

Análise histológica do impacto da isotretinoína na ossificação endocondral em ratos Wistar

Histological analysis of the impact of isotretinoin in the endochondral ossification in Wistar rats

Flávio Paccelli Silva Sento Sé¹; Huggo Luã Barros Medeiros²; Thárcia Kiara Beserra de Oliveira³; Thiago de Oliveira Assis⁴; Marina Suênia de Araújo Vilar⁵

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 conseqüências 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 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, decréscimo da matriz osteóide, má definição e redução do espessamento do perióstio 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 e redução da matriz óssea 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; Teratogênese

ABSTRACT: Isotretinoin is a drug that produces a teratogenic action and is used in the treatment of acne vulgaris because it causes the reduction of the size of the sebaceous glands and normalizes the keratin in the hair follicle opening. Reports indicate that the use of this drug is involved with bone malformations. The objective of this research is to analyze the consequences of the use of isotretinoin in the process of endochondral ossification of young male Wistar rats that were submitted to an oral ingestion of an 8 mg/kg/day dose of this drug from the 17th to the 30th day of their lives. The sample consists of 20 specimens that were distributed among the control group (receiving only vegetable oil, with n=10) and the experimental group (receiving isotretinoin diluted in vegetable oil, with n=10). At the end of the administration the animals were euthanized and the femurs were collected, dissected and cut for the preparation of histological slides stained by hematoxylin-eosin. Microscopic analysis of the material has shown a reduction of cell population in the cell channel and bone epiphysis, poorly defined and reduced thickening of the periosteum and poorly defined areas in the process of osteogenesis in the experimental group compared to the control group. Accordingly, based on the results, it was concluded that a delay in the process of ossification of the group undergoing treatment with isotretinoin was present, encouraging the suspicions of earlier studies where bone malformations arising from the use of this drug were reported.

Keywords: Isotretinoin; Osteogenesis; Teratogenesis

*Autor para correspondência

Recebido para publicação em 29/04/2014; aprovado em 20/03/2015

¹ Acadêmico do curso de Medicina - FCMCG. e-mail: paccelli_uni@hotmail.com

² Acadêmico do curso de Medicina - FCMCG. e-mail: huggobarros.neuro@hotmail.com

³ Graduada em Medicina Veterinária (UFCG). Mestranda em Engenharia Agrícola – UFCG (Coorientadora). e-mail: tharcia_kiara@hotmail.com

⁴ Mestre em Patologia pela UFPE. Professor da FCM-CG (Coorientador). E-mail: thiago.oa@hotmail.com

⁵ Graduada em Farmácia (UEPB). Mestre em Desenvolvimento em Meio Ambiente. Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos - UFRN. Professora da FCM - CG (Orientadora). e-mail: peritaquimica@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Essencial para o homem, a vitamina A é um nutriente que participa de importantes funções orgânicas, tais como visão, imunidade e crescimento. Sua deficiência, portanto, pode provocar alterações oculares (xerofthalmia e cegueira nutricional), aumento da susceptibilidade a infecções e até retardo no crescimento (ASSIS; BARRETO, 2002).

Assim como a vitamina A, também conhecida como retinol, seus diversos análogos, tanto naturais como sintéticos, denominados retinóides, estão também relacionados com o crescimento e diferenciação de vários tipos celulares durante o desenvolvimento fetal e também ao longo da vida (WEST *et al*, 1988).

A aplicação dos retinóides se dá em larga escala na dermatologia, devido a suas ações contra dermatoses inflamatórias e ceratóticas, além de inibir a queratinização (ROLEWSKI, 2003). Entre as doenças dermatológicas em que os retinóides possuem aplicabilidade, destacam-se a psoríase, a ictiose e a acne (BRUN, 2004). Esta última é uma grande preocupação para a dermatologia pediátrica, que tem lançado mão do uso desses retinóides, os quais também combatem a seborréia, por reduzirem o tamanho das glândulas sebáceas (em até 90%) e suprimirem a produção de sebo (RUIZ-MALDONADO; TAMAYO-SANCHEZ; OROZCO-COVARRUBIAS, 1988; ORFANOS; ZOUBOULIS, 1998).

Em síntese, os principais retinóides de uso terapêutico são a tretinoína (ácido retinóico), a isotretinoína (ácido 13-cis retinóico) e o etretinato, sendo a isotretinoína, apesar dos seus efeitos adversos, o principal fármaco para o tratamento de acne cística severa, devido aos seus altos índices de eficácia (DINIZ; LIMA; FILHO, 2002; HARDMAN; LIMBRID, 2003).

Porém, apesar dos enormes benefícios preventivos e terapêuticos, os retinóides também se destacam pelo seu enorme potencial teratogênico, podendo produzir alterações cardíacas, craniofaciais, neurológicas e tímicas (FERNHOFF; LAMMER, 1984 apud TRONCOSO; ROJAS; BRAVO, 2008).

Quanto às suas implicações ósseas, também já foram relatados casos de osteoporose e risco aumentado de fraturas de quadril em mulheres pós-menopausa que tiveram ingestão elevada de vitamina A, risco aumentado de fraturas quando a concentração sérica de retinol está aumentada, 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 (MELHUS *et al*, 1998; MICHAELSSON *et al*, 2003; HOUGH *et al*, 1988).

Desse 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 hiperostose do esqueleto apendicular e axial, principalmente da coluna vertebral, perda da densidade óssea, aumento da reabsorção óssea em pacientes com deficiência de vitamina D, inibição da remodelagem óssea, anomalias do osso temporal e dos ossículos do ouvido médio, como também, em ratos, foi verificada a aceleração no processo de reparo de defeitos ósseo em calota craniana (PENNES *et al*, 1988;

DIGIOVANNA, 2001; ELLIS *et al*, 1985; LEACHMAN *et al*, 1999; SAADI *et al*, 2008; KINDMARK *et al*, 1998; ISHIJIMA; SANDO, 1999; MOERIKE; PANTZAR, 2002; OLIVEIRA, 2009).

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 ricos 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 (JANONES, 2009).

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.

MATERIAL E MÉTODOS

Tratou-se de um estudo exploratório, experimental e comparativo, no qual 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 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, num ciclo de luz/escurecimento (12 h) e tiveram livre acesso à água filtrada. Os animais foram acasalados na proporção de 01 macho para 03 fêmeas e o estado de prenhez foi determinado através da observação da presença de espermatozoides 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. 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, em torno do qual se inicia o processo de ossificação endocondral,²⁴ 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, administrada via oral pela técnica de gavagem, durante o período de 14 dias. 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 análise histológica (JANONES, 2009).

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 e condrogênese dos grupos estudados, com a identificação de elementos morfológicos que avaliassem o potencial teratogênico da isotretinoína, no Laboratório de Histologia e Embriologia da FCMCG. Para isso foi

comparado os achados do grupo experimental para com os do grupo controle.

É importante salientar que os procedimentos adotados no manejo dos animais seguiram as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, que preconiza condutas éticas no que tange a pesquisa com animais (COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, 1991).

O projeto foi enviado ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da FCMCG para apreciação e seu início ocorreu somente após sua aprovação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

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 sua interpretação.

Para fim de estudo qualitativo o material dos grupos controle e experimento foram analisados apresentando os resultados dispostos no Quadro 1.

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;
Periósteo bem definido;	Periósteo 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.

No estudo comparativo dos achados histológicos, observou-se uma variação morfológica no material ósseo entre os dois grupos, sendo identificada a partir das irregularidades e imperfeições presentes nos fêmures dos animais tratados com o ácido 13-cis-retinóico, que diferenciavam em relação aos elementos teciduais encontrados nos ossos dos ratos que ingeriram apenas óleo vegetal.

Essa diferença se caracterizou por um retrocesso na osteogênese, e imperfeição dos elementos e aspectos que assinalam o processo correto e contínuo de ossificação, o que implica afirmar que a isotretinoína provocou um retardo do processo de ossificação endocondral dos animais jovens submetidos ao tratamento com essa droga, não por alteração na cartilagem epifisária ou fusão precoce das epífises, mas por lentificação do próprio processo de proliferação celular, da produção de matriz osteóide, de definição da formação da epífise, diáfise e perióstio, e da mineralização óssea.

Esses achados morfológicos encontrados representam a influência do fármaco no crescimento ósseo pós-nascimento, mas especificamente durante a fase do desenvolvimento e solidificação do esqueleto apendicular.

Ademais, a redução da eosinofilia da substância óssea compacta em formação, com osteóide ainda desordenada e abreviada frente ao grupo controle (Figura 1), com palidez da diáfise, e população celular menor, revela uma redução da matriz osteóide (ou seja, uma escassez de tecido ósseo recém-formado ou osteóide) e uma carência de fibras conjuntivas, o que aponta para um achado histológico que sugere aumento da reabsorção óssea, característico de uma osteopenia, condição possível precursora de osteoporose. Nessa fase de desenvolvimento o que se esperava era um predomínio da taxa de formação óssea sobre a de reabsorção.

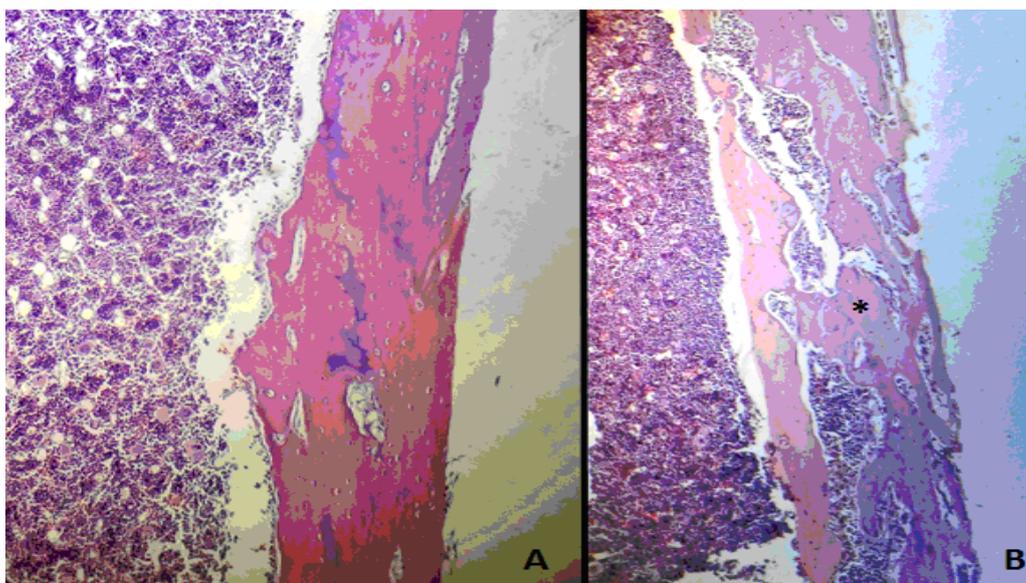


Figura 1: Hemisseção longitudinal da diáfise femoral dos ratos controle (A) e experimento (B). Observa-se em B uma redução da eosinofilia (*) da substância óssea compacta em formação, com osteóide ainda dispersa. HE – 40x.

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 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 (EICHELE; THALLER, 1987; MALPE; MENDELSON; CARDOSO, 2000).

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 (WEST *et al*, 1988).

Porém, ainda que o desenvolvimento ósseo normal exija níveis adequados de vitamina A, o 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 (HOUGH *et al*, 1988).

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

Os mecanismos pelos quais os retinóides interferem no metabolismo ósseo ainda não foram

completamente elucidados, e os relatos de estudos apresentam alterações ósseas antagônicas, desde osteoporose, fragilidade óssea, risco aumentado de fraturas, perda da densidade óssea, aumento da reabsorção óssea, até retardo do crescimento, calcificação progressiva dos ligamentos e inserções do tendão, fusão prematura das epífises, anormalidades na modelagem dos ossos longos, e formação progressiva de esporões na coluna vertebral (MELHUS *et al*, 1998; HOUGH *et al*, 1988; LEACHMAN *et al*, 1999; SAADI *et al*, 2008; MCGUIRE; LAWSON, 1987; KILCOYNE, 1988).

Essa divergência é reforçada pela contraditória atividade das células ósseas moduladas pelos retinóides, apresentada por alguns estudos, onde alguns relatam aumento da ação dos osteoblastos e outros, diminuição. Já a função osteoclástica apresenta-se elevada em alguns relatórios ou conservada em outros (BELANGER; CLARK, 1967; CLARK; SMITH, 1964; WOLKE *et al*, 1968; FRANKEL *et al*, 1986).

Todavia, diante da apreciação dos resultados alcançados nessa pesquisa, os achados histológicos desse estudo revelaram a redução da matriz óssea no grupo experimental, que apresentou também um atraso no processo de ossificação em relação ao grupo controle, caracterizado histologicamente por um retrocesso, mau 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 (onde deveria ocorrer a preponderância da formação sobre a reabsorção óssea) e acentuar a reabsorção óssea, sendo estas as alterações ósseas resultantes do tratamento com esse fármaco nesse estudo.

As consequências do retardo desse método de ossificação endocondral podem resultar em atraso do crescimento, baixa estatura, malformação dos ossos longos, encurtamento dos membros e deformidade em varo, além de outras anormalidades de crescimento em estruturas ósseas que resultam do mecanismo endocondral de ossificação (LIMA *et al*, 2008; CERVAN *et al*, 2008; FIGUEIRÊDO *et al*, 2007; COQUEIRO *et al*, 2011).

CONCLUSÃO

Há relevância do estudo sobre a inferência da isotretinoína no crescimento ósseo durante a fase do desenvolvimento do animal, em ratos jovens, já que a maior parte dos pacientes em tratamento para acne severa com isotretinoína é adolescente que ainda não concluíram o estágio de completa formação do esqueleto e que, portanto, estão sujeitos a interferências nesse processo.

Como também, o aumento da reabsorção óssea, e em consequência a diminuição de matriz óssea, tem como efeito a redução da massa óssea e indução de osteopenia e osteoporose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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;
- BRUN, P. Prescription of retinoids in psoriasis. *Rev Prat*, 2004; 54(1): 48-51.
- BELANGER, L.F.; CLARK, I. Alpharadiographic and histological observations on the skeletal effects of hypervitaminosis A and D in the rat. *Anat Rec*, 1967; 158:443.
- CERVAN, M.P. *et al.* Estudo comparativo do nível de qualidade de vida entre sujeitos acondroplásicos e não-acondroplásicos. *J Bras Psiquiatr*, 2008; 57(2):105-111.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. *Princípios Éticos na Experimentação Animal*. São Paulo, COBEA, 1991.
- CLARK, I.; SMITH, M.R. Effects of hypervitaminosis A and D on skeletal metabolism. *J Biol Chem*, 1964; 239:1266.
- COQUEIRO, E.S. *et al.* Displasia Campomélica: Relato de Caso e Revisão Bibliográfica. *Revista Huvy*, 2011; 10(2):22-29.
- DIGIOVANNA, J.J. Isotretinoin effects on bone. *J Am Acad Dermatol*, 2001; 45(5):176-182.
- DINIZ, D.G.A.; LIMA, E.M.; FILHO, N.R.A. Isotretinoína: perfis farmacológico, farmacocinético e analítico. *Rev Bras de Ciências Farmacêuti-cas*, 2002; 38(4): 415-429 .
- 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.
- 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.
- FERNHOFF, P.; LAMMER, E. Craniofacial features of isotretinoin embriopathy. *J Pediatr*, 1984; 105:583-597.
- apud TRONCOSO, S.M.; ROJAS, H.C.; BRAVO, C.E. Embriopatia por isotretinoína: Un daño evitable. *Rev Méd Chile*, 2008;136:763-766.
- FIGREIRÊDO, S.S. *et al.* Condrodisplasia Punctata Rizomélica: Relato de Caso e Breve Revisão Bibliográfica da Literatura. *Radiol Bras*, 2007; 40(1):69-72
- FRANKEL, T.A. *et al.* Hypervitaminosis A and calcium-regulating hormones in the rat. *J Nutr*, 1986; 116:578.
- 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.
- HOUGH, S. *et al.* Effects of hypervitaminosis A on the bone and mineral metabolism of the rat. *Endocrinology*. 1988;122:2933-2939.
- 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.
- JANONES, D.S. *Estudo da presença de osteoaderina 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.
- KINDMARK, A.; ROLLMAN, O.; MALLMIN, H.; PETREN-MALLMIN, M.; LJOUNGHALL, S.; MELHUS, H. Oral isotretinoína therapy in severe acne induces transient suppression of biochemical markers of bone turnover and calcium homeostasis. *Acta Derm Venereol*, 1998;78:266-269.
- KILCOYNE, R.F. Effects of retinoids in bone. *J Am Acad Dermatol*, 1988; 19:212-216.
- LEACHMAN, S.A. *et al.* Bone densities in patients receiving isotretinoin for cystic acne. *Arche Dermatol*, 1999; 135: 961-965;
- MELHUS, H. *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.
- MICHAELSSON, K. *et al.* Serum retinol levels and risk of fracture. *New Engl J Med*, 2003; 227 (1-4):245-258.
- MALPEL, S.; MENDELSON, C.; CARDOSO, W.V. Regulation of retinoic acid signaling during lung morphogenesis. *Development*, 2000; 127: 3057-3067.
- MOERIKE, S.; PANTZAR, J. T.; DE SA, D. Temporal bone pathology in fetuses exposed to isotretinoin. *Pediatr Dev Pathol*, 2002;5:405-409.
- MCGUIRE, J.; LAWSON, J.P. Skeletal changes associated with chronic isotretinoin and etretinate administration. *Dermatologica*, 1987; 175:169-181.

- ORFANOS, C.; ZOUBOULIS, C. Oral retinoids in the treatment of seborrhoea and acne. *Dermatology*, 1998; 196: 140-147.
- 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.
- PENNES, D.R. *et al.* Evolution of skeletal hyperostoses caused by 13-cis-retinoic acid therapy. *Am J Roentgenol*, 1988;151:967-973.
- ROLEWSKI, S.L. Clinical review: Topical retinoids. *Dermatol Nurs*, 2003; 15:447-565.
- RUIZ-MALDONADO, R.; TAMAYO-SANCHEZ, L.; OROZCO-COVARRUBIAS, M.L. The use of retinoids in the pediatric patient. *Dermatol Clin*, 1988; 16:553-569.
- SAADI, H. *et al.* 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.
- WOLKE, R.E. *et al.* Qualitative and quantitative osteoblastic activity in chronic porcine hypervitaminosis A. *J Pathol*, 1968; 98:677.
- WEST, K.P. *et al.* Vitamin A supplementation and growth: a randomized community trial. *Am J Clin Nutr*, 1988;48:1257-1264.