



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**GABRIELLA OLIVEIRA LIMA**

**DOSES SUPRAFISIOLÓGICAS DE VITAMINA D ALTERAM OS PADRÕES DE**  
**ATIVIDADE DAS ONDAS CEREBRAIS EM RATOS**

**BELÉM - PA**

**2022**

GABRIELLA OLIVEIRA LIMA

**DOSES SUPRAFISIOLÓGICAS DE VITAMINA D ALTERAM OS PADRÕES DE  
ATIVIDADE DAS ONDAS CEREBRAIS EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Moisés Hamoy.

Instituto de Ciências Biológicas - ICB – UFPA

Coorientadora: Prof<sup>fa</sup> Dr<sup>a</sup> Verônica Regina Lobato de Oliveira Bahia.

Instituto de Ciências Biológicas - ICB – UFPA

BELÉM - PA

2022

Dedico este trabalho à minha família por acreditar em mim e por sempre me incentivar.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por ter chegado até aqui, pois para Ele é toda honra e glória para todo o sempre.

Pelo amor e carinho da minha mãe e por minhas irmãs serem sempre tão compreensivas comigo e com os meus sonhos.

Muito obrigada ao meu noivo, Italo Higor Lima do Espírito Santo, por toda paciência, apoio e amor incondicionais durante a realização deste mestrado. Obrigada por segurar a minha mão e enxugar as minhas lágrimas. Todo meu coração a este homem inigualável.

Ao Professor Doutor Moisés Hamoy por ter acreditado em mim e pela paciência durante estes dois longos anos de mestrado, em meio a uma pandemia. Muito obrigada por ser meu “pai na ciência”. Obrigada por sua orientação neste mestrado e ter me incentivado a chegar até aqui. Muito obrigada por todo o seu tempo dedicado. Muito obrigada por suas aulas e sua metodologia que levarei para a minha vida. Muito obrigada pelo espaço em seu laboratório. São tantos "obrigados" que nem todos caberiam aqui nesta sessão de agradecimento. Mas todos estão em meu coração.

Obrigada à minha coorientadora Professora Doutora Verônica Regina Lobato de Oliveira Bahia, minha “mãe na ciência”. Obrigada pelo auxílio neste mestrado e pelo espaço em seu laboratório. Muito obrigada por muito mais que orientações acadêmicas durante todos estes anos, fico feliz em chamá-la de amiga. Muitas foram as vezes que me acalentou e me acalmou quando tudo fugia do controle e não apenas em experimentos, mas na vida também. Espero que nossa parceria permaneça por muitos e muitos anos.

Obrigada aos professores doutores Vanessa Jóia de Mello e Nilton Akio Muto pela disponibilidade e atenção de avaliarem meu trabalho e por ajudarem com as suas contribuições.

Muito obrigada a todos os envolvidos neste trabalho, sem eles, ele e eu não estaríamos aqui. O meu mais profundo e sincero obrigada!



“A tarefa é não tanto para ver o que ninguém viu ainda, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre o que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer.

## RESUMO

Os baixos níveis plasmáticos de vitamina D causam alterações minerais ósseas que podem precipitar osteopenia e osteoporose, podendo agravar doenças autoimunes, hipertensão e diabetes. A demanda por suplementação de vitamina D torna-se necessária. Contudo, o consumo de vitamina D não é isento de riscos e a sua toxicidade poderia ter consequências potencialmente graves relacionadas à hipervitaminose D, como a hipercalcemia. Trata-se de um estudo envolvendo duas fases: Experimento 1 (Eletrocorticografia) e Experimento 2 (Eletrocardiologia) e por fim coleta de material para exames laboratoriais. Assim, o presente estudo tem como objetivo geral descrever as alterações eletroencefalográficas causadas por um overdose aguda de vitamina D sobre a dinâmica elétrica do cérebro e alterações eletrocardiográficas. Após 4 dias de tratamento com vitamina D na dose de 25.000 UI/Kg, os níveis séricos de cálcio encontrados estavam aumentados em relação ao grupo controle. A análise de ECoG encontrou uma redução na atividade das ondas nas bandas de frequência delta, teta, alfa e beta. Para o ECG foram observadas alterações com seguimento do QT encurtado, o que pode estar relacionado à concentração sérica de cálcio. Este estudo apresentou evidências importantes sobre as alterações cerebrais e cardíacas causadas por altas doses de vitamina D, indicando parâmetros valiosos no processo de triagem e tomada de decisão para o diagnóstico de pacientes com sintomas sugestivos de intoxicação.

**Palavras-chaves:** Hipercalcemia. Vitamina D. Ondas cerebrais. Eletrocardiograma.

## ABSTRACT

Low plasma levels of vitamin D causes bone mineral change that can precipitate osteopenia and osteoporosis, and could aggravate autoimmune diseases, hypertension and diabetes. The demand for vitamin D supplementation becomes necessary; however, the consumption of vitamin D is not without risks, which its toxicity could have potentially serious consequences related to hypervitaminosis D, such as hypercalcemia and cerebral alterations. This is a study involving two phases: Experiment 1 (Electrocorticography) and Experiment 2 (Electrocardiology) and finally material collection for laboratory tests. Thus, the present study describes the electroencephalographic changes caused by supraphysiological doses of vitamin D in the brain electrical dynamics, and the electrocardiographic changes. After 4 days of treatment with vitamin D at dose of 25,000 IU/Kg, the serum calcium levels found was increased in comparison with control group. The ECoG analysis found a reduction in wave activity in the delta, theta, alpha and beta frequency bands. For ECG was observed changes with shortened QT follow-up, which could be related to serum calcium concentration. This study presented important evidence about the cerebral and cardiac alterations caused by high doses of vitamin D, indicating valuable parameters in the screening and decisionmaking process for diagnosing patients with symptoms suggestive of intoxication.

**Keywords:** Hypercalcemia. Vitamin D. Brainwaves. Electrocardiogram.

## LISTA

Figure 1. Resultados das análises bioquímicas dos animais tratados ou não com vitamina D.....	28
Figure 2. Registros eletrocorticográficos dos animais realizados por 3 minutos.....	29
Figure 3. Distribuição de frequência linear representativa das ondas cerebrais e quantitativo de potência total registrado por eletrocorticografia.....	30
Figure 4. Distribuição quantitativa de frequência linear das ondas cerebrais.....	31
Figure 5. Eletrocardiograma registrado dos grupos controle, veículo e vitamina D.....	33
Figure 6. Parâmetros do eletrocardiograma registrados dos animais controle por 3 minutos.....	35

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

C	Carbono
CYP	Citocromo
DBP	Proteína de ligação à vitamina D
DC	Células dendríticas
D2	Ergocalciferol (Vitamina D2)
D3	Colecalciferol (Vitamina D3)
ECG	Eletrocardiograma
ECoG	Eletrocorticograma
FGF23	Fator de Crescimento de Fibroblastos 23
Gc-MAF	Granulócito Ativador de Macrófago (Gc Protein-Derived Macrophage-Activating Factor)
Hz	Hertz
i.p.	Intraperitoneal
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
mV	Milivolt
mg	Miligrama
ml	Mililitro
NGF	Fator de Crescimento Nervoso (Nerve Growth Factor)
NPC1L1	Transportador Intracelular de Colesterol 1 (Niemann-Pick C1-Like 1)
OH	Hidroxila
PDIA3	Proteína Dissulfeto-Isomerase A3)
SNC	Sistema Nervoso Central
T Helper	Linfócitos T CD4+ (T Helper)
Th17	Células T Auxiliares 17
VDR	Receptor de Vitamina D
V.O.	Via Oral
UVB	Ultra Violeta B
UI	Unidade Internacional

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
1.1 ATIVAÇÃO METABÓLICA DA VITAMINA D	13
1.2 ABSORÇÃO E EXCREÇÃO DA VITAMINA D	13
1.3 FARMACODINÂMICA DA VITAMINA D	14
1.4. ATIVIDADE IMUNOLÓGICA DA VITAMINA D	15
1.5 ATIVIDADE ENDÓCRINA DA VITAMINA D E HOMEOSTASIA ÓSSEA	16
1.6 AÇÃO DA VITAMINA D NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	18
1.7 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA HIPERVITAMINOSE D	20
1.8. CARACTERÍSTICAS DA HIPERVITAMINOSE D EM RATOS	20
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
2.1. OBJETIVO GERAL	22
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
<b>3. JUSTIFICATIVA</b>	<b>23</b>
<b>4. METODOLOGIA</b>	<b>24</b>
4.1. TIPO DE ESTUDO	24
4.2. AMBIENTE DA PESQUISA	24
4.3. POPULAÇÃO DE ESTUDO E AMOSTRA	24
4.4. DROGAS	24
4.5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	25
4.6. REGISTROS ELETROCORTICOGRÁFICOS E ANÁLISE DE DADOS	25
4.7. ANÁLISE DE ELETROCARDIOGRAMA	26
4.8. ANÁLISES BIOQUÍMICAS	27
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
4.10. EUTANÁSIA DOS ANIMAIS	27
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>28</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>37</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>40</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	
<b>ANEXO I</b>	<b>41</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A vitamina D é considerada um hormônio lipossolúvel - esteróide - e desenvolve diversas funções no metabolismo humano (ANDRADE et al, 2015), atuando como um importante regulador (RIZZOLI, 2020). Encontrada em plantas e peixes e também produzida através da conversão por absorção pela pele de 7-desidrocolesterol pela ação do UVB, na dieta, o maior consumo encontrado de vitamina D é a vitamina D3, já que D2 é encontrada tão raramente através da alimentação, sendo ambas amplamente consumidas através de suplementos alimentares (SAPONARO et al, 2020; COURBEBAISSSE & CAVALIER, 2020).

De acordo com as diretrizes internacionais, as doses recomendadas de vitamina D variam de 400-800 UI/dia e a escolha da dosagem é influenciada pela idade (ROSS et al, 2011; GLADE, 2012; PLUDOWSKI et al, 2018). Esses níveis são suficientes para manter a homeostase das funções fisiológicas e, segundo o Food and Nutrition Board, doses acima de 2.000 UI/dia induzem aumento das concentrações séricas de cálcio acima dos valores normais e controlam o desenvolvimento e a função cerebral na idade adulta e a resposta imunomediada (VIETH, 2004; HATHCOCK et al, 2007; SHARIF et al, 2018).

A falta desta vitamina leva a sintomas de hipocalcemia e problemas na mineralização óssea. Além disso, essa redução pode estar associada a doenças neuroinflamatórias, neurodegenerativas e neuropsicológicas, sugerindo a hipótese de que a vitamina D pode desempenhar um papel importante em sua patogênese. O aumento das informações sobre a deficiência de vitamina D e as consequências associadas têm aumentado a demanda por suplementação (MARCINOWSKA-SUCHOWIERSKA et al, 2018; LUKASZYK et al, 2018).

Portanto, quando se observa as mudanças crescentes nos hábitos de vida e seu subsequente aumento de tempo dentro de casa para realização de tarefas e trabalho, resultando em pouca exposição solar, ocorre o aumento pela busca indiscriminada por suplementos orais para obtenção de vitamina D, como uma forma alternativa (SAWYER et al, 2017; DEB et al, 2020).

O aumento do consumo de vitamina D não é isento de riscos e a sua toxicidade apresenta consequências potencialmente graves (SPILLER et al, 2016; LEE et al, 2018). Um aumento da ingestão de vitamina D pela população, principalmente os idosos, associado a prescrições médicas com altas doses sem acompanhamento laboratorial podem resultar em um conjunto de consequências relacionadas à hipervitaminose D, com sintomas que podem estar relacionados à hipercalcemia, que, embora rara, tem sido relatados com mais frequência nos últimos anos (OZKAN, HATUN, BEREKET, 2012; DUDENKOV et al, 2015; MARCINOWSKA-SUCHOWIERSKA et al, 2018; ASIF, 2021).

Vinculada ao metabolismo do cálcio e à homeostasia óssea, na atualidade, existem evidências da presença de receptores para a forma ativa da vitamina D em outros tipos celulares, como o receptor de vitamina D amplamente expresso (VDR). Trata-se de um receptor de hormônios nucleares e fator de transcrição que pode ser expresso em diversos tecidos como linfócitos, células da epiderme, tecido adiposo, ilhotas pancreáticas, miócitos e neurônios, atuando também em processos imunológicos e metabólicos (SUN, 2018; SAPONARO et al, 2020).

A presença de receptores para a vitamina D no cérebro demonstra que este hormônio também afeta o funcionamento das células do tecido nervoso. Segundo KUBIS e PIWOWAR (2015), a vitamina D modula a neurotransmissão, resposta neuroimune, interação com hormônios, comportamento, envelhecimento cerebral e outros processos pouco explorados. Ademais, a deficiência desta vitamina e/ou disfunções de seus receptores indicam relação à processos moleculares patológicos carcinogênicos, distúrbios neurodegenerativos, neuroinflamatórios e neuropsicológicos (BIVONA et al, 2019).

Porém, mesmo que comprovada a presença dos receptores de vitamina D no tecido cerebral e demonstrado, segundo BRANCACCIO et al (2002) e SINGH et al (2003), a relação entre hipervitaminose D crônica e convulsões, hiperexcitabilidade neuromuscular, parestesias e coma; ainda faltam evidências detalhadas sobre o papel desse hormônio sobre o cérebro humano, principalmente no que tange os possíveis efeitos tóxicos do excesso de vitamina na atividade neuronal e, como consequência, no comportamento humano.



## 1.1 ATIVAÇÃO METABÓLICA DA VITAMINA D

O termo vitamina D é utilizado para referir-se ao ergocalciferol (vitamina D<sub>2</sub>) e colecalciferol (vitamina D<sub>3</sub>). A irradiação ultravioleta B (comprimento de onda 290 - 315 nm) através de um arranjo eletrocíclico do anel na posição C9 e C10 convertem a pró-vitamina 7-desidrocolesterol, encontrada na pele, em vitamina D<sub>3</sub>. Já a pró-vitamina de ergocalciferol – o ergosterol – é encontrada em plantas e fungos, estas diferem-se pelo fato de D<sub>2</sub> apresentar um grupo metil no carbono C24 e uma ligação dupla nos carbonos C22 e C23. Após isto, há a isomerização térmica em vitamina D<sub>3</sub>, com a deslocação de um hidrogênio nas posições C19 para C9 (CHANG & LEE, 2019; SAPONARO et al, 2020).

Independente da origem, dieta ou sintetizada endogenamente, após alimentação ou à exposição solar, a vitamina D precisa ser modificada à forma ativa – calcitriol. Para biossintetizar a vitamina D<sub>3</sub>, ocorrem duas etapas de hidroxilação, cada uma envolvendo a ação de um órgão específico. Na primeira fase, ocorre a hidroxilação no fígado que produz 25-hidroxivitamina D [25 (OH) D], sendo este um importante biomarcador para verificação de vitamina D em humanos. Já a segunda fase ocorre nos rins com a produção de 1,25 (OH)<sub>2</sub> D, o calcitriol (THEOBALD et al, 2019).

Este por sua vez se liga a VDR, ocasionando diversas mudanças nos padrões de expressão gênica em células-alvo. Este processo é controlado pelo hormônio da paratireóide e outros mediadores, incluindo a hipofosfatemia e hormônio do crescimento. A 1-alfa-hidroxilação também pode ocorrer em sítios não renais, como nos macrófagos alveolares, osteoblastos, linfonodos, placenta, cólon, mama e queratinócitos, sugerindo assim possível papel parácrino autócrino de 1,25 (OH)<sub>2</sub> D (THEOBALD et al, 2019; CHANG & LEE, 2019).

## 1.2 ABSORÇÃO E EXCREÇÃO DA VITAMINA D

Segundo Margier et al (2018) e Silva & Furlanetto (2017), pensava-se que a absorção da vitamina D no intestino ocorria por difusão passiva, porém, já se acredita que a absorção pode ocorrer por meio de outros mecanismos complexos da incorporação de vitamina D. Recentemente foi mostrado que os transportadores de membrana de colesterol, como os receptores eliminadores de tipo I B, CD36 e, em menor extensão, NPC1 - como o

transportador de colesterol intracelular 1 (NPC1L1), quem realmente facilita a absorção intestinal de D<sub>3</sub>, mas não de 25 (OH) D<sub>3</sub>. Esta descarga é um processo limitante importante na absorção de um grande número de lipídios e xenobióticos e seu mecanismo completo permanece pouco conhecido.

Desta forma esta proteína pode liberar ativamente uma ampla gama de compostos hidrofóbicos estruturalmente não relacionados e desempenha um papel central na proteção do tecido contra o acúmulo de xenobióticos e seus metabólitos endógenos. Também afeta a absorção e distribuição de vários lipídios endógenos do intestino, como os hormônios esteróides (MARGIER et al, 2020).

Estudos observaram os baixos níveis de vitamina D em tecido adiposo e hepático de ratos suplementados com vitamina D<sub>2</sub>, levando a crer que a vitamina D<sub>2</sub> é menos eficiente para causar a elevação dos níveis séricos de 25 (OH) D devido ao seu metabolismo tecidual diferente ao D<sub>3</sub> e a discussão sobre 25 (OH) D livre como um novo marcador para a verificação dos níveis séricos adequados de vitamina D (LIPKIE et al, 2013; BAUR et al, 2020).

### **1.3 FARMACODINÂMICA DA VITAMINA D**

A inativação de calcitriol e outros compostos de vitamina D é realizada principalmente por 24-hidroxilação produzindo 1,24,25(OH) colecalciferol; etapa esta que ocorre predominantemente no rim. Essas hidroxilações são mediadas principalmente pelas enzimas do citocromo P450 CYP1, CYP27B1 e CYP24A1, respectivamente. Os hormônios da vitamina D são transportados na circulação sanguínea ligados à proteína de ligação à vitamina D (DBP ou Gc-MAF), uma proteína multifuncional da família da albumina. 25(OH) D<sub>3</sub> é o composto medido no sangue para avaliar o status de "suficiência de vitamina D". Embora o fígado e os rins sejam os locais predominantes do metabolismo de D<sub>3</sub>, é importante lembrar que essas enzimas CYP são expressas na maioria dos tecidos estudados (TRUMP & ARAGON-CHING, 2018).

O hormônio da paratireóide é responsável por promover conversão de calcifediol em 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> ou calcitriol nos rins através da adição de um grupo hidroxila no carbono C<sub>25</sub>. Além do calcitriol, há ainda diversos outros derivados como 24R, 25

dihidroxitamina D<sub>3</sub>, 25S, 26-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, ácido calcitrico, (23S, 25R)-1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>-26, 23-lactona, calcitrol (1,24R, 25-trihidroxitamina D<sub>3</sub>), 1,23S, 25-trihidroxitamina D<sub>3</sub>, tetranorcolecalciferol (1,23-dihidroxi-24,25,26,27-tetranorvitamina D<sub>3</sub>) e 1,23S, 25-trihidroxi-24-oxo-vitamina D<sub>3</sub> (DEB et al, 2020).

#### 1.4. ATIVIDADE IMUNOLÓGICA DA VITAMINA D

A vitamina D, juntamente com seus metabólitos circulantes ligados à proteína multifuncional de vitamina D, além de atuar como transportador também atua como modulador de respostas inflamatórias e imunológicas. No sistema imune, estas enzimas moduladoras podem ser expressas em neutrófilos, linfócitos, monócitos, macrófagos e em células dendríticas (VANHERWEGEN et al, 2017; MARTENS et al, 2020; CHAROENNGAM & HOLICK, 2020).

Segundo Charoenngam & Holick (2020), alguns estudos experimentais mostraram atividades biológicas importantes nos sistemas imunológico inato e adaptativo em que a administração de vitamina D ou seus metabólitos produziram alterações na ocorrência e progressão de doenças relacionadas ao sistema imunológico, como psoríase, esclerose múltipla, artrite reumatóide, diabetes tipo 1 e doenças infecciosas.

A importância da vitamina D na regulação do sistema imune inato e adaptativo foi demonstrada pela descoberta da presença da expressão de VDR em quase todas as células do sistema imune, bem como pela presença de hormônios metabolizadores nas células. Além disso, o VDR epitelial intestinal é importante para proteger a integridade da barreira mucosa e regular a imunidade intestinal inata. Por exemplo, as células T adquirem uma expressão maior de VDR na ativação com um aumento que já é significativo após 8 horas e atinge o seu pico em 48 horas após a ativação, uma vez que as células imunes também expressam 24-hidroxilase, isso é apenas fracamente regulado por 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> e depende do estado de ativação das células imunes (MARTENS et al, 2020).

Nas células dendríticas (DC) após expostas aos sinais inflamatórios, estas amadurecem, migram para os linfonodos e apresentam os antígenos capturados às células T, iniciando assim uma resposta imune adaptativa antígeno-específica. Além disso, a expressão

de superfície de várias moléculas inibidoras de células T, como o transcrito semelhante à imunoglobina e o ligante de morte programada-1, é regulada positivamente por 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>. Assim, a tDC pode influenciar o comportamento das células T através da indução de hipo-responsividade, permitindo uma mudança na polarização das células T das respostas inflamatórias mediadas por T helper 1- e Th17 para respostas mais tolerogênicas por Th2 e células T reguladoras. A presença do ligante death-1 programado na tDC é crucial para estabelecer o fenótipo Treg, bem como sua produção de IL-10 (VANHERWEGEN et al, 2017).

Segundo Vanherwegen et al (2017), essas observações estão de acordo com um estudo proteômico que descobriu que 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> ou seu análogo estrutural, mas menos calcêmico, TX527, induziu mudanças significativas na organização do citoesqueleto, na biossíntese de proteínas e em proteínas envolvidas na proteólise e nas vias metabólicas. Embora tanto a glicólise aeróbia quanto o metabolismo da fosforilação oxidativa estejam simultaneamente aumentados em 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>, apenas a disponibilidade de glicose e a glicólise parecem necessárias para estabelecer e manter o fenótipo tolerogênico e a função da tDC modulada em 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>.

Observa-se então a importância da vitamina D para a maturação das células imunológicas, e que, portanto, a sua ação depende o tipo de célula, tecido ou órgão e que a sua deficiência favorece o desenvolvimento e progressão de doenças e sua suplementação adequada pode diminuir os efeitos adversos de enfermidades como a doença do enxerto contra o hospedeiro (ZMIJEWSKI, 2019).

### **1.5 ATIVIDADE ENDÓCRINA DA VITAMINA D E HOMEOSTASIA ÓSSEA**

A vitamina D é o principal fator necessário para o desenvolvimento e manutenção dos ossos, bem como para a manutenção da homeostase normal do cálcio e fósforo (CHRISTAKOS et al, 2019).

Sabe-se que para atuar no metabolismo mineral, ela deve primeiro ser metabolizada em sua forma ativa. A vitamina D, que é sintetizada na pele a partir do 7-desidrocolesterol em uma reação catalisada por irradiação ultravioleta ou ingerida na dieta, é primeiro hidroxilada no fígado, a 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> [25 (OH) D<sub>3</sub>], a principal forma circulante de vitamina D

e o índice mais confiável do status da vitamina D. A CYP é uma enzima metabolizadora que participa da conversão da vitamina D 25 hidroxilada e que justifica que pacientes com esta enzima com a mutação apresentam deficiência na forma 25-OH D3 (CHRISTAKOS et al, 2019).

A segunda hidroxilação que ocorre no túbulo renal proximal por meio da ação da 25 (OH) D 1  $\alpha$  hidroxilase (CYP27B1) mitocondrial, resulta na conversão de 25 (OH) D na principal forma hormonal de vitamina D, a 1,25-dihidroxitamina D3 (1,25 (OH)<sub>2</sub> D3), que é responsável pelas ações biológicas da vitamina D. A mutação no gene CYP27B1 resulta em raquitismo dependente de vitamina D tipo 1, caracterizado por mineralização diminuída, hipocalcemia e baixa circulação de 1,25 (OH)<sub>2</sub> D3 e que o hormônio da paratireóide, em resposta à hipocalcemia, estimula CYP27B1 (CHRISTAKOS et al, 2019).

Segundo Christakos et al (2019), 1,25 (OH)<sub>2</sub> D3 regula sua própria produção inibindo CYP27B1, regulando negativamente a síntese de PTH pela glândula paratireóide e também regulando positivamente a produção de FGF23 no osso. Estudos usando rim humano sugerem que existe um módulo específico do rim semelhante ao observado em camundongos e que fatores adicionais, como hormônios sexuais e a prolactina, foram relatados para estimular CYP27B1.

Atuando como outro mecanismo autorregulador, 1,25 (OH)<sub>2</sub> D3 induz CYP24A1, acelerando o catabolismo de 1,25 (OH)<sub>2</sub> D3 e catalisando a conversão deste em 24 produtos direcionados à excreção hidroxilada. Mutações no gene CYP24A1 resultam em hipercalcemia, hipercalcúria, diminuição do PTH e níveis que vão de normais a elevados de 1,25 (OH)<sub>2</sub> D3. Também foi relatado que 25 (OH) D3 é regulado pela atividade catabólica do CYP24A1 renal e que este está presente não apenas no rim, mas também em todas as células que contenham VDR (CHRISTAKOS et al, 2019).

Assim, CYP24A1 não apenas regula a circulação de 1,25 (OH)<sub>2</sub> D3 protegendo contra a hipercalcemia, mas também pode modular a sua quantidade nas células-alvo e controlar uma resposta celular. No rim, o CYP24A1 é regulado reciprocamente em comparação com o CYP27B1 suprimido por baixos níveis de cálcio e PTH e induzido por FGF23 e 1,25 (OH)<sub>2</sub>

D3. Nas células-alvo não renais, CYP24A1 é regulado exclusivamente por 1,25 (OH)<sub>2</sub> D3 (CHRISTAKOS et al, 2019).

Após todo o exposto, compreendemos que a vitamina D é essencial para a mineralização normal do osso, aumentando a absorção intestinal de cálcio e fósforo e mantendo os íons dentro de uma faixa que facilita a deposição de hidroxiapatita na matriz óssea. Bem como também que 1,25 (OH)<sub>2</sub> D3 atua diretamente no tecido ósseo a fim de aumentar a reabsorção óssea osteoclástica, como também a proliferação, diferenciação e ativação osteoclástica e que elevados níveis de 1,25 (OH)<sub>2</sub> D3 podem inibir a mineralização óssea (GOLTZMAN et al, 2018).

## **1.6 AÇÃO DA VITAMINA D NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

Atualmente, a vitamina D é considerada um potencial modulador neurogênico e um neuroesteróide de desenvolvimento, desempenhando um papel importante no sistema nervoso central. Até o momento, sabe-se que a deficiência pré-natal de vitamina D interrompe o desenvolvimento do cérebro e altera a expressão de fatores de crescimento e receptores de neurotrofina em adultos; estimula a síntese de NGF no hipocampo, levando a um crescimento excessivo de neurônios e diminuição da proliferação celular; sua deficiência materna altera a neurogênese no cérebro de ratos em desenvolvimento; e que por fim, em adultos aumenta o crescimento de neuroblastos na região subgranular do hipocampo e altera sua diferenciação neuronal (CUI et al, 2017; MORELLO et al, 2018).

Segundo Morello et al (2018), o calcitriol aumenta a proliferação em culturas secundárias de células progenitoras neurais, muito embora pouco se saiba sobre qualquer impacto na proliferação do hipocampo em camundongos adultos ou sobre o impacto da vitamina D na neurogênese hipocampal durante o envelhecimento ou em doenças neurodegenerativas.

A sinalização mediada pela vitamina D também ocorre por meio de receptores ligados à membrana, como em particular 1,25D 3-MARRS, também denominado PDIA3 (proteína dissulfeto-isomerase A3). A expressão de mRNA para os dois receptores sensíveis a 1,25 (OH)<sub>2</sub> D3 (1,25-di-hidroxivitamina D3) é relatada em células do sistema nervoso. O receptor livre VDR geralmente são citoplasmáticos e após a formação do complexo com seu ligante

são translocados para o núcleo. A sinalização dos receptores de membrana de 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>, induzindo respostas celulares mais rápidas, pode ser mediada por 1,25D<sub>3</sub>-MARRS (NORLIN, 2020).

Segundo Norlin (2020), alguns estudos sugerem que pode haver outros receptores de membrana sensíveis à 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> ou mesmo que, em alguns casos, o VDR nuclear pode se localizar na membrana celular. A principal forma circulante de vitamina D no soro é a 25-hidroxitamina D<sub>3</sub>, o precursor imediato da 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>. Esta forma de vitamina D também tem alguma afinidade para VDR, mas muito menos do que 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>.

Existem evidências de que a vitamina D pode ser sintetizada e metabolizada localmente no SNC. A presença de 1 $\alpha$ -hidroxilase em neurônios do cérebro humano fetal e adulto e células gliais também sugere que 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> é sintetizado e ambos os metabólitos da vitamina D cruzam a barreira hematoencefálica. Estudos *in vitro* confirmam que a microglia cultivada pode converter 25 (OH) D<sub>3</sub> em 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> (CUI et al, 2017).

Encontram-se evidências adicionais de que os níveis do SNC de 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> se correlacionam com os níveis plasmáticos de 25 (OH) D<sub>3</sub>, mas não com os níveis plasmáticos de 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> quando em camundongos suplementados com vitamina D. Esses dados suportam a teoria de que 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> seria possível de ser sintetizada *in situ* no SNC e que além disso, a CYP24A1 também é encontrada em células gliais primárias de rato e em neurônios e astrócitos no cérebro e que portanto, a vitamina D aumenta a expressão do CYP24A1 de forma dose-dependente. Assim, a forma ativa da vitamina D pode funcionar por meio da autorregulação de sua própria eliminação no cérebro (CUI et al, 2017).

Níveis anormalmente altos de vitamina D podem levar a sérios problemas de saúde, especialmente a hipercalcemia, anteriormente já citada. Alguns pacientes são mais sensíveis à vitamina D e o risco de toxicidade é aumentado, por exemplo, em pacientes com doenças granulomatosas e formadoras de linfoma e em pacientes com mutações genéticas que afetam a depuração da 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>. As manifestações clínicas da toxicidade da vitamina D podem incluir confusão, depressão, problemas gastrointestinais e disfunção cardíaca e renal (NORLIN, 2020).

Portanto, os efeitos do excesso de vitamina D no cérebro podem levar a alterações importantes, uma vez que há forte presença de receptores de vitamina D mediando respostas como plasticidade neuronal e como também conectividade de circuitos neurais (LANDEL et al, 2018; BIVONA et al, 2019) e poucos são os estudos que têm se dedicado a caracterizar as alterações elétricas causadas pelo excesso de vitamina D.

### **1.7 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA HIPERVITAMINOSE D**

A administração aguda ou a longo prazo de vitamina D ou o aumento da capacidade de resposta a quantidades normais da vitamina levam a distúrbios no metabolismo do cálcio. São variadas as manifestações clínicas e estão relacionadas principalmente à hipercalcemia e hipercalcúria, que podem ser semelhantes a outros estados hipercalcêmicos, como manifestações neuropsiquiátricas, dificuldade de concentração, confusão, apatia, sonolência, depressão, psicose e, em casos extremos, estupor e coma. Em paralelo, vômitos recorrentes, dor abdominal, polidipsia, poliúria, anorexia, constipação, úlceras pépticas e pancreatite incluem-se nos sintomas gastrointestinais (MARCINOWSKA-SUCHOWIERSKA et al, 2018; TAYLOR & DAVIES, 2018; CHANG & LEE, 2019).

Das manifestações cardiovasculares, acrescentam-se hipertensão, QT encurtado no eletrocardiograma, elevação do intervalo e segmento ST e bradiarritmias com bloqueio cardíaco de primeiro grau. As alterações renais abrangem hipercalcúria como primeiro sinal, além de poliúria, polidipsia, desidratação, nefrocalcinose e insuficiência renal. Outros sintomas de intoxicação por vitamina D englobam banda ceratopática, perda auditiva e calcinose periarticular dolorosa (MARCINOWSKA-SUCHOWIERSKA et al.,2018; CHANG & LEE, 2019).

### **1.8. CARACTERÍSTICAS DA HIPERVITAMINOSE D EM RATOS**

Peixoto et al (2012), em uma revisão da literatura, revelou dados sobre a intoxicação pela vitamina D em diversos animais. Em ratos, foi demonstrado, em 1980, que a dose tóxica da hipervitaminose D por vitamina D<sub>2</sub> foi de 8 mg /Kg /2 doses (dias 1 e 5), sendo que 27% desses animais morreram entre os dias 5 e 7 (o restante foi eutanasiado ao longo do experimento). Já com a vitamina D<sub>3</sub>, dois estudos, um de 1995 e outro de 2011, experimentaram doses de 10mg/animal/VO/1 dose e 2 mg /Kg /VO, respectivamente, sendo



que o primeiro estudo eutanasiou seis animais 5 dias após a administração e um foi monitorado por 8 semanas. Os animais deste estudo apresentaram hiporexia, perda de peso e letargia em 3 dias, e o que não foi sacrificado, duas semanas após a administração, apresentou pele ressecada e dura. De alterações bioquímicas, os animais do primeiro estudo, apresentaram plasma com hipercalcemia, dente com aumento de cálcio, volume, massa e densidade, fêmur com aumento de volume, massa e densidade, ossos com aumento de cálcio e duodeno e ceco com aumento de cálcio. No segundo estudo, todos os animais morreram entre o décimo e o décimo nono dia após a intoxicação, sendo que apresentaram um quadro clínico semelhante, com anorexia, perda de peso, rigidez dos membros, hipotermia, desidratação, dificuldade respiratória, diarreia, epistaxe e convulsão. As alterações bioquímicas demonstradas foram hipercalcemia, hiperfosfatemia, aumento nos níveis de ureia e hipoproteinemia.

Segundo Jones (2008), através dos componentes da maquinaria de transdução de sinal da vitamina D é possível teorizar sobre como a toxicidade da vitamina D pode surgir da hipervitaminose D e dentre algumas hipóteses sobre como os eventos desencadeantes de toxicidade, aumentos nas concentrações totais de 25 (OH) D e 1, 25 (OH)<sub>2</sub> D livre são os mais plausíveis, porém ainda não comprovados, o que nos leva a crer sobre a importância de mais estudos que comprovem tais aspectos acerca da toxicidade por vitamina D.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Descrever as alterações eletroencefalográficas sobre a dinâmica elétrica do cérebro e as alterações eletrocardiográficas associadas à dosagem de cálcio sérico em ratos albinos *wistar* induzidos a uma overdose aguda de vitamina D.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Verificar a existência de alterações eletroencefalográficas desencadeadas por hipervitaminose D;
- Descrever alterações nas faixas de oscilações cerebrais em delta (1-4 Hz), theta (4-8 Hz) alfa (8-12 Hz) Beta (12-28 Hz) e Gamma (28 a 40 Hz);
- Relatar alterações eletrocardiográficas provocadas pela hipervitaminose D;
- Avaliar níveis séricos de creatinina, cálcio, vitamina D e gluconato de cálcio.

### **3. JUSTIFICATIVA**

Visto que os sintomas cardiovasculares juntamente com os sintomas neurológicos são provavelmente os achados clinicamente mais importantes, pois apresentam instabilidade e podem colocar imediatamente a vida do paciente em risco, merecendo mais atenção, o presente estudo justifica-se pela escassez de dados na literatura os quais demonstrem possíveis alterações eletroencefalográficas e eletrocardiográficas associadas à hipervitaminose D e sobre a relação da elevação dos níveis plasmáticos desta vitamina a eventos eletroencefalográficos e eletrocardiográficos (ADAMS E HEWISON, 2010).

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. TIPO DE ESTUDO**

Trata-se de um estudo experimental de intervenção em laboratório envolvendo duas fases, sendo: Experimento 1 (Eletrocorticografia) e Experimento 2 (Eletrocardiologia) e coleta de material para exames laboratoriais.

### **4.2. AMBIENTE DA PESQUISA**

Instalações do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais (LFTPN) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

### **4.3. POPULAÇÃO DE ESTUDO E AMOSTRA**

Foram utilizados 72 ratos *wistar* machos adultos jovens ( $220 \pm 20$  g e com 07 semanas de idade) obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Pará. Os animais foram alojados em gaiolas brancas padrão (48 cm  $\times$  38 cm  $\times$  21 cm) e temperatura controlada, de  $23 \pm 2$  °C e ciclo claro-escuro de 12/12 h, com alimentação e água disponíveis *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com os princípios de cuidados com animais de laboratório e as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a aprovação do Comitê de Ética em Experimentos em Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA nº 2252220321).

### **4.4. DROGAS**

Para a realização do trabalho foram utilizadas as seguintes substâncias químicas: anestésico cloridrato de cetamina obtido no Laboratório Köing (Santana de Parnaíba, SP, Brasil), enquanto o cloridrato de xilazina foi obtido no laboratório Valée (Montes Claros, MG, Brasil). A lidocaína, anestésico local, foi obtida pelo laboratório Hipolabor (Sabará, MG, Brasil) para implantação dos eletrodos. O diazepam 10mg/2ml foi obtido da União Química (Embu Guaçu, SP, Brasil). A vitamina D3 (ADDERA D3 3.300 UI/ml) foi adquirida da FARMASA (São Paulo, SP, Brasil) e o óleo de amendoim (Katiguá, MG, Brasil) como veículo controle. Gluconato de cálcio (100mg/ml) adquirido do laboratório Veafarm (São Paulo, SP, Brasil).

#### 4.5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O estudo teve duas fases. A fase 1 consistiu nas análises de eletrocorticograma (ECoG) e a fase 2 consistiu nas análises de eletrocardiograma (ECG) e das análises bioquímicas. Nas duas fases, os ratos foram divididos aleatoriamente ( $n = 9$  animais por grupo) em: (a) grupo controle (animais que não receberam nenhum tipo de substância); (b) grupo tratado com veículo (animais que receberam óleo de amendoim como veículo); (c) grupo gluconato de cálcio e (d) grupo vitamina D.

Primeiramente, a vitamina D3 foi diluída em óleo de amendoim na concentração de 2.500 UI/mL, seguida do tratamento com vitamina D3 na dosagem de 25.000 UI/kg, via gavagem, uma vez ao dia, por quatro dias sucessivos (CHAVHAN et al, 2011). Para o grupo tratado com gluconato de cálcio a dose utilizada foi de 100 mg/kg (via intravenosa) (CHAKRABORTY, 2021) na veia lateral da cauda, uma vez ao dia por quatro dias. Por fim, no quinto dia, foram realizados os registros de ECoG e ECG e coleta de sangue para parâmetros bioquímicos (creatinina sérica, cálcio e vitamina D).

#### 4.6. REGISTROS ELETROCORTICOGRÁFICOS E ANÁLISE DE DADOS

Os registros de ECoG foram obtidos pelos procedimentos descritos por Ferreira et al. (2020). Para isso, dois dias antes do tratamento, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (80 mg/kg, ip) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg, ip), e após a abolição do reflexo interdigital, foram colocados em aparelho estereotáxico. O crânio foi exposto e eletrodos de aço inoxidável (exposição da ponta, 1,0 mm de diâmetro) foram colocados na dura-máter acima do córtex frontal nas coordenadas do bregma  $-0,96 \pm 1,0$  mm lateral. Um parafuso foi fixado no crânio occipital e os eletrodos foram fixados com cimento acrílico autopolimerizável.

Sete dias após a cirurgia, os eletrodos foram conectados a um sistema digital de aquisição de dados composto por um amplificador de alta impedância (Grass technologies, P511), um osciloscópio (Protek, 6510) e uma placa para aquisição e digitalização de dados (National Instruments, Austin, Tx). Os dados foram amostrados continuamente a 1 kHz em uma passagem baixa de 3 kHz e uma passagem alta de 0,3 Hz. Durante a gravação, os animais foram confinados em caixas de acrílico bem espaçadas (20 x 45 x 15 cm). Para todos os

tratamentos, os registros de ECoG seguiram um protocolo padrão: 10 minutos de acomodação, seguidos de registro com duração de 3 minutos.

O ECoG foi registrado por meio de um sistema de aquisição de dados digital e o traçado foi registrado em mV (milivolts) e a análise offline foi executada conforme descrito por Estumano et al (2019). Assim, as análises offline foram executadas utilizando uma ferramenta construída na linguagem de programação Python (versão 2.7), sendo utilizadas as bibliotecas “Numpy” e “Scipy” para o processamento matemático e uma biblioteca “matplotlib” para obtenção dos dados. Uma interface gráfica foi desenvolvida utilizando a biblioteca PyQt4. Os espectrogramas foram calculados usando a janela de Hamming com 256 pontos (256/1000 s). Para a densidade espectral de potência (PSD), cada quadro foi gerado com uma sobreposição de 128 pontos por janela. Para cada quadro, o PSD foi calculado pelo método do periodograma médio de Welch. Os histogramas de frequência foram obtidos calculando o PSD do sinal usando a janela de Hamming com 256 pontos sem sobreposição, produzindo uma resolução de 1 Hz por caixa. Cada forma de onda exibida em PSD é uma média de um conjunto de experiências. PSDs foram calculados para cada grupo e as médias são mostradas em caixas individuais. As análises foram realizadas na frequência de até 50 Hz e divididas em bandas de acordo com Santos et al (2021). Em delta (1-4 Hz), teta (4-8 Hz), alfa (8-12 Hz) e beta (12-8 Hz) para interpretação da dinâmica das ondas cerebrais durante o desenvolvimento da intoxicação.

#### **4.7. ANÁLISE DE ELETROCARDIOGRAMA**

A atividade eletrocardiográfica foi obtida pelo vetor na derivação D2, os eletrodos foram confeccionados de forma não conjugada, o eletrodo de referência foi colocado sob a axila direita (0,5 cm) e o eletrodo de registro foi fixado no décimo espaço intercostal, 3,5 cm abaixo da axila esquerda, obedecendo ao vetor de registro. Todos os animais receberam 2,5 mg/kg intraperitoneal de diazepam para evitar movimentação e ruídos nos registros. Cada registro teve duração de 3 minutos para cada animal e os dados analisados foram frequência cardíaca (bpm), amplitude (mV), intervalo RR (ms), intervalo PQ (ms), duração do QRS (ms) e intervalo QT (ms) (MUTO et al, 2021).

#### **4.8. ANÁLISES BIOQUÍMICAS**

Para os procedimentos bioquímicos, os ratos foram anestesiados intraperitonealmente com cetamina e xilazina, e o soro foi coletado por punção cardíaca para análise dos níveis de creatinina, cálcio, gluconato de cálcio e vitamina D. O nível de creatinina sérica foi medido pelo método de absorvância cinética (Labtest, MG, Brasil) e o cálcio sérico foi medido por ensaio colorimétrico quantitativo, de ponto final (Calcium Liquiform, Labtest, MG, Brasil). A 25-hidroxivitamina D (25-OHD) foi determinada por ensaios imunoenzimáticos e de quimioluminescência (Abbott Lab, Chicago, Illinois, EUA).

#### **4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A normalidade e homogeneidade das variações foram verificadas pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente. Os resíduos foram distribuídos normalmente e as variações são iguais, todas as comparações entre os grupos foram feitas usando ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey. Todos os dados são apresentados como média e desvio padrão (DP), e os valores de F e p são incluídos, quando pertinentes. O nível de significância  $p < 0,05$  foi considerado para todas as análises. O software GraphPad® Prism 9 (Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, EUA) foi utilizado para os testes estatísticos.

#### **4.10. EUTANÁSIA DOS ANIMAIS**

Após o período de registro, sob o efeito da hipervitaminose D aguda, os animais foram eutanasiados usando altas doses de cloridrato de cetamina (300 mg/kg i.p.) e xilazina (20 mg/kg i.p.) e diazepam (10 mg/kg i.p.), seguindo os requisitos institucionais para a eutanásia desses animais.

## 5. RESULTADOS

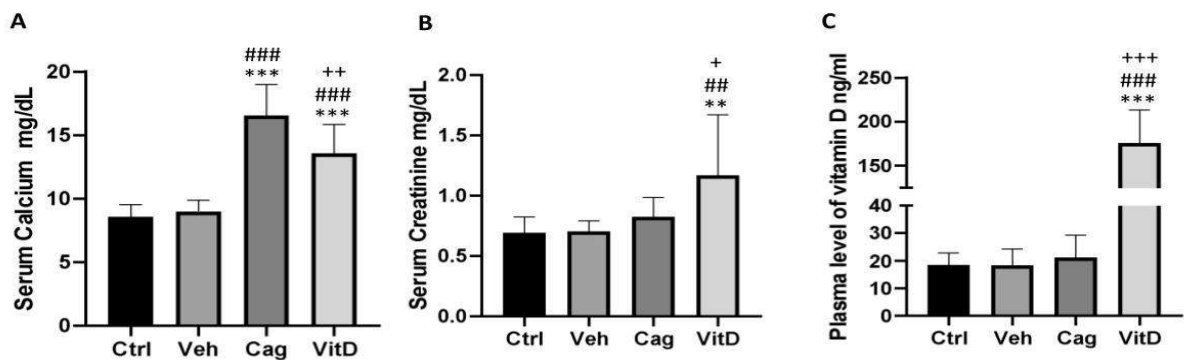
### **Hipercalcemia induzida por vitamina D em altas doses e aumento do nível de creatinina sérica**

Para avaliar se a vitamina D em altas doses foi capaz de induzir hipercalcemia, analisamos os níveis de cálcio sérico. Assim, os animais que receberam gluconato de cálcio e vitamina D apresentaram nível de cálcio sérico aumentado em comparação com os grupos controle e veículo, e o grupo vitamina D foi superior ao gluconato de cálcio ( $F(3, 32) = 40,38$ ,  $p < 0,0001$ ; controle:  $8,55 \pm 0,96$  mg/dL; veículo:  $8,99 \pm 0,88$  mg/dL; gluconato de cálcio:  $16,54 \pm 2,44$  mg/dL; vitamina D:  $13,58 \pm 2,29$  mg/dL;  $p < 0,01$  para todas as comparações; Figura 1A).

Para avaliar a função renal após a administração de altas doses de vitamina D foi medido o nível de creatinina sérica ( $F(3, 32) = 5,933$ ;  $p = 0,0025$ ). Aqui, mostramos que a vitamina D ( $1,17 \pm 0,50$  mg/dL) aumentou o nível de creatinina sérica em comparação com os grupos controle e veículo (controle:  $0,69 \pm 0,13$  mg/dL; veículo:  $0,70 \pm 0,09$  mg/dL;  $p < 0,01$  para todas as comparações), mas não em relação ao gluconato de cálcio ( $0,24 \pm 0,16$  mg/dL;  $p = 0,0547$ ; Figura 1B).

Os níveis plasmáticos de 25-OH D nos grupos que receberam alta dose de vitamina D mostraram um aumento em comparação com os grupos controle, veículo e gluconato de cálcio ( $F(3, 32) = 143,1$ ;  $p < 0,0001$ ; controle:  $18,32 \pm 4,48$  ng/mL; veículo:  $18,29 \pm 5,93$  ng/mL; gluconato de cálcio:  $21,15 \pm 8,15$  ng/mL; vitamina D:  $175,9 \pm 37,71$  ng/mL;  $p < 0,0001$  para todas as comparações; Figura 1C).



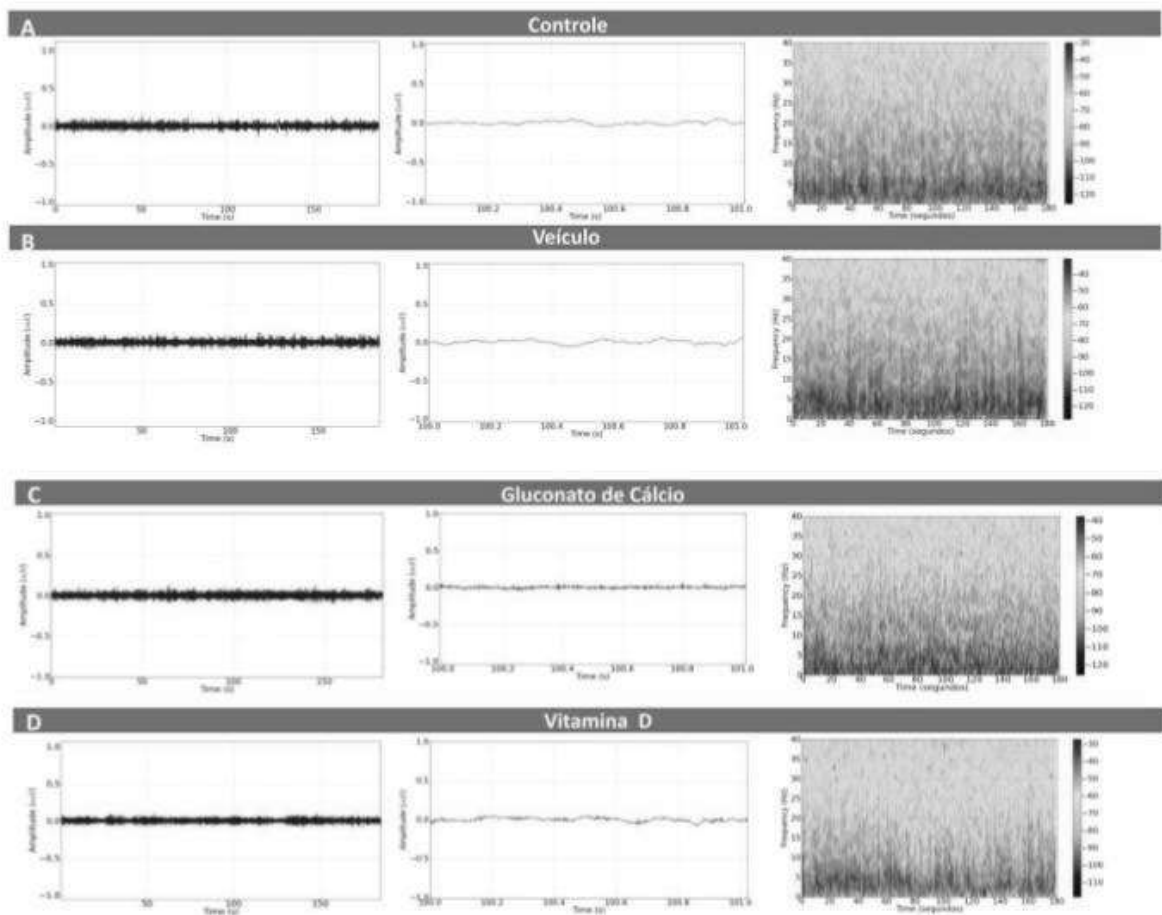


**Figura 1.** Resultados das análises bioquímicas dos animais tratados ou não com vitamina D. (A) Função renal baseada nos níveis de cálcio sérico. (B) níveis de creatinina e (C) níveis plasmáticos de vitamina D. Os dados são expressos como médias  $\pm$  DP (n = 9) animais por grupo, \* p < 0,01 \*\* p < 0,001 e \*\*\* p < 0,0001). Ctrl: controle. Veh: Veículo. Cag: gluconato de cálcio. VitD: Vitamina D. (\*) indica diferença para o grupo ctrl, (#) indica diferença para o grupo Veh; (+) indica diferença para o grupo Cag.

### Alta dose de vitamina D reduziu o poder de banda de todas as ondas cerebrais

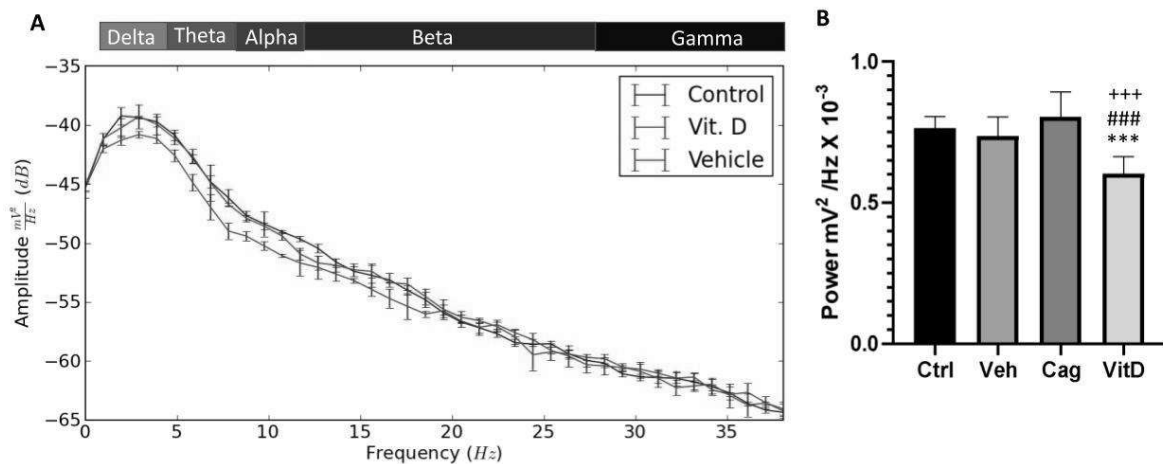
Durante o trabalho, os animais tratados com vitamina D não apresentaram alterações comportamentais e mantiveram sua ingestão alimentar e hídrica semelhante aos grupos controle e veículo (dados não apresentados).

As gravações de ECoG do grupo controle apresentaram amplitude abaixo de 0,1 mV (tipicamente baixa amplitude, Figura 2A), conforme demonstrado na ampliação de 1 segundo (Figura 2A, centro) com espectrograma apresentou a maior intensidade de energia abaixo de 10 Hz (Figura 2A, direita). As gravações de ECoG para o grupo de veículos (Figura 2B) e grupo gluconato de cálcio (Figura 2C) foram semelhantes ao grupo controle; no grupo vitamina D, ao contrário, podem ser observadas alterações no ECoG com diminuição da intensidade energética abaixo de 10 Hz (Figura 2D, à direita); no entanto, a amplitude do traçado foi mantida abaixo de 0,1 mV (Figura 2D, centro).



**Figura 2.** Registros eletrocorticográficos dos animais realizados por 3 minutos. (A) Grupo controle, (B) grupo veículo, (C) grupo glutamato de cálcio e (D) grupo vitamina D. Registro do traçado linear realizado por eletrocorticografia (ECoG, esquerda), fragmento representativo de 1 s do traçado ECoG (centro) e espectrograma de frequência (direita).

A decomposição da distribuição da potência espectral total revelou uma mudança sutil no traçado da amplitude dos animais vitamina D em comparação com os grupos controle e veículo (Figura 3). Diferenças entre vitamina D e outros grupos foram encontradas na análise da distribuição das frequências lineares de até 40 Hz ( $F(3, 32) = 15,69, p < 0,0001$ ). Neste caso, o grupo vitamina D apresentou menor poder espectral total do que os grupos controle, veículo e gluconato de cálcio (controle:  $0,76 \pm 0,04 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ ; veículo:  $0,74 \pm 0,07 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ ; cálcio gluconato:  $0,80 \pm 0,09 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ , vitamina D:  $0,60 \pm 0,06 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ ,  $p < 0,001$  para todas as comparações; Figura 3).



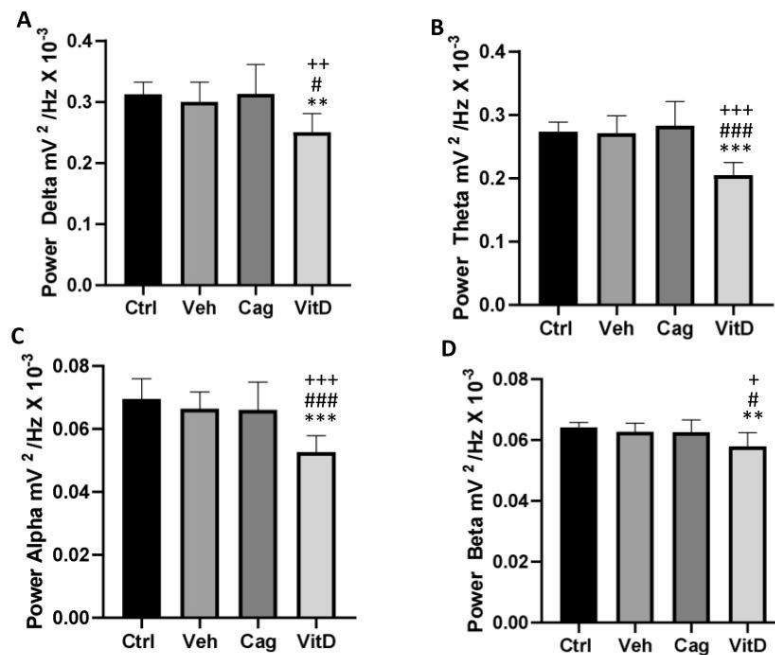
**Figura 3.** Distribuição de frequência linear representativa das ondas cerebrais e quantitativo de potência total registrado por eletrocorticografia. (A) Distribuição representativa da frequência linear nos grupos de até 40 Hz. (B) Distribuição quantitativa do poder linear total das ondas cerebrais. Os dados são expressos como a média  $\pm$  DP ( $n = 9$  animais por grupo; \*\*\*  $p < 0,0001$ ). Ctrl: controle. Veh: Veículo. Cag: gluconato de cálcio. VitD: Vitamina D. (\*) indica diferença para o grupo ctrl, (#) indica diferença para o grupo Veh; (+) indica diferença para o grupo Cag.

A decomposição das ondas cerebrais também foi analisada para a distribuição dos níveis de potência em delta (1-4 Hz), teta (4-8 Hz), alfa (8-12 Hz) e beta (12-28 Hz). Observou-se diferença para as frequências de onda delta ( $F(3, 32) = 6,804$ ;  $p = 0,0011$ ), com redução significativa observada para os animais tratados com vitamina D ( $0,25 \pm 0,03$   $mV^2/Hz \times 10^{-3}$ ) em comparação com o controle ( $0,31 \pm 0,02$   $mV^2/Hz \times 10^{-3}$ ,  $p = 0,0029$ ), veículo ( $0,30 \pm 0,03$   $mV^2/Hz \times 10^{-3}$ ;  $p = 0,0205$ ) e gluconato de cálcio ( $0,31 \pm 0,05$   $mV^2/Hz \times 10^{-3}$ ;  $p = 0,0025$ ). Não foi observada diferença entre os grupos controle, veículo e gluconato de cálcio ( $p > 0,05$ ; Figura 4A).

Para as ondas teta, também foram observadas diferenças entre os grupos ( $F(3, 32) = 16,16$ ;  $p < 0,0001$ ). Os animais do grupo vitamina D apresentaram potência teta média menor ( $0,20 \pm 0,02$   $mV^2/Hz \times 10^{-3}$ ) do que os do grupo controle ( $0,27 \pm 0,015$   $mV^2/Hz \times 10^{-3}$ ;  $p < 0,0001$ ), grupo veículo ( $0,27 \pm 0,027$   $mV^2/Hz \times 10^{-3}$ ;  $p < 0,0001$ ) e grupo gluconato de cálcio ( $0,28 \pm 0,04$   $mV^2/Hz \times 10^{-3}$ ;  $p < 0,0001$ ) e não foi observada diferença entre os grupos controle, veículo e gluconato de cálcio ( $p > 0,05$ ; Figura 4B). Semelhante às ondas delta e

teta, houve variação significativa entre os grupos para as ondas alfa ( $F(3, 32) = 11,64$ ;  $p < 0,0001$ ). Mais uma vez, os animais tratados com vitamina D apresentaram o menor poder alfa de todos os grupos, com média de  $0,053 \pm 0,005 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$  ( $p < 0,001$  para todas as comparações). Os grupos controle, veículo e gluconato de cálcio não diferiram entre si (controle:  $0,069 \pm 0,006 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ ; veículo:  $0,066 \pm 0,005 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ ; gluconato de cálcio:  $0,066 \pm 0,008 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ ;  $p > 0,05$ ; Figura 4C).

Assim como nos demais casos, os animais que receberam vitamina D apresentaram potência de onda beta menor que os grupos controle e veículo ( $F(3, 32) = 5,509$ ,  $p = 0,0036$ ; controle:  $0,064 \pm 0,002 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ ; veículo:  $0,063 \pm 0,003 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ ; gluconato de cálcio  $0,062 \pm 0,004 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ ; e vitamina D:  $0,058 \pm 0,004 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ ;  $p < 0,05$  para todas as comparações; Figura 4D).

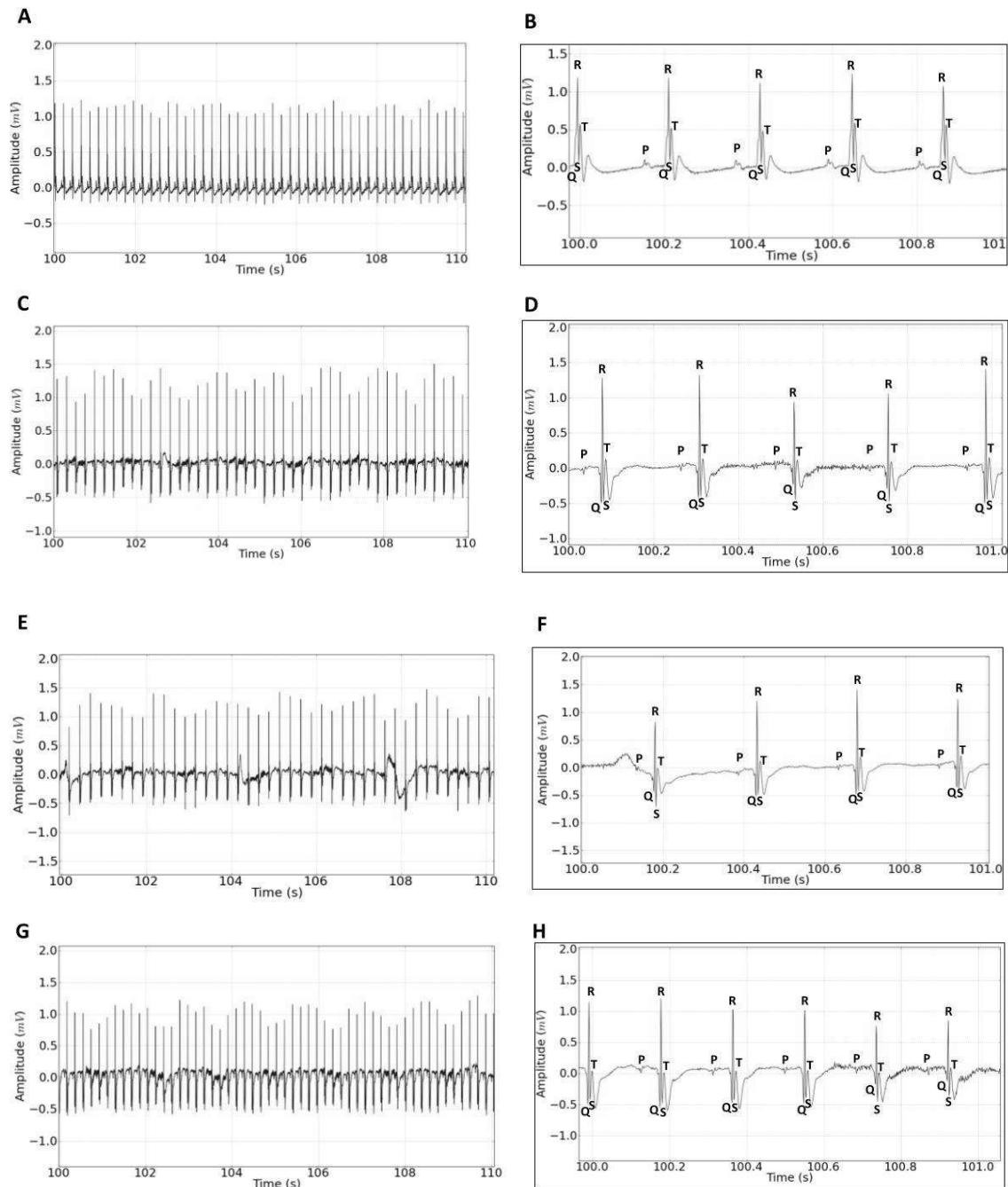


**Figura 4.** Distribuição quantitativa de frequência linear das ondas cerebrais: (A) ondas delta; (B) ondas teta; (C) ondas alfa; (D) ondas beta. Os dados são expressos como a média  $\pm$  DP ( $n = 9$ ) animais por grupo; \*  $p < 0,01$  \*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*  $p < 0,0001$ ). Ctrl: controle. Veh: Veículo. Cag: gluconato de cálcio. VitD: Vitamina D. (\*) indica diferença para o grupo ctrl, (#) indica diferença para o grupo Veh; (+) indica diferença para o grupo Cag.

### **Alterações eletrocardiográficas induzidas por altas doses de vitamina D**

A Figura 5 mostra a atividade cardíaca do grupo controle, apresentando a amplitude dos registros e o ritmo sinusal (Figura 5A). Quando amplificado, pôde-se observar todas as deflagrações cardíacas, com atividade atrial representada pela onda P, atividade ventricular representada pelo complexo QRS e onda T de repolarização ventricular (Figura 5B).

Os animais que receberam óleo de amendoim do grupo (veículo) apresentaram características ao grupo controle, demonstrando atividade cardíaca em ritmo sinusal com todos os gatilhos de funcionamento cardíaco (Figura 5C e D). Para o grupo tratado com gluconato de cálcio foi observada bradicardia sinusal (Figura 5E e F). Para o grupo vitamina D, as características eletrocardiográficas e o ritmo sinusal são semelhantes na comparação com o grupo controle (Figura 5G); porém, na amplificação de 1 segundo, foi possível observar bradicardia sinusal (Figura 5H).



**Figura 5.** Eletrocardiograma registrado dos grupos controle, veículo e vitamina D. (A, C, E, G) Amplificação de 10 segundos mostrando o ritmo sinusal dos grupos controle, veículo e vitamina D, respectivamente. (B, D, F, H) Amplificação de 1 segundo mostrando os intervalos cardíacos dos grupos controle, veículo, gluconato de cálcio e vitamina D, respectivamente.

A atividade cardíaca e os intervalos foram realizados. Para a frequência cardíaca foi observada diferença estatística entre os grupos ( $F(3, 32) = 106,9; p < 0,0001$ ). Os animais que receberam vitamina D apresentaram aumento da frequência cardíaca média de  $375,8 \pm 12,8$

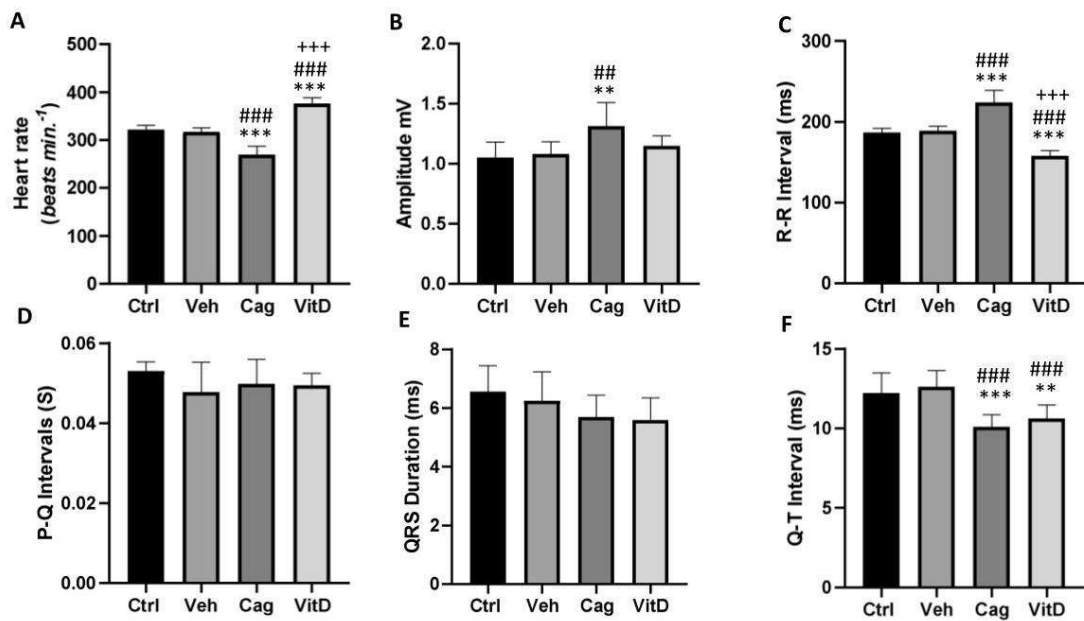
bpm em comparação aos grupos controle ( $321,6 \pm 9,0$  bpm;  $p < 0,0001$ ) e veículo ( $316,9 \pm 8,2$  bpm;  $p < 0,0001$ ). Os animais que receberam gluconato de cálcio apresentaram diminuição da frequência cardíaca média em comparação com todos os grupos ( $269,1 \pm 18,1$  bpm;  $p < 0,0001$  para todas as comparações). Não foi observada diferença entre os grupos controle e veículo ( $p = 0,8619$ ; Figura 6A).

Em relação à amplitude do registro de ECGs foi observada diferença entre os grupos ( $F(3,32) = 6,771$ ;  $p = 0,012$ ), sendo que apenas o grupo gluconato de cálcio apresentou aumento na amplitude do registro do ECG ( $1,31 \pm 0,19$  mV) quando comparado ao grupo controle ( $1,05 \pm 0,13$  mV;  $p = 0,0014$ ) e grupo veículo ( $1,08 \pm 0,1$  mV;  $p = 0,0050$ ). Não houve diferença entre o grupo gluconato de cálcio e vitamina D ( $1,14 \pm 0,09$  mV;  $p = 0,0638$ ) (Figura 6B).

O intervalo RR variou significativamente entre os tratamentos ( $F(3, 32) = 79,69$ ;  $p < 0,0001$ ), com diminuição significativa no grupo vitamina D ( $157,7 \pm 6,5$  ms) em comparação com os demais grupos (controle:  $186,3 \pm 5,566$  ms; veículo:  $188,9 \pm 5,5$  ms; e glutamato de cálcio:  $223,9 \pm 15,1$  ms;  $p < 0,0001$ , para todas as comparações). O grupo gluconato de cálcio teve aumento do intervalo RR em relação aos grupos controle e veículo ( $p < 0,0001$ ). Não foi observada diferença entre os grupos controle e veículo ( $p = 0,9337$ ; Figura 6C).

Para intervalo PQ ( $F(3, 32) = 1,583$ ;  $p = 0,2126$ ) e duração do QRS ( $F(3, 32) = 2,555$ ;  $p = 0,0727$ ) não foi observada diferença entre os grupos (Figura 6D e E).

Uma vez, foi observada diferença significativa entre os grupos no intervalo QT ( $F(3, 32) = 13,15$ ;  $p < 0,0001$ ), com os animais tratados com vitamina D ( $10,6 \pm 0,8$  ms;) e grupo gluconato de cálcio ( $10,1 \pm 0,8$  ms;) apresentou redução significativa em relação aos grupos controles (controle:  $12,2 \pm 1,3$  ms; veículo:  $12,6 \pm 1,0$  ms;  $p < 0,05$ ). Não foi observada diferença entre os grupos controle e veículo ( $p = 0,8549$ ); e grupos gluconato de cálcio e vitamina D ( $p = 0,6620$ ; Figura 6F).



**Figura 6.** Parâmetros do eletrocardiograma registrados dos animais controle por 3 minutos: (A) frequência cardíaca (bpm); (B) amplitude (mV); (C) intervalos RR; (D) intervalo PQ; (E) duração do QRS; (F) Intervalo QT. Os dados são expressos como a média  $\pm$  DP (n = 9 animais por grupo; \*\* p < 0,001 e \*\*\* p < 0,0001). Ctrl: controle. Veh: Veículo. Cag: glutamato de cálcio, VitD: vitamina D. (\*) indica diferença para o grupo ctrl, (#) indica diferença para o grupo Veh; (+) indica diferença para o grupo Cag.



## 6. DISCUSSÃO

A vitamina D e seus metabólitos regulam o fluxo hormonal e desempenham um papel importante na homeostase do cálcio, como absorção de cálcio pelas vilosidades intestinais, mobilização de cálcio dos ossos e reabsorção de cálcio pelos túbulos renais (BARRAGAN, GOOD, KOLLS, 2015). Existem inúmeros relatos de altas doses de vitamina D causando hipercalcemia por hiperativação das funções reguladoras do cálcio (MALIHI et al, 2016; MALIHI et al, 2019).

Os benefícios da correta suplementação de vitamina D na promoção da saúde e prevenção de doenças estão aumentando constantemente. Isso levou a um aumento desenfreado da suplementação, que muitas vezes pode levar a crises hipercalcêmicas e induzir distúrbios iônicos com repercussões cardíacas e cerebrais (SARATHI, KARETHIMMAIAH, GOEL, 2017). Em nosso trabalho, mostramos que a suplementação aguda (alta dose) de vitamina D causou hipercalcemia secundária, que induziu alterações significativas na função cardíaca, embora o aumento do cálcio independente da vitamina D não tenha revelado esse efeito.

Além disso, evidências importantes mostraram que os receptores de vitamina D no cérebro podem ser responsáveis por alterações nos circuitos neuronais e que são independentes da homeostase do cálcio (LANDEL et al, 2018). A vitamina D é um potente neuroesteroide que atravessa a barreira hematoencefálica e atua diretamente nas células que contêm seus receptores nucleares e de superfície, como o PDIA3 (proteína dissulfeto isomerase membro 3) ou também conhecido como ER57, em neurônios e células gliais, para realizam ações genômicas e não genômicas (BOYAN et al, 2012; LANDEL et al, 2018).

Em nosso trabalho, encontramos alterações nas ondas cerebrais que não dependiam de níveis de cálcio induzidos por doses suprafisiológicas de vitamina D. Uma possível explicação para esse fenômeno é que essas alterações podem ser causadas por vias de sinalização rápida não genômicas (LANDEL et al, 2018). Estudos mostraram que o PDIA3 é um dos principais reguladores das ações da vitamina D no cérebro e que pode estar envolvido na conectividade de circuitos neurais (CHEN et al, 2013; TOHDA et al, 2013). No entanto, mais estudos são necessários para confirmar suas ações regulatórias.

Além disso, é importante notar que existem 3 possíveis desfechos primários na suplementação aguda de vitamina D: hipercalcemia, hipercalcúria e nefrolitíase.

Perez-Barrios et al (2016) mostraram em uma série de casos que a suplementação de vitamina D sem acompanhamento médico resultou em níveis críticos de cálcio sérico superiores a 13 mg/dL. Nosso grupo neste trabalho encontrou dados semelhantes, onde foi encontrado nível sérico de cálcio maior que 13 mg/dL em ambos os grupos (VitD e CaG).

Alterações renais também foram relatadas por Malihi et al (2016) e Khadgawat et al. (2007), em que a hipercalcemia pode levar a cálculos de oxalato de cálcio e este desenvolver pós-lesão renal aguda, com aumento ou não de metabólitos nitrogenados, mas esse desfecho depende de outros fatores, como a ingestão hídrica. Aqui, os níveis de creatinina foram aumentados para o grupo que recebeu altas doses de vitamina D. Além disso, de forma aguda, o uso de vitamina D em doses suprafisiológicas também está associado à hipercalcemia e pode levar à lesão renal aguda por vasoconstrição renal direta e redução do volume de líquido extracelular (KAUR P, MISHRA SK, MITHAL, 2015; GUERRA et al, 2016). Isso pode explicar os valores elevados de creatinina nos grupos suplementados com vitamina D e gluconato de cálcio.

Além disso, dentre as manifestações clínicas, as alterações do nível de consciência são um dos sintomas mais comuns da vitamina D na hipercalcemia associada a altas doses, principalmente quando os níveis séricos são superiores a 13 mg/dL. Neste caso, o indivíduo geralmente progride para letargia, confusão mental com provável evolução para o estado de coma ou convulsões (RIGGS, 2002; HÄUSLER D, TORKE S, WEBER, 2020). Existem inúmeros relatos de encefalopatia/coma em pacientes hipercalcêmicos e isso está intimamente relacionado a um padrão de atividade delta teta (JOHNSON, KAPLAN, 2019). Estudos mostram que pacientes com encefalopatia apresentam diminuição da atividade coletiva dessas duas bandas de frequência; trata-se de uma condição grave, que pode evoluir para internação e cuidados intensivos (SUTTER, STEVENS, KAPLAN, 2013). Nesse sentido, nosso trabalho sugere o mesmo padrão de ondas, em que a atividade reduzida em ondas de baixa frequência na presença de hipervitaminose D pode indicar uma encefalopatia, se persistente, com possível progressão para coma.

Outro dado importante é a diminuição significativa da potência de banda alfa e beta, em relação ao grupo controle. Curiosamente, esse padrão é observado em pacientes com déficit de atenção, nos quais valores reduzidos dessas ondas estavam presentes em regiões cerebrais responsáveis pelo processamento e planejamento das ações (CHEN et al, 2019). Isso corrobora a hipótese de que pacientes com hipervitaminose D podem desenvolver letargia e

dificuldade de raciocínio, talvez pela redução dessas ondas (GALIOR, GREBE, SINGH, 2018). Isso sugere que áreas específicas do cérebro podem ser fortemente influenciadas pelos níveis séricos de vitamina D e pela ativação de receptores ER57 nessas regiões.

No coração, a hipercalcemia causa alterações no ECG e pode mimetizar o infarto do miocárdio (SCHUTT et al, 2014). É fundamental saber diferenciar essas duas alterações, pois pode gerar sofrimento e medidas de intervenção desnecessárias para o paciente. O intervalo QT curto é uma das alterações mais frequentes encontradas, e isso se deve ao encurtamento do segmento ST (AHMED, HASHIBA, 1988; KAZAMA, 2017). Dados semelhantes foram encontrados neste estudo, em que animais suplementados com vitamina D e gluconato de cálcio apresentaram hipercalcemia, intervalo QT significativamente menor, com discreto encurtamento do segmento ST (não significativo).

Além disso, outros estudos relatam que em estados hipercalcêmicos pode haver um alargamento do intervalo PQ, devido ao alargamento do complexo QRS (SONODA et al, 2016). Essas alterações não foram observadas neste estudo; entretanto, é importante esclarecer que tais alterações podem variar de acordo com os níveis séricos de cálcio (SONODA et al, 2016). Também podem induzir arritmias atriais e ventriculares, como fibrilação atrial e contrações ventriculares prematuras (KELWADE et al, 2016), embora não tenham sido observadas neste estudo.

## **7. CONCLUSÃO**

O presente estudo apresentou evidências importantes sobre alterações cerebrais e cardíacas causadas por altas doses de vitamina D. No entanto, mais estudos são necessários para melhor compreender as alterações causadas em neurônios e cardiomiócitos. Além disso, os dados deste estudo podem fornecer parâmetros diagnósticos valiosos, melhorando a triagem e a tomada de decisão em pacientes com sintomas sugestivos de intoxicação por vitamina D.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, J.S.; HEWISON, M. Update in vitamin D. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 95, n. 2, p. 471-478, 2010.

AHMED R, HASHIBA K. Reliability of qt intervals as indicators of clinical hypercalcemia. **Clin Cardiol** 11:395–400. doi:10.1002/clc.4960110607, 1988.

ANDRADE, P.C.O et al. Alimentação, fotoexposição e suplementação: influência nos níveis séricos de vitamina D. **Rev. Med. Minas Gerais**, v. 25, n. 3, p. 432-437, 2015.

ASIF A, FAROOQ N. Vitamin D Toxicity. , ed. In: **StatPearls** [Internet] StatPearls Publishing, Treasure Island (FL) Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32491799>, 2021.

BAUR, A. C.; BRANDSCH, C.; STEINMETZ, B.; SCHUTKOWSKI, A.; WENSCH-DORENDORF, M. & STANGL, G. I. Differential effects of vitamin D3 vs vitamin D2 on cellular uptake, tissue distribution and activation of vitamin D in mice and cells. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 204, p. 105768, 2020.

BARRAGAN M, GOOD M, KOLLS J. Regulation of Dendritic Cell Function by Vitamin D. **Nutrients** 7:8127–8151. doi:10.3390/nu7095383, 2015.

BIVONA, Giulia; GAMBINO, Caterina Maria Caterina; IACOLINO, Giorgia; CIACCIO, Marcello. (2019) Vitamina D e o sistema nervoso. **Neurological Research**, v. 41, p. 827-835, 2019. DOI: 10.1080 / 01616412.2019.1622872.

BRANCACCIO, D.; D; TETTA, C.; GALLIENI, M.; PANICHI, V. Inflammation, CRP, calcium overload and a high calcium-phosphate product: a “liaison dangereuse”. **Nephrol Dial Transplant**, v.17, p. 201-203, 2002.

BOYAN B. D., CHEN J., SCHWARTZ Z.. Mechanism of Pdia3-dependent 1 $\alpha$ ,25- dihydroxy vitamin D3 signaling in musculoskeletal cells. **Steroids** 77:892–896. doi:10.1016/j.steroids.2012.04.018, 2012.

CHANG, S.W. & LEE, H.C. (2019). Vitamin D and Health - the Missing Vitamin in Humans. **Pediatrics & Neonatology**. DOI: 10.1016/j.pedneo.2019.04.007.

CHAROENNGMAN, N.; & HOLICK, M. F. Immunologic effects of vitamin D on human health and disease. **Nutrients**, v. 12(7), p. 2097, 2020.

CHAVHAN S, BRAR R, BANGA H, SANDHU H, SODHI S, GADHAVE P, KOTHULE V, KAMMON A. Clinicopathological studies on vitamin D 3 toxicity and therapeutic evaluation of Aloe vera in rats. **Toxicol Int** 18:35. doi:10.4103/0971- 6580.7585, 2011.

CHAKRABORTY, A., CAN, A. S. Calcium Gluconate. [Updated 2. , ed. StatPearls [Internet] **StatPearls Publishing**, Treasure Island (FL) Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32491395>, 2021.

CHEN J, DOROUDI M, CHEUNG J, GROZIER AL, SCHWARTZ Z, BOYAN BD. Plasma membrane Pdia3 and VDR interact to elicit rapid responses to  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . **Cell Signal** 25:2362–2373. doi:10.1016/j.cellsig.2013.07.020, 2013.

CHEN H, CHEN W, SONG Y, SUN L, LI X. EEG characteristics of children with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Neuroscience** 406:444–456. doi:10.1016/j.neuroscience.2019.03.048, 2019.

CHRISTAKOS, S., LI, S.; DELA CRUZ, J.; VERLINDEN, L. & CARMELIET, G. (2019). **Vitamin D and Bone. Handbook of Experimental Pharmacology.** DOI: 10.1007/164\_2019\_338.

COURBEBAISSSE, M. & CAVALIER, E. ourbebaisse, M., & Cavalier, E. (2020). Vitamin D in 2020: An Old Pro-Hormone with Potential Effects beyond Mineral Metabolism. **Nutrients**, v. 12(11), p. 3378. DOI:10.3390/nu12113378.

CUI, X.; GOOCH, H., PETTY, A.; MCGRATH, J. J. & EYLES, D. (2017). Vitamin D and the brain: Genomic and non-genomic actions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 453, p. 131–143, 2017. DOI: 10.1016/j.mce.2017.05.035.

ESTUMANO DP, FERREIRA LO, BEZERRA PAL, DA SILVA MCP, JARDIM GC, SANTOS GFS, GUSTAVO KS, MATTOS BG, RAMOS JAB, JÓIA DE MELLO V, et al. Alteration of Testosterone Levels Changes Brain Wave Activity Patterns and Induces Aggressive Behavior in Rats. **Front Endocrinol (Lausanne)** 10: doi:10.3389/fendo.2019.00654, 2019.

DEB, Subrata; REEVES, Anthony Allen; LAFORTUNE, Suki. Simulation of Physicochemical and Pharmacokinetic Properties of Vitamin D3 and Its Natural Derivatives. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 8, p. 160, 2020.

DUDENKOV D V., YAWN BP, OBERHELMAN SS, FISCHER PR, SINGH RJ, CHA SS, MAXSON JA, QUIGG SM, THACHER TD. Changing Incidence of Serum 25-Hydroxyvitamin D Values Above 50 ng/mL: A 10-Year Population-Based Study. **Mayo Clin Proc** 90:577–586. doi:10.1016/j.mayocp.2015.02.012, 2015.

FERREIRA LO, DE SOUZA RD, DE ARAÚJO SILVA F, COSTA FFM, FARIAS RAF, HAMOY AO, DE MELLO VJ, LOPES DCF, HAMOY M. Electrographic patterns dominated by low-frequency waves in camphor-induced seizures. **Sci Rep** 10:18222. doi:10.1038/s41598-020-75309-w, 2020.

GALIOR K, GREBE S, SINGH R. Development of Vitamin D Toxicity from Overcorrection of Vitamin D Deficiency: A Review of Case Reports. **Nutrients** 10:953. doi:10.3390/nu10080953, 2018.

GLADE, M. J. A 21st century evaluation of the safety of oral vitamin D. **Nutrition** 28:344–356. doi:10.1016/j.nut.2011.11.006, 2012.

GRIFFIN, F.; HEWISON, M.; HOPKIN, J.; KENNY, R.; QUINTON, R.; RHODES, J.; SUBRAMANIAN, S. & THICKETT, D. Vitamin D and COVID-19: evidence and recommendations for supplementation. **Royal Society open Science**, v. 7(12), p. 201912, 2020.

GOLTZMAN, D.; MANNSTADT, M. & MARCOCCI, C. Physiology of the Calcium-Parathyroid Hormone-Vitamin D Axis. **Vitamin D in Clinical Medicine**, p. 1–13, 2018. DOI:10.1159/000486060.

GUERRA V, VIEIRA NETO OM, LAURINDO AF, PAULA FJA DE, MOYSÉS NETO M. Hypercalcemia and renal function impairment associated with vitamin D toxicity: case report. **J Bras Nefrol** 38: doi:10.5935/0101-2800.20160074, 2016.

HAMOY, M., DOS SANTOS BATISTA, L., DE MELLO, V. J., GOMES-LEAL, W., FARIAS, R. A. F., DOS SANTOS BATISTA, P., ... & BARBAS, L. A. L. Cunaniol-elicited seizures: behavior characterization and electroencephalographic analyses. **Toxicology and applied pharmacology**, 360, 193-200, 2018.

HATHCOCK JN, SHAO A, VIETH R, HEANEY R. Risk assessment for vitamin D. **Am J Clin Nutr** 85:6–18. doi:10.1093/ajcn/85.1.6, 2007.

HÄUSLER D, TORKE S, WEBER MS. High-Dose Vitamin D-Mediated Hypercalcemia as a Potential Risk Factor in Central Nervous System Demyelinating Disease. **Front Immunol** 11:301. doi:10.3389/fimmu.2020.00301, 2020.

JALILIFAR, M., YADOLLAHPOUR, A.; MOAZEDI, A.A.; GHOTBEDDIN, Z. Quantitative assessments of extracellular EEG to classify specific features of main phases of seizure acquisition based on kindling model in Rat. **Neuroscience letters**, v. 656, p. 144–151, 2017.

JONES, G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88(2), p. 582S–586S, DOI: 10.1093/ajcn/88.2.582s, 2008.

JOHNSON, Emily L.; KAPLAN, Peter W. Clinical neurophysiology of altered states of consciousness: encephalopathy and coma. **Handbook of clinical neurology**, 161: 73-88, 2019.

KAUR P, MISHRA SK, MITHAL A. Vitamin D toxicity resulting from overzealous correction of vitamin D deficiency. **Clin Endocrinol (Oxf)** 83:327–331. doi:10.1111/cen.12836, 2015.

KAZAMA I. High-calcium exposure to frog heart: a simple model representing hypercalcemia-induced ECG abnormalities. **J Vet Med Sci** 79:71–75. doi:10.1292/jvms.16-0413, 2017.

KELWADE J, MODI K, KUMAR N, PAREKH H. Hypercalcemia and electrocardiogram changes. **Indian J Endocrinol Metab** 20:892. doi:10.4103/2230- 8210.192900, 2016.

KHADGAWAT R, GOSWAMI R, GUPTA N, SEITH A, MEHTA AP. Acute Vitamin D Toxicity in an Infant. **Clin Pediatr Endocrinol** 16:89–93. doi:10.1297/cpe.16.89, 2007.

KUBIS, A. M.; PIWOWAR, A. The new insight on the regulatory role of the vitamin D3 in metabolic pathways characteristic for cancerogenesis and neurodegenerative diseases. **Ageing Research Reviews**, v. 24, p. 126-137, part. B, 2015. ISSN 1568-1637.

LIPKIE, T. E.; JANASCH, A.; COOPER, B. R.; HOHMAN, E. E; WEAVER, C. M., & FERRUZZI, M. G. Quantification of vitamin D and 25-hydroxyvitamin D in soft tissues by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B.**, v. 932, p. 6-11, 2013.

MALIHI Z, WU Z, LAWES CMM, SCRAGG R. Adverse events from large dose vitamin D supplementation taken for one year or longer. **J Steroid Biochem Mol Biol** 188:29–37. doi:10.1016/j.jsbmb.2018.12.002, 2019.

MALIHI Z, WU Z, STEWART AW, LAWES CM, SCRAGG R. Hypercalcemia, hypercalciuria, and kidney stones in long-term studies of vitamin D supplementation: a systematic review and meta-analysis. **Am J Clin Nutr** 104:1039–1051. doi:10.3945/ajcn.116.134981, 2016.

MARCINOWSKA-SUCHOWIERSKA, E. et al. Vitamin D toxicity – A clinical perspective. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, art. 550, 2018.

MARGIER, M.; COLLET, X.; LE MAY, C.; DESMARCHELIER, C.; ANDRÉ, F.; LEBRUN, C., DEFOORT, C.; BLUTEAU, A; BOREL, P.; LESPINE, A. & REBOUL, E. ABCB1 (P-glycoprotein) regulates vitamin D absorption and contributes to its transintestinal efflux. **The FASEB Journal**, v. 33(2), p. 2084-2094, 2019.

MARINS, Tatiana Aporta et al. Intoxicação por vitamina D: relato de caso. **Einstein (São Paulo)**, São Paulo, v. 12, n. 2, p. 242-244, 2014.

MARTENS, P. J.; GYSEMANS, C.; VERSTUYF, A. & MATHIEU, C. Vitamin D's effect on immune function. **Nutrients**, v. 12(5), p. 1248, 2020.

MORELLO, M.; LANDEL, V.; LACASSAGNE, E.; BARANGER, K., ANNWEILER, C.; FÉRON, F. & MILLET, P. (2018). Vitamin D improves neurogenesis and cognition in a mouse model of Alzheimer's disease. **Molecular neurobiology**, v. 55(8), p. 6463-6479, 2018.

MUTO N. A., HAMOY M., RODRIGUES L. D. C., TEIXEIRA B. B., SANTOS ALMEIDA A. F., DE CASTRO NAVEGANTES T., DE SOUSA FERREIRA DE SÁ V. S., DE MORAES B. P., DO VALE MEDEIROS J. P., DOS SANTOS Y. A., et al. Myorelaxation, respiratory depression and electrocardiographic changes caused by the administration of extract of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) stone in rats. **Toxicol Reports** 8:829–838. doi:10.1016/j.toxrep.2021.03.024, 2021.

NORLIN, M. Effects of vitamin D in the nervous system: Special focus on interaction with steroid hormone signalling and a possible role in the treatment of brain cancer. **Journal of neuroendocrinology**, v. 32(1), p. 12799, 2020.



OZKAN B, HATUN S, BERKET A. Vitamin D intoxication. **Turk J Pediatr** 54:93–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22734293>, 2012.

PEIXOTO, Paulo V. et al. Hipervitaminose D em animais. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 7, p. 573-594, 2012.

PÉREZ-BARRIOS C, HERNÁNDEZ-ÁLVAREZ E, BLANCO-NAVARRO I, PÉREZ-SACRISTÁN B, GRANADO-LORENCIO F. Prevalence of hypercalcemia related to hypervitaminosis D in clinical practice. **Clin Nutr** 35:1354–1358. doi:10.1016/j.clnu.2016.02.017, 2016.

PLUDOWSKI P, HOLICK MF, GRANT WB, KONSTANTYNOWICZ J, MASCARENHAS MR, HAQ A, POVOROZNYUK V, BALATSKA N, BARBOSA AP, KARONOVA T, et al. Vitamin D supplementation guidelines. **J Steroid Biochem Mol Biol** 175:125–135. doi:10.1016/j.jsbmb.2017.01.021, 2018.

RIGGS, J. E. Neurologic Manifestations of Electrolyte Disturbances. **Neurol Clin** 20:227–239. doi:10.1016/S0733-8619(03)00060-4, 2002.

RIZZOLI, R. Vitamin D supplementation: upper limit for safety revisited? **Aging Clinical and Experimental Research**. DOI: 10.1007/s40520-020-01678-x, 2020.

ROSS A. C., MANSON, J. E., ABRAMS, S. A., ALOIA, J. F., BRANNON, P. M., CLINTON, S. K., DURAZOARVIZU, R. A., GALLAGHER, J. C., GALLO, R. L., JONES, G., et al. The 2011 Report on Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D from the Institute of Medicine: What Clinicians Need to Know. **J Clin Endocrinol Metab** 96:53–58. doi:10.1210/jc.2010-2704, 2011.

SAPONARO, F.; SABA, A; ZUCCHI, R. An Update on Vitamin D Metabolism. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21(18), p. 6573, sep 8, 2020. DOI: 10.3390/ijms21186573. PMID: 32911795; PMCID: PMC7554947.

SANTOS G. F. S., FERREIRA L. O., GERRITS MATTOS B., FIDELIS E. J., SOUZA A. S., BATISTA P. S., MANOEL C. A. F., CABRAL D. A. C., JÓIA DE MELLO V., FAVACHO LOPES D. C., et al. Electrographic description of the effects of anticonvulsant drugs used to treat lidocaine-induced seizures. **Brain Behav** 11: doi:10.1002/brb3.1940, 2021.

SAWYER, M.E.; TRAN, H.T.; EVANS, M.V. A physiologically based pharmacokinetic model of vitamin D. **J. Appl Toxicol.**, v. 37, p. 1448-1454, Doi: 10.1002/jat.3489. Epub 2017 Jun 6. PMID: 28585774; PMCID: PMC6225524, 2017.

SCHUTT RC, BIBAWY J, ELNEMR M, LEHNERT AL, PUTNEY D, THOMAS AS, BARKER CM, PRATT CM. Severe Hypercalcemia Mimicking ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. **Methodist Debaquey Cardiovasc J** 10:193–197, 2014.

SILVA, M. C. & FURLANETTO, T. W. (2017). Intestinal absorption of vitamin D: a systematic review. **Nutrition Reviews**, v. 76(1), p. 60–76. DOI:10.1093/nutrit/nux034.

- SHARIF K, SHARIF Y, WATAD A, YAVNE Y, LICHTBROUN B, BRAGAZZI NL, AMITAL H, SHOENFELD Y. Vitamin D, autoimmunity and recurrent pregnancy loss: More than an association. **Am J Reprod Immunol** 80:e12991. doi:10.1111/aji.12991, 2018.
- SINGH, J.; MOGHAL, N.; PEARCE, S.; CHEETHAM, T. The investigation of hypocalcaemia and rickets. **Arch Dis Child**, v. 88, p. 403-407, 2003.
- SONODA K, WATANABE H, HISAMATSU T, ASHIHARA T, OHNO S, HAYASHI H, HORIE M, MINAMINO T. High Frequency of Early Repolarization and Brugada-Type Electrocardiograms in Hypercalcemia. **Ann Noninvasive Electrocardiol** 21:30–40. doi:10.1111/anec.12303, 2016.
- SUN, Jun. Dietary vitamin D, vitamin D receptor, and microbiome. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 21, n. 6, p. 471, 2018.
- SUTTER R, STEVENS RD, KAPLAN PW. Clinical and imaging correlates of EEG patterns in hospitalized patients with encephalopathy. **J Neurol** 260:1087– 1098. doi:10.1007/s00415-012-6766-1, 2013.
- TAYLOR, P.N. & DAVIES, J. S. A review of the growing risk of vitamin D toxicity from inappropriate practice. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 84(6), p. 1121-1127, 2018.
- THEOBALD, J.; EL MAATY, M. A. A.; KUSTERER, N.; WETTERAUER, B.; WINK, M., Cheng, X., & Wölfl, S. (2019). In vitro metabolic activation of vitamin D3 by using a multi-compartment microfluidic liver-kidney organ on chip platform. **Scientific reports**, v. 9(1), p. 1-11.
- TOHDA C, LEE Y-A, GOTO Y, NEMERE I. Diosgenin-induced cognitive enhancement in normal mice is mediated by 1,25D3-MARRS. **Sci Rep** 3:3395. doi:10.1038/srep03395, 2013.
- TRUMP, D., & ARAGON-CHING, J. Vitamin D in prostate cancer. **Asian Journal of Andrology**, 20(3), 244. doi:10.4103/aja.aja\_14\_18, 2018.
- VANHERWEGEN, A. S.; GYSEMANS, C. & MATHIEU, C. (2017). Regulation of Immune Function by Vitamin D and Its Use in Diseases of Immunity. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 46(4), 1061–1094, 2017. DOI: 10.1016/j.ecl.2017.07.010.
- VIETH, R. Why the optimal requirement for Vitamin D3 is probably much higher than what is officially recommended for adults. **J Steroid Biochem Mol Biol**89–90:575–579. doi:10.1016/j.jsbmb.2004.03.038, 2004.
- ZMIJEWSKI, M. A. Vitamin D and Human Health. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 20(1), p. 145. DOI: 10.3390/ijms20010145. PMID: 30609781; PMCID: PMC6337085, 2019.

## ANEXO I



G. O. Lima et al.

High doses of vitamin D  
changes brainwaves

EBC

e210457

## RESEARCH

## 100 YEARS OF VITAMIN D

# Supraphysiological doses of vitamin D changes brainwave activity patterns in rats

Gabriella Oliveira Lima<sup>1</sup>, Alex Luis Menezes de Silva<sup>1</sup>, Julianne Elba Cunha Azevedo<sup>1</sup>,  
Chirleise Pinheiro Nascimento<sup>1</sup>, Luana Rodrigues Vieira<sup>1</sup>, Akira Otaka Hamoy<sup>2</sup>, Luan Oliveira Ferreira<sup>2</sup>,  
Verônica Regina Lobato Oliveira Bahia<sup>3</sup>, Nilton Akio Moto<sup>4</sup>, Dielly Catrina Favacho Lopes<sup>1,2</sup> and Moisés Hamoy<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Pharmacology and Toxicology of Natural Products, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Belém, Pará, Brazil

<sup>2</sup>Laboratory of Experimental Neuropathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Belém, Pará, Brazil

<sup>3</sup>Interdisciplinary Laboratory of Animal Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Belém, Pará, Brazil

<sup>4</sup>Advanced Bioactive Compounds Utilization Center, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Belém, Pará, Brazil

Correspondence should be addressed to D. C. F. Lopes or M. Hamoy; [dclopes@ufpa.br](mailto:dclopes@ufpa.br) or [hamoy@ufpa.br](mailto:hamoy@ufpa.br)

This paper forms part of a special series on 100 Years of Vitamin D. The guest editors for this section were Josef Bittler, Susat Lantieri-Pere and Marina Ruzier.

## Abstract

Low plasma levels of vitamin D causes bone mineral change that can precipitate osteopenia and osteoporosis and could aggravate autoimmune diseases, hypertension and diabetes. The demand for vitamin D supplementation becomes necessary; however, the consumption of vitamin D is not without risks, which its toxicity could have potentially serious consequences related to hypervitaminosis D, such as hypercalcemia and cerebral alterations. Thus, the present study describes the electroencephalographic changes caused by supraphysiological doses of vitamin D in the brain electrical dynamics and the electrocardiographic changes. After 4 days of treatment with vitamin D at a dose of 25,000 IU/kg, the serum calcium levels found were increased in comparison with the control group. The electrocorticogram analysis found a reduction in wave activity in the delta, theta, alpha and beta frequency bands. For ECG was observed changes with shortened QT follow-up, which could be related to serum calcium concentration. This study presented important evidence about the cerebral and cardiac alterations caused by high doses of vitamin D, indicating valuable parameters in the screening and decision-making process for diagnosing patients with symptoms suggestive of intoxication.

## Key Words

- hypervitaminosis
- vitamin D
- brainwaves
- electrocardiogram

Endocrine Connections  
(2022) 11, e210457

## Introduction

Vitamin D is an important pro-hormone that plays a key role in preserving the skeletal system, serum calcium levels and playing important roles in the cardiovascular system, central nervous system (1,2) and cancer prevention (3). According to international guidelines, recommended doses of vitamin D range from 400 to 600 IU/day and the chance of damage is influenced by age (1, 3, 4). These levels are sufficient to maintain the homeostasis of physiological functions and, according to the Food and Nutrition Board,

doses above 2000 IU/day induce an increase in serum calcium concentrations above normal values and interfere cerebral development and function in adulthood and the immune-mediated response (5, 6, 7).

The lack of this vitamin leads to symptoms of hypocalcemia and problems to bone mineralization. In addition, this reduction can be associated with neuroinflammatory, neurodegenerative and neuropsychological diseases, suggesting the hypothesis

