

Núcleo de Pesquisa e Extensão (Nupex)

Curso: Medicina

Equipe:

Professor coordenador/orientador: Marina Suênia de Araújo Vilar

Professores pesquisadores: Tharcia Kiara B. de Oliveira

Thiago de Oliveira Assis

Maricelma Ribeiro Moraes

Alunos: Arthur Vitoriano de Farias

Daniel Brasil Araújo Nicolletti

Flávio Paccelli Silva Sento Sé

Huggo Luãn Barros Medeiros

Paulo Cícero Macedo

IMPACTO DA AÇÃO DA ISOTRETINOÍNA NO DESENVOLVIMENTO ÓSSEO EM RATOS WISTAR

Relatório de Pesquisa

Campina Grande, PB

2012

MARINA SUÊNIA DE ARAÚJO VILAR
MARICELMA RIBEIRO MORAIS
THARCIA KIARA B. DE OLIVEIRA
THIAGO DE OLIVEIRA ASSIS

IMPACTO DA AÇÃO DA ISOTRETINOÍNA NO DESENVOLVIMENTO ÓSSEO EM RATOS WISTAR

Relatório de pesquisa apresentado ao Núcleo de Pesquisa e de Extensão (Nupex) do Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento (Cesed) de acordo com o que preconiza o regulamento.

Campina Grande, PB

2012

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
1.1	Identificação do foco e problemática da pesquisa.....	8
1.4	Objetivos.....	8
1.5	Justificativa.....	9
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	9
3	METODOLOGIA	13
3.1	Tipo de Estudo.....	13
3.2	Animais.....	13
3.3	Delineamento Experimental.....	13
3.4	Análise dos Dados	14
3.5	Considerações Bioéticas.....	15
4	RESULTADOS	15
5	CONCLUSÕES	16
6	REFERÊNCIAS	18

RESUMO

A isotretinoína é uma droga de ação teratogênica utilizada no tratamento da acne vulgar por causar a redução no tamanho das glândulas sebáceas e ainda normalizando a queratina na abertura do folículo piloso. Relatos indicam que o uso desse fármaco está envolvido com malformações ósseas. Objetivou-se nessa pesquisa analisar as consequências do uso da isotretinoína sobre o processo de ossificação endocondral, de jovens ratos Wistar machos submetidos à ingestão oral de uma dose de 8mg/kg/dia dessa medicação, do 17º ao 30º dia de vida. A amostra, composta por 20 espécimes foi randomizada e distribuída entre o Grupo Controle (recebendo apenas óleo vegetal, com n=10) e o Grupo Experimento (recebendo a isotretinoína diluída em óleo vegetal, com n=10). Ao fim da administração os animais foram eutanasiados e os fêmures foram coletados, dissecados e realizados cortes para a confecção das lâminas histológicas coradas pela técnica da Hematoxilina-Eosina. A análise microscópica do material permitiu verificar uma redução da população de células no canal celular e na epífise óssea, má definição e redução do espessamento do periósteo e áreas mal definidas no processo de osteogênese no Grupo Experimento em relação ao Grupo Controle. Nesse sentido, com base nos resultados, foi possível concluir que houve um retardo no processo de ossificação do grupo submetido ao tratamento com isotretinoína, vindo a alentar as suspeitas de estudos anteriores onde se relatou as malformações ósseas decorrentes do uso desse fármaco.

Palavras-Chave: Isotretinoína. Osteogênese. Teratógeno.

1 INTRODUÇÃO

A Isotretinoína é o ácido 13-cis retinóico, medicação pertencente à família dos retinóides que tem ação queratolítica, esfoliante, sebonormalizadora e antibacteriana. Sua ação leva a atrofia das glândulas sebáceas diminuindo a oleosidade da pele, além de diminuir a resposta inflamatória perante a infecção bacteriana comum pelo *P. carini*, sendo a medicação de eleição para o tratamento de acne de graus elevados. Contudo, esta medicação pode apresentar efeitos colaterais indesejados como alteração das enzimas hepáticas (fígado) causando uma hepatite medicamentosa e riscos de más formações fetais em grávidas. Outras alterações decorrentes desta medicação são: dores musculares, dores articulares, cefaléia, prisão de ventre, depressão, aumento do colesterol e triglicérides e diminuição das células brancas de defesa do sangue tornando o paciente suscetível à candidíases e outras afecções devido à baixa imunidade corporal. Além disso, o uso dessa medicação durante a gravidez está relacionado a relatos de malformações congênitas, entre elas defeitos neurológicos, cardíacos e esqueléticos.

No que diz respeito às desordens ósseas, diversos estudos relatam sua aparição em decorrência do emprego da isotretinoína na terapêutica da acne grave, porém algumas divergências existem em relação a sua atuação, no sentido de que alguns pesquisadores acreditam que esta substância possa ser propiciadora da aceleração e da formação óssea, enquanto outros a caracterizam como inibidora do processo de ossificação, não havendo esclarecimentos sobre os mecanismos pelos quais a isotretinoína intervêm no metabolismo ósseo.

Isotretinoína (ácido 13-cis-retinóico da família dos retinóicos) é um análogo sintético da vitamina A. Fármaco que possui ação teratogênica quando do uso na gravidez. É bastante utilizada no tratamento da acne vulgar, uma doença inflamatória da pele, cuja frequência é maior na adolescência, quando o nível elevado de hormônios sexuais causa o aumento da secreção de sebo pelas glândulas sebáceas provocando as erupções cutâneas características principalmente no rosto, costas, peito e ombros.

Quando a acne alcança os graus III e IV, uma das opções de tratamento é a isotretinoína que reduz o tamanho das glândulas sebáceas e ainda normaliza a queratina na abertura do folículo piloso.

Alguns relatos sugerem que o uso desse fármaco, mesmo que durante o desenvolvimento fetal, pode gerar disfunções importantes no desenvolvimento ósseo fetal.

1.1 Identificação do foco e problemática da pesquisa:

Esta pesquisa focaliza as consequências que o uso da isotretinoína poderá trazer para com o desenvolvimento dos ossos do feto cujas mães foram submetidas ao tratamento contendo esse fármaco.

Problema: Quais as consequências para o desenvolvimento ósseo de fetos de ratos Wistar cujas mães foram submetidas ao tratamento farmacológico com a isotretinoína?

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Estudar o impacto da ação da isotretinoína no desenvolvimento ósseo em ratos Wistar.

1.2.2 Objetivos específicos

- a) Identificar as possíveis alterações histológicas no processo de ossificação endocondral na mandíbula de fetos de ratos Wistar cujas mães foram submetidas ao tratamento farmacológico com a isotretinoína.

- b) Identificar as possíveis alterações histológicas no processo de ossificação intramembranosa no parietal de fetos ratos Wistar cujas mães foram submetidas ao tratamento farmacológico com a isotretinoína.
- c) Comparar as possíveis alterações histológicas nos processos de ossificação intramembranosa e endocondrais com seus respectivos controles.

1.3 Justificativa

É conhecido o potencial teratogênico que a isotretinoína pode provocar em fetos de ratos bem como de seres humanos, por isso é um fármaco de uso proibido durante o período gestacional. Porém, as informações na comunidade científica acerca dos seus efeitos sobre o desenvolvimento ósseo ainda são escassos, embora, alguns relatos de caso tenham apontado para uma desordem no processo de formação óssea.

Os resultados desse estudo, ao indicar se a isotretinoína traz alterações morfológicas importantes durante os estágios de maior sensibilidade na formação óssea e indicar quais são os tipos de alterações, poderão melhorar, assim, o entendimento do fenômeno e favorecer o desenvolvimento de medidas profiláticas que, posteriormente, poderão ser adotadas para uma conscientização da sua população consumidora.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A vitamina A é um nutriente essencial para o homem e a sua deficiência além de provocar alterações oculares (xerofthalmia e cegueira nutricional) pode causar retardo de crescimento e aumento da susceptibilidade a infecções.

Aliás, uma evidente função de tal substância é como um grande composto de proteínas presente nos olhos (chamadas Rhodopsin) que reagem à luz e tornam a visão possível.

Com efeito, pesquisas publicaram a importância da suplementação dessa vitamina para combater a morbidade infantil nos casos de deficiência desta, reduzindo

significativamente a diarreia¹ e melhorando o crescimento infantil.²

Nesse sentido, a vitamina A, também conhecida como retinol, apresenta diversos análogos estruturais, tanto naturais como sintéticos, denominados retinóides e que estão relacionados com o crescimento e diferenciação de vários tipos celulares durante o desenvolvimento fetal e também ao longo da vida.

Assim sendo, os retinóides são usados para uma diversidade de afecções dermatológicas devido as suas ações contra dermatoses inflamatórias e ceratóticas³, além de inibir a queratinização.

Entre as doenças dermatológicas em que os retinóides possuem aplicabilidade destacam-se a psoríase⁴ (destacando-se como droga de excelência a acitretina⁵), a ictiose e a acne, que são doenças características de crianças e adolescentes, sendo uma preocupação para a dermatologia pediátrica⁶, além da seborréia, por reduzir o tamanho das glândulas sebáceas (em até 90%) e suprimir a produção de sebo.⁷

Ademais, relatos mostram que além das doenças da pele, os retinóides têm ação na prevenção e na terapia em oncologia. A saber, estudos clínicos revelaram certo grau de eficácia na prevenção de carcinomas basocelulares, espinocelulares, tumores superficiais de bexiga e tumores primários e secundários, e pacientes com carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço, com a utilização de isotretinoína e etretinato.⁸ De forma análoga, outro estudo aponta a ação anti-câncer do retinóide acetato de retinil atribuída a sua característica de imunoproteção.⁹

Em síntese, os principais retinóides de uso terapêutico são a tretinoína (ácido retinóico), a isotretinoína (ácido 13-cis retinóico) e o etretinato, contudo, apesar dos efeitos adversos, a isotretinoína continua a ser o principal fármaco para o tratamento de acne cística severa, devido aos seus altos índices de eficácia.^{10, 11}

Em outras palavras, a isotretinoína sistêmica continua a ser a forma de terapêutica mais enérgica e efetiva para a acne grave, e seu mecanismo de ação envolve a redução da produção de sebo e atuação antiinflamatória.¹²

Por conseguinte, estudos reafirmam os bons resultados do tratamento com a isotretinoína. Em um deles, uma amostra de 22 homens e 58 mulheres com acne grave, após tratamento com esse retinóico, obteve-se uma redução da acne em 88% dos pacientes.¹³ Pesquisa semelhante, ocorrida no Oriente Médio, apresentou

excelente resposta ao tratamento em 90,4% dos casos.¹⁴ Como também, em outro ensaio, a resposta ao tratamento foi muito boa em 62,8% dos casos e boa em 31,9%, havendo apenas um resultado não satisfatório.¹⁵

Porém, apesar dos enormes benefícios preventivos e terapêuticos, os retinóides também se destacam pelo seu enorme potencial teratogênico. Nesse sentido, existem regras de prescrição que devem ser seguidas à risca, para evitar a exposição durante a gestação, havendo necessidade de uma cooperação entre as mulheres e seus médicos, no que diz respeito à seleção de pacientes, aconselhamento contraceptivo minucioso, acompanhamento e inclusive a realização de testes de gravidez antes do início do tratamento.¹⁶

Para tal, um estudo revela que a contracepção oral com uma formulação estrógeno-progestágeno é o método contraceptivo de escolha para as mulheres em tratamento com retinóides, mas o dispositivo intra-uterino (DIU) é de pouca relevância ou quase nenhuma para mulheres jovens em terapêutica.¹⁷

Haja vista esse potencial teratogênico dos diversos tipos de retinóides, um estudo elaborou a seguinte ordem de classificação de toxicidade: tretinoína > etretinato > acitretina > isotretinoína > N-(4-hidroxifenil)-retinamida > N-tetrazol-5-ylretinamida = N-butylretinamida > N-ethylretinamida = 13-cisN-ethylretinamida,¹⁸ e um segundo estudo reafirmou, comparando a tretinoína com a isotretinoína, que este foi de 4 a 8 vezes menos teratogênico que o primeiro.¹⁹

Entretanto, apesar da isotretinoína ter sido considerada menos tóxica que outros retinóides, aproximadamente 35% das crianças cujas mães tiveram contato com a isotretinoína durante a gravidez apresentam ao nascimento alterações cardíacas craniofaciais, neurológicas e tímicas.²⁰⁻²³

Em se tratando das alterações ósseas, só para ilustrar, pesquisadores já indicaram que a ingestão de quantidades elevadas de vitamina A está associada com a osteoporose^{24, 25} e o risco aumentado de fraturas de quadril em mulheres pós-menopausa.²⁶ Além disso, os riscos de fraturas mostraram-se maior quando a concentração sérica de retinol está aumentada.²⁷

Mesmo em larvas de peixes, uma revisão bibliográfica sobre os componentes nutricionais que influenciam o desenvolvimento esquelético informou que a alta na dieta de vitamina A aumenta a incidência de deformidades ósseas, como a curvatura

vertebral, fusão central e compressão de vértebra.²⁸ Bem como, uma distinta apreciação também avaliou o efeito da Hipervitaminose A sobre os ossos e observou retardo do crescimento, fraqueza e fraturas espontâneas dos membros dos ratos do grupo experimental.²⁹

Outrossim, no que tange aos retinóides de forma geral, seus efeitos sobre a estrutura óssea incluem calcificação progressiva dos ligamentos e inserções do tendão, fusão prematura das epífises, anormalidades na modelagem dos ossos longos,³⁰ e também pode estar relacionada com a formação progressiva de pequenos esporões na coluna vertebral.³¹

Do mesmo modo, sendo o ácido 13-cis-retinóico o retinóide de maior uso terapêutico, despertou-se o interesse de estudiosos sobre seus efeitos adversos. Dessa maneira, diversas pesquisas em humanos analisaram e relataram seus efeitos sobre os ossos, entre eles a osteofitose bilateral do osso nasal,³² hiperostose do esqueleto apendicular e axial, principalmente da coluna vertebral,³³⁻³⁶ perda da densidade óssea,³⁷ aumento da reabsorção óssea em pacientes com deficiência de vitamina D,³⁸ inibição da remodelagem óssea,³⁹ anomalias do osso temporal e dos ossículos do ouvido médio,^{40, 41} como também, em ratos, foi verificada a aceleração no processo de reparo de defeitos ósseo em calota craniana.⁴²

Em suma, a gênese do tecido ósseo é bastante susceptível a interferências, visto que é um processo complexo, delicadamente controlado, e que resulta em cristais mineralizados rico em matriz orgânica composta de colágeno. A saber, os ossos longos se ossificam por um método endocondral, em que células derivadas do mesoderma se diferenciam em condroblastos constituindo um molde cartilaginoso, que posteriormente se mineraliza, ocorrendo a morte dos condrócitos e as células mesenquimais circundantes se diferenciam em osteoblastos secretores de matriz óssea sobre a cartilagem subjacente.⁴³

Dessa forma, sabendo-se do evidente potencial teratogênico da isotretinoína, das implicações desse fármaco sobre os ossos, e do delicado processo de ossificação endocondral, apesar dos diversos relatos macroscópicos de alterações ósseas induzidas por esse fármaco, objetivou-se analisar histologicamente o impacto da isotretinoína na osteogênese de ossos longos.

3 METODOLOGIA

3.1 Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo exploratório, experimental e comparativo.

3.2 Animais

Foram utilizadas 10 ratas albinas primíparas da linhagem *Wistar* (250-300g) e suas descendências (compostas por 20 ratos machos), provenientes da colônia de criação do biotério da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande - FCMCG. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno com dimensão de 430x430x200 mm (CxLxA) num ambiente com temperatura de 23 ± 1 °C, num ciclo de luz/escuridão (12 h) e tiveram livre acesso à água filtrada. Os animais foram acasalados na proporção de 1 macho para 3 fêmeas e o estado de prenhez foi determinado através da observação da presença de espermatozóides na secreção vaginal.

As ratas tiveram sua gestação fluindo normalmente sem nenhuma interferência e sem ingestão do medicamento em estudo, ocorrendo os partos normais por volta do 21º dia de gestação, sendo verificada apenas a data exata do nascimento dos filhotes.

3.3 Delineamento experimental

Experimento – Impacto teratogênico da isotretinoína no desenvolvimento ósseo endocondral em fetos de ratos Wistar.

A partir da prole das 10 ratas prenhas originou-se aleatoriamente o Grupo Controle (n=10) e o grupo experimental (n=10). A partir do 17º dia de vida, no Laboratório de Farmacologia e Bioquímica da FCMCG, foi administrada uma dose 8mg/kg/dia de isotretinoína diluída em óleo vegetal no Grupo Experimento e óleo vegetal sem a isotretinoína no Grupo Controle. No 30º dia de vida das proles, os animais foram sacrificados por aprofundamento de anestesia sob a resolução 714 de

Medicina Veterinária, e seus fêmures dissecados e fixados em formol a 10% para futura análise histológica. A pesquisa seguiu com a análise histológica dos fêmures previamente dissecados e a montagem das lâminas para leitura microscópica se deu da seguinte forma:

- Fixação em formol a 10%;
- Inclusão: processamento em 3 etapas:
 - 1) Desidratação: banhos de álcool a 70%, 80%, 90% e 3 banhos de álcool 100%;
 - 2) Diafanização: 3 banhos de xilol;
 - 3) Impregnação: 2 banhos de parafina a 60°C em histotécnico e preparação dos blocos com tecido impregnado por parafina para dar consistência;
- Microtomia: corte dos blocos em micrótomo a cinco micras, não havendo a necessidade da descalcificação prévia dos fêmures em virtude da consistência não rígida e da pequena espessura do material;
- “Pescaria”: os cortes dos blocos foram colocados em banho-maria e “pescados” pelas lâminas de vidro;
- Coloração pela técnica hematoxilina-eosina;
- Montagem final das lâminas: foi depositada uma gota de resina líquida sobre o corte aderido à lâmina de vidro e coberto com uma lamínula.

Assim que as lâminas foram finalizadas e catalogadas, realizou-se uma análise qualitativa dos focos da osteogênese.

3.4 Análise dos dados

Foi realizada uma análise qualitativa dos focos da osteogênese e/ou condrogênese dos grupos estudados, com a identificação de elementos morfológicos que possam avaliar o potencial teratogênico da isotretinoína, no Laboratório de Histologia e Embriologia da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande - FCMCG. Para isso foi comparado os achados do grupo experimental para com os do grupo controle.

3.5 Considerações bioéticas

Os procedimentos adotados no manejo dos animais seguiram as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA (BRASIL, 1979).

O projeto foi enviado ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências médicas de Campina Grande para apreciação e seu início ocorreu após sua aprovação.

4 RESULTADOS

O processo de confecção e análise das lâminas histológicas foi realizado com altos padrões de qualidade, sem nenhum prejuízo ou dano aos fêmures que foram estudados, não apresentando assim nenhum empecilho que pudesse interferir na leitura das lâminas, dificultando ou modificando a interpretação.

Para fim de estudo qualitativo o material dos grupos controle e experimento foram analisadas apresentando os resultados dispostos no Quadro 1, apresentado na página seguinte.

O processo de confecção e análise das lâminas histológicas foi realizado com altos padrões de qualidade e para fim de estudo qualitativo foi selecionada aleatoriamente uma espécime do Grupo Controle e uma espécime do Grupo Experimento cujo material apresentou os seguintes resultados:

Quadro 1: Aspectos morfológicos dos fêmures cujos ratos foram submetidos à isotretinoína diluída em óleo vegetal (Grupo Experimento) e à somente óleo vegetal, sem isotretinoína (Grupo Controle).

Grupo Controle	Grupo Experimento
A diáfise mostra células típicas no canal medular, osteóide densamente corada, característico de bom depósito de fibras conjuntivas;	A diáfise apresenta-se pálida, canal medular com população celular menor que o grupo controle;
Perióstio bem definido;	Perióstio mal definido e quando visualizado, menos espesso que no grupo controle
Cartilagem epifisária bem definida e apresentando o molde de condrócitos característico;	Cartilagem epifisária sem alterações aparente
Epífise bem definida com presença de células típicas do processo de ossificação endocondral;	Epífise mal definida com redução aparente na população de células em relação ao grupo controle
Apresenta áreas bem definidas do processo de osteogênese.	Apresenta áreas mal definidas no processo de osteogênese.

Fonte: Dados da pesquisa

5 CONCLUSÕES

O processo de mineralização óssea sucede como resultado da interação rigorosamente comandada, entre a ingestão e absorção de cálcio alimentar, a síntese mineral e remodelamento ósseo. Esse controle homeostático é intercedido pelo hormônio da paratireóide, a produção de vitamina D, os níveis séricos de cálcio e ativação dos osteoblastos.

Diversas malformações e/ou perturbações no aparelho ósseo decorrem de desequilíbrios nesse mecanismo de regulação, seja por alterações fisiopatológicas desses mediadores da homeostasia ou por ação de substâncias que exercem influência direta ou indiretamente sobre essa maquinaria.

Nesse sentido, distintos retinóides têm sido encontrados em uma abundância

de sistemas de desenvolvimento, incluindo ossos e cartilagens, pulmões e pele, onde cumprem uma função crucial na padronização, proliferação e diferenciação celular.^{45, 46}

Inclusive, a suplementação de vitamina A vem sendo utilizada no sentido de combater a mortalidade e melhorar os índices de crescimento infantil, em populações de risco.²

Dessa forma, pesquisadores já mostraram que os retinóides exercem certa influência sobre o metabolismo ósseo, e no que diz respeito às desordens osteo-locomotoras, múltiplos estudos relatam sua aparição em decorrência do emprego da isotretinoína na terapêutica da acne grave.

Ainda que o desenvolvimento ósseo normal exija níveis adequados de vitamina A, animais alimentados com excesso dessa vitamina ou retinóides sintéticos têm remodelagem óssea modificada, o que leva ao crescimento pobre do osso, radiolucidez, perda de conteúdo mineral e fraturas espontâneas.

De tal modo, as múltiplas publicações a cerca da relação entre a isotretinoína e o sistema esquelético sempre relataram os aspectos negativos dessa interação, principalmente no que diz respeito à exacerbação da dosagem da droga e sua utilização em fases críticas como o período gestacional e a idade infantil, onde está ocorrendo a formação óssea.

Todavia, esse estudo procurou realizar uma análise mais minuciosa do impacto desse fármaco, no que tange a histologia óssea, procurando observar os aspectos celulares e a conformidade dos componentes microscópicos do grupo submetido ao tratamento com a isotretinoína em contraposição aos animais que receberam apenas placebo.

Assim, diante da apreciação dos resultados alcançados nessa pesquisa, o grupo experimental apresentou um retardo no processo de ossificação em relação ao grupo controle, caracterizado histologicamente por um retrocesso, mal delineamento, falta de definição e redução dos componentes teciduais do material em processo de formação óssea, salientando e reforçando as teorias que apontam para a ação da isotretinoína no sentido de inibir a osteogênese, sendo esta a causa das malformações ósseas resultante do tratamento com esse fármaco.

REFERÊNCIAS

1. ASSIS, A.M.O.; BARETO, M.L. Suplementação em vitamina A: impacto na morbidade e efeitos adversos. *Ver Bras Epidemiol*, 2002; 5(1):84-92;
2. WEST, K.P.; DJUNAEDI, E.; PANDJI, A.; TARWOTJO, I.; KUSDIONO; SOMMER, A. Vitamin A supplementation and growth: a randomized community trial. *Am J Clin Nutr*, 1988;48:1257-1264.
3. ROLEWSKI, S.L. Clinical review: Topical retinoids. *Dermatol Nurs*, 2003; 15:447-565.
4. BERBIS, P. Treatment with retinoids. *Rev Prat*, 1991; 41(22):2180-2181.
5. BRUN, P. Prescription of retinoids in psoriasis. *Rev Prat*, 2004; 54(1): 48-51.
6. RUIZ-MALDONADO, R.; TAMAYO-SANCHEZ, L.; OROZCO-COVARRUBIAS, M.L. The use of retinoids in the pediatric patient. *Dermatol Clin*, 1988; 16:553-569.
7. ORFANOS, C.; ZOUBOULIS, C. Oral retinoids in the treatment of seborrhoea and acne. *Dermatology*, 1998; 196: 140-147. 8. BOLLAG, W.; HOLNENER, E.E. retinoids in cancer prevention and therapy. *Ann ncol*, 1992; 3(7):513-526.
9. MEDAVAR, P.B; HUNT, R. Anti-cancer action of retinoids. *Immunology*, 1981; 42(2): 349-353.
10. DINIZ, D.G.A.; LIMA, E.M.; FILHO, N.R.A. Isotretinoína: perfis farmacológico, farmacocinético e analítico. *Rev Bras de Ciências Farmacêuticas*, 2002; 38(4): 415-429 .
11. HARDMAN, J. G.; LIMBRID, L. E. (ED.) *Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica*. 10.ed. Rio de Janeiro: Mac GrawHill, 2003. 1647 p.
12. LAYTON, A. The use of isotretinoin in acne. *Dermatoendocrinol*, 2009; 1:162-169.
13. GOULDEN, V.; CLARK, S.M.; MCGEOWN, C. *et al.* Treatment of acne with intermittent isotretinoin. *Br J Dermatol*, 1998;137:106-108.
14. MERRITT, B.; BURKHART, C.N.; MORRELL, D.S. Isotretinoin for acne vulgaris. *International Journal of Dermatology*, 2009; 35(3), 311-320.
15. HERMES, B.; PRAETEL, C.; HENZ, B.M. Medium dose isotretinoin for the treatment of acne. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 1998;11:117- 121.

- 16.CHAN, A.; HANNA, M.; ABBOTT, M.; KEANE, R.J. Oral retinoids and pregnancy. *MJA*, 1996;165:164-167.
- 17.CEYRAC, D.L.; SERFATY, D.; LEFRANCG, H. Retinoids and contraception. *Dermatology*, 1992; 184:161-170.
- 18.TURTON, J.A.; WILLARS, G.B.; HASELDEN, J.N. *et al.* Comparative teratogenicity of nine retinoids in the rat. *Int J Exp Pathol*, 1992; 73: 551–563.
- 19.KOCHHAR, D.M.; PENNER, J.D.; TELLONE, C.I. Comparative teratogenic activities of two retinoids: effects on palate and limb development. *Teratog Carcinog Mutagen*, 1984; 4:377-387.
- 20.FERNHOFF, P.; LAMMER, E. Craniofacial features of isotretinoin embriophathy. *J Pediatr*, 1984; 105:583-597. apud TRONCOSO, S.M.; ROJAS, H.C.; BRAVO, C.E. Embriopatía por isotretinoína: Un daño evitable. *Rev Méd Chile*, 2008;136:763-766.
- 21.TRONCOSO, S.M.; ROJAS, H.C.; BRAVO, C.E. Embriopatía por isotretinoína: Un daño evitable. *Rev Méd Chile*, 2008; 136:763-766.
- 22.HANSEN, L.; PEARL, G.S. Isotretinoin teratogenicity: Case report with neuropathologic findings. *Acta Neuropathol*, 1985; 65: 335-337. apud TRONCOSO, S.M.; ROJAS, H.C.; BRAVO, C.E. Embriopatía por isotretinoína: Un daño evitable. *Rev Méd Chile*, 2008;136:763-766.
- 23.COHEN, M.M; SHIOTA, K. Teratogenesis of holoprosencephaly. *J Med Genet*, 2002;109:1-15. apud TRONCOSO, S.M.; ROJAS, H.C.; BRAVO, C.E. Embriopatía por isotretinoína: Un daño evitable. *Rev Méd Chile*, 2008;136:763-766.
- 24.MELHUS, H.; MICHAELSSON, K; KINDMARK. A. *et al.* Excessive dietary intake of vitamin A is associated with reduced bone mineral density and increased risk for hip fracture. *Ann Intern Med*, 1998; 129:770-778.
- 25.PROMISLOW, J.H.E.; GOODMAN-GRUEN, D.; SLYMEN, D.J.; BARRETT-CONNOR, E. Retinol intake and bone mineral density in the elderly: the Rancho Bernardo Study. *J Bone Miner Res*, 2002; 17:1349-1358.
- 26.FESKANICH D, SINGH V, WILLETT WC, COLDITZ GA. Vitamin A intake and hip fractures among postmenopausal women. *JAMA*, 2002; 287: 47-54.
27. MICHAELSSON, K.; LITHELL, H.; VESSBY, B.; MELHUS, H. Serum retinol levels and risk of fracture. *New Engl J Med*, 2003; 227 (1-4):245-258.
- 28.CAHU, C.; INFANTE, J. Z.; TAKEUCHI, T. Nutritional components affecting skeletal development in larval fish. *Aquaculture*, 2003; 227 (1-4), 245-258.

- 29.HOUGH, S.; AVIOLI, L.V.; MUIR, H. *et al.* Effects of hypervitaminosis A on the bone and mineral metabolism of the rat. *Endocrinology*. 1988;122:2933-2939.
- 30.MCGUIRE, J.; LAWSON, J.P. Skeletal changes associated with chronic isotretinoin and etretinate administration. *Dermatologica* 1987; 175:169-181.
- 31.KILCOYNE, R.F. Effects of retinoids in bone. *J Am Acad Dermatol*, 1988; 19:212-216.
- 32.NOVICK, N.L.; LAWSON, W.; SCHWARTZ, I.S. Bilateral nasal bone osteophytosis associated with short-term oral isotretinoin therapy for cystic acne vulgaris. *Am J Med*, 1984; 77: 736739.
- 33.PENNES DR. MARTEL W, ELLIS CN, VOORHEES JJ. Evolution of skeletal hyperostoses caused by 13-cis-retinoic acid therapy. *Am J Roentgenol*, 1988;151:967-973.
- 34.DIGIOVANNA, J.J. Isotretinoin effects on bone. *J Am Acad Dermatol*, 2001; 45(5):176-182.
- 35.ELLIS, C.N.; PENNES, D.R.; MARTEL, W.; VOORHEES, J.J. Radiographic bone surveys after isotretinoin therapy for cystic acne. *Acta Dermatovenereologica*, 1985;65(1), 83-85.
- 36.KILCOYNE, R.F.; COPE, R.; CUNNINGHAM, W. *et al.* Minimal spinal hyperostosis with low-dose isotretinoin therapy. *Invest Radiol*, 1986; 21:41-44.
- 37.LEACHMAN, S.A.; INSOGNA, K.K.; KATZ, L.; ELLISON, A. MILSTONE, L.M. Bone densities in patients receiving isotretinoin for cystic acne. *Arche Dermatol*, 1999; 135: 961-965;
- 38.SAADI, H.; AFANDI, B.; HOUSSAMI, L.; SALEH, N.; MOHAMADIYEH, M.; BENEDICT, S. Effects of isotretinoin on bone turnover markers and bone mineral density in women with acne vulgaris and vitamin D deficiency: a preliminary study. *Int J Diabetes & Metabolism*, 2008; 16: 107-112.
- 39.KINDMARK, A.; ROLLMAN, O.; MALLMIN, H.; PETREN-MALLMIN, M.; LJOUNGHALL, S.; MELHUS, H. Oral isotretinoin therapy in severe acne induces transient suppression of biochemical markers of bone turnover and calcium homeostasis. *Acta Derm Venereol*, 1998;78:266-269.
- 40.ISHIJIMA, K.; SANDO, I. Multiple temporal bone anomalies in isotretinoin syndrome: a temporal bone histopathologic case report. *Archives of Otolaryngology: Head and Neck Surgery*, 1999; 125: 1385-1388.
- 41.MOERIKE, S.; PANTZAR, J. T.; DE SA, D. Temporal bone pathology in fetuses exposed to isotretinoin. *Pediatr Dev Pathol*, 2002;5:405-409.

42.OLIVEIRA, H.T.R. *Efeito da Isotretinoína no reparo de defeitos ósseos em calota craniana: estudo em ratos*. Tese (Doutorado em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial) - Fac. de Odontologia, PUCRS, Porto Alegre, 2009.

43.JANONES, D.S. *Estudo da presença de osteoadarina durante a ossificação intramembranosa e endocondral através de imunocitoquímica e Western Blotting*. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

44.COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. *Princípios Éticos na Experimentação Animal*. São Paulo, COBEA, 1991.

45.EICHELE, G.; THALLER, C. Characterization of Concentration Gradients of a Morphogenetically Active Retinoid in the Chick Limb Bud. *J. Cell Bio.* 1987;105,:1917–1923.

46.MALPEL, S.; MENDELSON, C.; CARDOSO, W.V. Regulation of retinoic acid signaling during lung morphogenesis. *Development*, 2000; 127: 3057–3067.
