



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA




CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Trabalho de Conclusão de Curso

Aluno(a): Cristiane Izumi Maruya

Orientador(a): Prof. Dr. José Ricardo de Albergaria Barbosa

Ano de Conclusão do Curso: 2011


Assinatura do(a) Orientador(a)



Relação entre a vitamina D e a osseointegração de implantes

Cristiane Izumi Maruya

2011

Faculdade de Odontologia de Piracicaba

Universidade Estadual de Campinas

Cristiane Izumi Maruya

Relação entre a vitamina D e a osseointegração de implantes

Monografia apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para conclusão do curso de graduação.

Orientador: Prof. Dr. José Ricardo de Albergaria Barbosa

Piracicaba

2011

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

M368r Maruya, Cristiane Izumi, 1988-
Relação entre a vitamina D e a osseointegração de implantes / Cristiane Izumi Maruya. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: José Ricardo de Albergaria Barbosa.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) –
Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Deficiência de vitamina D. 2. Implantes dentários endoósseos. I. Albergaria-Barbosa, José Ricardo de, 1956- II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Dedicatória

Dedico este trabalho à Deus, por sempre estar presente em minha vida.

Agradecimentos

Agradeço a todos da minha família por me darem apoio ou por terem me ajudado de alguma forma. Ojiichan, obaachan, otousan, okaasan, Ayumi, Yukari, todos os tios e tias, primos e primas muito obrigada! Penso que se não fosse por vocês eu não estaria onde estou agora. Otousan, okaasan, muito obrigada por tudo que fizeram por mim até agora; Ayumi e Yukari, com vocês a minha vida nunca foi entediante. Sayuri nechan, apesar de não estarmos tão presentes uma na vida da outra, valeu pela força, pelos conselhos, foi muito importante para mim.

Vale lembrar-se dos meus amigos de Itatiba, pessoal do primeiro Junia-kai de Itatiba. Obrigada pela energia positiva que vocês sempre passaram, pela força que vocês deram para eu poder continuar seguindo em frente. Mais uma coisa que ficará para sempre na minha memória, são as meninas da “Rep.” Dona Aranha (Aline, Cida, Cris, Darlle, Marina, Mayra, Mocoquinha, Van), minhas primeiras amigas em Piracicaba... já está dando muitas saudades! Meninas vocês vão ficar no meu coração forever! Muito obrigada por todos os momentos que vivemos juntas.

Também quero agradecer ao Prof. Zé Ricardo por toda a paciência que teve durante a realização deste TCC, muito obrigada! Estou muito agradecida à FOP-UNICAMP, não existe outro lugar no mundo para se aprender odontologia; aos professores que ensinaram muito além da odontologia; aos funcionários da secretaria da clínica que sempre me ajudaram. Carregarei o nome desta instituição com muito orgulho.

Resumo

A vitamina D (calciferol) já vastamente conhecida por várias de suas funções como promover a absorção de cálcio, mantém as concentrações de cálcio e fósforo no sangue, e a osseointegração em contrapartida, ainda não foi totalmente explicada. Este trabalho foi realizado com o intuito de revisar a literatura sobre deficiência de vitamina D e a osseointegração de implantes. Em todos os trabalhos, os hospedeiros que eram deficientes em vitamina D não responderam tão bem à cicatrização quanto os hospedeiros suficientes em vitamina D.

Palavras-chaves

Vitamina D, calciferol, osseointegração, deficiência de vitamina D, implante, hipovitaminose

Abstract

The vitamin D is well known about its function, it helps the calcium absorption, keeps the concentration of the calcium and the phosphorus in the blood, and in the other hand, the osseointegration isn't well explained yet. This literature review was made to relate the vitamin D deficiency with the implant osseointegration. In all the researches, the hosts had vitamin D deficiency didn't have a good healing process as the hosts that have enough vitamin D.

Keywords

Vitamin D, calciferol, osseointegration, vitamin D deficiency, implant, hypovitaminosis

Sumário

Resumo.....	IV
Abstract.....	V
Introdução.....	1
Revisão de Literatura.....	3
Conclusão.....	9
Referências.....	10

Introdução

A vitamina D é um hormônio esteroide essencial que participa de variadas reações fisiológicas, incluindo o metabolismo ósseo. As fontes, funções e metabolismo da vitamina D têm sido extensivamente descritos na literatura (Mengatto, 2009). Na deficiência de vitamina D, as concentrações de cálcio e de fosfato no sangue diminuem, provocando uma doença óssea, pois não existe uma quantidade suficiente de cálcio disponível para manter os ossos saudáveis. Esse distúrbio é denominado raquitismo nas crianças, uma doença que se manifesta com atraso no fechamento da moleira nos recém-nascidos (importante na calota craniana), desmineralização óssea, as pernas tortas e outros sinais relacionados com estrutura óssea. É denominado osteomalácia nos adultos, onde se desenvolve ossos fracos e moles.

A vitamina D em quantidade insuficiente para o organismo pode ser causado independentemente da estação do ano (Romagnoli *et al*, 1999; Armas, 2008), da latitude (van der Wielen *et al*, 1995), da idade (Misra M *et al*, 2008), da raça ou do estado de saúde (Harris, 2000). Já os idosos (Reginster JY, 2005; Wolpowitz & Gilchrist, 2006; Hyppönen E *et al*, 2008), os pacientes com osteoporose (Holick, 2004; Meier *et al*, 2004), e as mulheres pós-menopausa (Bhattoa HP *et al*, 2004; Sahota *et al*, 2004; Need *et al*, 2007) tem maior prevalência para ficar com baixo nível de vitamina D. Vários estudos foram realizados sobre a deficiência de vitamina D quanto a atividade mitogênica e osteoindutiva (Turner *et al*, 1988; Vandersteenhoven *et al*, 1988; Atkin *et al*, 1992), a osteoporose (Baxter & Fattore, 1993; Starck & Epker, 1995.)

O termo osseointegração foi criado por Branemark para definir o contato estrutural e funcional entre a superfície do titânio e o osso, assim representando uma modalidade ideal de tratamento para a reabilitação oral (Alvim-Pereira *et al*, 2008).

A falha precoce na osseointegração de implantes tem sido descrito como a incapacidade de se estabelecer um contato íntimo entre osso e implante;

de forma que a cicatrização óssea após a inserção do implante torna-se prejudicada (Mengatto, 2009). Para se alcançar o sucesso na osseointegração de um implante ao osso, é desejado que haja uma cicatrização óssea mínima exigida (Alvim-Pereira et al, 2008).

Revisão de Literatura

Em 1986, Vukicevic et al investigou a influência dos metabólitos de vitamina D em implantes intramusculares em matriz óssea de ratos raquíticos. Ratos raquíticos diariamente recebiam injeções de 1alfa,25(OH)2D3, de 24(R),25(OH)2D3 ou da combinação dos dois metabólitos. A presença do 1alfa,25(OH)2D3 aumentou significativamente a atividade da fosfatase alcalina, e aumentou levemente a atividade do ácido fosfatase. O 24(R),25(OH)2D3 não causou efeitos nas atividades das enzimas que foram analisados. O resultado revelou que: (a) 1alfa,25(OH)2D3 estimulou a incorporação de magnésio e diminuiu o conteúdo de fósforo dos ossos com implantes, quando comparados com ratos que receberam os dois metabólitos de vitamina D; (b) tanto o 1alfa,25(OH)2D3 quanto o 24(R),25(OH)2D3 tiveram efeitos antagonistas em relação à quantidade de carbonato. Os animais que foram tratados com 1alfa,25(OH)2D3 apresentaram valores significativamente altos, e os ratos tratados com 24(R),25(OH)2D3 apresentaram valores significativamente baixos em relação ao conteúdo de carbonato em osso com implante comparado ao grupo controle. Diagramas dependente de tempo e liberação de CO₂ indicaram uma ligação diferente de carbonato com o osso em ratos tratados com 1alfa,25(OH)2D3; (c) quando são relacionados contra o tempo, os diagramas tanto para os valores de zinco quanto para a atividade de distribuição das enzimas analisadas tiveram uma apresentação similar, indicando que a incorporação do zinco em enzimas do osso ocorre durante a mineralização inicial. Pode ser concluído que com base nos mesmos efeitos, o 24(R),25(OH)2D3 não pode ser comparado ao 1alfa,25(OH)2D3 pois os outros efeitos dos 24(R),25(OH)2D3 sobre o osso em mineralização são o oposto dos efeitos do 1alfa,25(OH)2D3 que são importantes para a proteção do osso contra diferentes agentes e na determinação precoce da origem mineral que foi depositada.

Alguns anos depois, em 1991, Finkelman et al realizou um estudo para determinar se os ossos dos ratos deficientes em vitamina D, eram

deficientes em um ou mais fatores de crescimentos específicos. Foi demonstrado previamente que implantes em matriz de osso em ratos deficientes em vitamina D (ratos D-) eram menos osteoindutivos e continham menos atividade mitogênica extraível, comparados aos ratos sem deficiência à vitamina D (ratos D+). Para testar essa hipótese, ratos foram criados num ambiente escuro por oito semanas e alimentados com dietas D+ e D-, deles foram retirados ossos para análise de fatores de crescimento I e II similares à insulina (IGF-I e IGF-II) e para transformação do fator de crescimento beta (TGF-beta), os três fatores de crescimento mais abundantes nos ossos dos ratos e a osteocalcina. No momento do sacrifício, foram determinadas as quantidades de cálcio, 25-hydroxyvitamin D3 e 1,25-dihydroxyvitamin D3 [1,25(OH)2D3] que continham no soro. Em ratos D-, houve reduções significantes em cálcio, 25-hydroxyvitaminD3 e 1,25(OH)2D3 do soro e em TGF-beta do osso, mas não houve diferenças em proteínas ósseas extraíveis, IGF-I, IGF-II, ou osteocalcina; comparados aos ratos D+. Para determinar se o 1,25(OH)2D3 aumentava a produção de TGF-beta pelas células ósseas, a calvária e os osteoblastos dos ratos foram tratados com 10 η m de 1,25(OH)2 D3 por 6 e 2 dias respectivamente. A produção de TGF-beta aumentou em quase 100% pelo 1,25(OH)2D3. A deficiência de vitamina D reduz a deposição de TGF-beta no osso, assim diminuindo osteoindução em implantes de ratos D-. Existe a possibilidade de que a vitamina D e o TGF-beta derivado do osso sejam essenciais para uma reparação óssea normal.

Alvim-Pereira et al em 2008 realizou um trabalho com o propósito de relacionar os fatores clínicos com o processo de insucesso do implante, e para investigar a relação entre o polimorfismo (rs731236, TaqI) do receptor da vitamina D (VDR) e a perda de implante dental. A falha na osseointegração é complexa, de característica multifatorial que podem aparecer concentradas em algumas populações tratadas. Também foi demonstrado evidências da contribuição genética para a perda de implante dental. Polimorfismos genéticos têm sido classicamente considerados como fatores de risco genéticos para várias doenças e, mais recentemente para a perda de implante dental. 217 pacientes não relacionados, com média de idade de 51,7 +/- 11,3

anos foram divididos em 2 grupos: (I) grupo controle (C), 137 indivíduos apresentando pelo menos 1 implante osseointegrado em função por 6 meses ou mais e sem nenhuma perda de implante, e (II) grupo de estudo (S), 80 indivíduos apresentando pelo menos 1 perda de implante. Depois da coleta e purificação do DNA, foi realizada uma análise do VDR polimorfismo TaqI pela cadeia de polimerase de reação-restrição do comprimento de fragmentos do polimorfismo (CPR-RFLP). Diferenças entre C e S, e entre healthy (H; n=1232) e lost (L; n=135) implantes foram acessados. Os resultados mostraram uma evidência positiva de associação que foi detectada entre perda de implante e as seguintes variáveis: edentulismo, posição do implante, estabilidade primária e comprimento do implante. O modelo de regressão de Cox mostrou que a estabilidade primária, técnica cirúrgica e quantidade óssea estão relacionadas com a duração do implante ao longo do tempo. Nenhuma associação foi encontrada entre genótipos ou alelos do polimorfismo VDR TaqI e a perda de implante dental.

No mesmo ano, Nakamura et al estudaram sobre o benefício do tratamento pré-operatório com alendronato, vitamina D (calcitrol), ou um combinado dessas substâncias na fixação de implantes revestidos por hidroxiapatita em ratos modelos de osteoporose ovariectomizadas. A osteoporose é um potencial fator de risco que afeta a estabilidade do implante após a artroplastia da articulação. Bifosfonados são inibidores potentes de reabsorção óssea, e a vitamina D é um importante hormônio que está envolvido na regulação do metabolismo do cálcio. Para o trabalho foram utilizadas 64 fêmeas de ratos em estudo, 56 delas passaram por ovariectomia e 8 por simulação cirúrgica. Um implante femural revestido com hidroxiapatita e um implante sem revestimento foram implantados 7 meses após a ovariectomia ou a cirurgia simulada. Dos 56 ratos que fizeram ovariectomia, 8 serviram de grupo controle, e os 48 restante foram tratados com alendronato, calcitrol, ou a combinação desses agentes, começando 8 semanas antes da implantação do implante, ou começando imediatamente após a implantação. O tratamento continuou até a 4ª semana após a implantação. Após 4 semanas de implantação, a densidade mineral total e esponjoso do osso da parte proximal

da tíbia e a força de cisalhamento da interface osso-implante foi mensurado em todos os ratos. Embora a densidade óssea total tenha aumentado em todos do grupo que foi tratado com alendronato, comparado com o grupo controle ovariectomizada, a densidade mineral do osso esponjoso aumentou apenas no grupo que foi tratado previamente à cirurgia com alendronato e calcitriol. A estabilidade do implante ratos ovariectomizados controles foi significativamente diminuído, quando comparados aos ratos que passaram pela simulação cirúrgica. Enquanto o tratamento somente com alendronato ou somente com calcitriol não melhorou a estabilidade dos implantes, o tratamento com alendronato combinado com calcitriol, previamente à cirurgia, significativamente melhorou a estabilidade dos implantes revestidos por hidroxiapatita. Tratamento com alendronato e calcitriol, começando no pré-operatório, pode melhorar a densidade mineral do osso esponjoso e estabilidade do revestimento de hidroxiapatita em implante de ratos com osteoporose.

Em 2009, Kelly et al realizou um estudo com o objetivo de avaliar o efeito de uma deficiência comum de vitamina D em osseointegração de implante em rato modelo – As deficiências nutricionais variam numa população de pacientes, e essas podem confundir as respostas do hospedeiro a biomateriais. Ratos machos Sprague-Dawley foram mantidos com uma interrupção de vitamina D e de exposição ao UV. Os níveis séricos de 1,25(OH)2D3, 25OHD3, Ca e P foram determinados. Miniatura cilíndrica de implante Ti6Al4V (2mm de comprimento, 1mm de diâmetro) foi fabricado com a superfície com duplo condicionamento ácido (DAE – double acid-etched) ou DAE modificado por uma discreta deposição cristalina (DCD - discrete crystalline deposition) de hidroxiapatita nanoparticuladas. Os implantes DAE e DCD foram colocados nos fêmur dos ratos com insuficiência de vitamina D e dos ratos controles. Após 14 dias de cicatrização, as amostras de fêmur-implante são submetidas a testes de push-in de implantes e histologia não descalcificada. As superfícies das amostras de implantes recuperados após o teste de push-in de implante foram novamente avaliados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A diminuição dos níveis séricos de 25 OHD(D3) demonstrou o estabelecimento da deficiência de vitamina D neste modelo. O

teste de push-in de implante revelou que implantes DAE e DCD em grupos insuficientes em vitamina D (15,19 \pm 8,2 N, n=7; 15,63 \pm 3,69 N, n=7; respectivamente) foram significativamente menores do que aqueles do grupo controle (24,99 \pm 7,92 N, n=7, p<0,05; 37,48 \pm 17,58 N, n=7, p<0,01; respectivamente). A proporção de contato de transcortical osso-implante (BIC – bone-to-implant contact) foi também significativamente diminuída no grupo de ratos deficientes em vitamina D. As análises por MEV sugeriram que os tecidos calcificados remanescentes próximos à superfície do implante após o teste de push-in, apareceram fragmentadas excepcionalmente. O efeito da deficiência de vitamina D prejudica significativamente o estabelecimento da ósseointegração do implante Ti6Al4V in vivo foi inesperadamente profundo. O resultado do Ti-based implante endósseo pode ser confundido pelo aumento da prevalência de insuficiência de vitamina D na população de pacientes.

Mengatto et al, em 2009, realizou uma pesquisa com o objetivo de comparar os perfis de expressão gênica da cicatrização óssea ao redor de implantes de titânio em ratos suficiente e deficientes em vitamina D. 16 ratos receberam osteotomia ou implantes experimentais com formato de “T” em seus fêmures. O RNA foi isolado após 2 semanas de cicatrização e se utilizou a técnica do microarray de cDNA para analisar 41.000 genes. ANOVA de dois fatores foi utilizado para comparar a expressão entre os grupos. Utilizou-se o banco de dados de vias metabólicas para se investigar vias e funções biológicas conhecidas. A cicatrização peri-implantar revelou diferente assinatura de expressão gênica quando comparado à cicatrização óssea, e a deficiência de vitamina D atenuou a expressão dos genes envolvidos neste processo.

E em 2011, Mengatto et al com o intuito de identificar redes de genes críticos que estão envolvidos na osseointegração, através da exploração de um modelo de insucesso do implante quando está sob a deficiência de vitamina D realizou este estudo. Para se obter sucesso em implante e ortopédico, é necessário o estabelecimento de um íntimo associado com o tecido ósseo, no entanto, o mecanismo de como os sistemas biológicos

realizam a osseointegração ainda não está totalmente explicado. Ratos Sprague-Dawley, machos adultos foram expostos a uma dieta controle ou deficiente em vitamina D antes da cirurgia de osteotomia no osso fêmur e colocação de implante (Ti4Al6V) em forma de T. 2 semanas após a osteotomia e a colocação do implante, formou-se um tecido na região da osteotomia ou no espaço vazio do implante em formato de T, que foi colhida e o RNA total foi avaliado por análises de microarray do genoma. O teste de ANOVA de 2 fatores foi aplicado nos dados de microarray e identificaram 103 genes que eram significativamente (> 2 fold) modulados pela colocação do implante e deficiência em vitamina D. As análises da Enciclopédia de Genes e Genoma de Kyoto (KEGG) atribuiu a mais alta z-score para o ritmo circadiano, incluindo o domínio PAS neuronal 2 (NPAS2), e o homólogo do período 2 (Per2). NPAS2 e o receptor de hidrocarboneto aromático nuclear translocator-like (ARNTL/Bmal 1) foram aumentados ao redor do implante e diminuída pela deficiência da vitamina D, enquanto que o padrão de expressão de Per2 foi complementar. Análise hierárquica de agrupamento revelou ainda que NPAS2 estava em um grupo predominantemente composto de genes de matriz extracelular (ECM) de cartilagem. Considerando que a expressão de gene de ECM do osso em torno de implante não foi significativamente afetada pela deficiência de vitamina D, os genes de ECM de cartilagem foram modulados pela presença do implante e pelo estado da vitamina D. Em uma prova de conceito de estudo "in vitro", a expressão da cartilagem tipo II e X colágeno foi encontrado um aumento quando as células-tronco mesenquimais dos ratos foram cultivadas no disco de implante com suplementação de 1,25D. Este estudo sugere que o sistema de ritmo circadiano e da matriz extracelular da cartilagem podem estar envolvidos no estabelecimento da osseointegração sob a regulação da vitamina D.

Conclusão

Com o fim da revisão de literatura, foi possível concluir que apesar da osseointegração de implantes não esteja totalmente explicada, a deficiência em vitamina D pode prejudicar a osseointegração de implantes.

Referências

- 1- Vukicević S, Bagi C, Vujčić G, Krempien B, Stavljenić A, Herak M. The influence of 1 alpha,25- and 24(R),25-dihydroxyvitamin D3 on bone constituents during early mineralization in the rat. *Bone Miner.* 1986 Oct;1(5):383-96.
- 2- Vandersteenhoven JJ, DeLustro FA, Bell NH, Turner RT. Osteoinduction by implants of demineralized allogeneic bone matrix is diminished in vitamin D-deficient rats. *Calcif Tissue Int.* 1988 Jan;42(1):39-45.
- 3- Turner RT, Farley J, Vandersteenhoven JJ, Epstein S, Bell NH, Baylink DJ. Demonstration of reduced mitogenic and osteoinductive activities in demineralized allogeneic bone matrix from vitamin D-deficient rats. *J Clin Invest.* 1988 Jul;82(1):212-7.
- 4- Finkelman RD, Linkhart TA, Mohan S, Lau KH, Baylink DJ, Bell NH. Vitamin D deficiency causes a selective reduction in deposition of transforming growth factor beta in rat bone: possible mechanism for impaired osteoinduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 May 1;88(9):3657-60.
- 5- Atkin I, Dean DD, Muniz OE, Agundez A, Castiglione G, Cohen G, et al. Enhancement of osteoinduction by vitamin D metabolites in rachitic host rats. *J Bone Miner Res.* 1992 Aug;7(8):863-75.
- 6- Baxter JC, Fattore L. Osteoporosis and osseointegration of implants. *J Prosthodont.* 1993 Jun;2(2):120-5.
- 7- Starck WJ, Epker BN. Failure of osseointegrated dental implants after diphosphonate therapy for osteoporosis: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1995 Jan-Feb;10(1):74-8.
- 8- van der Wielen RP, Löwik MR, van den Berg H, de Groot LC, Haller J, Moreiras O, van Staveren WA. Serum vitamin D concentrations among elderly people in Europe.. *Lancet.* 1995 Jul 22;346(8969):207-10.

- 9- Romagnoli E, Caravella P, Scarnecchia L, Martinez P, Minisola S. Hypovitaminosis D in an Italian population of healthy subjects and hospitalized patients. *Br J Nutr.* 1999 Feb;81(2):133-7.
- 10- Harris SS, Soteriades E, Coolidge JA, Mudgal S, Dawson-Hughes B. Vitamin D insufficiency and hyperparathyroidism in a low income, multiracial, elderly population.. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Nov;85(11):4125-30.
- 11- Bhattoa HP, Bettembuk P, Ganacharya S, Balogh A. Prevalence and seasonal variation of hypovitaminosis D and its relationship to bone metabolism in community dwelling postmenopausal Hungarian women. *Osteoporos Int.* 2004 Jun;15(6):447-51. Epub 2003 Dec 23.
- 12- Sahota O, Munday MK, San P, Godber IM, Lawson N, Hosking DJ. The relationship between vitamin D and parathyroid hormone: calcium homeostasis, bone turnover, and bone mineral density in postmenopausal women with established osteoporosis. *Bone.* 2004 Jul;35(1):312-9.
- 13- Meier C, Woitge HW, Witte K, Lemmer B, Seibel MJ. Supplementation with oral vitamin D3 and calcium during winter prevents seasonal bone loss: a randomized controlled open-label prospective trial. *J Bone Miner Res.* 2004 Aug;19(8):1221-30. Epub 2004 May 24.
- 14- Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2004 Dec;80(6 Suppl):1678S-88S. Review.
- 15- Reginster JY. The high prevalence of inadequate serum vitamin D levels and implications for bone health. *Curr Med Res Opin.* 2005 Apr;21(4):579-86. Review.
- 16- Wolpowitz D, Gilchrest BA. The vitamin D questions: how much do you need and how should you get it? *J Am Acad Dermatol.* 2006 Feb;54(2):301-17. Epub 2006 Jan 4.

17- Need AG, Horowitz M, Morris HA, Moore R, Nordin C. Seasonal change in osteoid thickness and mineralization lag time in ambulant patients. *J Bone Miner Res.* 2007 May;22(5):757-61.

18- Armas L, Heaney RP, Recker RR. Seasonal variation in bone histomorphometry. *J Bone Miner Res.* 2008 Feb;23(2):301; author reply 301.

19- Hyppönen E, Boucher BJ, Berry DJ, Power C. 25-hydroxyvitamin D, IGF-1, and metabolic syndrome at 45 years of age: a cross-sectional study in the 1958 British Birth Cohort.. *Diabetes.* 2008 Feb;57(2):298-305. Epub 2007 Nov 14.

20- Nakamura Y, Hayashi K, Abu-Ali S, Naito M, Fotovati A. Effect of preoperative combined treatment with alendronate and calcitriol on fixation of hydroxyapatite-coated implants in ovariectomized rats. *J Bone Joint Surg Am.* 2008 Apr;90(4):824-32.

21- Alvim-Pereira F, Montes CC, Thomé G, Olandoski M, Trevilatto PC. Analysis of association of clinical aspects and vitamin D receptor gene polymorphism with dental implant loss. *Clin Oral Implants Res.* 2008 Aug;19(8):786-95.

22- Misra M, Pacaud D, Petryk A, Collett-Solberg PF, Kappy M; Drug and Therapeutics Committee of the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society. Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations.. *Pediatrics.* 2008 Aug;122(2):398-417. Review.

23- Kelly J, Lin A, Wang CJ, Park S, Nishimura I. Vitamin D and bone physiology: demonstration of vitamin D deficiency in an implant osseointegration rat model. *J Prosthodont.* 2009 Aug;18(6):473-8. Epub 2009 Mar 26.

24- Mengatto CM. Tese de doutorado. Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas. 2009

25- Mengatto CM, Mussano F, Honda Y, Colwell CS, Nishimura I. Circadian rhythm and cartilage extracellular matrix genes in osseointegration: a genome-wide screening of implant failure by vitamin D deficiency. PLoS One. 2011 Jan 11;6(1):e15848.