

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-graduação em Odontologia

**OS EFEITOS DE SUPLEMENTO ALIMENTAR À BASE DE *LITHOTHAMNIUM*
SPE CÁLCIO NA MOVIMENTAÇÃO ORTODÔNTICA**

IZABELLA LUCAS DE ABREU LIMA

Belo Horizonte

2011

Izabella Lucas de Abreu Lima

**OS EFEITOS DE SUPLEMENTO ALIMENTAR À BASE DE *LITHOTHAMNIUM*
SP E CÁLCIO NA MOVIMENTAÇÃO ORTODÔNTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia-Mestrado, da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração: Ortodontia.

Orientador: Prof. Dr. Ildeu Andrade Jr.

Co-orientador: Prof. Dr. Dauro Douglas Oliveira.

Belo Horizonte

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

L732e Lima, Izabella Lucas de Abreu
Os efeitos de suplemento alimentar à base de *lithothamnium* sp e cálcio na movimentação ortodôntica / Izabella Lucas de Abreu Lima. Belo Horizonte, 2011. 52f.

Orientador: Ildeu Andrade Júnior
Coorientador: Dauro Douglas Oliveira
Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

1. Suplementos alimentares. 2. Carbonato de cálcio. 3. Movimentação dentária. 4. Remodelação óssea. I. Andrade Júnior, Ildeu. II. Oliveira, Dauro Douglas. III. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

CDU: 612.39

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aos meus pais e irmãos pelo apoio, amizade, e amor incondicionais.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde, força e por me iluminar e clarear meus pensamentos durante todo esse caminho.

Ao meu orientador, Dr. Ildeu Andrade Jr, pela confiança e disponibilidade na realização deste trabalho, por seus conselhos nos momentos de frustração e pelo incentivo constante.

Ao meu co-orientador, Dr. Dauro Douglas Oliveira, por ser um grande exemplo de profissional e inspiração, por todas as palavras de incentivo e confiança. Agradeço também pela sua presença nos momentos de maior dificuldade, por ter me proporcionado um enorme aprendizado ao longo desses 2 anos e meio e pelos conselhos sempre indispensáveis.

À minha co-orientadora, Dr. Tarcília Aparecida Silva, por ceder seu laboratório, pela confiança e pelo importante incentivo em prosseguir na carreira acadêmica.

Ao professor Mauro Teixeira, por tornar viável a execução deste projeto cedendo seu laboratório e pela confiança.

Ao professor Paulo Alencar, pela ajuda, paciência e incentivo, por permitir a utilização do laboratório de patologia da PUC Minas sempre que necessário e pela disponibilidade, desde os tempos de graduação.

À Silvana Albuquerque, por tudo que me ensinou, pela confiança e disponibilidade, que foram fundamentais no decorrer do curso.

À Adriana Moura, pela ajuda em diversos momentos de dificuldade, pela paciência e disponibilidade.

Ao Celso Queiroz, pela paciência e disponibilidade sempre presentes.

À minha família, que sempre me apoiou em minhas decisões e me ajudou em todos os desafios da minha vida. Em especial aos meus pais Francisco e Percília, pelos esforços e amor incondicional, por me fazerem tornar a pessoa que sou hoje e por estarem sempre ao meu lado, em qualquer situação. Sou eternamente grata e feliz por ter vocês como pais! Aos meus irmãos, Daniella e Thiago, pela amizade, compreensão, amor e incentivo, agradeço por serem os melhores amigos que eu poderia ter no mundo. Vocês são a razão da minha vida.

Ao professores que colaboraram de forma ativa em minha formação, me proporcionando um aprendizado inestimável durante o curso: Dr. Armando Lima, Dr. Bernardo Souzi, Dr. Dauro Oliveira, Dr. Ênio Mazzeiro, Dr. Flávio Almeida, Dr. Hélio Brito, Dr. Heloísio Leite, Dr. Ildeu Andrade, Dr. José Eymard Bicalho, Dr. José Maurício Vieira, Dr.

Júlio Brant, Dr. Tarcisio Junqueira, agradeço pela paciência diária e por todos os ensinamentos.

Ao professor Dr. Bernardo Quiroga Souki, pela confiança e incentivo, por ser fonte de grande inspiração e possibilitar um enorme crescimento em atividades extracurriculares.

Ao professor Dr. Flávio Ricardo Manzi, pelo incentivo durante o período de graduação, por acreditar em mim e no meu sonho. Obrigada pelos conselhos que sempre serão lembrados.

Aos funcionários da PUC Minas, pela amizade, paciência, apoio, carinho e disponibilidade. Em especial ao Diego, Alcides, Reni, Lorraine, Vívian, Cristina, Cristiane, Poliana, Ana Paula e Beto.

Às minhas amigas do Colégio, por estarem sempre ao meu lado, me apoiarem e compreenderem.

Às minhas amigas da PUC, por compartilharem cada momento da minha vida e fazerem parte deles, pela compreensão, amizade e alegria.

Aos meus amigos de mestrado Alessandra, Daniel, Fernanda, Petrus e Raquel, pela convivência, companheirismo, pela alegria de cada dia e por tornarem esses 29 meses mais divertidos. Foi difícil, mas sem vocês teria sido impossível. Em especial ao Daniel, meu amor, por toda a compreensão, carinho e paciência, obrigada por me fazer feliz.

Aos meus colegas do mestrado das turmas IX, X e XII, pela ótima convivência nestes anos, pelos conselhos e alegria. Em especial à Larissa, Lucas e Cybelle, pela amizade e carinho.

Aos pacientes, que estiveram comigo durante o curso, sempre com muito carinho, possibilitando tamanho aprendizado.

A todas as pessoas que de certa forma contribuíram para a realização desse trabalho e para minha formação, tanto intelectual quanto pessoal.

“Seu trabalho vai ocupar uma grande parte da sua vida, e a única maneira de estar verdadeiramente satisfeito é fazendo aquilo que você acredita ser um ótimo trabalho. E a única maneira de fazer um ótimo trabalho é fazendo o que você ama fazer.”

Steve Jobs, 2005

RESUMO

Lithothamnium sp (LTT) é uma alga rica em cálcio que vem sendo amplamente utilizada em suplementos alimentares para reposição mineral. Este suplemento apresenta propriedades antiinflamatórias, antibióticas e imunorreguladoras, e por isso, pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de investigar seus efeitos terapêuticos em doenças inflamatórias relacionadas e na reabsorção óssea. Como a remodelação óssea é influenciada tanto pelo equilíbrio de cálcio quanto por drogas antiinflamatórias, o presente estudo tem como objetivo investigar os efeitos do suplemento à base de LTT na movimentação dentária ortodôntica (MDO). Um aparelho ortodôntico foi colocado em camundongos C57BL6/J e os animais foram alimentados com dieta normal (controle), com dieta rica em LTT (LTT) ou com dieta rica em carbonato de cálcio - CaCO_3 (CaCO_3). Os níveis de $\text{TNF-}\alpha$ e CCL2 dos tecidos periodontais foram avaliados. Os resultados mostraram uma redução no número de células TRAP positivas nos animais submetidos à suplementação alimentar com LTT e cálcio, com uma grande diminuição no grupo CaCO_3 quando comparado ao controle. Enquanto isto, os níveis de $\text{TNF-}\alpha$ e CCL2 estavam significativamente diminuídos nos tecidos periodontais do grupo LTT e os níveis séricos de cálcio foram significativamente maiores nos grupos LTT e CaCO_3 . As análises do trabalho também revelaram que a quantidade de MDO estava significativamente menor nos grupos LTT e o CaCO_3 . Esse trabalho sugere que, em adição à aplicação de forças ortodônticas, a movimentação dentária depende também do metabolismo do cálcio no osso alveolar. Sendo assim, suplementos à base de cálcio, como o LTT, influenciam o recrutamento e as atividades dos osteoclastos, a liberação de mediadores inflamatórios e consequentemente, a MDO.

Palavras-chave: Suplementos alimentares. Carbonato de cálcio. Movimentação dentária. Remodelação óssea.

ABSTRACT

Lithothamnium sp (LTT), a calcium rich algae, has been widely used in dietary supplements (DS) for mineral reposition. Since it presents anti-inflammatory, antibiotic and immunoregulatory properties, current studies are focusing on its therapeutic effects on bone resorptive and inflammatory diseases. As bone remodeling is influenced by both calcium balance and anti-inflammatory drugs, the present study aimed to investigate the effect of LTT supplement on orthodontic tooth movement (OTM). An orthodontic appliance was placed in C57BL6/J mice fed with regular diet (vehicle), LTT-rich diet (LTT) or calcium rich diet (calcium carbonate – CaCO₃). Levels of TNF- α and CCL2 were evaluated in periodontal tissues. TRAP-positive cells were diminished in mice nourished with LTT and calcium diet, with a greater decrease in the CaCO₃ group, when compared to the control group. Meanwhile, the levels of TNF- α and CCL2 were significantly reduced in periodontal tissues and the serum levels of calcium were significantly higher in the LTT and CaCO₃ group. Analysis of the data also revealed that LTT and calcium groups exhibited a diminished amount of OTM. This study suggests that, in addition to the applied force, tooth movement is dependent upon the state of calcium metabolism, since dietary calcium-rich supplements, such as LTT, influence osteoclast recruitment and function, inflammatory mediators release, and consequently, OTM.

Key words: Dietary supplements. Calcium carbonate. Tooth movement. Bone remodeling.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	13
2.1.	Objetivos específicos	13
3	MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1.	Delineamento experimental	14
3.2.	Protocolo experimental	14
3.2.1.	<i>Instalação do aparelho ortodôntico</i>	15
3.2.2.	<i>Distribuição dos animais para análises bioquímicas, histomorfométricas e sorológicas</i>	18
3.2.3.	<i>Protocolo de suplementação da dieta</i>	20
3.3.	Processamento histológico	20
3.4.	Análise histomorfométrica	21
3.4.1.	<i>Contagem de células TRAP-positivas</i>	21
3.4.2.	<i>Mensuração da movimentação dentária</i>	22
3.5.	Análise quantitativa dos níveis de citocinas por meio de ELISA	23
3.6.	Análise sorológica	23
3.7.	Análise Estatística	24
	ARTIGO	25
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

Quando um estímulo mecânico com intensidade, constância e duração específicas é aplicado ao dente, inicia-se um processo inflamatório transitório que gera uma cascata de eventos físicos e biológicos no periodonto, resultando em remodelação óssea e consequente movimentação dentária ortodôntica (MDO) (ISIK et al., 2005). O processo de remodelação óssea, assim como a massa e a densidade óssea, também é fortemente influenciado por uma série de mediadores moleculares: fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, hormônios (DAVIDOVITCH, 1991) e disponibilidade de cálcio (MATKOVIC, 1991). Esse processo também pode ser afetado por outros fatores como idade, exercícios físicos, genética e dieta (BARTZELA et al., 2009; HARADA; RODAN, 2003; MATKOVIC, 1991; POLLITZER; ANDERSON, 1989).

Um importante componente de uma dieta saudável é a ingestão diária de cálcio. Por não ser produzido endogenamente, o cálcio é adquirido apenas pela dieta e sua concentração sérica depende não só apenas da disponibilidade de cálcio na dieta (HEANEY et al., 2001; WEAVER, 1992), mas também da capacidade do indivíduo de absorvê-lo (WOLF et al., 2000). O mecanismo de absorção do cálcio é complexo e é determinado pela capacidade de absorção intestinal. A saturação da absorção transcelular do cálcio depende da Vitamina D (NORMAN et al., 1981), que possui um importante papel na homeostase do cálcio, promovendo a absorção intestinal do cálcio, estimulando os osteoblastos e permitindo o crescimento normal e a preservação do osso (GARCIA et al., 2011). Deste modo, fatores que interferem na Vitamina D, podem indiretamente agir sobre o metabolismo do cálcio.

Aproximadamente 99% do cálcio do corpo é estocado nos ossos e dentes. O 1% restante é utilizado como um reservatório que mantém os níveis séricos de cálcio estáveis e equilibrados, sendo essa uma condição essencial em diversos processos fisiológicos como contrações musculares, regulação dos batimentos cardíacos, e o equilíbrio dos fluidos sanguíneos e das atividades enzimáticas (MATKOVIC et al., 1990; MATKOVIC, 1991).

O cálcio extracelular é também um dos fatores responsáveis pela regulação da remodelação óssea, sendo que a sinalização de cálcio aparenta ter um papel crítico na diferenciação e ativação de osteoclastos. (YAMASAKI, 1983). Além disso, as células ósseas expressam alguns receptores P2X, como P2X4 e P2X7, que são mediadores do fluxo de

cátions e, em alguns casos, do cálcio (KORCOK et al., 2004). A sinalização de cálcio parece ser importante na modulação de osteoblastos e na atividade de osteoclastos (JORGENSEN et al., 2002) e essa sinalização pode ser transmitida entre essas células ósseas por meio da ativação do P2X7 (KE et al., 2003).

Entretanto, perturbações mecânicas dos osteoclastos foram descritas como um indutor da mobilização de cálcio, sendo que a amplitude e duração dependeram das concentrações extracelulares de cálcio (XIA; FERRIER, 1995). Posteriormente, a perfusão de cálcio intracelular foi observada na secreção de ácido dos osteoclastos, sugerindo que o cálcio possa estar envolvido na sinalização da secreção de ácidos que ocorre durante a reabsorção óssea (RADDING et al., 1999). Outro estímulo envolvido nas concentrações de cálcio nos osteoclastos são as oscilações citoplasmáticas de cálcio que ocorrem durante a osteoclastogênese. As oscilações de cálcio promovem um sinal que induz os osteoclastos a uma regulação exacerbada e amplificação do fator nuclear de ativação de células T, nomeado NFATc1, que é considerado o maior regulador de diferenciação de osteoclastos (HWANG; PUTNEY, 2011).

Sob condições de equilíbrio negativo de cálcio, as necessidades metabólicas prevalecem sobre a demanda (HEANEY et al., 2001), causando uma diminuição do cálcio nos ossos, o que pode levar à uma osteopenia e osteoporose, com sintomas orais como perda de estrutura óssea (TAGUCHI et al., 1995; TAGUCHI et al., 2003). O cálcio é um importante adjunto no tratamento e prevenção de doença periodontal (HILDEBOLT, 2005). Indivíduos com doenças ósseas como osteopenia, osteoporose e doença periodontal, é indicada a suplementação de cálcio (BILEZIKIAN, 1995; GARCIA et al., 2011; NIH, 2001; STARK et al., 2002). Além disso, a suplementação de cálcio vem sendo recentemente recomendada como tratamento de pacientes com sobrepeso (ZEMEL et al., 2004). Diferentes substâncias contendo diversos tipos de sais de cálcio como citrato de cálcio, carbonato de cálcio, gluconato de cálcio e fosfato de cálcio, são utilizadas na criação de suplementos de cálcio que são amplamente oferecidos no mercado (NICAR; PAK, 1985a).

Uma estratégia com potencial de aumento de consumo de cálcio na dieta seria a utilização de uma alga marinha rica em cálcio, sendo que ela possui elevados índices de carbonato de cálcio. *Lithothamnium* sp (LTT) é um grupo de alga da família hepalidaceae, rica em cálcio e que vem sendo amplamente utilizada como base mineral de suplementos alimentares muito vendidos. É uma alga de aspecto calcário, pois absorve o carbonato de cálcio e magnésio. Não é fonte de proteína, vitaminas, carboidratos e lipídeos, somente de

macro e micro minerais em concentrações variadas, dependendo do local, estação do ano e profundidade. Tem a função de repor minerais, promover nutrientes balanceados e elevadas concentrações de cálcio. Esses suplementos são facilmente absorvidos por animais e podem auxiliar a recuperação de fraturas ósseas, melhorando a resistência. (MELO; MOURA, 2009).

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do suplemento alimentar à base de LTT, uma dieta rica em cálcio, no recrutamento e ativação de osteoclastos e, consequentemente, na MDO.

2 OBJETIVOS

Avaliar em um modelo de camundongos, os efeitos de suplementos alimentares à base de *Lithothamnium* sp e carbonato de cálcio na movimentação dentária ortodôntica.

2.1. Objetivos específicos

- a) avaliar a influência das dietas ricas em cálcio e em *Lithothamnium* sp nos níveis séricos de cálcio;
- b) investigar a influência das dietas ricas em cálcio e em *Lithothamnium* sp nos níveis séricos de vitamina D;
- c) quantificar a movimentação ortodôntica em animais com suplemento alimentar à base de *Lithothamnium* sp;
- d) mensurar a movimentação ortodôntica em animais com suplemento alimentar à base de carbonato de cálcio;
- e) examinar o efeito do suplemento alimentar à base de *Lithothamnium* sp nos níveis de TNF- α e CCL2 nos tecidos periodontais;
- f) comparar os resultados dos efeitos dos suplementos alimentares ricos em cálcio e *Lithothamnium* sp na movimentação ortodôntica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Imunofarmacologia (Departamento de Bioquímica e Imunologia – ICB/UFMG). Todos os animais foram tratados sob as normas do Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob o protocolo CETEA: 135/2008.

3.1. Delineamento experimental

Foram utilizados camundongos machos C57BL6/J selvagens. Os animais foram divididos de acordo com a dieta experimental utilizada, 20 animais foram alimentados com dieta normal (grupo controle), 5 com ração e suplemento à base de carbonato de cálcio (grupo CaCO_3) e 20 com ração e suplemento à base de *Lithothamnium* sp (grupo LTT). Para cada grupo analisado foram utilizados 5 animais. Os níveis de TNF- α e CCL2 foram avaliados com 0, 12 e 72 horas após a aplicação de força. A quantidade de movimentação ortodôntica e o número de osteoclastos foram avaliados histopatologicamente, os níveis séricos de cálcio e vitamina D sorologicamente, ambas as avaliações foram realizadas após 12 dias de aplicação de força mecânica.

3.2. Protocolo experimental

Os animais utilizados foram obtidos no biotério da UFMG e iniciaram o experimento com idade aproximada de 10 semanas e peso médio de 25g, que foi monitorado durante todo o período experimental. Os animais já haviam atingido a maturidade sexual e seu peso máximo corporal. O condicionamento destes animais foi realizado em gaiolas de plástico, a alimentação foi composta de ração pastosa e água, os animais foram mantidos em local com ciclo de 12 horas claro/escuro. Como critério de inclusão avaliou-se: ausência de irritações ou inflamações na cavidade oral, permanência do aparelho nos elementos dentários até o final do tratamento e perda de peso inferior a 20%.

3.2.1. Instalação do aparelho ortodôntico

O protocolo referente à indução da movimentação ortodôntica foi feito baseado no artigo intitulado “*The Role of Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1 in Orthodontic Tooth Movement*” (ANDRADE et al., 2007).

Os camundongos foram anestesiados pela injeção intraperitoneal de 0,2 mL/25g de peso corporal, de uma solução contendo xilazina ($0,02 \text{ mg mL}^{-1}$), ketamina (50 mg mL^{-1}) e solução salina em uma proporção de 1: 0,5: 3, respectivamente. Os animais foram posicionados com a cabeça para cima em uma mesa cirúrgica especialmente desenhada para restringir movimentos do animal e permitir o acesso intra-oral (FIG. 1 e 2). Para melhor visualização da cavidade oral, foi utilizado um estereomicroscópio e iluminação com fibra óptica (FIG.3).

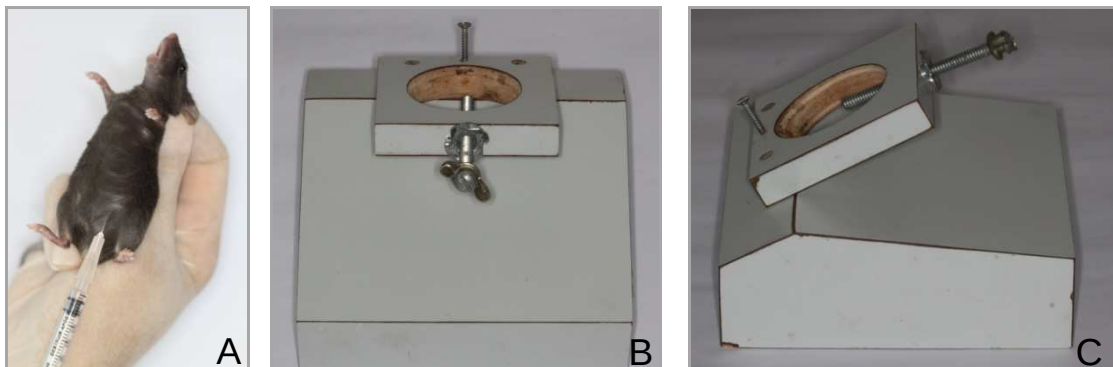


Figura 1: Anestesia e mesa cirúrgica

A) Anestesia peritoneal. B e C) Mesa cirúrgica utilizada neste trabalho.

Fonte: Arquivo pessoal



Figura 2: Camundongo posicionado na mesa cirúrgica
Camundongo imobilizado na mesa cirúrgica com o auxílio de fitas adesivas.

Fonte: Arquivo pessoal

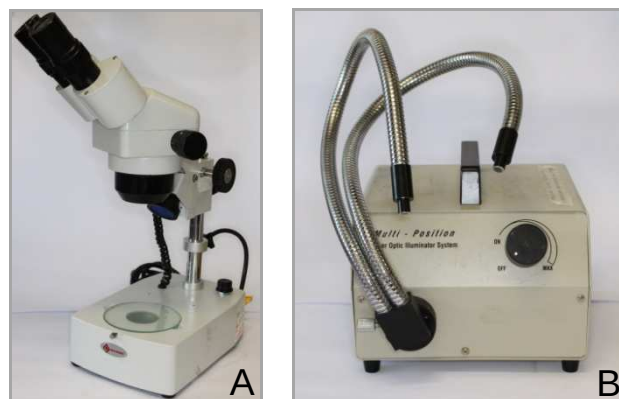


Figura 3: Esteromicroscópio e fibra óptica

A) Estereomicroscópio para visualização do campo microcirúrgico. B) Fibra óptica para iluminação do campo microcirúrgico.

Fonte: Arquivo pessoal

Uma vez que os animais estavam devidamente anestesiados, bem posicionados e o campo iluminado se iniciou a colagem do aparelho ortodôntico (FIG.4A). A superfície oclusal do primeiro molar superior do lado direito foi limpa com acetona por 10 segundos e um selante auto-adesivo (*self-etching primer*, Unitek, 3M, Mineapolis, USA) foi aplicado em seguida. Uma mola ortodôntica aberta em Níquel-Titânio (Ni-Ti) de 0.25 x 0.76 mm (Lancer Orthodontics, San Marcos, CA, USA), foi fixada com resina fotopolimerizável (Transbond, Unitek/3M, St. Paul, MN) e posicionada entre o primeiro molar superior direito e os incisivos centrais, essa mola foi selecionada devido a sua capacidade de liberar menos força

ao sistema. A parte posterior da mola foi então colada na superfície oclusal do primeiro molar superior (FIG. 4B).

A porção anterior/mesial da mola foi ativada no sentido mesial e fixada com a mesma resina nos incisivos (FIG.4C). Estes dentes foram unidos com resina, com objetivo de prevenir a erupção dos incisivos e a conseqüente perda de ancoragem. Não houve reativação da mola durante o período experimental.

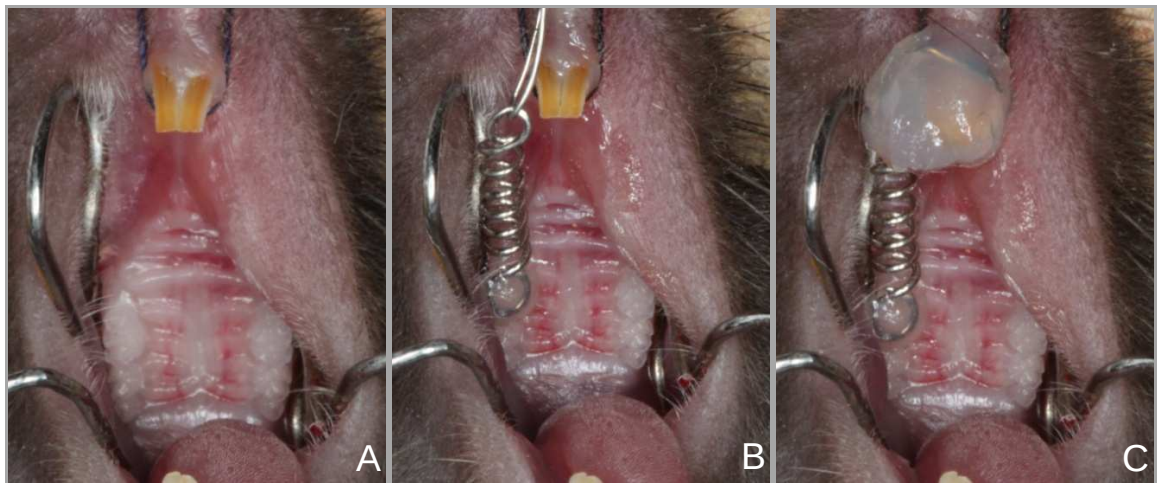


Figura 4: Colocação da mola

A) Vista oclusal da maxila. B) Vista oclusal da maxila com apenas a extremidade distal/posterior da mola aberta de Ni-Ti fixada na superfície oclusal do primeiro molar superior do lado direito, sem ativação. C) Vista oclusal da maxila com mola ativada e posicionada entre o primeiro molar superior direito e os incisivos superiores.

Fonte: Arquivo pessoal

Estudo piloto anterior, realizado por Silvana Rodrigues de Albuquerque Taddei, preconizou o uso da força de 35g para a ativação da mola. Esta metodologia será publicada em 2012 no artigo intitulado “*CCR2 on osteoclastic activity in orthodontic tooth movement*” no *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. Para a calibração desta força foi utilizado um dinamômetro (Shimpo Corp., Tokyo, Japan) (FIG. 5A), fixado sobre uma plataforma. Esta plataforma era composta de um trilho (FIG. 5A) sob o qual deslizava a mesa cirúrgica. Desta forma, era possível a movimentação da mesa através do giro de uma manivela (FIG. 5B). Na extremidade oposta à manivela estava disposta uma torre onde o dinamômetro foi fixado (FIG. 5B). A utilização desta plataforma permitiu um maior controle do experimento ao impedir a interferência de fatores como vibração e calor transmitidos a partir do contato com as mãos do operador. Um fio de 0,8 mm de espessura e 4 cm de comprimento (Morelli Ortodontia, Sorocaba, SP, Brasil) foi utilizado para conectar a

extremidade mesial/anterior da mola ao gancho do dinamômetro (FIG. 5C). Para a ativação da mola, a manivela da plataforma foi girada movimentando assim a mesa cirúrgica para trás até registrar no dinamômetro a força ortodôntica de 0,35N (35g). Uma vez atingida a força, a mola foi fixada nos incisivos (FIG. 5D).

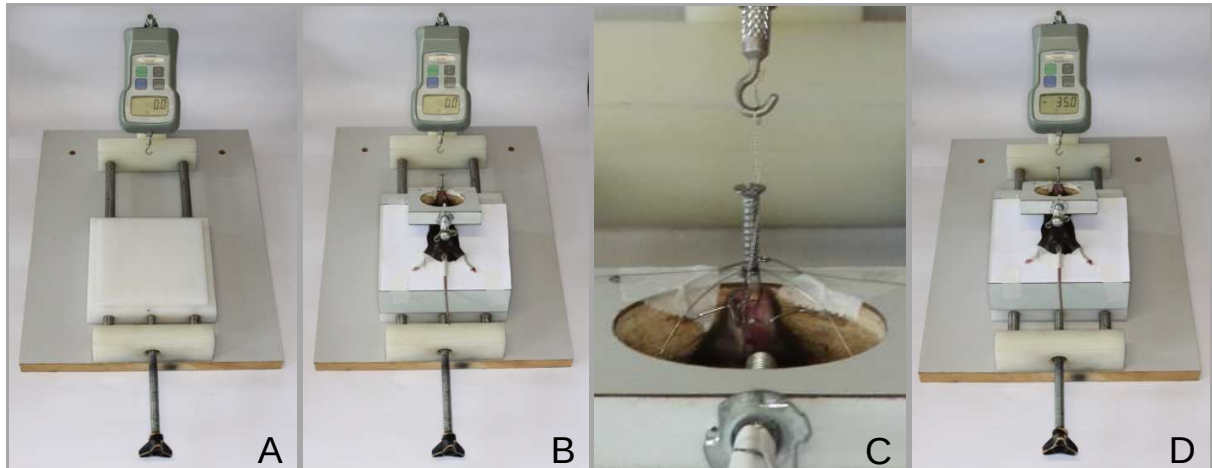


Figura 5: Ativação da mola

A) Plataforma de ativação da mola ortodôntica com o dinamômetro fixado. B) Plataforma de ativação da mola ortodôntica com a mesa cirúrgica em posição. C) Fio de aço posicionado entre a extremidade mesial/anterior da mola e o gancho de medição do dinamômetro. D) Dinamômetro marcando 35g de ativação da mola ortodôntica.

Fonte: Arquivo pessoal

Como protocolo, para impedir que o peso do animal interferisse na mensuração da força ortodôntica pelo dinamômetro, o camundongo permaneceu totalmente imobilizado durante a ativação da mola. Sendo assim, a fixação adequada dos animais, (FIG. 2), impossibilitando a movimentação do corpo em direção ao dinamômetro durante a ativação da mola e impedindo a movimentação da cabeça do animal, permitiram que o dinamômetro fosse ligado apenas quando o fio estava totalmente esticado sem apresentar deformação da mola ou qualquer interferência na mensuração da força.

3.2.2. Distribuição dos animais para análises imunológicas, histomorfométricas e sorológicas

Os animais foram divididos em três grupos: grupo controle com ingestão de dieta normal, grupo CaCO_3 com suplemento à base de carbonato de cálcio e grupo LTT com

suplemento à base de *Lithothamnium* sp. Foram utilizados 5 animais em cada grupo experimental sendo sacrificados com 0, 12 e 72 horas os animais para análise dos níveis de citocinas e após 12 dias de aplicação de força ortodôntica os animais para análise histopatológica e sorológica. O aparelho ortodôntico foi fixado na hemi-maxila direita, sendo esta considerada experimental. A hemi-maxila esquerda, por sua vez, foi considerada controle, pois não houve qualquer aplicação de força mecânica deste lado. No mesmo momento, foram coletadas amostras de sangue dos animais para avaliação dos níveis séricos de cálcio no sangue

A escolha do dia de sacrifício dos animais seguiu o protocolo publicado no artigo “*The Role of Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1 in Orthodontic Tooth Movement*” (ANDRADE et al., 2007). No estudo realizado por este autor, foi observado que o número de osteoclastos atinge seu número máximo após 12 dias do início da força.

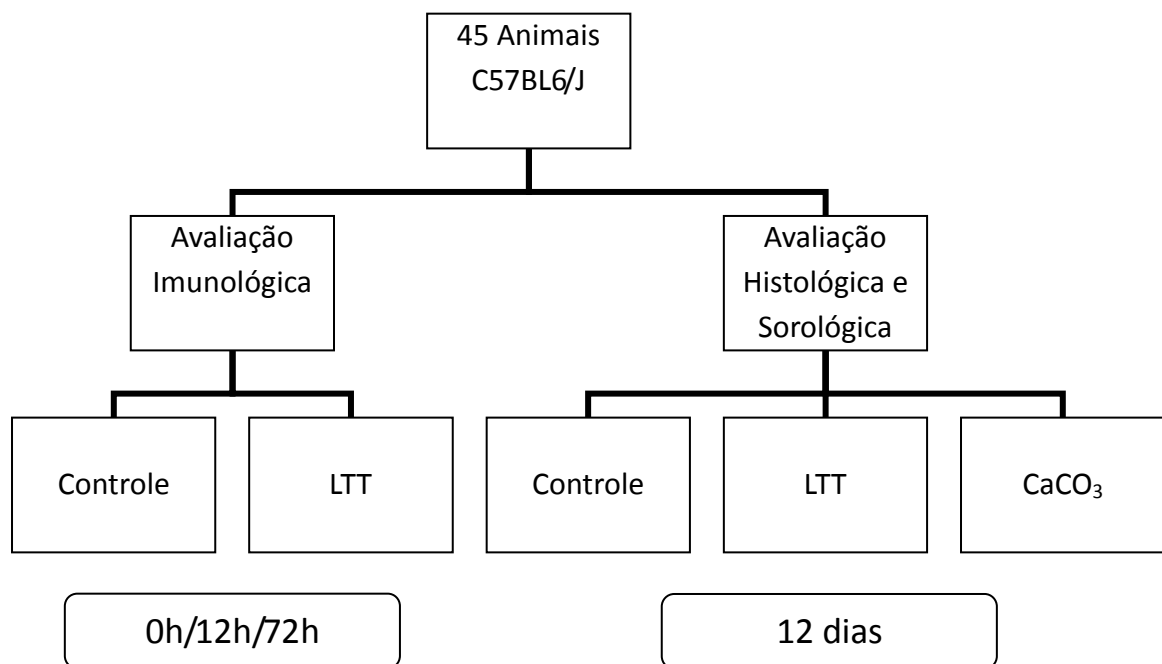


Figura 6: Esquema demonstrando a divisão dos animais para o desenvolvimento do modelo experimental

Fonte: Dados da pesquisa

3.2.3. Protocolo de suplementação da dieta

Os animais foram divididos em três grupos de acordo com a dieta recebida, grupo controle, que recebeu dieta normal, composta por 26.3% de proteína, 2.5% de óleo de milho e 55.6% de carboidratos, grupo CaCO_3 com suplemento à base de carbonato de cálcio a 0.9% (25mg/dia/animal) e grupo LTT com 1% de extrato de *Lithothamnium* sp (24mg/dia/animal de CaCO_3), a quantidade de cálcio ingerida por dia foi determinado por uma estimativa pesando as rações todos os dias e fazendo a média de ingestão por caixa e por animal. Os animais receberam suplementação da dieta a partir de 32 dias anteriormente ao início da aplicação de força ortodôntica e durante todo o experimento, o tempo de suplementação foi determinado de forma arbitrária.

3.3. Processamento histológico

Os maxilares superiores foram então removidos (FIG. 7) e imersos em solução de paraformaldeído a 4% em PBS 7.4, por 48 horas para a fixação. As amostras posteriormente foram lavadas em PBS. A desmineralização foi realizada em solução de EDTA 14% (pH 7.4) por 2 semanas com trocas diárias da solução, o que permite a remoção das molas facilmente. Em seguida as peças foram lavadas em água corrente por um período 8 horas e então iniciou-se o preparo histológico das amostras. A maxila foi então dissecada com o auxílio de um estereomicroscópio (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, Brasil). Com a utilização de uma lâmina de aço foram realizados 2 cortes, inicialmente a porção anterior contendo os incisivos foi cortada e descartada. Um segundo corte foi realizado a 1mm da superfície palatina da coroa dos molares, paralelo a uma linha imaginária traçada sobre a superfície oclusal dos molares. Desta forma restou uma amostra apenas dos fragmentos contendo três molares superiores e uma pequena área do palato. O mesmo protocolo foi realizado do lado da movimentação ortodôntica e do lado contralateral.

Uma vez obtidos os fragmentos, estes foram desidratados em séries crescentes de álcool a 70%, 80%, 90% e absoluto (3 banhos) por 30 minutos cada. Em seguida as peças foram clarificadas em xilol (20, 15, 10 minutos) e incluídas em parafina. As amostras foram incluídas com a superfície palatina voltada para o lado da microtomia, que foi realizada por um micróto mo rotatório (Jung, Histocut 820, Mussioch, Alemanha). Os cortes foram corados

com Hematoxilina e eosina para seleção. As amostras foram selecionadas de acordo com a visualização das regiões que seriam analisadas, posteriormente foram coradas com fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) e contra-coradas com hematoxilina de acordo com instruções do fabricante.

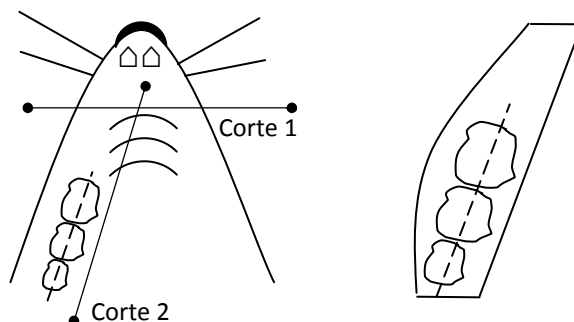


Figura 7: Desenho esquemático do preparo das peças para processamento histológico

Fragmento da maxila anterior, contendo os incisivos está separado pelo Corte 1. Em seguida, um bisturi posicionado a 1 mm da superfície palatal da coroa dos molares e paralelo a uma linha imaginária traçada sobre a oclusal dos molares, separa o fragmento de interesse (corte 2). Procedimento foi realizado em ambos os lados (direito e esquerdo) da maxila.

Fonte: Figura gentilmente cedida pelo Dr. Ildeu Andrade Jr. (Tese de Doutorado – Departamento de Biologia Celular – ICB/UFMG, 2007).

3.4. Análise histomorfométrica

3.4.1. Contagem de células TRAP-positivas

Cinco sessões representativas por animal, em três campos microscópicos consecutivos por sessão representativa foram coradas com TRAP, para análise histomorfométrica. As contagens foram realizadas na superfície da lâmina dura do osso alveolar na face voltada para o ligamento periodontal na região mesial da raiz distovestibular do primeiro molar usando um microscópio de luz Axioskop 40 (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha). O número total de osteoclastos presentes nas lacunas ósseas da região óssea da raiz distovestibular foram identificadas como células positivas TRAP. Para validação destas análises, dois examinadores devidamente calibrados avaliaram as lâminas.

3.4.2. Mensuração da movimentação dentária

O protocolo de mensuração da movimentação dentária foi baseado no estudo de Andrade Jr (ANDRADE *et al.*, 2007). A quantidade de movimentação dentária induzida foi determinada pela mensuração da distância entre a junção amelo-cementária (JAC) do primeiro e segundo molares (FIG. 8) do lado experimental (hemi-maxila direita) em relação ao lado controle (hemi-maxila esquerda) do mesmo animal. As medidas foram determinadas com a utilização de um microscópio Axioskop 40 (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) adaptado a uma câmera digital (PowerShot A620, Canon, Tokyo, Japan),

A quantificação da movimentação dentária foi realizada com o software Image J (National Institutes of Health – EUA). A mensuração foi realizada em 5 sessões por animal, por um único examinador (IL), três vezes cada, para cada grupo e a variabilidade foi menor que 5% em todos os casos.

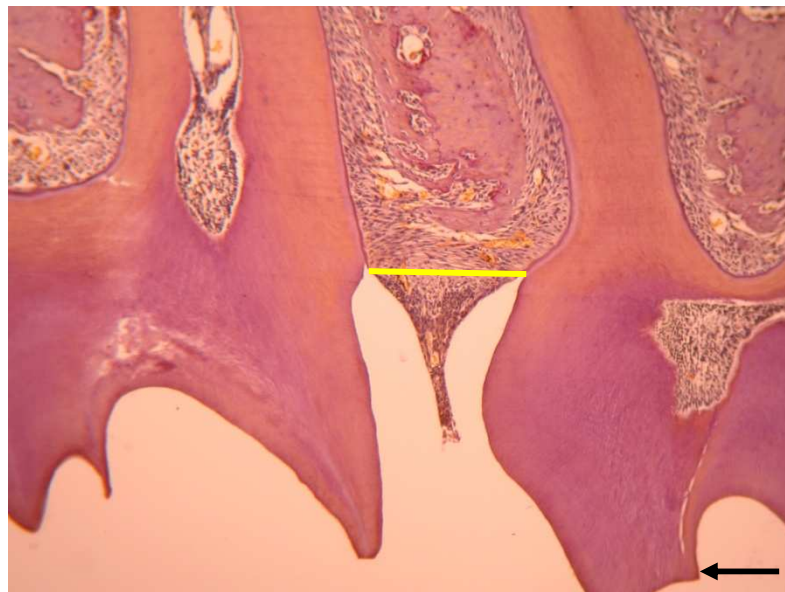


Figura 8: Avaliação morfométrica do movimento dentário após a aplicação de força ortodôntica.

A linha amarela representa a distância entre as junções amelo-cementárias do primeiro e segundo molar superior. Os cortes verticais serão avaliados através de um microscópio Axioskop 40 (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) utilizando o software Image J do NIH (National Institutes of Health). A seta preta indica a direção do movimento dentário ortodôntico. Barra = 100 μ m.

Fonte: Arquivo pessoal

3.5. Análise quantitativa dos níveis de citocinas por meio de ELISA

Usando um estereomicroscópio, o ligamento periodontal e o osso alveolar circundante foram extraídos dos primeiros molares superiores. A mucosa gengival e oral foram dissecadas e descartadas, juntamente com os dentes. As amostras foram pesadas e homogeneizadas em PBS (0.4 mM NaCl e 10 mM NaPO₄) contendo inibidores da proteinase (0.1 mM de PMSF, 0.1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA, e 0.01 mg/mL de aprotinina A) e 0.05% de Tween-20 a 1mg/mL. A mistura foi colocada em gelo e centrifugada (10.000 g) durante 10 minutos. O sobrenadante foi então coletado e armazenado a -70°C até que fosse analisado. Os níveis de TNF- α e CCL2 foram avaliados por ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), conforme protocolo do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Os resultados foram expressos por meio de picogramas de citocinas/mg de tecido.

3.6. Análise sorológica

Para análise sorológica, no momento do sacrifício dos animais, após 12 dias de aplicação de força mecânica, foram coletadas amostras de sangue pelo seio da órbita dos animais. Com os dedos indicador e polegar, a pele na região da órbita foi afastada e o globo ocular foi projetado o quanto possível para fora da cavidade orbitária. A ponta de uma pipeta fina foi inserida abaixo do globo ocular em um ângulo de 45°. Quando uma pequena quantidade de sangue começou a preencher a pipeta ela foi ligeiramente removida de sua posição permitindo que o sangue enchesse a mesma. O orifício aberto no final da pipeta foi coberto com a ponta do dedo antes da remoção da pipeta para prevenir que a amostra coletada saísse da pipeta (HOFF, 2000).

Em seguida, as amostras foram colocadas em tubos vazios. Cada tubo foi centrifugado a 5000rpm por 5 minutos a 4°C. O soro foi então coletado com pipeta e mantido sob refrigeração a 4°C, até que fosse enviado ao Laboratório Lapecco (Belo Horizonte, MG) para análise. O laboratório utilizou o método Colorimétrico Arsenazo III para os níveis de cálcio e o Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho para os níveis de vitamina D.

3.7. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média $\pm$ EPM (erro padrão da média). As comparações entre os grupos foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls para avaliação da quantidade de células TRAP positivas, movimentação dentária e níveis de TNF- α e CCL2. Foi também utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida por teste Bonferroni para avaliação dos níveis séricos de cálcio e vitamina D no sangue do grupo controle, LTT e CaCO₃. Os dados obtidos foram processados no programa GraphPad Prism (version 5.01, GraphPad Software, San Diego, CA). Os níveis de significância para todos os testes estatísticos foram predeterminados a 5%.

ARTIGO

Periódico para o qual será submetido: Journal of Dental Research

The effect of *Lithothamnium* sp and calcium supplements in orthodontic tooth movement

TADDEI SRA^{1,2*}, QUEIROZ-JUNIOR C^{1,2}, LIMA ILA³, ANDRADE JR. I³, OLIVEIRA DD³, SILVA TA^{1,2}, TEXEIRA MM¹

¹*Laboratory Immunopharmacology, Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Avenida Presidente Antônio Carlos 6627, 31.270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil*

²*Department of Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Avenida Presidente Antônio Carlos 6627, 31.270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil*

³*Department of Orthodontics, Faculty of Dentistry, Pontifical Catholic University of Minas Gerais (PUC Minas), Avenida Dom José Gaspar 500, 30535-901 Belo Horizonte, MG – Brazil*

1)Short title (running head): Calcium supplementation and Orthodontic Tooth

Movement

2)Key words: dietary supplements – calcium carbonate – tooth movement – bone remodeling

3)The number of words in the abstract: 211

4)The number of words in the abstract and the text (excluding tables, figure, legends, acknowledgments, and cited references): 2.960

5)The number of tables and figures: 4

6)The number of cited references: 43

* *Corresponding author: Ildeu Andrade Jr. Mailing address: Department of Orthodontics, Faculty of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC Minas), Av. Dom José Gaspar 500, CEP 31.270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Phone: 55 31 3319-4410 (voice), 55 31 3481-6726 (fax). E-mail: ildeu_andrade@yahoo.com.br*

ABSTRACT

Lithothamnium sp (LTT), a calcium rich algae, has been widely used in dietary supplements (DS) for mineral reposition. Since it presents anti-inflammatory, antibiotic and immunoregulatory properties, current studies are focusing on its therapeutic effects on bone resorptive and inflammatory diseases. As bone remodeling is influenced by both calcium balance and anti-inflammatory drugs, the present study aimed to investigate the effect of LTT supplement on orthodontic tooth movement (OTM). An orthodontic appliance was placed in C57BL6/J mice fed with regular diet (vehicle), LTT-rich diet (LTT) or calcium rich diet (calcium carbonate – CaCO₃). Levels of TNF- α and CCL2 were evaluated in periodontal tissues. TRAP-positive cells were diminished in mice nourished with LTT and calcium diet, with a greater decrease in the CaCO₃ group, when compared to the control group. Meanwhile, the levels of TNF- α and CCL2 were significantly reduced in periodontal tissues and the serum levels of calcium were significantly higher in the LTT and CaCO₃ group. Analysis of the data also revealed that LTT and calcium groups exhibited a diminished amount of OTM. This study suggests that, in addition to the applied force, tooth movement is dependent upon the state of calcium metabolism, since dietary calcium-rich supplements, such as LTT, influence osteoclast recruitment and function, inflammatory mediators release, and consequently, OTM.

Key words: dietary supplements – calcium carbonate – tooth movement – bone remodeling

INTRODUCTION

Physiological bone remodeling is a highly coordinated process responsible for bone resorption and formation and is necessary to repair damaged bone and to maintain mineral homeostasis. In addition to the traditional bone cells (osteoclasts, osteoblasts, and osteocytes) that are necessary for bone remodeling, several immune cells have also been implicated in bone disease¹. The availability of an animal model with genes related to bone metabolism is of great interest to enhance our understanding of the process of orthodontic tooth movement².

When a mechanical stimulus is applied to a tooth, it begins a transient inflammatory process that generates a physical and biological cascade of events in the periodontium, resulting in bone remodeling, and consequently, the orthodontic tooth movement (OTM)³. The bone remodeling process, as well as the bone mass and density, are strongly influenced by several molecular mediators, such as growth factors, cytokines, chemokines, hormones⁴ and calcium availability⁵. It can also be affected by other factors, such as age, physical exercises, genetics and dietary⁵⁻⁸.

An important component of a healthy dietary is the daily calcium intake. Calcium is not produced endogenously and is only acquired through daily intake. Its absorption depends on the patient calcium absorptive capacity⁹ and calcium availability^{10,11}. Calcium absorption mechanism is complex and it is determined by intestinal absorption capability. Transcellular absorption saturation depends on Vitamin D¹², that plays an important role in calcium homeostasis, promoting calcium absorption in the intestine and stimulating osteoblasts to enable normal bone growth and preservation¹³. Thus, factors that interfere on Vitamin D can indirectly act on calcium metabolism. Approximately 99% of the body's calcium is stored in bones and teeth. The remaining 1% serves as a large reservoir for maintaining the plasma calcium on stable concentrations, which is essential in various physiological processes, such as muscle contraction, regulation of the heartbeat, fluid balance, and enzyme activities^{5,14}.

Extracellular calcium is also one of the main factors regulating bone remodeling, as calcium signaling appears to play a critical role in osteoclast differentiation and activity^{15,16,17}. These bone cells express functional P2X receptors, such as P2X4 and P2X7, that mediate cation fluxes, and in some cases, calcium influx¹⁸. Moreover, calcium signals seems to be important for osteoblast modulation of osteoclast function¹⁵ and it can be transmitted between these bone cells by means of activation of P2X7¹⁶.

Under conditions of negative calcium balance, metabolic needs prevail over demand¹⁹ causing a bone calcium mobilization, which can lead to bone diseases, with oral symptoms such as bone structure loss^{20,21}. Calcium is also an important adjunct for preventing and treating periodontal disease^{13,22}. A study in dogs revealed more rapid OTM under bone negative calcium balance, suggesting that, in addition to applied force, tooth movement is dependent upon the state of calcium metabolism in alveolar bone²³.

Different substances, containing several types of calcium salts such as calcium citrate, calcium carbonate, calcium lactate, calcium gluconate and calcium phosphate are used to create commercially available calcium supplementation²⁴. A potential dietary strategy to increase calcium consumption would be to use calcium rich marine algae since they have high levels of calcium carbonate. *Lithothamnion* sp (LTT) is a calcium rich algae group of the hepalidaceae family that it is used for calcium supplementation. It has been widely used in diet supplements for mineral reposition and provides balanced nutrients and high calcium concentrations. It is easily absorbed by animals and it can help to recover from fractures and to improve resistance²⁵.

The present study aimed to evaluate if a LTT supplementation, a calcium-rich diet, could influence bone remodelling in a model of OTM.

MATERIAL and METHODS

Experimental Animals

Forty-five ten-week-old wild-type (C57BL6/J), were used in this experiment. All animals were kept in an environmentally controlled room with a 14/10 h light/dark cycle, were treated under ethical regulations for animal experiments, defined by the Institutional Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais (protocol N° 135/2008).

Experimental Dietary

Animals were divided according to the type of experimental diet that they were fed: vehicle, 0,9% calcium carbonate (25mg/day/animal) (CaCO_3) and 1% of LTT algae extract (24mg/day/animal of CaCO_3) (LTT) during 32 days. Vehicle animals fed a standard laboratory chow (vehicle), composed of 26.3% protein, 2.6 % corn oil, 55.6 % carbohydrates.

Experimental Protocol

The experimental protocol was based on previous studies (2). Mice were anesthetized i.p. with 0.2 mL of a solution containing xylazine (0.02 mg/mL) and ketamine (50 mg/mL). An orthodontic appliance consisted of a Ni-Ti 0.25 x 0.76 mm coil spring (Lancer Orthodontics, San Marcos, CA, USA) was bonded by a light cured resin (Transbond, Unitek/3M, Monrova, CA, USA) between maxillary right first molar and the incisors. The magnitude of force was calibrated by a tension gauge (Shimpo Instruments, Itasca, IL, USA) to exert a force of 35 g applied in the mesial direction²⁶. There was no reactivation during the experimental period. Animals were divided in 3 groups: 20 with regular diet (vehicle), 20 with LTT diet (LTT) and 5 with calcium rich diet (CaCO_3). Each animal's weight was recorded throughout the experimental period, and there was no significant loss of weight.

For histomorphometric analysis, the left side of the maxilla, without appliance, was used as control. For histopathological analysis, mice were killed with an overdose of anesthetic after 12 days of mechanical loading. In this same time point, a sample of blood was obtained to evaluate serum levels of calcium by colorimetric Arsenazo III method and vitamin D3 assessed by High Performance Liquid Chromatograph (HPLC).

For molecular examination, these groups were sacrificed at 0, 12 and 72 hr. For every set of experiments, 5 animals were used for each time-point.

Histopathological Analysis

The right and the left maxillae halves, including first, second and third molars were dissected and fixed in 10% buffered formalin (pH 7.4). After fixation, each hemimaxillae were decalcified in 14% EDTA (pH 7.4) for 20 days and embedded in paraffin. Samples were cut into sagittal sections of 5 μ m thickness. Sections were stained for tartrate resistant acid phosphatase (TRAP; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), counterstained with hematoxylin, and used for histological examination. The first molar distal-buccal root, on its coronal two-thirds of the mesial periodontal site, was used for the osteoclasts counts, on 5 sections per animal. Osteoclasts were identified as TRAP-positive, multinucleated cells sited on the bone surface. The slides were counted by two examiners, and the intraclass correlation coefficient showed average measures of 0.977, validating the measurement.

Measurement of Tooth Movement

Image J software (National Institutes of Health) was used to quantify the amount of tooth movement. Tooth movement was obtained through the difference between the distance of the cementum-enamel-junction's (CEJ's) of the first molar and the second molar (1st and 2nd molar distance) of the experimental side (right hemimaxillae) in relation to the control side (left hemimaxillae) of the same animal. Five vertical sections per animal were evaluated under a microscope Axioskop 40 (Carl Zeiss, Göttingen, Niedersachsen, Germany) adapted to a digital camera (PowerShot A620, Canon, Tokyo, Honshu, Japan). A single examiner (I.L.) conducted observations blinded to the group status. Three measurements were conducted for each evaluation and the variability was below 5%.

Measurement of Cytokine Levels

Using a stereomicroscope, we extracted periodontal ligament and surrounding alveolar bone samples from the areas adjacent to the upper first molars. The samples were weighed and

homogenized in PBS (0.4 mM NaCl and 10 mM NaPO₄) containing protease inhibitors (0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA, and 0.01 mg/mL aprotinin A) and 0.05% Tween-20 at 1mg/mL. The mixture was placed on ice and centrifuged (10.000 *g*) for 10 min. The supernatant was then collected and stored at -70°C until further analysis. The levels of TNF- α and CCL2 were evaluated by a double-ligand enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to the manufacturer's protocol (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The results were expressed as pictograms of cytokine/mg tissue. In preliminary experiments, the interexperimental variability was below 5%.

Serological Analysis

For serological analysis, when mice were killed with an overdose of anesthetic after 12 days of mechanical loading, the blood sample was collected from the Orbital Sinus. With the first finger and thumb pull the skin away from the eyeball, above and below the eye, so that the eyeball is protruding out of the socket as much as possible. A tip of a fine-walled Pasteur pipette was inserted into the corner of the eye socket underneath the eyeball, the tip was directed at a 45-degree angle toward the middle of the eye socket. When a small amount of blood began filling the pipette, withdraw slightly and allow the pipette to fill. The open end of the pipette needed to be covered with the tip of the finger before removing it from the orbital sinus to prevent blood from spilling out of the tube²⁶.

The samples were stored in empty tubes. The tubes were centrifuged 5000rpm for 5 minutes at 4°C; the serum was collected with a pipette and kept under refrigeration at 4°C, until it was sent to Lapecco Laboratory (Belo Horizonte, MG) for evaluation. The laboratory used Colorimetric Arsenazo III method to analyze calcium levels and vitamin D3 was assessed by High Performance Liquid Chromatograph (HPLC).

Statistical Analysis

Results in each group were expressed as the mean $\pm$ SEM. As the data sets presented a normal distribution, differences among the groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls multiple comparison post hoc test to evaluate and compare the TRAP activity, the number of TRAP positive cells, the amount of tooth

movement of each group the measurement of cytokine levels, The one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test was used for paired comparisons to evaluate differences of calcium and 1,25 dihydroxy vitamin D3 serum levels between the three groups. The data obtained from all evaluations were processed with GraphPad Prism (version 5.01, GraphPad Software, San Diego, CA). The level of significance for all statistical tests was predetermined at 5%.

RESULTS

TRAP Activity and The Number of TRAP-positive Cells decreased in mice fed with LTT and CaCO₃

In the control group, TRAP-positive cells was found on the distal side of the alveolar bone surface, and no activity was observed in the mesial region of the periodontium (Fig.1). After 12 days of mechanical loading, TRAP-positive cells appeared to decrease more extensively in mice fed with LTT and CaCO₃, which presented a smaller alveolar bone resorption than did mice fed with vehicle based on the bone surface irregularity (Fig.1).

Overall, there was a good correlation between the intensity of TRAP activity, as evaluated qualitatively, and the number of TRAP positive osteoclasts. Indeed, the number of TRAP-positive cells in mice fed with LTT and CaCO₃ decreased compared to the vehicle group after 12 days of mechanical loading. However, the number of TRAP-positive osteoclasts was significantly lower in mice fed with CaCO₃ diet (Fig. 1).

The Amount of Tooth Movement were significantly diminished in mice fed with LTT and CaCO₃

Next, we evaluated whether the latter changes were reflected in changes of tooth movement. Histomorphometric results showed that the amount of tooth movement significantly decreased in the CaCO₃ and in the algae group after 12 days of mechanical loading, compared to the control group (Fig.2).

TNF- α and CCL2 levels in the Periodontal Tissue were diminished in mice fed with LTT

There was a significant decrease in periodontal tissue levels of TNF- α and CCL2 after 72hr of mechanical loading in the LTT group, compared to the vehicle and to the 0hr analysis ($p < 0.05$) (Fig. 3).

Serum levels of calcium increased in mice fed with LTT and CaCO₃, but 1,25-dihydroxy vitamin D3 levels were not affected

The serum levels of calcium were significantly higher in the LTT and CaCO₃ group, when compared to the vehicle group but did not affect 1,25 dihydroxy vitamin D3 levels. (Fig.4).

DISCUSSION

Adults require 1000 to 1300 mg of calcium in their daily diet, which is often prescribed as a dietary supplement for the prevention and treatment of bone diseases²⁷, including the periodontal ones^{13,22}. Several studies have attempted to elucidate the role of calcium on the mechanisms controlling the appearance of osteoclasts at compression sites and consequent osteoclast-dependent tooth movement^{15,28,29}. Previous studies have shown that calcium might be associated with osteoclast differentiation, activation and function^{15,17,18,28,30-32}. The present study aimed to investigate whether calcium supplementation from LTT algae and calcium carbonate could influence bone remodeling associated with OTM. The results demonstrated that a CaCO_3 supplementation significantly decreased the amount of tooth movement, which was correlated with decreased alveolar bone resorption and low numbers of TRAP-positive osteoclasts (Fig. 1 and Fig. 2).

Some reports have investigated the effect of extracellular calcium in osteoclast recruitment and function^{33,34}. Their results demonstrated that calcium might be important on signaling acid secretion and RANKL-mediated osteoclastogenesis. In line with these studies, analysis of the data showed that increasing the serum levels of calcium with CaCO_3 supplements significantly decreased the number of osteoclasts on sites of compression and significantly decreases the amount of alveolar bone resorption² (Fig. 4).

As some types of algae have anti-inflammatory properties³⁵, this study evaluated if levels of important inflammatory mediators that are involved in bone remodeling, such as $\text{TNF-}\alpha$ and CCL2 , were affected. The data showed a significant decrease in periodontal tissue levels of these pro-inflammatory proteins in the LTT group (Fig. 3). Our results are not in agreement with a previous study that some volunteers were submitted to a multivitamin/mineral supplementation and it had no effect on cytokine production³⁶. Previous studies have also shown that, like dietary intake of calcium, hormone such as parathyroid hormone (PTH), thyroid hormones (thyroxine, calcitonin), sex hormones (estrogens), and vitamins (eg, vitamin D3) are important regulators of calcium homeostasis³⁷. Studies dealing with the effects of a low-calcium diet have shown that it increases PTH release in animals^{23,38}, which increases the concentration of calcium in the blood, and leading to an bone resorption. However, our results showed that, despite of the elevation in the serum levels of calcium, the levels of 1,25 dihydroxy vitamin D3 remained the same (Fig. 4). Therefore, additional studies are necessary

to evaluate the effect a high-calcium diet on those hormones, and consequently, on the rate of OTM.

Furthermore, calcium dietary supplementation is one of the most commonly used therapies associated to treatment of osseous conditions, including osteopenia^{39,40} and osteoporosis^{5,41}. In addition, calcium supplementation has been recently widely recommended in treatment of overweight patients⁴². As the daily calcium intake maintains steady expansion, orthodontists should be aware of the possible consequences underlying the orthodontic treatment of patients under calcium supplementation.

In conclusion, this present study suggested that CaCO_3 and LTT dietary supplementation decrease osteoclast chemoattraction and diminishes osteoclast, leading to a reduced tooth movement. This is one demonstration that dietary intake can play an important role in bone resorption during OTM. Further studies are now required to understand the effects of a high-calcium diet on important regulators of calcium homeostasis, such as PTH and calcitonin, and their indirect effects on OTM.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Fundação de Amparo a Pesquisas do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) for financial support.

REFERENCES

1. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *The Journal of biological chemistry*. 2010 Aug 13;285(33):25103-25108.
2. Andrade I, Silva T a, Silva G a B, Teixeira a L, Teixeira MM. The role of tumor necrosis factor receptor type 1 in orthodontic tooth movement. *Journal of dental research*. 2007 Nov;86(11):1089-1094.
3. Isik F, Sayinsu K, Arun T, Unlüçerçi Y. Bone marker levels in gingival crevicular fluid during orthodontic intrusive tooth movement: a preliminary study. *The journal of contemporary dental practice*. 2005 May 15;6(2):27-35.
4. Davidovitch Z. Tooth Movement. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 1991;2(4):411-450.
5. Matkovic V. Calcium metabolism and calcium requirements during skeletal modeling and consolidation of bone mass. *The American journal of clinical nutrition*. 1991 Jul;54(1 Suppl):245S-260S.
6. Harada S-ichi, Rodan G a. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):349-355.
7. Bartzela T, Türp JC, Motschall E, Maltha JC. Medication effects on the rate of orthodontic tooth movement: a systematic literature review. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*. 2009 Jan;135(1):16-26.
8. Pollitzer S, Anderson J. Special Ethnic and genetic differences in bone mass□: hereditary vs environmental Articles a review with a. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1989;50:1244-1259.
9. Wolf RL, Cauley J a, Baker CE, Ferrell RE, Charron M, Caggiula a W, et al. Factors associated with calcium absorption efficiency in pre- and perimenopausal women. *The American journal of clinical nutrition*. 2000 Aug;72(2):466-471.
10. Heaney RP, Dowell MS, Bierman J, Hale C a, Bendich A. Absorbability and cost effectiveness in calcium supplementation. *Journal of the American College of Nutrition*. 2001 Jun;20(3):239-246.
11. Weaver CM. Calcium bioavailability and its relation to osteoporosis. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*. 1992;200:157-160.
12. Norman D a, Fordtran JS, Brinkley LJ, Zerwekh JE, Nicar MJ, Strowig SM, et al. Jejunal and ileal adaptation to alterations in dietary calcium: changes in calcium and magnesium absorption and pathogenetic role of parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D. *The Journal of clinical investigation*. 1981 Jun;67(6):1599-1603.

13. Garcia MN, Hildebolt CF, Miley DD, Dixon D a, Couture R a, Spearie CLA, et al. One-year effects of vitamin D and calcium supplementation on chronic periodontitis. *Journal of periodontology*. 2011 Jan;82(1):25-32.
14. Matkovic V, Fontana D, Tominac C, Goel P, Chesnut CH. Factors that influence peak bone mass formation: a study of calcium balance and the inheritance of bone mass in adolescent females. *The American journal of clinical nutrition*. 1990 Nov;52(5):878-888.
15. Jorgensen NR, Henriksen Z, Sorensen OH, Eriksen EF, Civitelli R, Steinberg TH. Intercellular calcium signaling occurs between human osteoblasts and osteoclasts and requires activation of osteoclast P2X7 receptors. *The Journal of biological chemistry*. 2002 Mar 1;277(9):7574-7580.
16. Ke HZ, Qi H, Weidema a F, Zhang Q, Panupinthu N, Crawford DT, et al. Deletion of the P2X7 nucleotide receptor reveals its regulatory roles in bone formation and resorption. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*. 2003 Jul;17(7):1356-1367.
17. Yamasaki K. The Role of Cyclic AMP, Calcium, and Prostaglandins in the Induction of Osteoclastic Bone Resorption Associated with Experimental Tooth Movement. *Journal of Dental Research*. 1983 Aug 1;62(8):877-881.
18. Korcok J, Raimundo LN, Ke HZ, Sims SM, Dixon SJ. Extracellular Nucleotides Act Through P2X7 Receptors to Activate NF- B in Osteoclasts. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2004;19(4):642-651.
19. Roberts EW. Adjunctiva Orthodontic Therapy in Adults Over 50 Yars of age. *Journal Indiana Dental Association*. 1997;76(2):15-19.
20. Taguchi A, Sanada M, Krall E, Nakamoto T, Ohtsuka M, Suei Y, et al. Relationship between dental panoramic radiographic findings and biochemical markers of bone turnover. *Journal of bone and mineral research*. 2003 Sep;18(9):1689-1694.
21. Taguchi a, Tanimoto K, Suei Y, Otani K, Wada T. Oral signs as indicators of possible osteoporosis in elderly women. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 1995 Nov;80(5):612-616.
22. Hildebolt CF. Effect of vitamin D and calcium on periodontitis. *Journal of periodontology*. 2005 Sep;76(9):1576-1587.
23. Midgett RJ, Ph D, Shaye R, Fruge JF. The effect of altered bone metabolism on orthodontic tooth movement. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 1981;80(3):256 - 262.
24. Nicar MJ, Pak CY. Calcium Bioavailability from Calcium Carbonate and Calcium Citrate. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1985;61(2):391-393.

25. Melo T, Moura A. Utilização da farinha de algas calcáreas na alimentação animal. *Archivos De Zootecnia*. 2009;58(R):99-107.
26. Taddei SA, Andrade Jr I, Queiroz-Jr CM, Garlet TP, Garlet GP, Cunha FQ, Teixeira MM, Silva TA. The Role of CCR2 in Orthodontic Tooth Movement. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* - In press. 2012;1-19.
27. Hoff J. Methods of Blood Collection in the Mouse. *Lab Animal*. 2000;29(10):47-53.
28. Houtkooper L, Farrell VA. Calcium Supplement Guidelines. 2011;1-4.
29. Hwang S-Y, Putney JW. Calcium signaling in osteoclasts. *Biochimica et biophysica acta*. 2011 May;1813(5):979-983.
30. Kameda T, Mano H, Yamada Y, Takai H, Amizuka N, Kobori M, et al. Calcium-Sensing Receptor in Mature Osteoclasts, Which Are Bone Resorbing Cells bone formation coupled to osteoclastic resorption of. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1998;422(245):419-422.
31. Radding W, Jordan SE, Hester RB, Blair HC. Intracellular calcium puffs in osteoclasts. *Experimental cell research*. 1999 Dec 15;253(2):689-696.
32. Rasmussen P. Calcium Deficiency, Pregnancy, and Lactation in rats. *Calcified tissue international*. 1977;23(1):87-94.
33. Xia SL, Ferrier J. Calcium signal induced by mechanical perturbation of osteoclasts. *Journal of cellular physiology*. 1995 Jun;163(3):493-501.
34. Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL, et al. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000 Feb 15;97(4):1566-1571.
35. Gartland a, Buckley K a, Bowler WB, Gallagher J a. Blockade of the pore-forming P2X7 receptor inhibits formation of multinucleated human osteoclasts in vitro. *Calcified tissue international*. 2003 Oct;73(4):361-9.
36. Berteau O, Mulloy B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology*. 2003 Jun;13(6):29R-40R.
37. McKay DL, Perrone G, Rasmussen H, Dallal G, Hartman W, Cao G, et al. The effects of a multivitamin/mineral supplement on micronutrient status, antioxidant capacity and cytokine production in healthy older adults consuming a fortified diet. *Journal of the American College of Nutrition*. 2000 Oct;19(5):613-621.

38. Talmage RV, Matthews JL, Mobley HT, Lester GE. Calcium homeostasis and bone surface proteins, a postulated vital process for plasma calcium control. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*. 2003 Sep;3(3):194-200.
39. Hodsman a B, Fraher LJ, Ostbye T, Adachi JD, Steer BM. An evaluation of several biochemical markers for bone formation and resorption in a protocol utilizing cyclical parathyroid hormone and calcitonin therapy for osteoporosis. *The Journal of clinical investigation*. 1993 Mar;91(3):1138-1148.
40. Avioli LV. Calcium and osteoporosis. *Annual review of nutrition*. 1984 Jan;4:471-491.
41. Nordin B, Morris H. The Calcium deficiency model for osteoporosis. *Nutrition reviews*. 1989;47(3):65-72.
42. Peterson C, Eurell J, Erdman J. Alterations in Calcium Intake on Peak Bone Mass in the Female rat. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1995;10(1):81-95.
43. Zemel MB, Thompson W, Milstead A, Morris K, Campbell P. Calcium and dairy acceleration of weight and fat loss during energy restriction in obese adults. *Obesity research*. 2004 Apr;12(4):582-590.

FIGURE LEGENDS

Figure 1

A) Histological changes related to orthodontic tooth movement. Sections of the periodontium around the disto-buccal root of the first molar were stained with TRAP.

A. vehicle mice, side without appliance amplified view 10x

B. vehicle mice, side without appliance amplified view 40x

C. vehicle mice, experimental amplified view 10x

D. vehicle mice, experimental amplified view 40x

E. LTT amplified view 10x

F. LTT amplified view 40x

G. CaCO_3 amplified view 10x

H. CaCO_3 amplified view 40x

B) Number of TRAP positive osteoclasts in vehicle, LTT and CaCO_3 fed mice, after twelve days, on control side (control). Number of TRAP positive osteoclasts in vehicle, LTT and calcium fed mice, after twelve days, on experimental side (experimental). Data are expressed as the mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ comparing the control side to the respective experimental one. # $P < 0.05$ comparing vehicle with algae and calcium groups. One-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test. Bar = 100 μm .

Figure 2

Amount of orthodontic tooth movement in vehicle, LTT and CaCO_3 fed mice, after twelve days, on experimental side. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM. # $P < 0.05$ comparing all three groups. One-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test. Bar = 100 μm .

Figure 3

Expression of CCL2 and $\text{TNF-}\alpha$ in vehicle and LTT fed mice, after 0, 12 and 72 hours of mechanical loading. The data were expressed as the mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ compared control group to experimental group (12 or 72 hours of orthodontic force). Data are expressed as the mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ comparing the control side to the respective experimental one. # $P < 0.05$ comparing vehicle with algae and calcium groups. One-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test. Bar = 100 μm .

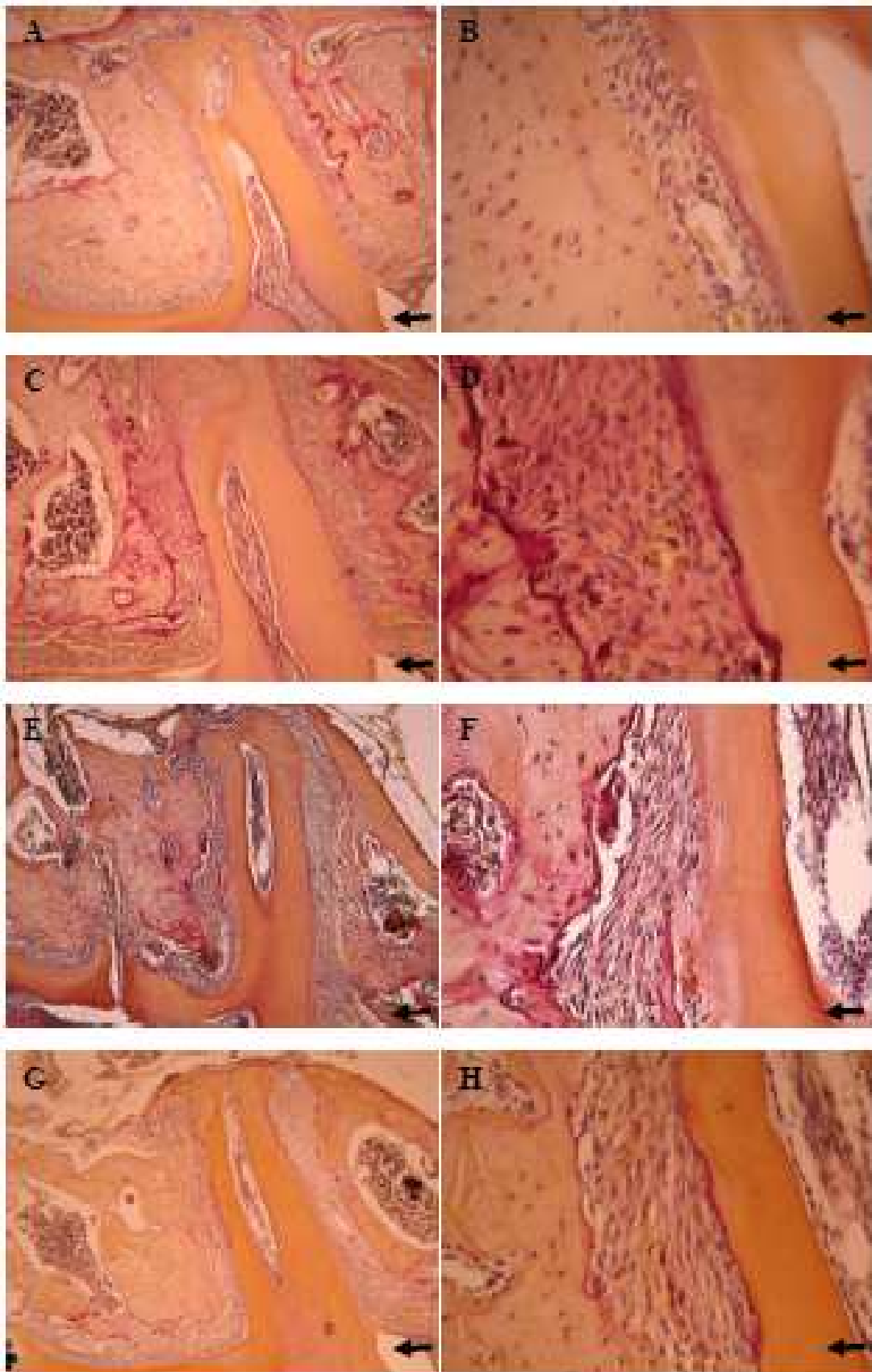
Figure 4

A) Amount of calcium serum levels in vehicle, LTT and CaCO₃ fed mice, after twelve days. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM. #P < 0.05 comparing all three groups. One-way ANOVA and Bonferroni test. Bar = 100 μ m.

B) Amount of 1,25 dihydroxy vitamin D₃ serum levels in vehicle, LTT and CaCO₃ fed mice, after twelve days. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM. #P < 0.05 comparing all three groups. One-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test. Bar = 100 μ m.

Figure 1

A)



B)

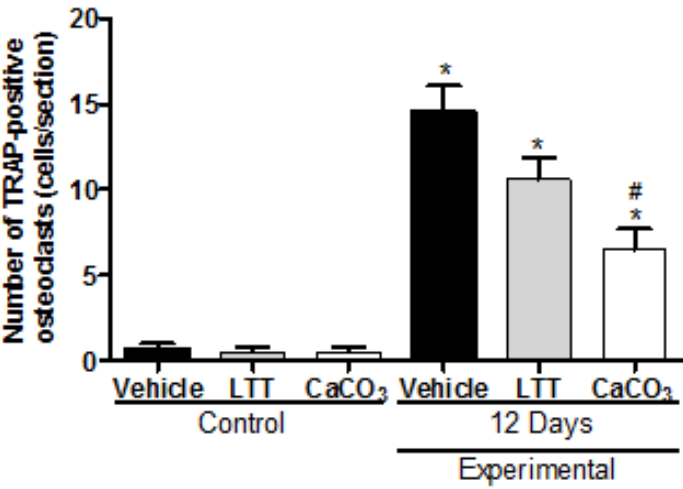


Figure 2

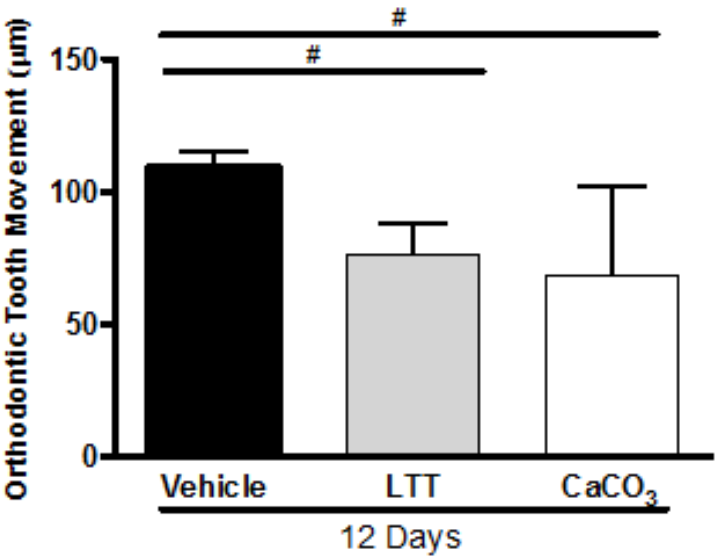


Figure 3

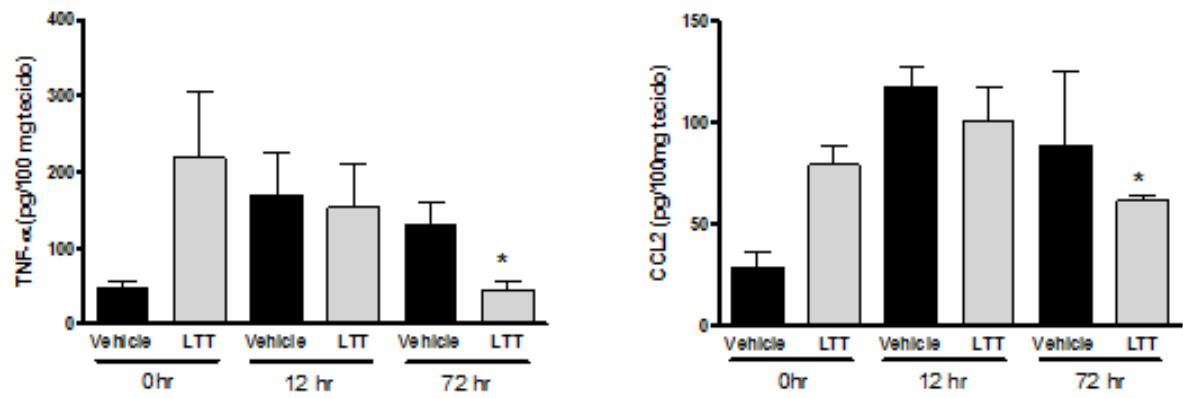
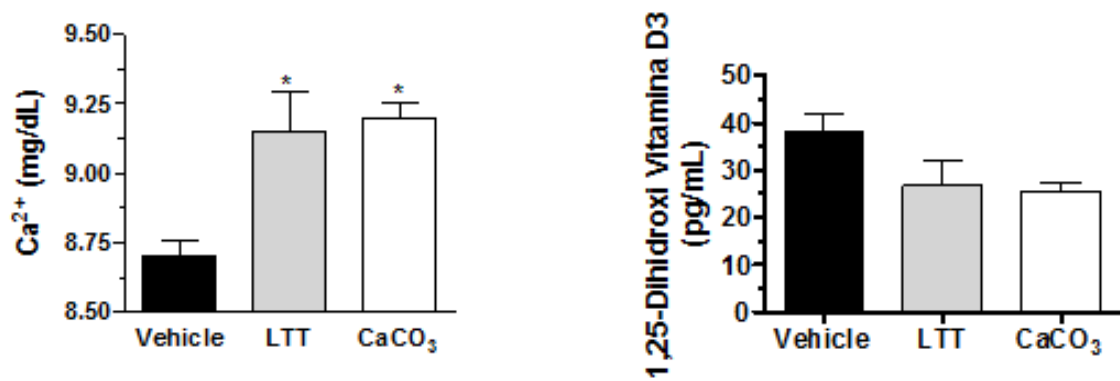


Figure 4



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta dissertação intitulada “Os efeitos de suplemento alimentare à base de *Lithothamnium* sp e cálcio na movimentação ortodôntica” é parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ortodontia pela Universidade Católica de Minas Gerais (PUC Minas).

Este trabalho segue a linha de pesquisa que estuda a biologia do movimento dentário e foi desenvolvida em associação com a Universidade Federal de Minas Gerais. Esta cooperação entre as universidades, bem como o desenvolvimento do modelo de movimentação dentária ortodôntica em camundongos, foi iniciada no doutorado do Dr. Ildeu Andrade Jr., orientador desta dissertação. O intuito deste trabalho é elucidar a relação entre a utilização de suplementos alimentares à base de cálcio e a diferenciação e ativação de osteoclastos na movimentação dentária ortodôntica.

De acordo com as normas vigentes na PUC Minas esta dissertação gerou o artigo “*The effect of Lithothamnium sp and calcium supplements in orthodontic tooth movement*”.

Considerando os limites éticos e o custo, foi utilizada uma amostra de 5 animais por grupo. Sabendo-se que trabalhamos com camundongos de idades semelhantes, mesmo gênero, seres isogênicos, que foram mantidos em condições idênticas e com dieta padronizada, é esperado que a distribuição seja normal. Essas condições viabilizam e justificam a utilização do testes estatísticos realizados nessa pesquisa, pois os resultados dos experimentos obedecem a uma distribuição normal.

No decorrer dos experimentos nos deparamos com uma limitação, foram coletadas amostras sorológicas para análise dos níveis de paratormônio e calcitonina, essas amostras foram enviadas ao laboratório, que por sua vez, realizaram testes como se as amostras fossem de humanos, o que invalidou nosso resultado. Uma sugestão seguinte teria sido a remoção da tireóide e paratireóide para avaliarmos sua hipertrofia ou atrofia na tentativa de relacionarmos essas condições aos níveis de produção de paratormônio o calcitonina, mas esse experimento não foi levado à diante, pois os animais haviam sido submetidos à dieta com suplementos alimentares apenas 32 dias antes da colocação da mola, e esse tempo não seria suficiente para provocar alterações na anatomia das glândulas.

Esta reflexão final tem o objetivo de esclarecer algumas limitações desse experimento, que segue uma linha de pesquisa que relaciona a ingestão diária de um suplemento alimentar à base de *Lithothamnium* sp com algumas condições como movimentação ortodôntica, doenças periodontais, artrites reumatóides e obesidade.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, I. SILVA, T. A; SILVA, G. A B. TEIXEIRA, A L.; TEIXEIRA, M. M. The role of tumor necrosis factor receptor type 1 in orthodontic tooth movement. **Journal of dental research**, v. 86, n. 11, p. 1089-1094, nov 2007.
- AVIOLI, L. V. Calcium and osteoporosis. **Annual review of nutrition**, v. 4, p. 471-491, jan 1984.
- BARTZELA, T. TÜRKP, J. C. MOTSCHALL, E.; MALTHA, J. C. Medication effects on the rate of orthodontic tooth movement: a systematic literature review. **American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics**, v. 135, n. 1, p. 16-26, jan 2009.
- BERTEAU, O.; MULLOY, B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. **Glycobiology**, v. 13, n. 6, p. 29R-40R, jun 2003.
- BILEZIKIAN, J. P. Osteoporosis: Why Calcium is Important. **Journal of women's health**, v. 4, n. 5, p. 483-494, 1995.
- DAVIDOVITCH, Z. Tooth Movement. **Critical reviews in oral biology and medicine**, v. 2, n. 4, p. 411-450, 1991.
- GARCIA, M. N. HILDEBOLT, C. F. MILEY, D. D. *et al.* One-year effects of vitamin D and calcium supplementation on chronic periodontitis. **Journal of periodontology**, v. 82, n. 1, p. 25-32, jan 2011.
- GARTLAND, A; BUCKLEY, K. A; BOWLER, W. B.; GALLAGHER, J. A. Blockade of the pore-forming P2X7 receptor inhibits formation of multinucleated human osteoclasts in vitro. **Calcified tissue international**, v. 73, n. 4, p. 361-369, out 2003.
- HARADA, S.-ICHI; RODAN, G. A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 349-355, 15 maio 2003.
- HEANEY, R. P. DOWELL, M. S. BIERMAN, J. HALE, C. A; BENDICH, A. Absorbability and cost effectiveness in calcium supplementation. **Journal of the american college of nutrition**, v. 20, n. 3, p. 239-246, jun 2001.
- HILDEBOLT, C. F. Effect of vitamin D and calcium on periodontitis. **Journal of periodontology**, v. 76, n. 9, p. 1576-1587, set 2005.
- HODSMAN, A B. FRAHER, L. J. OSTBYE, T. ADACHI, J. D.; STEER, B. M. An evaluation of several biochemical markers for bone formation and resorption in a protocol utilizing cyclical parathyroid hormone and calcitonin therapy for osteoporosis. **The Journal of clinical investigation**, v. 91, n. 3, p. 1138-1148, mar 1993.
- HOFF, J. Methods of Blood Collection in the Mouse. **Lab animal**, v. 29, n. 10, p. 47-53, 2000.
- HOUTKOOPE, L.; FARRELL, V. A. Calcium Supplement Guidelines. p. 1-4, 2011.

HWANG, S.-Y.; PUTNEY, J. W. Calcium signaling in osteoclasts. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1813, n. 5, p. 979-983, maio 2011.

ISIK, F. SAYINSU, K. ARUN, T.; UNLÜÇERÇİ, Y. Bone marker levels in gingival crevicular fluid during orthodontic intrusive tooth movement: a preliminary study. **The journal of contemporary dental practice**, v. 6, n. 2, p. 27-35, 15 maio 2005.

JORGENSEN, N. R. HENRIKSEN, Z. SORENSEN, O. H. *et al.* Intercellular calcium signaling occurs between human osteoblasts and osteoclasts and requires activation of osteoclast P2X7 receptors. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 9, p. 7574-7580, 1 mar 2002.

KAMEDA, T. MANO, H. YAMADA, Y. *et al.* Calcium-Sensing Receptor in Mature Osteoclasts , Which Are Bone Resorbing Cells bone formation coupled to osteoclastic resorption of. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 422, n. 245, p. 419-422, 1998.

KE, HUA ZHU; QI, H. WEIDEMA, A F. *et al.* Deletion of the P2X7 nucleotide receptor reveals its regulatory roles in bone formation and resorption. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 17, n. 7, p. 1356-1367, jul 2003.

KORCOK, J. RAIMUNDO, L. N. KE, HUA Z; SIMS, S. M.; DIXON, S. J. Extracellular Nucleotides Act Through P2X7 Receptors to Activate NF- B in Osteoclasts. **Journal of bone and mineral research**, v. 19, n. 4, p. 642-651, 2004.

LI, J. SAROSI, I. YAN, X. Q. *et al.* RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 97, n. 4, p. 1566-1571, 15 fev 2000.

MATKOVIC, V. Calcium metabolism and calcium requirements during skeletal modeling and consolidation of bone mass. **The american journal of clinical nutrition**, v. 54, n. 1 Suppl, p. 245S-260S, jul 1991.

MATKOVIC, V. FONTANA, D. TOMINAC, C. GOEL, P.; CHESNUT, C. H. Factors that influence peak bone mass formation: a study of calcium balance and the inheritance of bone mass in adolescent females. **The american journal of clinical nutrition**, v. 52, n. 5, p. 878-888, nov 1990.

MCKAY, D. L. PERRONE, G. RASMUSSEN, H. *et al.* The effects of a multivitamin/mineral supplement on micronutrient status, antioxidant capacity and cytokine production in healthy older adults consuming a fortified diet. **Journal of the american college of nutrition**, v. 19, n. 5, p. 613-621, out 2000.

MELO, T.; MOURA, A. Utilização da farinha de algas calcáreas na alimentação animal. **Archivos de zootecnia**, v. 58, n. R, p. 99-107, 2009.

MIDGETT, R. J. PH, D. SHAYE, R.; FRUGE, J. F. The effect of altered bone metabolism on orthodontic tooth movement. **American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics**, v. 80, n. 3, p. 256 - 262, 1981.

NICAR, M. J.; PAK, C. Y. Calcium bioavailability from calcium carbonate and calcium citrate. **Journal of clinical endocrinology & metabolism**, v. 61, n. 2, p. 391-393, 1985a.

NIH. Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. **JAMA: The journal of the american medical association**, v. 285, n. 6, p. 785-795, 14 fev 2001.

NORDIN, B.; MORRIS, H. The Calcium deficiency model for osteoporosis. **Nutrition reviews**, v. 47, n. 3, p. 65-72, 1989.

NORMAN, D. A; FORDTRAN, J. S. BRINKLEY, L. J. *et al.* Jejunal and ileal adaptation to alterations in dietary calcium: changes in calcium and magnesium absorption and pathogenetic role of parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D. **The journal of clinical investigation**, v. 67, n. 6, p. 1599-1603, jun 1981.

PETERSON, C. EURELL, J.; ERDMAN, J. Alterations in Calcium Intake on Peak Bone Mass in the Female rat. **Journal of bone and mineral research**, v. 10, n. 1, p. 81-95, 1995.

POLLITZER, S.; ANDERSON, J. Special Ethnic and genetic differences in bone mass: hereditary vs environmental Articles a review with a. **American journal of clinical nutrition**, v. 50, p. 1244-1259, 1989.

RADDING, W. JORDAN, S. E. HESTER, R. B.; BLAIR, H. C. Intracellular calcium puffs in osteoclasts. **Experimental cell research**, v. 253, n. 2, p. 689-696, 15 dez 1999.

RAGGATT, L. J.; PARTRIDGE, N. C. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 33, p. 25103-25108, 13 ago 2010.

RASMUSSEN, P. Calcium Deficiency, Pregnancy, and Lactation in rats. **Calcified tissue international**, v. 23, n. 1, p. 87-94, 1977.

ROBERTS, E. W. Adjunctiva Orthodontic Therapy in Adults Over 50 Yars of age. **Journal Indiana dental association**, v. 76, n. 2, p. 15-19, 1997.

STARK, L. J. JANICKE, D. M. MCGRATH, A. M. *et al.* Prevention of osteoporosis: a randomized clinical trial to increase calcium intake in children with juvenile rheumatoid arthritis. **Journal of pediatric psychology**, v. 30, n. 5, p. 377-386, 2002.

TAGUCHI, A; TANIMOTO, K; SUEI, Y; OTANI, K.; WADA, T. Oral signs as indicators of possible osteoporosis in elderly women. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**, v. 80, n. 5, p. 612-616, nov 1995.

TAGUCHI, A. SANADA, M. KRALL, E. *et al.* Relationship between dental panoramic radiographic findings and biochemical markers of bone turnover. **Journal of bone and mineral research**, v. 18, n. 9, p. 1689-1694, set 2003.

TALMAGE, R. V. MATTHEWS, J. L. MOBLEY, H. T.; LESTER, G. E. Calcium homeostasis and bone surface proteins, a postulated vital process for plasma calcium control. **Journal of musculoskeletal & neuronal interactions**, v. 3, n. 3, p. 194-200, set 2003.

WEAVER, C. M. Calcium bioavailability and its relation to osteoporosis. **Proceedings of the society for experimental biology and medicine**, v. 200, p. 157-160, 1992.

WOLF, R. L. CAULEY, J. A; BAKER, C. E. *et al.* Factors associated with calcium absorption efficiency in pre- and perimenopausal women. **The american journal of clinical nutrition**, v. 72, n. 2, p. 466-471, ago 2000.

XIA, S. L.; FERRIER, J. Calcium signal induced by mechanical perturbation of osteoclasts. **Journal of cellular physiology**, v. 163, n. 3, p. 493-501, jun 1995.

YAMASAKI, K. The Role of Cyclic AMP, Calcium, and Prostaglandins in the Induction of Osteoclastic Bone Resorption Associated with Experimental Tooth Movement. **Journal of dental research**, v. 62, n. 8, p. 877-881, 1 ago 1983.

ZEMEL, M. B. THOMPSON, W. MILSTEAD, A. MORRIS, K.; CAMPBELL, P. Calcium and dairy acceleration of weight and fat loss during energy restriction in obese adults. **Obesity research**, v. 12, n. 4, p. 582-590, abr 2004.