, there are no studies that evaluate the effect of chronic use of LC in tooth movement.

Taking into consideration the controversial results found in the literature and the possible influence of LC on induced tooth movement, this study aimed to evaluate induced tooth movement in rats subjected to chronic use of lithium carbonate.

MATERIAL AND METHODS

This research was approved by the Ethics Committee on the use of animals (CEUA) of the *Pontifícia Universidade Católica do Paraná* (PUCPR), under the registration number 631/11.

Animals

The sample was composed of 192 male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*), 9 weeks old, weighing about 300-350 g, from the PUCPR Vivarium.

The animals were randomly placed in 3 groups.

- L Group (n=64) daily intraperitoneal administration of 60mg/kg of LC in saline solution (*Bioarte Farmácia de Manipulação Ltda.*, Piracicaba, SP, Brazil), a dose that resulted in lithium serum levels of 1.30 ± 0.55 mmol/L, 90 minutes after administration.² The purity and power of the drug were certified by the manufacturer. The administration was performed using disposable plastic syringes U-100 Insulin ½ cc 0.05 mL (BD ultra-fine™ BD- Becton Driver, Franklin Lakes). These animals were not subjected to tooth movement and were euthanized after 33, 37, 44 and 51 days (n=16 in each period) of application of the drug. Um estudo prévio considerou o uso agudo de Lítio equivalente a uma dose única e uso

crônico quando o fármaco foi administrado diariamente por três semanas.³⁹ Como no presente estudo os ratos foram submetidos à administração de Lítio por um período superior a três semanas (33, 37, 44 e 51 dias) esse uso foi considerado como crônico.

- LM group (n=64) prior daily administration of LC as described above, resulting in serum lithium levels of 1.34 ± 0.53 mmol/L. The drug was administered for 30 days and during the subsequent days 3, 7, 14 and 21, corresponding to the period of induced tooth movement. The euthanasia occurred on days 33, 37, 44 and 51.

- SM group (n=64): administration of saline solution (*LBS-Laborasa Indústria Farmacêutica LTDA*, São Paulo, SP, Brazil) in an equal volume and period used for the previous groups. Tooth movement and euthanasia were carried out in accordance with the aforementioned periods.

The animals were weighed, at the beginning (ip) and at the end (fp) of the experimental time, using an electronic precision balance (Gehaka-BG 4001, São Paulo, SP, Brazil). The weight change (ΔP) was calculated in percentage, using the formula:

$$\Delta P(\%) = (ip/fp-1) \times 100$$

Experimental protocol

The animals were sedated with an intramuscular injection of 50 mg/kg of Tiletamina/Zolazepan (Zoletil[®] 50, *Brasil indústria e comércio Ltda*, Jurubatuba, São Paulo, SP, Brazil), for the induced tooth movement. The orthodontic device consisted of a closed, nickel titanium spring (GH[®] Wire Orthodontics, Franklin) and stainless steel tying wire (Dental Morelli Ltda, São Paulo, SP, Brazil) of 0.025 mm, to attach the spring to the first upper right molar and to the upper incisor on the same side. This produced a 30g/F²⁴ reciprocal force on the distal face of the upper right incisor and on the mesial face of the upper molar on the same side, measured using a dynamometer (Haag-Streit AG, Koeniz, Switzerland). The end of the tying wire was attached to the upper right incisor, using composite resin (4 seasons, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein, Luxembourg) after being conditioned with

37% phosphoric acid (Total Etch, Ivoclar Vivadent, Schaan, Luxembourg) and application of light-cured adhesive (AdheSE, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein, Luxembourg) (Fig 1).



Figure 1. Orthodontic device installed

Measurement of tooth movement

The distance between the first upper right molar and the upper central incisor on the same side, prior to placement of the orthodontic device (initial measurement - im) and after the euthanasia (final measurement - fm), was measured using a digital caliper (Absolute-Mitutoyo, Kawasaki-Shi, Japan). The rate of induced tooth movement (ΔTM) was calculated using the formula:

$$\Delta TM (\%) = (im/fm - 1) \times 100$$

Biochemical analysis

The animals were euthanized using an overdose of anesthetic solution (100 mg/kg) of sodium pentobarbital (Syntec, Cotia, SP, Brazil), administered intraperitoneally.

Blood samples from the animals were collected by intracardiac puncture at the moment of euthanasia. 6 ml of blood were collected in disposable vacutainer tubes with gel (BD-Becton Driver, Franklin Lakes, New Jersey), without anticoagulant.

Biochemical blood analysis was performed in the Lanac clinical analyses laboratory (Curitiba, PR, Brazil), and the following was quantified: the plasma level of inorganic phosphate (PO_4), alkaline phosphatase (ALP), aspartate

aminotransferase (AST), creatinine, and calcium, using the Advia 1200/1800 (Medcorp-Siemens, Brasília, DF, Brazil) automatic biochemistry system. The serum level of lithium was measured using the Dimension RXL (Medcorp-Siemens, Brasília, DF, Brazil) automatic analyzer; and, of albumin using the Advia 1200 (Medcorp-Siemens, Brasília, DF, Brazil) automatic biochemistry analyzer. The corrected total serum calcium values (alb-adjCa) obtained were adjusted for albumin and calculated using the formula:

$$\text{alb-adjCa} = [(40 - \text{albumin}) \times 0.025 + \text{total calcium}]^{20,24}$$

Histopathological analysis

Following euthanasia, the maxilla of every animal was removed, dissected and sectioned on the mid-line. The right hemi-maxilla was set in a 10% formalin solution for 24 hours and demineralized with 5% EDTA for 2 months.

After demineralization, the specimens were processed and embedded in paraffin in the Experimental Pathology Laboratory of PUCPR. Five cross sections, 4 μm thick, were obtained from the cervical third of the mesio-buccal root of the first molar, cut using a microtome with the occlusal surface of the molar parallel to the microtome and a 60 μm interval between each section. These sections were stained using the TRAP histochemistry technique. The TRAP enzyme is considered a specific marker for osteoclasts and can be used to determine bone resorption quantitatively.²⁵ TRAP staining was performed using the TRAP kit 387 (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO) according to the manufacturer's instructions.

In each section, 5 images of the mesial region of the mesio-buccal root of the first molar were captured, comprising a total area of 942,813.00 μm^2 , using a BX-50 Olympus microscope (Olympus, Tokyo, Japan) attached to a Dinolite[®] AM 423X micro-camera (AmMo Electronics Corporation, New Taipei City 241, Taiwan), at 400X magnification.⁷ The image acquisition parameters were set during the capture process. The number of osteoclasts were counted using the Image Pro-Plus 4.5 morphometry program (Media Cybernetics, Silver Spring, MD), with which a count grid was created. The multinucleated, TRAP-positive cells located in the periodontal ligament adjacent to the alveolar bone were considered to be

osteoclasts (Fig 2). The number of osteoclasts was obtained by calculating the mean of the five sections.⁷

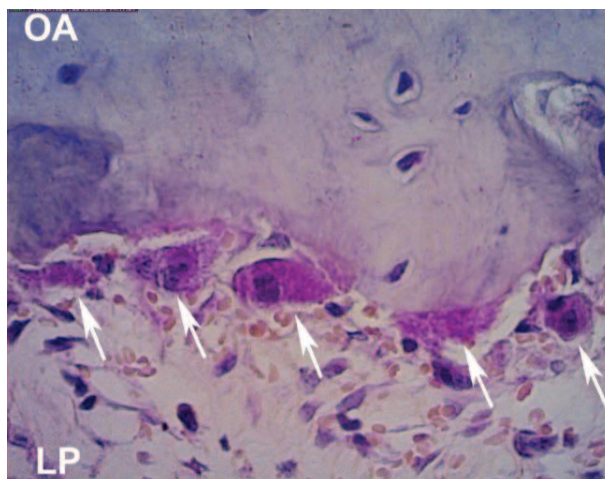


Fig 2- Osteoclasts (white arrows) - Multinucleated, TRAP-positive cells located in the periodontal ligament adjacent to the alveolar bone (TRAP, 400X magnification)

Statistical analysis

The SPSS 19.0 program was used in the statistical analysis (SPSS Inc, Chicago, Illinois). The Kolmogorov-Smirnov test of normality showed that the variables displacement rate, weight variation, corrected total calcium, PO_4 , ALP and creatinine presented normal distribution. Despite the fact that the variables AST and number of osteoclasts did not show normal distribution, the mean and median values were close, indicating symmetrical distribution. The two-way ANOVA, full factorial design was performed for the variables above. Since serum Lithium is a constant for the SM group at all times, the non-parametric Kruskal-Wallis test was used. Levene's Test for Homogeneity of Variance showed that the variables displacement rate, corrected total calcium, serum PO_4 , ALP, creatinine, AST and number of osteoclasts presented heterogeneous variances; therefore, the parametric Games-Howell multiple comparisons test was used. For serum Lithium, the non-parametric Dunn's multiple comparisons test was used. The significance level adopted for all tests was 5% ($p < 0.05$). The reproducibility power of the count of osteoclasts was assessed and it was observed that the Dahlberg error was

0.037%, indicating that the single evaluator reproduced the measurements reliably.^{26,27}

RESULTS

The LM group showed lower rate of movement at 44 days, when compared with the SM group (Table I).

Table I - Rate of induced tooth movement (%) in the LM group compared with the SM group, on days 33, 37, 44 and 51.

Group/ days	SM (Mean \pm SD)	LM (Mean \pm SD)
33 days	4.05 \pm 3.61 A	1.76 \pm 1.29 A
37 days	5.23 \pm 3.23 A	3.02 \pm 2.00 A
44 days	6.22 \pm 3.90 A	1.84 \pm 1.49 B
51 days	6.13 \pm 3.53 A	3.14 \pm 2.10 A

Note: Two-way ANOVA, full factorial design, $p > 0.05$; Games Howell Test: different letters in the same line indicate statistically significant differences

A higher serum lithium level was observed in the L and LM groups. In the SM group, a higher level of serum PO_4 was observed. The L and LM groups showed a higher level for the AST analysis, when compared with the SM group. In addition, the LM group showed a higher mean value than the L group. A higher value for ALP was verified in L group, when compared with the SM and LM groups. The creatinine variable showed a lower level in the LM group, when compared with the L and SM groups. Weight variation was higher in animals from the L and LM groups (Table II).

Table II - Means and standard deviations of the variables: serum lithium, corrected total calcium, serum PO_4 , aspartate transaminase (AST), serum alkaline phosphatase (ALP), serum creatinine and weight variation in the groups Saline Solution and movement (SM), Lithium (L) and Lithium and Movement (LM).

Group/ Variables	Mean \pm SD		
	SM	L	LM
Intact serum lithium (mmol/L) ^{1a}	0.10 \pm 0.00 A	1.30 \pm 0.55 B	1.34 \pm 0.53 B
Corrected total Ca (mg/dL) ^{2b}	9.92 \pm 0.40 A	10.06 \pm 0.33 A	9.96 \pm 0.43 A
Serum PO ₄ (mg/dL) ^{2b}	9.94 \pm 1.92 A	7.59 \pm 1.17 B	7.08 \pm 1.48 B
Serum AST (U/L) ^{2b}	155.16 \pm 42.02 A	180.71 \pm 48.26 B	204.21 \pm 47.70 C
Serum ALP (U/L) ^{2b}	120.56 \pm 43.22 A	154.63 \pm 56.44 B	127.17 \pm 45.08 AB
Serum creatinine (mg/dL) ^{2b}	0.34 \pm 0.08 A	0.31 \pm 0.05 A	0.27 \pm 0.05 B
Weight variation (%) ^{2b}	8.01 \pm 7.24 A	23.34 \pm 11.59 B	24.55 \pm 12.37 B

Note: ¹ Kruskal-Wallis Test, $p < 0.05$; ² two-way ANOVA full factorial design, $p < 0.05$; ^a Dunn's Test; ^b Games-Howell's test; Different letters in the same line indicate statistically significant differences.

The number of osteoclasts in the L group remained constant at all times. No statistically significant differences were observed between the SM and LM groups at any times (Table III).

Table III- Means and standard deviations of the variable number of osteoclasts in the groups lithium and movement (LM), saline solution and movement (SM) and lithium (L) on days 33, 37, 44 and 51.

Group/ Variables	SM (Mean \pm SD)	L (Mean \pm SD)	LM (Mean \pm SD)
Osteoclasts			
33 days	1.54 \pm 0.93 A	0.23 \pm 0.25 B	1.13 \pm 0.48 A
37 days	0.93 \pm 0.95 A	0.21 \pm 0.31 A	0.61 \pm 0.40 A
44 days	2.56 \pm 1.26 A	0.17 \pm 0.30 B	1.60 \pm 1.32 A
51 days	1.18 \pm 0.96 A	0.16 \pm .28 B	0.96 \pm 0.98 AB

Note: Two-way ANOVA full factorial design, $p < 0.05$; Games-Howell's test: Different letters in the same line indicate statistically significant differences.

DISCUSSION

This experimental study assessed induced tooth movement in rats subjected to the chronic use of lithium carbonate by daily administration of LC within the therapeutic levels (0.8 to 1.5 mmol/L) recommended for humans and also used in

rats.^{18, 25} The serum LC levels reached in this study were 1.30 ± 0.55 mmol/L for the L group and 1.34 ± 0.53 mmol/L for the LM group.

This is the first study which identified a lower rate of tooth displacement in rats subjected to chronic use of LC during the 14 days of induced tooth movement. These 14 days correspond to the animals that received lithium for 30 days and during the 14 days following tooth movement; i.e., euthanized on the 44th day. The possible explanation for this fact was the reduction in the number of osteoclasts during this period which, although not statistically significant, may have caused less bone resorption, resulting in the lower rate of clinically observed tooth movement. Em um estudo prévio, Spencer et al.²⁸ verificaram *in vitro* que o cloreto de lítio (LiCl) inibe a osteoclastogênese em co-culturas de osteoblastos de ratos e células mononucleares do baço. Além disso, em um estudo anterior, foi verificado que o lítio induz a apoptose em macrófagos.²⁹ Osteoclasts are derived from granulocyte-macrophage colony forming units in bone marrow, cells then fuse and differentiate into mature osteoclasts.³⁰ Entretanto, não existem estudos que avaliem a apoptose induzida pelo lítio em osteoclastos. Posteriores estudos *in vitro* poderão elucidar este possível efeito do lítio nos osteoclastos. The number of osteoclasts remained constant in Group L, as was expected, because there was no tooth movement in this group.

Within 21 days, the rate of movement was observed to be similar between Groups LM and SM; however, this observation was verified in just one, single moment of activation. Further studies should be conducted in order to determine whether, after reactivation of the orthodontic devices, this reduction in the tooth movement observed within 14 days can be cumulative and represent an important delay in induced tooth movement. This would make individualization both in the diagnosis and orthodontic treatment plan necessary.

Biochemical studies may be useful in assessing induced tooth movement^{5,6} and in analyzing the cytotoxicity of drugs²⁹. The significant increase of calcium and PO_4 is considered a result of bone demineralization.²⁹ However, in the present study, no change was found in the calcium and there was a decrease of PO_4 in the rats subjected to chronic use of LC, which does not indicate bone demineralization.

PO₄ is critical for many physiological functions, including skeleton development and mineral metabolism, among others. This reduction in PO₄ levels could be related to chronic diarrhea.³⁰ Diarrhea, polydipsia and polyuria have been reported in association with the use of this drug.³¹ These results were also found in this study. This decrease in PO₄ was not observed in some studies^{18,20} in which the levels did not change with the administration of LC, and are contrary to the results observed by Sharman et al²⁹ in which the serum level increased. These differences may be related to differences in methodology, such as: studies in animals and humans, gender, induced tooth movement, time and dose of treatment with the LC, and the form of administration.

Aspartate amino transferase (AST) is an enzyme released in serum in response to liver cell damage and this increase may indicate the occurrence of drug-induced lesions of the liver.³² This study found an increase in AST levels in the groups treated with LC, compared with the group that did not receive the drug, indicating hepatotoxicity. This is in agreement with previous studies in rats.^{29,32} An interesting result was that Group LM showed a higher level of AST when compared with Group L. Therefore, more liver damage possibly may have occurred in the animals in which movement was associated with LC therapy. Thus, for patients using this drug and undergoing orthodontic treatment, it is recommended that AST be monitored and that the benefits of this association be evaluated carefully. Further studies are needed to evaluate this possible synergistic effect of tooth movement with lithium therapy.

ALP is a systemic marker for bone formation and has been used to assess bone formation during induced tooth movement.^{6,33} In this study, a higher ALP value was observed in the L group when compared with the LM group. This suggests that tooth movement reduces ALP in patients using LC. Likewise, Milne et al⁵ also found a decrease in ALP levels after applying orthodontic forces, consistent with histologically observed reduction in bone mass. During induced tooth movement, resorption occurs on the compression side and new bone formation on the traction side. This bone mass reduction, verified against the application of orthodontic forces, may be related to bone resorption. The effect of

lithium carbonate on bone and its biology has not yet been completely elucidated.^{18,34} In this study, when the animals were subjected to LC and tooth movement, ALP levels similar to those of the rats in the SM group were observed, not changing, in this case, bone deposition.

A quantitative analysis of creatinine serum levels may indicate kidney damage.³⁵ In the present study, creatinine levels below the maximum normal limit (0.65 mg/dL)³⁸ for Wistar rats were found in all groups, indicating absence of kidney damage. Differing from the present study, Allagui et al,³⁴ found significant increase in the creatinine levels in the animals of the group treated with LC. This indicates kidney lesions, that may be associated with the high dose of the drug administered in the food in order to reach the therapeutic serum levels. Kidney lesions are frequently observed in patients subjected to lithium therapy for more than one year.³⁴ In the present study, LC was administered for 51 days, the longest period of therapy.

The animals treated with LC showed greater weight gain, in agreement with the results of Mcknigh et al¹, in which the association between lithium and weight gain may be due to the property, similar to that of insulin, of increasing the cellular uptake of glucose, increasing thirst, and direct stimulation of the appetite center.¹

A lower rate of tooth movement after 14 days, and no alteration after 21 days were verified with the use of Lithium Carbonate. It was also observed that Lithium Carbonate did not change bone deposition when associated with tooth movement indicating that this drug, combined with induced tooth movement, does not appear to interfere in bone deposition. Estudos em humanos são necessários a fim de monitorar os pacientes que usam Carbonato de Lítio e são submetidos ao tratamento ortodôntico, com relação à citotoxicidade hepática e renal, por todo período de tratamento ortodôntico.

CONCLUSIONS

A movimentação dentária induzida associada ao uso crônico do Carbonato de Lítio, em ratos *Wistar* resulta em:

- Menor taxa de movimentação dentária no período de 14 dias;

- Padrão de deposição óssea semelhante ao controle com movimento;
- Possível risco de dano hepático em associação da movimentação dentária e o uso crônico do Carbonato de Lítio.

REFERENCES

3 ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS



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: 631 – 1ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Efeito do carbonato de lítio no movimento dentário induzido em ratos

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Viviane da Silva Kagy

EQUIPE DE PESQUISA:

Viviane da Silva Kagy, Aline Cristina Batista Rodrigues, Elisa de Souza Camargo

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	09 semanas 300-350g	B	75

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 633 (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,

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



ANEXO B – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO- AMERICAN JOURNAL OF ORTHODONTICS AND DENTOFACIAL ORTHOPEDICS

Information for Authors

Electronic manuscript submission and review

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

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

Send other correspondence to:

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

American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics

University of Washington

Department of Orthodontics, D-569

HSC Box 357446

Seattle, WA 98195-7446

Telephone (206) 221-5413

E-mail: vgkokich@u.washington.edu

General Information

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

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

Statements and opinions expressed in the articles and communications herein are those of the author(s) and not necessarily those of the editor(s) or publisher, and the editor(s) and publisher disclaim any responsibility or liability for such material. Neither the editor(s) nor the publisher guarantees, warrants, or

endorses any product or service advertised in this publication; neither do they guarantee any claim made by the manufacturer of any product or service. Each reader must determine whether to act on the information in this publication, and neither the Journal nor its sponsoring organizations shall be liable for any injury due to the publication of erroneous information.

Guidelines for Original Articles

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

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

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

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

3. *Manuscript. The manuscript proper should be organized in the following sections: Introduction and literature review, Material and Methods, Results, Discussion, Conclusions, References, and figure captions. Express measurements in metric units, whenever practical. Refer to teeth by their full name or their FDI tooth number. For style questions, refer to the AMA Manual of Style, 9th edition. Cite references selectively, and number them in the order cited. Make sure that all references have been mentioned in the text. Follow the format for references in "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (Ann Intern Med 1997;126:36-47); <http://www.icmje.org>. Include the list of references*

with the manuscript proper. Submit figures and tables separately (see below); do not embed figures in the word processing document.

4. Figures. Digital images should be in TIF or EPS format, CMYK or grayscale, at least 5 inches wide and at least 300 pixels per inch (118 pixels per cm). Do not embed images in a word processing program. If published, images could be reduced to 1 column width (about 3 inches), so authors should ensure that figures will remain legible at that scale. For best results, avoid screening, shading, and colored backgrounds; use the simplest patterns available to indicate differences in charts. If a figure has been previously published, the legend (included in the manuscript proper) must give full credit to the original source, and written permission from the original publisher must be included. Be sure you have mentioned each figure, in order, in the text.

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

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

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

*"The undersigned author(s) transfers all copyright ownership of the manuscript **[insert title of article here]** to the American Association of Orthodontists in the event the work is published. The undersigned author(s) warrants that the article is original, does not infringe upon any copyright or other*

proprietary right of any third party, is not under consideration by another journal, has not been previously published, and includes any product that may derive from the published journal, whether print or electronic media. I (we) sign for and accept responsibility for releasing this material." Scan the printed [copyright release](#) and submit it via EES.

8. Use the International College of Medical Journal Editors Form for the Disclosure of Conflict of Interest (ICMJE Conflict of Interest Form). If the manuscript is accepted, the disclosed information will be published with the article. The usual and customary listing of sources of support and institutional affiliations on the title page is proper and does not imply a conflict of interest. Guest editorials, Letters, and Review articles may be rejected if a conflict of interest exists.

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

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

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

Other Articles

Follow the guidelines above, with the following exceptions, and submit via EES.

Case Reports will be evaluated for completeness and quality of records, quality of treatment, uniqueness of the case, and quality of the manuscript. A high quality manuscript must include the following sections: introduction; diagnosis; etiology; treatment objectives, treatment alternatives, treatment progress, and treatment

results; and discussion. The submitted figures must include extraoral and intraoral photographs and dental casts, panoramic radiographs, cephalometric radiographs, and tracings from both pretreatment and posttreatment, and progress or retention figures as appropriate. Complete Case Report Guidelines can be downloaded from [Case Report Guidelines](#).

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

Miscellaneous Submissions

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

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

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

Checklist for authors

- Title page, including full name, academic degrees, and institutional affiliation and position of each author, and author to whom correspondence and reprint requests are to be sent, including address, business and home phone numbers, fax numbers, and e-mail address
- Abstract
- Article proper, including references and figure legends
- Figures, in TIF or EPS format
- Tables
- [Copyright release statement](#), signed by all authors

- [Photographic consent statement\(s\)](#)
- [ICMJE Conflict of interest statement](#)
- *Permissions to reproduce previously published material*

ANEXO C – LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔP	Varição do peso
ΔTM	Varição da Taxa de Movimentação Dentária Induzida
ALP	Fosfatase Alcalina sérica
AST	Aspartato Amino Transferase
Cálcio Total	Cálcio total sérico corrigido
CEUA	Comitê de Ética em Uso de Animais
CL	Carbonato de Lítio
L	Grupo Lítio
LM	Grupo Lítio e Movimento Ortodôntico
PO_4	Fosfato inorgânico
SM	Grupo Solução e Movimento Ortodôntico
THB	Transtorno de Humor Bipolar
TRAP	Fosfatase Ácida Tartarato-Resistente

REFERENCES

1. A I, Opin AEC. *Bipolar disorder and resembling special psychopathological manifestations in multiple sclerosis: a review.* *Psychiatry* 2011;24:336-340.
2. Young W. *Review of lithium effects on brain and blood.* *Cell Transplant* 2009;18:951-975.
3. Cipriani A, Pretty H, Hawton K, Geddes JR. *Lithium in the Prevention of Suicidal Behavior and All- Cause Mortality in Patients With Mood Disorders: A Systematic Review of Randomized Trials.* *Am J Psychiatry* 2005;162:1805–1819.
4. Geddes JR, Burgess S, Hawton K, Jamison K, Goodwin GM. *Long-Term Lithium Therapy for Bipolar Disorder: Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials.* *Am J Psychiatry* 2004;161:217–222.
5. McKnight RF, Adida M, Budge K, Stockton S, Goodwin GM, Geddes JR. *Lithium toxicity profile: a systematic review and meta-analysis.* *Lancet* 2012;379:721-728.
6. Talic NF, Evans CA, Daniel JC, Zaki AEM. *Proliferation of ephitelial rests of Malassez during experimental tooth movement.* *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2003;123:527-533.
7. Meikle MC. *The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt.* *Eur J Orthod* 2006;28:221-240.
8. Marquezan M, Bolognese AM, Araújo MTdS. *Effects of two Low-Intensity Laser Therapy Protocols on Experimental Tooth Movement.* *Photomedicine and Laser Surgery* 2010;28:757-762.
9. Milne TJ, Ichim I, Patel B, McNaughton A, Meikle MC. *Induction of osteopenia during experimental tooth movement in the rat: alveolar bone remodelling and the mechanostat theory.* *Eur J Orthod* 2009;31:221-231.
10. Keeling SD, King GJ, McCoy EA, Valdez M. *Serum and alveolar bone phosphatase changes reflect bone turnover during orthodontic tooth movement.* *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1993;103:320-326.
11. Braga SM, Taddei SR, Andrade I, Jr., Queiroz-Junior CM, Garlet GP, Repeke CE et al. *Effect of diabetes on orthodontic tooth movement in a mouse model.* *Eur J Oral Sci* 2011;119:7-14.
12. Yoshimatsu M, Shibata Y, Kitaura H, Chang X, Moriishi T, Hashimoto F et al. *Experimental model of tooth movement by orthodontic force in mice and its application to tumor necrosis factor receptor-deficient mice.* *J Bone Miner Metab* 2006;24:20-27.
13. Andrade I, Jr., Silva TA, Silva GA, Teixeira AL, Teixeira MM. *The role of tumor necrosis factor receptor type 1 in orthodontic tooth movement.* *J Dent Res* 2007;86:1089-1094.
14. Gonzales C, Hotokezaka H, Matsuoc KI, Shibazakid T, Yozgatiana JH, Darendelilere MA et al. *Effects of Steroidal and Nonsteroidal Drugs on Tooth Movement and Root Resorption in the Rat Molar.* *Angle Orthodontist* 2009;79:715-726.

15. Wang Y, Wang XX, Zhang LN, Jin SM, Zhang J. Effects of traditional Chinese medicine on bone remodeling during orthodontic tooth movement. *J Ethnopharmacol* 2012;141:642-646.
16. Diravidamani K, Sivalingam SK, Agarwal V. Drugs influencing orthodontic tooth movement: An overall review. *J Pharm Bioallied Sci* 2012;4:S299-303.
17. Baran DT, Schwartz MP, Bergfeld MA, Teitelbaum SL, Slatopolsky E, Avioli LV. Lithium inhibition of bone mineralization and osteoid formation. *J Clin Invest* 1978;61:1691-1696.
18. Lewicki M, Paez H, Mandalunis PM. Effect of lithium carbonate on subchondral bone in sexually mature Wistar rats. *Exp Toxicol Pathol* 2006;58:197-201.
19. Cohen O, Rais T, Lepkifker E, Vered I. Lithium carbonate therapy is not a risk factor for osteoporosis. *Horm Metab Res* 1998;30:594-597.
20. Clement-Lacroix P, Ai M, Morvan F, Roman-Roman S, Vayssiere B, Belleville C et al. Lrp5-independent activation of Wnt signaling by lithium chloride increases bone formation and bone mass in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:17406-17411.
21. Zamani A, Omrani GR, Nasab MM. Lithium's effects on bone mineral density. *Bone* 2009;44:331-334.
22. Tang GH, Xu J, Chen RJ, Qian YF, Shen G. Lithium delivery enhances bone growth during midpalatal expansion. *J Dent Res* 2011;90:336-340.
23. Knop LA, Shintcovsk RL, Retamoso LB, Ribeiro JS, Tanaka OM. Non-steroidal and steroidal anti-inflammatory use in the context of orthodontic movement. *Eur J Orthod* 2012;34:531-535.
24. Mak TW, Shek CC, Chow CC, Wing YK, Lee S. Effects of lithium therapy on bone mineral metabolism: a two-year prospective longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3857-3859.
25. Galvao MJ, Santos A, Ribeiro MD, Ferreira A, Nolasco F. Optimization of the tartrate-resistant acid phosphatase detection by histochemical method. *Eur J Histochem* 2011;55:e1.
26. Houston WJ. The analysis of errors in orthodontic measurements. *Am J Orthod* 1983;83:382-390.
27. Midtgard J, Bjork G, Linder-Aronson S. Reproducibility of cephalometric landmarks and errors of measurements of cephalometric cranial distances. *Angle Orthod* 1974;44:56-61.
28. Spencer GJ UJ, Etheridge SL, Arnett TR, Genever PG., . Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NFkB ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. *J Cell Sci* 2006:1283-1296.
29. Minying Zhang WJ, Xiaofei Zhou, Jiayi Yu, Andrew J. Lee, Shao-Cong, Sun HH. Deregulation of Tpl2 and NF-κB signaling and induction of macrophage apoptosis by the anti-depressant drug lithium. *Cell Signal* 2010;21:559-566.
30. Masato Tamura MMS, Masayuki Nashimoto. Regulation of CXCL12 expression by canonical Wnt signaling in bone marrow stromal cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2011: 760–767.
31. Sharma SD, Iqbal M. Lithium induced toxicity in rats: a hematological, biochemical and histopathological study. *Biol Pharm Bull* 2005;28:834-837.
32. Moe SM. Disorders Involving Calcium, Phosphorus, and Magnesium. *Prim Care* 2008;35:215–237, v-vi.

33. Davies NL. *Lithium toxicity in two dogs*. *J S Afr Vet Assoc* 1991;62:140-142.
34. Chadha VD, Bhalla P, Dhawan DK. *Zinc modulates lithium-induced hepatotoxicity in rats*. *Liver Int* 2008;28:558-565.
35. Alvarez L, Guanabens N, Peris P, Monegal A, Bedini JL, Deulofeu R et al. *Discriminative value of biochemical markers of bone turnover in assessing the activity of Paget's disease*. *J Bone Miner Res* 1995;10:458-465.
36. Allagui MS, Hfaiedh N, Croute F, Guerhazi F, Vincent C, Soleilhavoup JP et al. *[Side effects of low serum lithium concentrations on renal, thyroid, and sexual functions in male and female rats]*. *C R Biol* 2005;328:900-911.
37. Prigent A. *Monitoring Renal Function and Limitations of Renal Function Tests*. *Seminars in Nuclear Medicine* 2008;38:32-46.
38. Tucker MJ. *Diseases of the wistar rat*. 1997.
39. Hillert M, Zimmermann M, Klein J. *Uptake of lithium into rat brain after acute and chronic administration*. *Neuroscience Letters* 2012;521:62– 66.