



Alteraciones histológicas por hipervitaminosis A en huesos largos de ratas Sprague Dawley recién nacidas

Histological alterations due to hypervitaminosis A in the long bones of newly born Sprague Dawley rats

Rayza Hernández Díaz, ¹José Guillermo Sanabria Negrín, ²Isvel Zaldívar Garrit, ³Margarita LLanuch Lara. ⁴

¹ Médica. Especialista en Medicina General Integral y en Histología. Profesora Asistente. Facultad de Ciencias Médicas de Pinar del Río. Cuba. rayza@infomed.sld.cu

² Médico. Especialista de Segundo Grado en Histología. Dr. en Ciencias Biológicas. Profesor Consultante. Investigador Auxiliar. Universidad de Ciencias Médicas de Pinar del Río. Cuba. joseg_50@infomed.sld.cu

³ Médico. Especialista de Primer Grado en Embriología. Profesor Asistente. Universidad de Ciencias Médicas de Pinar del Río. Cuba. izvelzq@infomed.sld.cu

⁴ Médica. Especialista de Segundo Grado en Histología. Profesora Auxiliar. Universidad de Ciencias Médicas de Pinar del Río. Cuba. margarita.llanuch@infomed.sld.cu

Recibido: 04 de diciembre de 2017

Aprobado: 09 de febrero de 2018

RESUMEN

Introducción: el consumo en altas dosis de vitamina A a dosis mínima teratogénica podría ser causa posible de alteraciones histológicas del hueso durante el crecimiento intrauterino.

Objetivo: evaluar el efecto de la hipervitaminosis A inducida en ratas sobre los huesos largos de la descendencia.

Método: se realizó un estudio experimental en ratas Sprague Dawley preñadas: dos grupos con tres animales c/u: control negativo y casos con dosis de VA 50 µg/g durante los primeros 16 días de preñez entre septiembre 2015 y febrero 2016. Se tomaron los fémures derechos de todas las ratas (n=12 en cada grupo) con 2 horas de nacidas. Los huesos fueron descalcificados, procesados en parafina y

teñidos con hematoxilina/eosina. Se realizó morfometría de corte longitudinal de fémur derecho en el punto medio de las diáfisis del grosor del periostio, endostio, cortical y total de la diáfisis. Las variables cualitativas fueron resumidas mediante frecuencias y las cuantitativas, mediante la media y desviación estándar. Las comparaciones se verificaron mediante las pruebas de X^2 y T de Student al 95 % de certeza.

Resultados: tanto el grosor del periostio, como el del endostio, de la cortical y el diámetro de la diáfisis del fémur mostraron disminuciones altamente significativas ($p < 0.0001$) en la comparación de medias entre los grupos de estudio y control. El cartílago endocondral aumentado, y la dilatación de los vasos medulares fueron más frecuente entre los casos ($p < 0.0001$).

Conclusiones: la hipervitaminosis A durante la preñez en ratas Sprague Dawley reduce el tamaño del fémur en la descendencia.

DeCS: VITAMINA A; HIPERVITAMINOSIS A; RATAS; HUESOS.

February 2016. The right femurs of all rats were taken ($n = 12$ in each group) 2 hours after birth. The bones were decalcified, processed in paraffin and stained with haematoxylin / eosin. Longitudinal section morphometry of the right femur was performed at the midpoint of the diaphysis of the thickness of the periosteum, endosteum, cortical and total of the diaphysis. The qualitative variables were summarized by frequencies and the quantitative using the mean and standard deviation. The comparisons were verified by X^2 and Student's-T tests at 95 % certainty.

Results: thickness of the periosteum and endosteum, cortex thickness, and diaphysis of the femur showed highly significant decreases ($p < 0.0001$) when comparing the means between the study and control groups. Increased endochondral cartilage and dilation of medullar vessels were more frequent among cases ($p < 0.0001$).

Conclusions: hypervitaminosis A during pregnancy in Sprague Dawley rats reduces the size of the femur in offspring.

DeCS: VITAMIN A; HIPERVITAMINOSIS A; RATAS; BONES.

ABSTRACT

Introduction: the consumption in high doses of vitamin-A at a minimum teratogenic dose could be a possible cause of histological alterations of bones during intrauterine growth.

Objective: to assess the effect of hypervitaminosis A induced in rats on the long bones of offspring.

Method: an experimental study was conducted on pregnant Sprague Dawley rats: two groups with three animals each: negative control and cases with VA dose $50 \mu\text{g} / \text{g}$ during the first 16 days of pregnancy between September 2015 and

INTRODUCCIÓN

La vitamina A (VA, retinol) es un micronutriente esencial, que solamente puede obtenerse de la dieta, ya que ningún animal tiene la capacidad para la síntesis de novo. ⁽¹⁾ Cumple varias funciones en el organismo, pero su naturaleza liposoluble y su larga semivida biológica favorecen ciertos rasgos tóxicos. ⁽²⁾

Tanto su carencia como la hipervitaminosis A (HVA) constituyen problemas de salud. La HVA se está transformando en un problema clínico de frecuencia creciente y de alto riesgo en

diversos países desarrollados y no desarrollados, debido a la automedicación y al exceso de prescripción. ^(2, 3)

Con el interés actual en incrementar los estilos de vida saludables y la disponibilidad de la VA en alimentos y medicamentos, existe potencial para que la toxicidad por esta vitamina pueda volverse un problema en el transcurso de la vida. El consumo elevado de formas de retinol se puede proponer como una gran amenaza. ⁽⁴⁾

Se conoce que una de las funciones más importantes de la VA es el mantenimiento estructural y funcional de las células. Incluso en el hueso media numerosas funciones celulares, sin embargo, se ha reconocido por mucho tiempo que el aumento en los niveles de esta vitamina tiene efectos deletéreos en este componente del sistema osteomioarticular, produciendo aumento en la fragilidad del esqueleto. Y se ve más afectada la función osteoblástica, por lo que en una persona adulta puede causar fracturas espontáneas, y en los fetos afecta de manera significativa el desarrollo óseo. ^(5, 6)

A pesar de conocerse las malformaciones inducidas por HVA en los fetos, se describen muy pocos defectos óseos por esta causa, y son muy escasos además los estudios sobre las alteraciones tisulares del hueso que puedan presentarse en estos casos.

Al revisar la bibliografía sobre vitamina A y su relación con el crecimiento óseo en la vida prenatal y las alteraciones histológicas que puedan presentarse, se encontró que en Cuba y específicamente en Pinar del Río no se han realizado investigaciones experimentales relacionadas con la influencia que ejerce este micronutriente sobre la histología del hueso. Entonces ¿cómo contribuir al conocimiento y la integración básica clínica en la relación entre la hipervitaminosis A en el embarazo y las alteraciones tisulares del hueso?

El propósito de este trabajo ha sido evaluar si la Vitamina A en dosis mínima teratogénica en ratas Sprague Dawley

preñadas pudiera asociarse a alteraciones histológicas de los huesos largos de la descendencia.

MÉTODO

Se realizó un estudio de paradigma cuantitativo, experimental, prospectivo en el tiempo, transversal en la observación y determinaciones, de casos y controles en un modelo animal de ratas Sprague Dawley.

El estudio fue conducido y se rigió por lo establecido en la Guía de Buenas Prácticas para el Cuidado, Uso, y Reproducción de los Animales para la Experimentación del CENPALAB. ⁽⁷⁾

Todas las hembras fueron alojadas en grupos de tres por caja (cajas T2) y los machos a razón de dos por caja (cajas T3). Antes del apareamiento los machos fueron ubicados individualmente en cajas T2. Posterior al apareamiento, las hembras presuntamente preñadas, se alojaron a razón de una por caja (cajas T2) hasta el final del estudio. Todas las cajas son plásticas con tapa de rejilla (INPUD) y se ubicaron en estantes. Se mantuvieron con encamado de bagazo de caña desmeollado, esterilizado en autoclave (POT 01.01.05.003) en la Dirección de Animales Gnotobióticos de la institución previamente mencionada.

Para el estudio se utilizaron seis hembras que fueron seleccionadas y distribuidas aleatoriamente en los dos grupos de tratamiento, empleando el programa LABTOOLS, ⁽⁸⁾ constituidos cada uno de la siguiente manera: tres hembras preñadas en cada grupo. En el control no se suministró ninguna sustancia adicional a la dieta normal, y en el grupo experimental se suministró vitamina A (50 µg/g de peso corporal) desde el día cero hasta el día 16 de la gestación, una sola vez al día, a las 9:00 am.

Se sacrificaron todos los animales en el primer día de nacidos. Para ellos los mismos fueron narcotizados con éter dietílico.

Se tomaron los fémures derechos de todas las ratas, identificados por cada grupo de estudio. Los huesos fueron descalcificados en solución ácida Osteosof[®] alrededor de 15 días hasta su total reblandecimiento lo que permitió la preparación hística.

Para arrastrar todo el ácido descalcificador se trató el tejido con abundante agua y se comenzó la fijación en formalina tamponada al 12 % por no más de 24 horas, más tarde se trataron con alcoholes a concentraciones crecientes, se aclararon con xilol para procesarlos por el método de inclusión en parafina y al final obtener los cortes hísticos mediante micrótopo con cuchilla de acero. Los portaobjetos de vidrio con el tejido fueron teñidos mediante la técnica de rutina de hematoxilina/eosina.

Una vez teñidas, fueron observadas mediante microscopía óptica de campo brillante.

La morfometría se realizó en los portaobjetos de vidrio que contenían el corte de hueso descalcificado, y teñido con hematoxilina y eosina. Los cortes se examinaron con un microscopio óptico MOTIC y se realizaron fotos a 40x con la cámara digital MOTICAM 3, conectado a un ordenador para la recogida de estas imágenes, utilizando el software MOTIC para análisis morfométrico de las imágenes a una magnificación de 2500 y cámara de 3MP entre 2048 x 1536 píxeles.

Se realizaron cortes longitudinales en los fémures derechos de todas las ratas estudiadas y en el punto medio de las diáfisis se midió el grosor del periostio, endostio, cortical y grosor total de la diáfisis. Se buscó el punto de mayor grosor a razón de una medición por fémur derecho de la rata recién nacida.

Las variables utilizadas fueron:

Cuantitativas: grosor del periostio, de la cortical, del endostio, y el grosor total de la diáfisis, medidas en μm .

Cualitativas: Prominencia o no del cartílago metafisario y dilatación o no de los vasos medulares.

Las variables cualitativas fueron resumidas mediante frecuencias absolutas y relativas porcentuales, Las cuantitativas, además, mediante la media y la desviación estándar, y en caso de no normalidad mediante la mediana y el intervalo intercuartílico.

Las medias se compararon mediante la prueba de la T de Student previa verificación de homocedasticidad con la prueba F de Levene. De no resultar homocedásticas se empleó la prueba T'. Las frecuencias se compararon mediante la prueba de X^2 y se utilizó la prueba de Odds ratio para mediar la fuerza de la asociación entre las variables en consideración en casos y controles. En todos los casos el nivel de confianza fue del 95 %.

El ensayo fue conducido y se rigió por lo establecido en la Guía de Buenas Prácticas para el Cuidado, Uso, y Reproducción de los Animales para la Experimentación según las normas del CENPALAB ⁽⁷⁾, así como la realización de la eutanasia en animales de experimentación.

RESULTADOS

Tanto el grosor del periostio, como el del endostio, de la cortical y el diámetro de la diáfisis del fémur mostraron diferencias altamente significativas en la comparación de medias entre los grupos de tratamiento. (tabla 1)

Tabla 1. Resumen de las variables cuantitativas en casos (madres tratadas con Vitamina A) y controles (sin tratamiento) en crías de ratas Sprague Dawley.

Variable	Casos (media y DS) n ₁ =12		Controles (media y DS) n ₂ =12		Prueba F p=0,192	Prueba T T= 18,08; gl=22; p=0,000
	Media	DS	Media	DS		
Grosor del periostio en μm	1,19	0,299	3,14	0,224	1,813; p=0,192	T= 18,08; gl=22; p=0,000
Grosor del endostio en μm	0,06	0,019	0,90	0,253	15,894 p<0,001	T'=11,518 gl=11,1 p=0,000
Grosor de la cortical en μm	54,01	3,052	86,22	2,602	0,22 p=0,644	T=27,827 gl=22; p=0,000
Diámetro de la diáfisis en mm	1,614	0,129	2,071	0,114	0,988 P=0,331	T=9,176 gl=22; p=0,000

Fuente: Base de datos.

Esas diferencias entre casos y controles se pueden expresar de la siguiente manera:

El intervalo de confianza al 95 % de certeza de las diferencias de medias para el grosor del periostio resultó en: -2.174 a -1.726 μm , indicando que siempre en los casos tratados con vitamina A hubo una reducción del grosor significativo de esta variable. Para el grosor del endostio la diferencia de medias mediante la prueba T', al ser diferentes las varianzas, resultó en -1.005 a -0.683 μm , también altamente significativa. Para el grosor de la cortical la diferencia de medias resultó en un intervalo de confianza de -34.618 a -29.816 μm , también altamente significativa. El intervalo de confianza de la diferencia de medias para el diámetro de la diáfisis resultó también altamente significativo: desde -0.559 a -0.353 μm .

Con relación a las dos variables cualitativas consideradas y estudiadas en casos y controles se encontró significación estadística para ambas, y mientras el cartílago era más prominente entre los casos por 6,75 veces superior que en los controles, la dilatación resultaba 9,00 veces superior entre los casos. (Tabla 2)

Tabla 2. Frecuencia de ratas recién nacidas por prominencia del cartílago endocondral y dilatación de vasos sanguíneos medulares en casos y controles.

Variable	Casos (n1=12)		Controles (n2=12)		X ²	p	OR	IC 95%
	No.	%	No.	%				
Prominencia del cartílago endocondral	9	75	4	33,3	4,19	0,04	6,75	1,16-39,20
Dilatación de vasos sanguíneos medulares	9	75	3	25	6,00	0,01	9,00	1,42-57,12

Fuente: base de datos

DISCUSIÓN

En el análisis de los datos obtenidos se encontró que los fémures de las ratas estudiadas mostraron diferencias significativas en las medidas relacionadas con el grosor del periostio, grosor del endostio, grosor de la cortical y grosor total de la diáfisis entre casos y controles.

Se comprobó que las crías de las ratas (grupo de casos) mostraron una reducción altamente significativa del grosor del periostio. Este resultado tiene relación con los del estudio del efecto de los retinoides en la resorción de los huesos del cráneo de ratones neonatos y se confirman los efectos de la vitamina A y sus derivados, como el ácido retinoico, en el periostio de los huesos y sugieren que esto es un estímulo para la formación de los osteoclastos, como ocurre en el esqueleto humano. ⁽⁹⁾

En otros modelos de roedores han sido identificados receptores para el ácido retinoico tanto en los osteoclastos como en los osteoblastos, y se ha comprobado la acción inhibitoria del ácido retinoico sobre los osteoblastos. Se plantea que la vitamina A deprime la actividad osteoblástica. ^(10, 11)

Pensamos entonces que la afectación en la formación del periostio en nuestros casos está evidenciada por la disminución del grosor del periostio, lo que puede estar sustentado por estudios del periostio de fémures y tibias donde se fundamenta como en el grosor del mismo influye directamente el espesor y la celularidad de la capa de cambio del periostio donde las células osteoprogenitoras de las que derivan los osteoblastos juegan un papel protagónico. ⁽¹²⁾

En el estudio morfométrico de los fémures se observa que el grosor de la cortical de los casos disminuyó significativamente (tabla 1). Estos resultados coinciden con los de otros estudios que describen los cambios que ocurren en el esqueleto debido a la hipervitaminosis A en los animales experimentales, donde es característico el adelgazamiento de la corteza de la diáfisis de los huesos largos y una frecuencia aumentada de fractura. ⁽¹⁰⁾

Los estudios en animales han revelado que el ácido del retinoico suprime la actividad del osteoblasto, estimula la formación del osteoclasto, y se opone a la habilidad de vitamina D para mantener las concentraciones de calcio de suero normales. ⁽¹³⁾

Al estudiar el efecto de una dieta rica en VA sobre los huesos se encuentra alteración de las dimensiones de los mismos en ratas jóvenes en las que produce una reducción en el espesor del hueso cortical. Estos resultados son consistentes con la literatura actual donde hay otras situaciones, por ejemplo, la influencia de la Vitamina A durante el desarrollo fetal donde los resultados son similares. ^(13, 14) Así se ha indicado que una alta ingestión de vitamina A tiene efecto directo, inhibiendo la formación de hueso. ^(8, 15)

Se puede justificar entonces los resultados obtenidos, ya que concuerdan con el estudio histomorfométrico del hueso diafisario realizado en ratas, donde se demuestra cómo el endostio presenta una alta capacidad formativa ósea en los primeros 45 días de vida de las mismas. Al disminuir en nuestro experimento el

grosor del endosito, se ve afectada entonces de manera directa la formación del hueso descrita en los casos de HVA. ⁽¹⁵⁾

En nuestro estudio el grosor total de la diáfisis de los fémures también mostró diferencias altamente significativas (tabla 1), lo que pudiera estar sustentado en la literatura cuando se plantea que los huesos se adelgazan y se tornan frágiles, que aumenta la acción osteoclástica y disminución de la acción osteoblástica en los casos de hipervitaminosis A. ^(8, 10) Otros investigadores han demostrado la reducción característica del diámetro de los huesos largos y su relación con la disminución de la fuerza biomecánica que ejerce el hueso, pero el estudio fue realizado en ratas maduras. ⁽¹²⁾

Relacionada con esta variable estudiada, la investigación histomorfométrica referida anteriormente ⁽¹⁴⁾ nos ayuda a explicar lo sucedido con la disminución en los casos del grosor total de la diáfisis, pues el crecimiento en anchura de un hueso largo se debe principalmente a la formación subperióstica de hueso nuevo comenzando antes del nacimiento y continuando a lo largo de la vida, estando afectada en nuestra investigación la superficie perióstica que tiene una actividad directa en la formación del hueso.

La valoración histológica ayudó a determinar la prominencia del cartílago metafisario, la cual fue observada en un 75% de los casos (tabla 2), mientras que en el grupo control este resultado fue significativamente menos frecuente.

El hueso se forma por dos mecanismos: osificación intramembranosa y osificación endocondral. El crecimiento longitudinal es por osificación endocondral. Se produce a partir del cartílago de crecimiento, que va desde una zona de reposo, donde se forman las células madre, hasta una zona de cartílago calcificado, pasando por la multiplicación e hipertrofia de las células proliferantes. En estudios en animales jóvenes con cojera se describe la osteopatía hipertrófica por HVA; en los animales en crecimiento se plantea retraso del crecimiento por detención de la proliferación condrocitaria en el seno del

cartílago de crecimiento.⁽¹¹⁾ Sin embargo, en nuestro estudio, lo que ha ocurrido es retraso de la mineralización del ese cartílago y la formación concomitante de hueso.

Según estos estudios se puede pensar que nuestros resultados son compatibles con los mismos, ya que en los casos donde se precisa la prominencia del cartílago puede estar retardada o reducida la osificación, lo cual podía traer consecuencias futuras para estos animales.

En cuanto a la dilatación de los vasos sanguíneos medulares, que fue nueve veces más frecuente entre los casos (tabla 2), no hay explicación plausible.

En las revisiones realizadas sobre los mecanismos moleculares que se desencadenan en el hueso en la HVA fue posible identificar que esta parece tener efectos diferentes en la expresión de genes de hipoxia en la médula del hueso, comparado con las células en el hueso cortical; describen como a nivel de la médula se identifica mayor hipoxia y señales de flujo sanguíneo dañado, por lo que puede ser relacionado nuestro resultado con lo planteado por estos autores.⁽¹⁵⁾

Se concluye que la vitamina A ingerida en la etapa de organogénesis a una dosis mínima teratogénica produce disminución significativa del grosor del periostio, de la cortical, del endostio y disminución el grosor total de la diáfisis de los fémures de crías de ratas Sprague Dawley. Además, se presentan alteraciones también significativas de los componentes tisulares del hueso por la presencia de cartílago metafisario prominente y dilatación de vasos o disminución de la cavidad medular, lo que afecta el crecimiento óseo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Beijer MR, Kraal G, den Haan JM. Vitamin A and dendritic cell differentiation. *Immunology* [internet]. 2014 May [citado 2017 jun 12];142(1):39-45. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3992046/>
2. Mahassni S, Al-Shaikh N. Effects of vitamin A overdose on rat's organs involved in immunity and vitamin A storage. *Acta Alimentaria* [internet]. 2014 [citado 2017 jun 12]; 43(3):452-8. Disponible en: <http://akademai.com/doi/pdf/10.1556/AAlim.43.2014.3.12>
3. Elshama SS, Osman HE, El-Kenawy AM, Youseef HM. Comparison between the protective effects of vitamin K and vitamin A on the modulation of hypervitaminosis D3 short-term toxicity in adult albino rats. *Turk J Med Sci* [internet]. 2016 Feb [citado 2017 jun 12];46(2):524-38. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27511521>
4. Sempere Manuel M, Sintés Marco MA, Roth Damas P. Abordaje del embarazo en Atención Primaria y uso de medicamentos en el embarazo. *Fml* [internet]. 2016 [citado 2017 jun 12]; 20(3):3. Disponible en: <http://www.revistafml.es/articulo/333/abordaje-del-embarazo-en-atencion-primaria-y-uso-de-medicamentos-en-el-embarazo/>
5. Azimpour S, Mortazavi P. Clinical and pathological findings in experimental hypervitaminosis A in newborn lambs. *Comparative Clinical Pathology* [internet]. 2013 [citado 2017 jun 12]; 22(5):941-6. Disponible en: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs00580-012-1504-8.pdf>

6. Jang H-J, Ha B-K, Zhou J, Ahn J, Yoon S-H, Kim S-W. Selective Retinol Production by Modulating the Composition of Retinoids From Metabolically Engineered. *Biotechnology and Bioengineering*. 2015;112(8). Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.25577/full>
7. CENPALAB. Manual de Procedimientos Operacionales de Trabajo. Edición 01/0.
8. Azimpour S, Mortazavi P. Clinical and pathological findings in experimental hypervitaminosis A in newborn lambs. *Comparative Clinical Pathology* [internet]. 2013 [citado 2017 jun 12]; 22(5):941-6. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00580-012-1504-8>
9. Conaway HH, Pirhayati A, Persson E, Pettersson U, Svensson O, Lindholm C, et al. Retinoids Stimulate Periosteal Bone Resorption by Enhancing the Protein RANKL, a Response Inhibited by Monomeric Glucocorticoid Receptor. *J Biol Chem*. 2011;286(36):31425-36 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3173101/>
10. Dai Z, Wang R, Ang LW, Low YL, Yuan JM, Koh WP. Protective effects of dietary carotenoids on risk of hip fracture in men: The Singapore Chinese Health Study. *J Bone Miner Res*. 2014;29(2):408-17. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbmr.2041/full>
11. Durán AJ. Diagnóstico de cojeras (II). Cojeras en perros jóvenes. Instituto Veterinario de Ortopedia y Traumatología [internet]. 2015 [citado 2017 sept 4]. Disponible en: http://www.traumatologiveterinaria.com/divulgacion/015_03.php
12. Moore SR, Milz M, Knothe Tate ML. Periosteal thickness and cellularity in mid-diaphyseal cross-sections from human femora and tibiae of aged donors. *J Anat* [internet]. 2014 [citado 2017 sept 4]; 224(2). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3969058/>
13. Conaway H, Henning P, Lerner UH. Vitamin a metabolism, action, and role in skeletal homeostasis. *Endocr Rev* [internet]. 2013 Dec [citado 2017 jun 12];34(6):766-97. Disponible en: <https://academic.oup.com/edrv/article-lookup/doi/10.1210/er.2012-1071>
14. Wray AE, Okita N, Ross C. Cortical and Trabecular Bone, Bone Mineral Density, and Resistance to ex Vivo Fracture Are Not Altered in Response to Life-Long Vitamin A Supplementation in Aging Rats. *J Nutr*. 2011;141(4):660-6. Disponible en: <http://jn.nutrition.org/content/141/4/660.long>
15. Henning P, Conaway H, Lerner UH. Retinoid Receptors in Bone and Their Role in Bone Remodeling. *Front Endocrinol*. 2015;6:31. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2015.00031/full>



Rayza Hernández Díaz: Médica. Especialista en Medicina General Integral y en Histología. Profesora Asistente. Facultad de Ciencias Médicas de Pinar del Río. Cuba. ***Si usted desea contactar con el autor de la investigación hágalo aquí***