

## EFEITOS DA HIPERVITAMINOSE A SOBRE O DISCO EPIFISÁRIO DE FÊMURES DE RATOS

### Mariana Tomazini Pinto

Doutora em Biociências Aplicadas à Farmácia pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP; Hemocentro da Faculdade de Medicina - USP, Brasil.

### Ana Rosa Crisci

Mestre em Bioengenharia pela Universidade de São Paulo - USP, Brasil; Docente adjunta do departamento de Morfologia do Centro Universitário "Barão de Mauá", Brasil.

E-mail: [criscicozac@netsite.com.br](mailto:criscicozac@netsite.com.br)

### Maria Helena Simões Jorge

Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade de São Paulo - USP, Brasil; Docente no Centro Universitário "Barão de Mauá", Brasil.

### Afonso Luiz Ferreira

Doutor em Medicina pela Universidade de São Paulo - USP, Brasil; Docente Titular do Departamento de Anatomia Humana do Centro Universitário "Barão de Mauá", Brasil.

**RESUMO:** A vitamina A (C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O) é um álcool (retinol) isoprenóide, insaturado, termoestável, lipossolúvel e insolúvel na água. Pode ser encontrado na forma precursora de β-caroteno, sendo transformada posteriormente nas suas formas ativas (ou pré-formadas) denominadas retinol, ácido retinóico e éster retilínicos. A vitamina A exerce diversas funções no desenvolvimento do ser humano, entretanto, o seu excesso causa várias manifestações, como sonolência, irritabilidade, dermatite escamativa, unhas frágeis, gengivite, fadiga, hipertensão, cefaléias intensas, fraqueza generalizada e fragilidade óssea. Sabendo que a vitamina A influencia no crescimento ósseo, o presente estudo propôs avaliar eventuais alterações produzidas no disco epifisário do fêmur de ratos em crescimento, submetidos a uma hipervitaminose A. Foram administradas, em ratos Wistar, doses na concentração de 150.000 UI (0,5 ml / 100g de peso) por via intraperitoneal e comparados com um grupo controle. Cada grupo composto por 8 animais foi sacrificado com 10, 20, 30 e 40 dias após a injeção e os fêmures foram removidos para obtenção de cortes histológicos. A morfometria dos discos epifisários demonstrou que os animais que receberam as doses elevadas de vitamina A apresentaram uma diminuição na espessura dos discos epifisários, condizente com uma maturação mais acelerada. Dessa forma, os resultados sugerem que excesso de vitamina A pode levar a um aumento no amadurecimento dos discos epifisários.

**PALAVRAS-CHAVE:** Disco epifisário; Hipervitaminose A; Osteogênese.

### EFFECTS OF HYPERVITAMINOSIS ON THE EPIPHYSARY DISC IN RATS' FEMURS

**ABSTRACT:** Vitamin A (C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O) is an isoprenoid, unsaturated, thermostable, lipid-soluble alcohol (retinol), insoluble in water which may be found in the precursory form of beta-carotene and later transformed in its active forms (or pre-formed) called retinol, retinoic acid and retilinic ester. Although Vitamin A has several functions in human development, its excess causes several phenomena, such as sleepiness, irritability, squamous dermatitis, weak nails, gingivitis, fatigue, hypertension, intense headache, general weakness and bone fragility. Since Vitamin A affects bone growth, current analysis evaluates eventual changes in the epiphysary disc of growing rats' femur when submitted to hypervitaminosis A. Doses at concentration 150.000 UI (0.5 ml / 100g weight) were administered in Wistar rats by intraperitoneal pathway and compared to control group. Each group composed of 8 animals was killed after 10, 20, 30 and 40 days after the injection, and femurs were removed for histological cuts. The morphometry of epiphysary discs showed that animals which received high doses of Vitamin A decreased the thickness of the epiphysary discs due to faster maturation. Results suggest that excess of Vitamin A may increase the maturity of the epiphysary discs.

**KEY WORDS:** Epiphysary Discs; Hypervitaminosis A; Osteogenesis.

## INTRODUÇÃO

A descoberta da vitamina A ocorreu quase simultaneamente em 1913 por dois grupos independentes de pesquisadores, McCollum e Davis, na Universidade de Wisconsin, e Osborne e Mendel, na Universidade de Yale. É um álcool (retinol) isoprenóide, insaturado, termoestável, lipossolúvel e insolúvel na água (CHAGAS et al., 2003). Pode ser encontrada na forma precursora de -caroteno, sendo transformada posteriormente nas suas formas ativas (ou pré-formadas) denominadas retinol, ácido retinóico e éster retilínicos (READER'S DIGEST, 1998).

Apresenta, portanto, diversos análogos estruturais, tanto naturais como sintéticos, relacionados com o crescimento e diferenciação de vários tipos celulares durante o desenvolvimento fetal e também ao longo da vida; os retinóides são usados para uma diversidade de afecções dermatológicas devido às suas ações contra dermatoses inflamatórias e ceratóticas, além de inibir a queratinização (ROLEWSKI, 2003).

A vitamina A é um nutriente essencial para o homem e a sua deficiência além de provocar alterações oculares (xeroftalmia e cegueira nutricional) pode causar retardo de crescimento e aumento da susceptibilidade a infecções. Assim, a importância da suplementação dessa vitamina para combater a morbidade infantil nos casos de deficiência desta, reduzindo significativamente a diarreia (ASSIS; BARRETO, 2002) e melhorando o crescimento infantil (WEST et al., 1988).

Entretanto a ingestão de quantidades elevadas de vitamina A está associada com a osteoporose (PROMISLOW et al., 2002) e o risco aumentado de fraturas de quadril em mulheres pós-menopausa (FESKANICH et al., 2002). Além disso, os riscos de fraturas mostraram-se maiores quando a concentração sérica de retinol está aumentada (MICHAELSSON et al., 2003).

De acordo com Cahu, Infante e Takeuchi (2003), em uma revisão bibliográfica sobre os componentes nutricionais que influenciam o desenvolvimento esquelético em larvas de peixes, o estudo informou que a alta na dieta de vitamina A aumenta a incidência de deformidades ósseas, como a curvatura vertebral, fusão central e compressão de vértebra.

Desta maneira, os efeitos dos retinóides foram avaliados tanto em humanos quanto em ratos e observou-se uma aceleração no processo de reparo de defeitos ósseos em calota craniana (OLIVEIRA, 2009).

Estudos demonstram que o crescimento ósseo é influenciado pela ação da vitamina A (MACARI; FURLAN; GONZALES, 2002) e a ingestão excessiva da mesma, proveniente da dieta ou suplementos, está relacionada negativamente com a densidade mineral óssea (CRANDALL, 2004). Da mesma forma, a alta incidência de fraturas de quadril está associada com elevadas concentrações plasmáticas de retinol (GENARO; MARTINI, 2004). Ademais, foi demonstrado que uma vez que a vitamina A é ingerida em longo prazo ocorre a reabsorção e inibição da formação óssea (GENARO; MARTINI, 2004).

Embora seja sabido que a vitamina A exerce um importante papel no crescimento e maturação óssea, os efeitos da hipervitaminose A no disco epifisário ainda não estão completamente elucidados. Desse modo, este estudo teve como propósito avaliar as alterações causadas no disco epifisário de fêmures de ratos em crescimento submetidos à hipervitaminose A.

## 2 MATERIAL E MÉTODO

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Morfologia do Centro Universitário Barão de Mauá. Foram utilizados 16 ratos Wistar machos desmamados com 21 dias, divididos em dois grupos com 8 animais cada. O grupo controle representado por 8 animais que não receberam vitamina A e o grupo experimental contendo 8 animais submetidos a hipervitaminose A mediante injeção intraperitoneal, de 150.000 UI (0,5ml/100g de peso) (REZENDE et al., 1987).

Durante o período experimental, os animais foram mantidos no Biotério do Centro Universitário Barão de Mauá, em ambiente com temperatura de  $22 \pm 2$  °C, 50-60% de umidade relativa do ar e ciclo com alternância automática para claro/escuro de 12 horas. Os animais receberam dieta balanceada (Purina) e água a vontade. O protocolo do estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro Universitário Barão de Mauá (n° 033/2007).

Os animais foram sacrificados sem sofrimento, em câmara de CO<sub>2</sub>, de acordo com as normas do Comitê de Ética, após 10, 20, 30, 40 dias da indução de hipervitaminose A. Em seguida, os dois fêmures de todos os animais foram retirados e fixados em solução de formalina neutra por três dias. As partes moles foram retiradas, os fêmures foram descalcificados em solução ácida e processados para inclusão em parafina e obtenção de cortes histológicos. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina (H. E.).

Os animais de ambos os grupos foram pesados após o desmame e ao término de cada período estudado (10, 20, 30 e 40 dias).

Sob microscopia de luz foram realizadas as análises e comparação histomorfométricas. Para o estudo e avaliação de uma área que pudesse informar a velocidade do amadurecimento e a ossificação, o disco epifisário foi analisado morfometricamente. Para a morfometria foi utilizado um programa específico de medida (*Image Tool*), devidamente calibrado em micrômetro.

Para cada animal mediu-se aleatoriamente 10 vezes a altura do disco epifisário, foi realizada uma média e os resultados obtidos foram representados

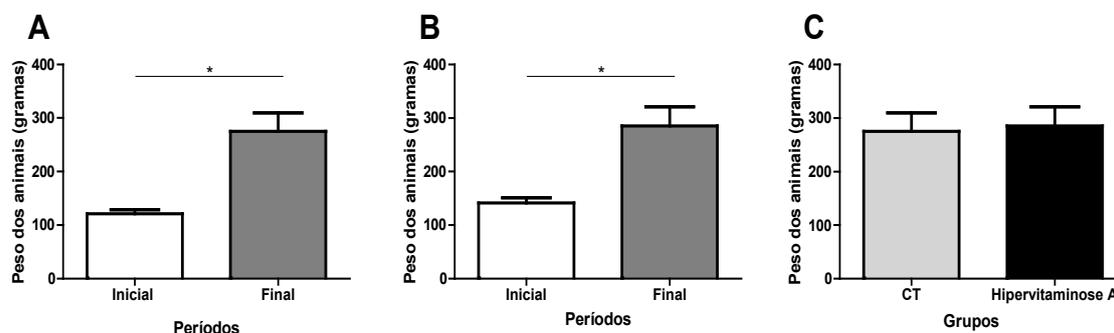
graficamente.

As análises estatísticas para a comparação dos pesos, bem como a espessura dos discos foi realizada através do *software* GraphPad PRISM, versão 5.01 (GraphPad software California, USA) usando o teste *Mann-Whitney U-test one-tailed* ( $p \leq 0,05$ ).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais do grupo controle e os submetidos à hipervitaminose A apresentaram diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) com relação ao ganho de peso, durante os dias do ensaio (Figura 1A e B). Entretanto, ao comparar o peso do grupo controle com o experimental, não houve diferença significativa (Figura 1C).

As microfotografias do disco epifisário de fêmures de ratos do grupo controle e os submetidos a hipervitaminose A foram realizadas para comparação histomorfométricas. A Figura 2 demonstra a espessura dos discos epifisários nos períodos estudados (10, 20, 30 e 40 dias).

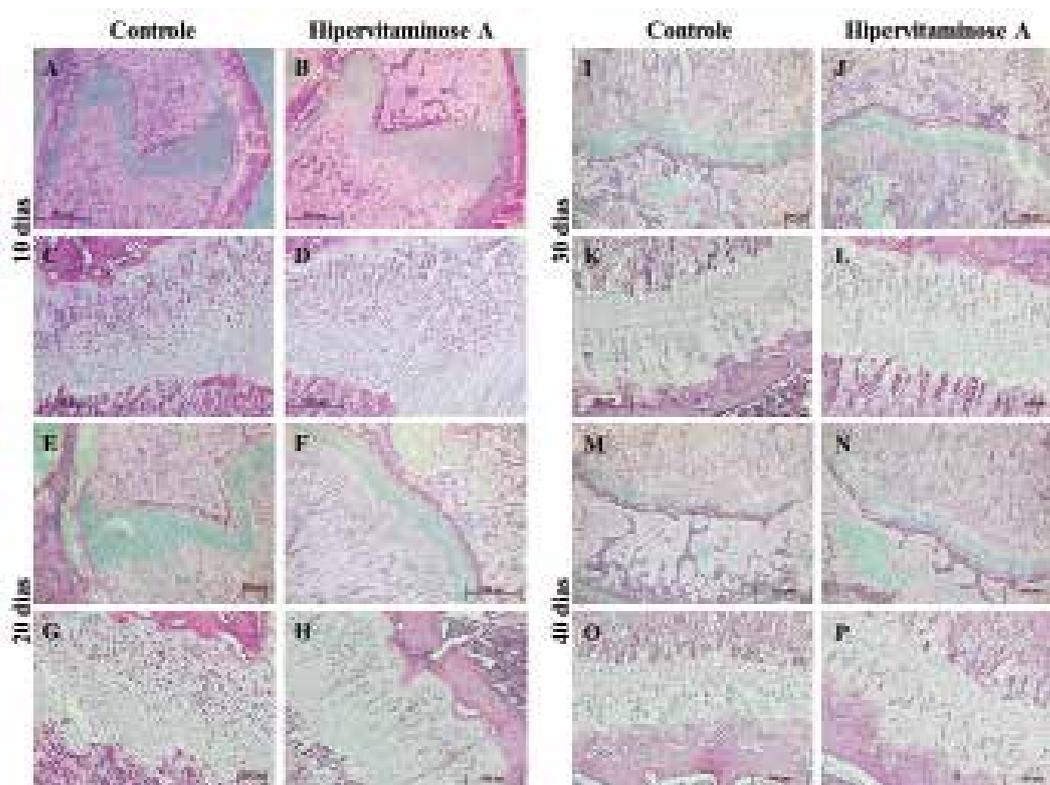


**Figura 1.** Avaliação do peso dos ratos Wistar dos grupos controle e experimental submetidos à hipervitaminose A. Comparação do peso dos ratos no início (1 dia) do experimento com o peso final, após os períodos de indução com a hipervitaminose A (10, 20, 30 e 40), do grupo controle (A) e experimental (B). C) Comparação do peso final do grupo controle com o experimental submetidos a hipervitaminose A. Os gráficos foram gerados considerando o peso dos oito animais de cada grupo. Foi realizado o teste Mann-Whitney usando o software GraphPad PRISM, versão 5.01. \* $p \leq 0,05$ .

Com a finalidade de avaliar a influência da hipervitaminose A no disco epifisário, a espessura dos mesmos foi medida e plotada na Figura 2.

Na Figura 3 o gráfico demonstra que no período inicial (10 dias) os valores da espessura dos discos epifisários eram quase equivalentes tanto no grupo

controle quanto no grupo submetido à hipervitaminose A (Figura 3A). Entretanto, após 20 dias, a espessura dos discos epifisários dos animais que receberam o excesso de vitamina A mostrou-se menor (Figura 3B), sendo essa diferença mais evidente e significativa com 30 dias (Figura 3C). Esses resultados sugerem que o excesso

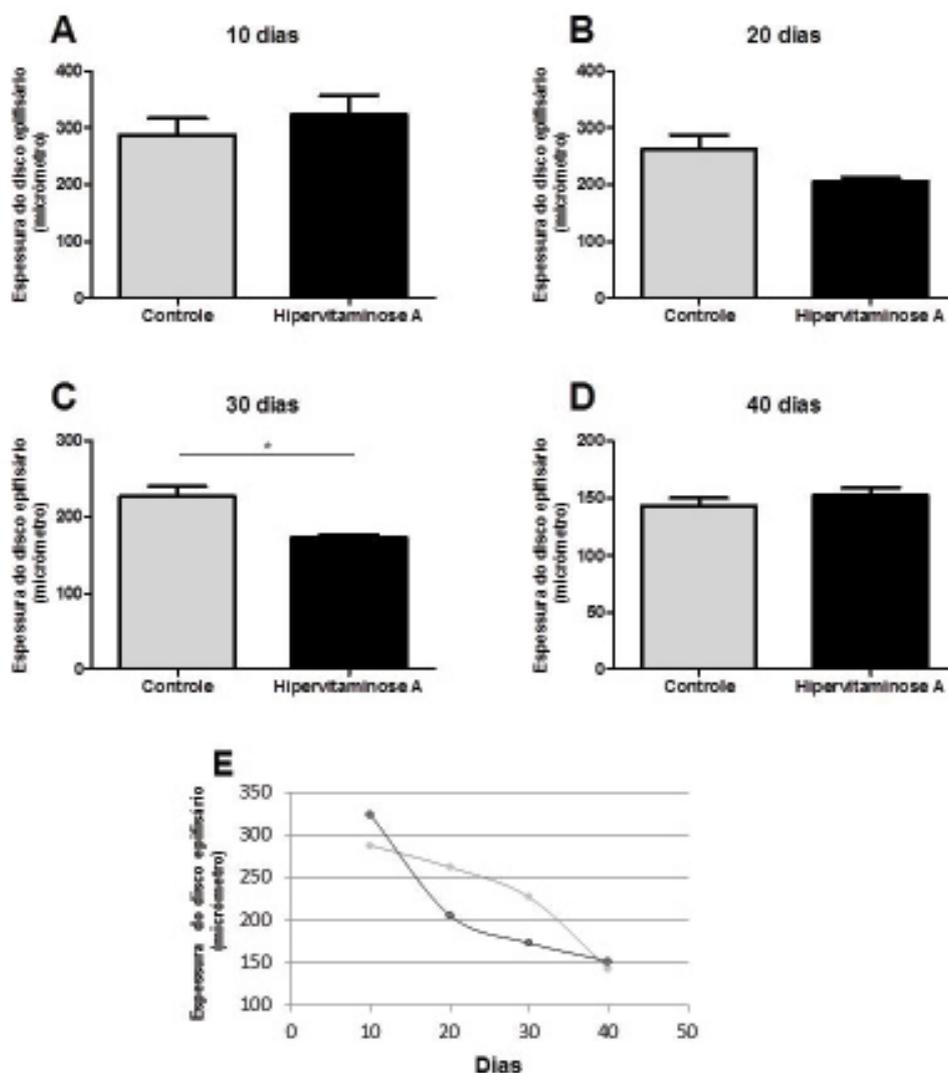


**Figura 2.** Microfotografias dos aspectos histológicos do disco epifisário de fêmures de ratos controle e submetidos a hipervitaminose A corados com hematoxilina e eosina (H. E.). A/B/C/D) Disco epifisário do grupo controle (A/C) e do grupo experimental submetidos a hipervitaminose A (B/D) com 10 dias. E/F/G/H) Disco epifisário do grupo controle (E/G) e do grupo experimental submetidos a hipervitaminose A (F/H) com 20 dias. I/J/K/L) Disco epifisário do grupo controle (I/K) e do grupo experimental submetidos a hipervitaminose A (J/L) com 30 dias. M/N/O/P) Disco epifisário do grupo controle (M/O) e do grupo experimental submetidos a hipervitaminose A (N/P) com 40 dias. As imagens foram obtidas no aumento de 40x (A/B/E/F/I/J/M/N) e 200x (C/D/G/H/K/L/O/P).

de vitamina A ocasiona inibição do crescimento ósseo. Ao final do último tempo considerado (40 dias), os valores da espessura do disco epifisários voltaram a uma quase equivalência (Figura 3D). Esses dados podem ser justificados pelo fato da vitamina A ter sido metabolizada e seu efeito não se fez mais ativo no disco epifisário. Dessa forma, a Figura 3E demonstra a evolução da espessura dos discos epifisários durante os períodos estudados, no qual é possível observar uma progressão da calcificação no grupo que recebeu vitamina A (especialmente nos dias 20 e 30).

Outras pesquisas também descreveram uma diminuição do disco epifisário mediante um excesso de vitamina A (CLARK, 1970; CLARK; SEAWRIGHT, 1968; CLARK; SEAWRIGHT; GARTNER, 1970; DOIGE; SCHOONDERWOERD, 1988; KODAKA et al., 1998; SOETA et al., 1999).

Soeta et al. (1999) demonstrou que doses elevadas de vitamina A em ratos ocasiona uma disfunção dos condrócitos resultando na deformação e na diminuição da espessura do disco epifisário. Outros estudos ainda mostram que alguns derivados de vitamina



**Figura 3.** Evolução da espessura dos discos epifisários dos grupos controle e experimentais submetidos à hipervitaminose A nos períodos de 10 (A), 20 (B), 30 (C) e 40 (D) dias. (E) Evolução da espessura dos discos epifisários durante os períodos estudados. As análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad PRISM, versão 5.01 (GraphPad software California, USA) usando o teste Mann-Whitney U-test one-tailed. \* $p \leq 0,05$ .

A em excesso podem afetar a proliferação e diferenciação dos condrócitos no disco epifisário causando uma diminuição da espessura (BALLOCK et al., 1994; CANCEDDA et al., 1992; FREYRIA et al., 1995). Ademais, foi demonstrado que o excesso de vitamina A também reduz a zona hipertrófica (TAKAKI, 1995; TAKAKI et al., 1996).

De Luca et al. (2000) consideram, em seu estudo, que o ácido retinóico administrado em dose única causa anormalidades no crescimento longitudinal de ossos longos de ratos da espécie Sprague Dawley. Admite-se a hipótese de que o ácido retinóico regula a condrogênese, havendo uma redução do crescimento da tíbia de animais que receberam uma dose única de ácido

retinóico, pelo fato dos animais apresentarem inibição da proliferação dos condrócitos, bem como dos condrócitos hipertróficos e diminuição da síntese da matriz.

Binkley e Krueger (2000), através de estudos *in vitro*, admitiram que em animais e no homem o excesso de vitamina A estimula a reabsorção óssea e inibe a formação do osso, considerando a hipótese de uma consequente osteoporose.

Por outro lado algumas pesquisas contradizem todos esses relatos. Foi descrito que após o tratamento com ácido retinóico, o mesmo induziu a expressão dos genes fosfatase alcalina, osteonectina e osteopontina ocasionando um aumento da atividade APase e provocando a mineralização óssea. Portanto, o ácido

retinóico pode ser um potente promotor da maturação terminal e da calcificação da matriz em condrócitos (IWAMOTO et al., 1993). Ainda nesse sentido, postula-se que o tratamento com ácido retinóico estimula a proliferação de condrócitos em cultura (TAKISHITA; HIRAIWA; NAGAYAMA, 1990).

#### 4 CONCLUSÃO

A vitamina A é essencial ao crescimento e desenvolvimento ósseo, entretanto, altas doses da mesma causam algumas alterações no disco epifisário. Nossos resultados sugerem que a hipervitaminose A promove uma maturação óssea mais acelerada, resultando na diminuição da espessura do disco epifisário, intercorrendo no desenvolvimento dos ossos longos (fêmures) dos ratos em crescimento.

#### REFERÊNCIAS

- ASSIS, A. M. O.; BARETO, M. L. Suplementação em vitamina A: impacto na morbidade e efeitos adversos. **Rev Bras Epidemiol.**, v. 5, n. 1, p. 84-92, 2002.
- BALLOCK, J.; HEYDEMANN, A.; WAKEFIELD, L. M.; FLANDERS, K. C.; ROBERTS, A. B.; SPORN, M. B. Inhibition of the chondrocyte phenotype by retinoic acid involves upregulation of metalloprotease genes independent of TGF- $\beta$ . **J Cell Physiol.**, v. 159, p. 340-346, 1994.
- BINKLEY, N.; KRUEGER, D. Hypervitaminosis A and bone. **Nutr Rev.**, v. 58, n. 5, p. 138-44, 2000.
- CAHU, C.; INFANTE, J. Z.; TAKEUCHI, T. Nutritional components affecting skeletal development in larval fish larvae. **Aquaculture**, v. 227, n. 1-4, p. 245-258, 2003.
- CANCEDDA, F. D.; GENTILI, C.; MANDUCA, P.; CANCEDDA, R. Hypertrophic chondrocytes undergo further differentiation in culture. **J Cell Biol.**, v. 117, n. 2, p. 427-435, 1992.
- CHAGAS, M. H. C.; FLORES, F.; CAMPOS, F. A. C. S.; SANTANA, R. A.; LINS, E. C. B. Vitamin A Teratogenicity. **Rev Bras Saúde Matern Infant.**, v. 3, n. 3, p. 247-252, 2003.
- CLARK, L. The affects of excess vitamin A on longbone growth in kittens. **J Comp Pathology**, v. 80, p. 625-634, 1970.
- CLARK, L.; SEAWRIGHT, A. A. Skeletal abnormalities in the hindlimbs of young cats as a result of hypervitaminosis A. **Nature**, v. 217, p. 1174-1176, 1968.
- CLARK, L.; SEAWRIGHT, A. A.; GARTNER, R. J. W. Longbone abnormalities in kittens following vitamin A administration. **J Comp Pathol.**, v. 80, p. 113-121, 1970.
- CRANDALL, C. Vitamin A intake and osteoporosis: a clinical review. **J Womens Health (Larchmt)**, v. 13, n. 8, p. 939-953, 2004.
- DE LUCA, F.; UYEDA, J. A.; MERICQ, V.; MANCILLA, E. E.; YANOVSKI, J. A.; BARNES, K. M.; ZILE, M. H.; BARON, J. Retinoic acid is a potent regulator of growth plate chondrogenesis. **Endocrinology**, v. 141, n. 1, p. 346-353, 2000.
- DOIGE, C. E.; SCHOONDERWOERD, M. Dwarfism in a swine herd: suspected vitamin A toxicosis. **J Am Vet Med Assoc.**, v. 193, n. 6, p. 691-693, 1988.
- FESKANICH, D.; SINGH, V.; WILLETT, W. C.; COLDITZ, G. A. Vitamin A intake and hip fractures among postmenopausal women. **JAMA**, v. 287, n. 1, p. 47-54, 2002.
- FREYRIA, A. M.; RONZIÈRE, M. C.; BOUTILLON, M. M.; HERBAGE, D. Effect of retinoic acid on protein synthesis by foetal bovine chondrocytes in high-density culture: downregulation of the glucose-regulated protein, GRP-78, and type II collagen. **Biochem J.**, v. 305, p. 391-396, 1995.
- GENARO, P. S.; MARTINI, L. A. Vitamin A supplementation and risk of skeletal fracture. **Nutr Rev.**, v. 62, n. 2, p. 65-7, 2004.

- IWAMOTO, M.; SHAPIRO, I. M.; YAGAMI, K.; BOSKEY, A. L.; LEBOY, P. S.; ADAMS, S. L.; PACIFICI, M. Retinoic acid induces rapid mineralization and expression of mineralization-related genes in chondrocytes. **Exp Cell Res**, v. 207, n. 2, p. 413-20, 1993.
- KODAKA, T.; TAKAKI, H.; SOETA, S.; MORI, R.; NAITO, Y. Local disappearance of epiphyseal growth plates in rats with hypervitaminosis A. **J Vet Med Sci.**, v. 60, n. 7, p. 815-21, 1998.
- MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2ª ed. [s.l.]: Ed da FUNEP, 2002.
- MICHAELSSON, K. *et al.* Serum retinol levels and risk of fracture. **New Engl J Med.**, v. 227, n. 1-4, p. 245-258, 2003.
- OLIVEIRA, H. T. R. **Efeito da Isotretinoína no reparo de defeitos ósseos em calota craniana: estudo em ratos**. 2009. Tese (Doutorado em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial) - Pontifícia Universidade Católica, Faculdade de Odontologia, PUCRS, Porto Alegre, 2009.
- PROMISLOW, J. H. E.; GOODMAN-GRUEN, D.; SLYMEN, D. J.; BARRETT-CONNOR, E. Retinol intake and bone mineral density in the elderly: the Rancho Bernardo Study. **J Bone Miner Res.**, v. 17, p. 1349-1358, 2002.
- READER'S DIGEST BRASIL LTDA. **Alimentos saudáveis, alimentos perigosos: guia prático para uma alimentação rica e saudável**. Rio de Janeiro: Reader's Digest, 1998. 400 p.
- REZENDE, M. L. T.; PETENUSCI, S. O.; LOPES, R. A.; SALA, M. A.; CAMPOS, G. M. Hipervitaminose A experimental no rato x. Estudo morfométrico e bioquímico da reversibilidade das alterações hepáticas. **Rev Goiana Med.**, v. 33, n. 1/4, p. 31-55, 1987.
- ROLEWSKI, S. L. Clinical review: topical retinoids. **Dermatol Nurs.**, v. 15, p. 447-565, 2003.
- SOETA, S.; MORI, R.; KODAKA, T.; NAITO, Y.; TANIGUCHI, K. Immuno histo chemical observations on the initial disorders of the epiphyseal growth plate in rats induced by high dose of vitamin A. **J Vet Med Sci.**, v. 61, n. 3, p. 233-238, 1999.
- TAKAKI, H. et al. Clinical, anatomical and biochemical studies on bovine hyena disease caused by administration of vitamin AD3E premix and vitamin A. **J Vet Med Sci**, v. 58, p. 311-316, 1996.
- TAKAKI, H. **Studies on the etiology of bovine hyena disease**. Morioka, Japan: Iware Univ., 1995. p. 64-83.
- TAKISHITA, Y.; HIRAIWA, K.; NAGAYAMA, M. Effect of retinoic acid on proliferation and differentiation of cultured chondrocytes in terminal differentiation. **J Biochem**, v. 107, n. 4, p. 592-6, 1990.
- WEST, K. P.; DJUNAEDI, E.; PANDJI, A.; KUSDIONO, T. I.; SOMMER, A. Vitamin A supplementation and growth: a randomized community trial. **Am J Clin Nutr.**, v. 48, p. 1257-1264, 1988.

Recebido em: 18 de setembro de 2014

Aceito em: 28 de junho de 2015

