

**HENRIQUE TELLES RAMOS DE OLIVEIRA**

**EFEITO DA ISOTRETINOÍNA NO REPARO DE DEFEITOS  
ÓSSEOS EM CALOTA CRANIANA - ESTUDO EM RATOS**

Porto Alegre  
2009

**HENRIQUE TELLES RAMOS DE OLIVEIRA**

**EFEITO DA ISOTRETINOÍNA NO REPARO DE DEFEITOS  
ÓSSEOS EM CALOTA CRANIANA - ESTUDO EM RATOS**

Tese apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, pela Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Nascimento Silva

Porto Alegre  
2009

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

O48e

Oliveira, Henrique Telles Ramos de.

Efeito da isotretinoína no reparo de defeitos ósseos em calota craniana: estudo em ratos / Henrique Telles Ramos de Oliveira. — Porto Alegre, 2009. 109 f. : il.

Tese (Doutorado em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial) - Fac. de Odontologia, PUCRS, 2009. Orientador: Prof.<sup>a</sup> D.<sup>ra</sup> Daniela Nascimento Silva.

1. Odontologia. 2. Tecido ósseo - cicatrização. 3. Reparação óssea (Odontologia). 4. Hipervitaminose. 5. Vitamina A. 6. Isotretinoína. I. Título. II. Silva, Daniela Nascimento.

CDD: 617.52

Alessandra Pinto Fagundes  
Bibliotecária  
CRB10/1244



## ***DEDICATÓRIA***

---

Dedico esta tese a **Deus**, que sempre esteve presente em todos os momentos da minha vida, mostrando-me os verdadeiros caminhos do crescimento pessoal, familiar, espiritual e profissional.

Dedico esse sonho a vocês, **meus pais**, Luiz Fernando Negrison Ramos de Oliveira e Maria Luisa Telles de Oliveira, que, mesmo de longe nesta caminhada, senti-os sempre ao meu lado, com apoio incondicional, a fim de que eu pudesse concretizar mais este passo para a minha felicidade. Orgulho-me e me espelho muito em vocês. Muito obrigado por tudo. Pelo incentivo constante. A distância entre nós me fez amadurecer. Senti falta da presença de cada um, da palavra amiga, compreensiva, sábia e do afeto de vocês. Amo-os muito.

Dedico à **Taise Schwanck Plucênio (minha Linda)**, obrigado pela convivência, pelo apoio profissional pela sensibilidade e forma de encarar a vida. Obrigado por me fazer acreditar que podemos sempre conciliar e administrar, trabalho, divertimento e família. Obrigado por compartilhar esse sonho comigo. Sorte daqueles que encontram pessoas que lhe fazem feliz. Amo você.

Dedico à **Fernanda, Marcelo, Larissa, Matheus, Felipe, Gabriel, Leonardo e Luisa**. Obrigado minha família!!! Vocês, que souberam entender e dividir comigo a realização deste sonho e muitas vezes tiveram que abdicar de muitas coisas pelo investimento dos pais em mim. Obrigado por fazerem a minha vida mais feliz. Amo-os muito.



## ***AGRADECIMENTOS ESPECIAIS***

---

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

---

À amiga e Orientadora **Daniela Nascimento**, obrigado por vivenciar e ter disponibilidade durante todo o período deste trabalho. Obrigado pela amizade, carinho e por ter me ouvido com tanta paciência nos momentos mais difíceis. É muito bom conhecer pessoas como você.

"Amigo não é aquele que tira as pedras do seu caminho e sim quem te ajuda a caminhar sobre elas."

Agradeço ao Prof Dr. **Claiton Heitz**, obrigado por aprimorar e enriquecer meu conhecimento técnico-científico.

Aos amigos **Giuliano Henrique Mião Luchi e André Luiz Marinho Falcão Gondim**, toda manhã quando toca o despertador, temos uma oportunidade totalmente nova para fazer o que quisermos com as horas que foram concedidas. Ganhamos essa folha em branco a cada novo dia do resto de nossas vidas. Obrigado por preencherem grande partes destas folhas durante este tempo que estivermos juntos, vocês foram e serão sempre indispensáveis na minha vida.

Agradeço ao **Sinval, Bernadete e família**, Obrigado por tudo, pelos conselhos amigos e por sempre me tratarem como filho. Sou e serei eternamente grato.

Agradeço à **Roberta Bergoli**, por compartilhar esse trabalho e estar sempre pronta para ajudar.

Agradeço ao **Rogério Belle**, exemplo de caráter, integridade e honestidade. Obrigado pelos conhecimentos, conselhos e por plantar ainda mais esse amor pela CTBMF. Torço muito pelo seu sucesso.

Ao amigo **Rodrigo Matos**, compartilhamos muitas idéias durante este período, o que enriqueceu ainda mais meu conhecimento científico. Sou e serei eternamente grato em todos os aspectos no crescimento profissional e no pessoal, os quais foram muito importantes para meu amadurecimento como cirurgião e como pessoa.

Ao amigo **Bruno Campanha (Brunão)**, mostrou-me que a amizade está nos pequenos gestos, nas palavras na hora certa, nos conselhos, nos bate papos. É muito bom saber que temos amigos que podemos confiar, meu muito obrigado...

Agradeço a **minha Família (primos, tios, vovó)**, obrigado por torcerem sempre. Tenho orgulho de fazer parte de uma família na qual o espírito de união é fortalecido sempre, a cada dia, a cada ano renovamos a nossa união.

Agradeço à Comissão Avaliadora de Pré-defesa de Teses, Prof<sup>a</sup> Luciane Menezes, Prof. Eraldo Batista e Prof<sup>a</sup> Daniela Nascimento Silva, pelas considerações e melhorias que enriqueceram o trabalho.



## ***AGRADECIMENTOS***

---

## **AGRADECIMENTOS**

---

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. Joaquim Clotet ao qual expresso minha admiração.

À Faculdade de Odontologia, na pessoa do Diretor Prof. Marcos Túlio Mazzini Carvalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nilza Pereira da Costa, ex-coordenadora do Programa de Pós-Graduação, pela amizade e dedicação dispensada à Odontologia.

Ao Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Agradeço aos amigos **Fabício e Tais**, obrigado pelos ensinamentos, orientações, sugestões sempre tão oportunas, fazendo-me enxergar com mais clareza meus objetivos e caminhos a serem seguidos. Irmãos, amigos, companheiro de sempre...

Agradeço aos Amigos (**Bertão, Vitão, Lê, Paulinho, Marcio, Luiz, Murilo, João, Tais, Maniho, Vivi**), poucas coisas no mundo têm mais poder do que um empurrão positivo. Uma palavra de otimismo e esperança - “Você vai conseguir” -, quando as coisas estão difíceis. Obrigado pelos empurrões durante a minha vida. Companheiros presentes em todos os momentos, quando menos espero uma palavra amiga sempre chega.

Agradeço aos Colegas do Doutorado (**Ana, Tais, Bruna, Otacilio, Airton**), são pessoas que ao longo da convivência mais próxima, tive o privilégio de compartilhar, admirar, pela abnegação, dedicação, profissionalismo e cordialidade. Tornando-se pessoas especiais que merecem todo o meu respeito.

Agradeço ao **Corpo Docente do programa de Pós-Graduação em CTBMF da FO/PUCRS**, muito obrigado por todo convívio salutar e prazeroso nesta casa, através de vocês pude aprimorar e enriquecer meu conhecimento técnico-científico. Acredito que, ser Doutor é isso... “É plantar a semente, vê-la germinar, desenvolver-se e gerar frutos”. Esta sim, é a verdadeira felicidade e o prazer de ser professor.

Agradeço a **Capes**, obrigado pelo incentivo à pesquisa.

Agradeço ao laboratório de Farmácia da PUCRS, e ao Instituto de Patologia de Porto Alegre.

## “Um dia você aprende que...”

Depois de algum tempo você aprende a diferença, a sutil diferença, entre dar a mão e acorrentar uma alma. E você aprende que amar não significa apoiar-se, que companhia nem sempre significa segurança, e começa a aprender que beijos não são contratos, e que presentes não são promessas.

Depois de um tempo você aprende que o sol queima se ficar exposto por muito tempo, e aprende que não importa o quanto você se importe, algumas pessoas simplesmente não se importam [...] aceita que não importa quão boa seja uma pessoa, ela vai ferí-lo de vez em quando e você precisa perdoá-la por isso. Aprende que falar pode aliviar dores emocionais, **e descobre que se leva anos para se construir confiança e apenas segundos para destruí-la**, e que você pode fazer coisas em um instante, das quais se arrependerá pelo resto da vida; aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias, e **o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida**, e que **bons amigos são a família que nos permitiram escolher**.

Aprende que não importa onde já chegou, mas onde se está indo, mas se você não sabe para onde está indo qualquer lugar serve.

**Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás, portanto, plante seu jardim e decore sua alma.**

Descobre que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida! Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar, se não fosse o medo de tentar.

***William Shakespeare***



**RESUMO**

---

## RESUMO

---

A isotretinoína é um derivado da vitamina A, indicada para o tratamento dermatológico em pacientes com acne severa, que apresenta diversos efeitos colaterais sobre o metabolismo ósseo. O presente estudo teve por objetivo avaliar o processo de reparo ósseo em cavidades confeccionadas em calota craniana de ratos, submetidos à ingestão oral de 7,5 mg/Kg/dia de isotretinoína e avaliar o nível sérico de cálcio através da coleta de sangue do plexo venoso orbital antes de iniciarem o uso da medicação e no dia da eutanásia. Foram utilizados 33 ratos albinos machos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) com aproximadamente 60 dias e peso corporal médio de 250 a 500 gramas, distribuídos aleatoriamente em dois grupos controle (n=15) e experimental (n=18). Na calota craniana de cada animal foi confeccionada uma cavidade de 2mm de diâmetro. Os animais foram eutanasiados aos 21, 28 e 90 dias de pós-operatório. O osso parietal, contendo a cavidade previamente confeccionada, foi removido e as peças operatórias submetidas a processamento histológico, seguida de coloração pela técnica de HE. Foi realizada análise histomorfométrica computadorizada que permitiu mensurar a proporção entre área do osso neoformado e a área total dos defeitos nos diferentes períodos de observação. Os resultados expressos em porcentagem média de osso neoformado no grupo experimental foram: 25,37% ( $\pm 9,14$ ) aos 21 dias, 41,78% ( $\pm 7,00$ ) aos 28 dias e 57,51% ( $\pm 11,62$ ) aos 90 dias. No grupo controle os resultados foram de 17,10% ( $\pm 9,23$ ) aos 21 dias, 34,42% ( $\pm 7,70$ ) aos 28 dias e 48,49% ( $\pm 16,40$ ) aos 90 dias. Após análise histológica descritiva observou-se um aumento da neoformação óssea no grupo experimental, mas sem diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ). O nível sérico de cálcio teve uma diminuição estatisticamente significativa entre a 1° e a 2° coleta de sangue em todos os grupos. Com base nos resultados, foi possível concluir que, mesmo não sendo estatisticamente significativa, a isotretinoína promoveu uma aceleração no processo de neoformação óssea em calota craniana de ratos, bem como redução dos níveis séricos de cálcio. Palavras-chave<sup>1</sup>: Tecido ósseo. Vitamina A. Hipervitaminose A. Isotretinoína.

---

<sup>1</sup> DeCS – Descritores em Ciências da Saúde. Disponível em: <[www.decs.bvs.br](http://www.decs.bvs.br)>. Acesso em: 25 maio de 2009



***ABSTRACT***

---

## ABSTRACT

---

Isotretinoin is a vitamin A derivative that is indicated for dermatologic treatment in patients with severe acne, which shows various side effects on bone metabolism. The aim of the present study was to evaluate the bone repair process in cavities made in the calvarial bone of rats, submitted to oral administration of 7.5 mg/kg/day isotretinoin, and to determine the serum calcium level in blood samples of the retro-orbital plexus before drug administration and on day of euthanasia. Thirty-three male albino rats (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) were used, which were approximately 60 days old and weighed 250 to 500 g; they were distributed randomly into two groups, control (n=15) and experimental (n=18). A cavity of 2 mm in diameter was made in the calvarial bone of each animal. The animals were killed at 21, 28 and 90 days postoperative. The parietal bone, containing the cavity previously made, was removed and the surgical pieces were submitted to histological processing, followed by H&E staining. Computerized histomorphometric analysis was performed to determine the area of neoformed bone relative to the total defect area at different times of observation. The results expressed as mean percent of neoformed bone in the experimental group were: 25.37% ( $\pm 9.14$ ) at 21 days, 41.78% ( $\pm 7.00$ ) at 28 days, and 57.51% ( $\pm 11.62$ ) at 90 days. In the control group the results were 17.10% ( $\pm 9.23$ ) at 21 days, 34.42% ( $\pm 7.70$ ) at 28 days, and 48.49% ( $\pm 16.40$ ) at 90 days. Therefore, bone neoformation was greater in the experimental group, but the difference versus control was not statistically significant ( $p \leq 0.05$ ). The serum calcium level showed a statistically significant decrease between the first and second blood sampling in all groups. Based on the results of this study, it was concluded that, despite not being statistically significant, isotretinoin promoted acceleration in the process of bone neoformation in the calvarial bone of rats, along with a reduction in serum calcium levels

Key-Words<sup>2</sup>: Bone and Bones. Vitamin A. Hypervitaminosis A. Isotretinoin.

---

<sup>2</sup> DeCS – Descritores em Ciências da Saúde. Disponível em: <[www.decs.bvs.br](http://www.decs.bvs.br)>. Acesso em: 25 maio de 2009.



***LISTAS DE FIGURAS, GRÁFICOS E QUADROS***

---

---

## LISTA DE FIGURAS

---

	Páginas
Figura 1 - Administração oral de isotretinoína por gavagem.....	58
Figura 2 - Incisão, Descolamento, Confecção da cavidade cirúrgica.....	60
Figura 3 - Desenho esquemático do corte da peça operatória para confecção das Lâminas histológicas.....	62
Figura 4 - Peça cirúrgica obtida do osso parietal direito, cortada no centro da ferida operatória, no sentido longitudinal.....	62
Figura 5 - Procedimento de histomorfometria utilizando o programa Image J, versão 1.41®.....	64
Figura 6 - Programa Image J versão 1.41®, usado para medir área do defeito circundado pela linha amarela e setas.....	64
Figura 7 - Cânula de Vidro.....	66
Figura 8 - Coleta de sangue no pleno venoso orbital.....	66
Figura 9 - Tubo contendo sangue.....	67
Figura 10 – Centrífuga.....	67
Figura 11 - Defeito Controle com 21 dias de observação.....	71
Figura 12 - Defeito experimental com 21 dias de observação.....	71
Figura 13 - Defeito controle com 28 dias de observação.....	73
Figura 14 - Defeito experimental com 28 dias de observação.....	73
Figura 15 - Defeito controle com 90 dias de observação. ....	75
Figura 16 - Defeito experimental com 90 dias de observação.....	75

## LISTA DE GRÁFICOS

---

	Páginas
Gráfico 1 - Comparação da porcentagem de neoformação óssea entre os grupos, em cada período de observação.....	77
Gráfico 2 - Comparação da porcentagem de neoformação óssea entre os períodos de observação em cada grupo de estudo.....	79
Gráfico 3 - Comparação da porcentagem de neoformação óssea entre os períodos de observação em cada grupo de estudo.....	79
Gráfico 4 - Comparação entre níveis séricos de cálcio antes e após a administração de isotretinoína no grupo experimental.....	81

## LISTA DE QUADROS

---

Quadro 1 - Distribuição dos animais de acordo com os grupos controles e experimental e com o período de observação após o defeito ósseo.....	56
--	----



***LISTAS DE TABELAS***

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 - Comparação da porcentagem de neoformação óssea entre os grupos de estudo em cada período de observação.....	76
Tabela 2 - Comparação da porcentagem de neoformação óssea entre os períodos de tempo em cada grupo de estudo.....	78
Tabela 3 - Comparação entre níveis séricos de cálcio antes e após a administração de isotretinoína no grupo experimental.....	80



## ***LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS***

---

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

---

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CEUA	Comitê de Ética para uso de Animais
cm	centímetro
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CTBMF	Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial
dL	decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FDA	Food and Drug Administration
FO	Faculdade de Odontologia
H <sub>0</sub>	Hipótese nula
H <sub>1</sub>	Hipótese um
H <sub>2</sub>	Hipótese dois
HE	Hematoxilina e eosina
Kg	quilograma
mg	miligrama
ml	mililitro
mm	milímetros
mm <sup>2</sup>	milímetro quadrado
n	número
25-OHD	Hidroxivitamina
PTH	Hormônio Paratireóide
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RAR	Receptores ácido retinóicos
RE	Equivalent Retinol
rpm	rotações por minuto
RXR	Receptores x Retinóicos
%	porcento
®	marca registrada



## ***SUMÁRIO***

---

## SUMÁRIO

---

---

	Páginas
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>28</b>
<b>2 REVISTA DE LITERATURA.....</b>	<b>31</b>
<b>2.1 TECIDO ÓSSEO E SEU METABOLISMO.....</b>	<b>31</b>
<b>2.2 REPARO ÓSSEO.....</b>	<b>34</b>
<b>2.3 ISOTRETINOÍNA.....</b>	<b>36</b>
<b>2.3.1 Aplicação da Isotretinoína.....</b>	<b>39</b>
<b>2.3.2 Efeitos colaterais da Isotretinoína.....</b>	<b>41</b>
<b>2.3.3 Tratamento com isotretinoína X Dose X Efeitos colaterais.....</b>	<b>44</b>
<b>3 PROBLEMA/HIPÓTESES.....</b>	<b>51</b>
<b>3.1 PROBLEMA.....</b>	<b>51</b>
<b>3.2 HIPÓTESES.....</b>	<b>51</b>
<b>4 PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>4.1 Objetivo geral.....</b>	<b>53</b>
<b>4.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>53</b>
<b>5 METODOLOGIA.....</b>	<b>55</b>
<b>5.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS DA PESQUISA.....</b>	<b>55</b>
<b>5.2 CARACTERIZAÇÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>5.3 ANIMAIS.....</b>	<b>55</b>

<b>5.4 ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS.....</b>	<b>56</b>
<b>5.5 ADMINISTRAÇÃO ORAL DA ISOTRETINOÍNA.....</b>	<b>57</b>
<b>5.6 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....</b>	<b>58</b>
<b>5.7 PREPARO DAS AMOSTRAS.....</b>	<b>60</b>
<b>5.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA.....</b>	<b>62</b>
<b>5.9 PROCEDIMENTO DE CAPTURA DE IMAGENS E ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....</b>	<b>63</b>
<b>5.10 COLETA DE SANGUE PARA AVALIAÇÃO DO NÍVEL SÉRICO DE CÁLCIO.....</b>	<b>65</b>
<b>5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>67</b>
<b>6 RESULTADOS.....</b>	<b>70</b>
<b>6.1 DESCRIÇÕES DA OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA DOS DEFEITOS ÓSSEOS.....</b>	<b>70</b>
<b>6.1.1 Grupo controle 21 dias.....</b>	<b>70</b>
<b>6.1.2 Grupo experimental 21 dias.....</b>	<b>70</b>
<b>6.1.3 Grupo controle 28 dias.....</b>	<b>72</b>
<b>6.1.4 Grupo experimental 28 dias.....</b>	<b>72</b>
<b>6.1.5 Grupo controle 90 dias.....</b>	<b>74</b>
<b>6.1.6 Grupo experimental 90 dias.....</b>	<b>74</b>
<b>6.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA DESCRITIVA DAS MENSURAÇÕES DA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA.....</b>	<b>76</b>
<b>6.2.1 Comparação da porcentagem da área de neoformação óssea em relação à área total do defeito, entre os grupos de estudo em cada período de observação.....</b>	<b>76</b>
<b>6.2.2 Comparação da porcentagem de neoformação óssea entre os períodos de tempo em cada grupo de estudo.....</b>	<b>77</b>

<b>6.2.3 Comparação dos níveis de cálcio antes e após a administração de isotretinoína no grupo experimental.....</b>	<b>80</b>
<b>7 DISCUSSÃO.....</b>	<b>83</b>
<b>8 CONCLUSÕES.....</b>	<b>90</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>92</b>
<b>ANEXO A – APROVAÇÃO DO PROJETO DE TESE PELA COMISSÃO CIENTÍFICA E DE ÉTICA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL (PUCRS).....</b>	<b>99</b>
<b>ANEXO B – APROVAÇÃO DO PROJETO DE TESE PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA USO DE ANIMAIS.....</b>	<b>100</b>
<b>ANEXO C - LEI N.º 6.638, DE 08 DE MAIO DE 1979.....</b>	<b>101</b>
<b>ANEXO D – PRINCÍPIOS ÉTICOS NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DO COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (COBEA).....</b>	<b>103</b>
<b>ANEXO E – FARMÁCIA MANIPULAÇÃO.....</b>	<b>105</b>



## ***INTRODUÇÃO***

---

## 1 INTRODUÇÃO

As perdas ósseas constituem um dos maiores problemas dentro das especialidades odontológicas e estão associadas à exposição do tecido ósseo a várias condições fisiológicas e patológicas. O tecido ósseo possui uma capacidade reparativa e, em muitas condições, é capaz de restabelecer perfeitamente sua estrutura óssea arquitetônica e as propriedades mecânicas através de um processo complexo que envolve atividade local e sistêmica do organismo. Participam desse processo vários tipos de células, enzimas e fatores de regeneração tecidual.

A extensão e a velocidade da reparação dependem da localização anatômica, do agente etiológico (exodontias, traumatismos ósseos, processo inflamatório), das dimensões da lesão, além de características biológicas de cada indivíduo. A capacidade reparativa óssea tem limites e também pode falhar, caso certas condições não sejam atendidas. Fatores que interferem na formação óssea, podem ser intrínsecos, relacionados a raça, sexo e hormonais ou ser extrínsecos, como, hábitos, uso de medicamentos e nutricionais, como as vitaminas (CASSIDY, 1999).

As vitaminas são micronutrientes essenciais a diversas reações metabólicas do organismo, presentes em pequenas quantidades em alimentos naturais. A vitamina A é uma família de compostos essenciais, necessários no crescimento, no desenvolvimento do osso, na diferenciação celular, no desenvolvimento e na manutenção do tecido epitelial, no processo imunológico, na reprodução e na visão (DOWNS, 2003).

Os derivados retinóides são substâncias que têm propriedades biológicas da vitamina A. Os retinóides ocorrem na natureza ou são produzidos sinteticamente (KOCHHAR; CHRISTIAN, 1997). Os retinóides mais conhecidos são os ácidos all-transretinóico e 13-cis-retinóico ou isotretinoína, comercialmente conhecido como Roacutan<sup>®</sup>. A isotretinoína é usada atualmente como a medicação de eleição para o tratamento de acne severa, não-responsivo à terapia habitual. Desde a sua liberação para uso corrente, em setembro de 1982, a droga adquiriu grande importância para os dermatologistas, os quais devem, portanto, estar familiarizados com seus efeitos colaterais (AZULAY et al., 1985). Na maioria dos adolescentes, as lesões são mínimas e toleráveis. Entretanto, em outros suas manifestações são conspícuas e eventualmente severas, causando transtorno, problemas psíquicos e sociais que

afetam a vida do adolescente. De outro lado, na ausência do tratamento adequado podem deixar cicatrizes marcantes e indeléveis (SAMPAIO; PIMENTEL, 1985).

Deve-se, entretanto, levar em consideração que o excesso de retinóides pode causar alterações clínicas agudas ou crônicas desagradáveis e até preocupantes, as quais variam de pessoa para pessoa, com direta relação à dose. Os efeitos vão desde o ressecamento labial, até as alterações mais graves, como diminuição da densidade óssea mineral, com maiores riscos de fraturas ósseas, lesões hepáticas, parada de crescimento, além de alterações laboratoriais, como aumento do colesterol e triglicerídeos, alterações das enzimas hepáticas e alterações da fosfatase alcalina (AZULAY et al., 1985; SAMPAIO; PIMENTEL, 1985).

Em se tratando do tecido ósseo, relatos demonstram que o excesso de retinóicos tem efeitos em lugares específicos, como a diminuição da densidade óssea de mais de 9% no Triângulo de Ward (uma área quadrada que apresenta a menor densidade da região proximal do fêmur, caracterizada por predomínio de osso trabecular), mudanças hiperostóticas ou calcificação de tendões e ligamentos, fechamento prematuro das epífises (DIGIOVANNA, 2004; LEACHMAN, 1999), porém nos ossos cranianos os efeitos não estão determinados.

Os retinóides, como a isotretinoína e o etretinato, apresentam efeitos colaterais semelhantes à síndrome de hipervitaminose A. Frankel et al. (1986) observaram que o excesso de vitamina A causa um aumento da reabsorção óssea no número e no tamanho dos osteoclastos, diminuição da superfície osteóide e deteriorização da cartilagem em ratos.

Considerando que a acne vulgar é a enfermidade cutânea mais comum na adolescência e adultos jovens, que a isotretinoína é a medicação de eleição para o tratamento de acne severa, não-responsivo à terapia habitual, e sem comprovações das alterações relacionadas ao uso da isotretinoína no esqueleto craniofacial, fica evidente a preocupação no atendimento de pacientes, submetidos a esta terapia, na área de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial em que um dos principais tecidos abordados é o ósseo, em diversos seguimentos desta especialidade.

Diante do exposto, o presente estudo propõe-se a avaliar o efeito da administração diária de isotretinoína, em dose terapêutica similar ao utilizado para distúrbios dermatológicos como acne severa, no reparo ósseo de defeitos confeccionados em calota craniana de ratos.



***REVISTA DE LITERATURA***

---

## 2 REVISTA DE LITERATURA

### 2.1 TECIDO ÓSSEO E SEU METABOLISMO

O tecido ósseo, constituinte principal do esqueleto, é um dos mais resistentes do corpo humano. É formado por células (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos), minerais (cálcio e fósforo) e matriz orgânica (proteínas colágenas e não-colágenas). A matriz orgânica é responsável pela estrutura de suporte para deposição de sais inorgânicos, sendo constituído por 90% de colágeno, com restante de proteoglicanas. O mais importante sal inorgânico constituinte do osso são os cristais de hidroxiapatita. O colágeno presente no osso é do tipo I, similar ao encontrado na pele e nos tendões, mas pode ser observada também, a presença do colágeno tipo II (cartilagem), nos estágios tardios de união óssea das cicatrizações dos ossos fraturados de origem endocondral através do calo ósseo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999, 2004).

A formação dos cristais de hidroxiapatita no osso envolve o início e a indução da mineralização pela matriz orgânica e é rigidamente regulado por inúmeros fatores. A taxa de mineralização pode variar, mas normalmente existe um espaço de tempo de 12 a 15 dias entre a formação da matriz e sua mineralização. O osso não mineralizado é conhecido como osteóide. As células formadoras de osso incluem as células osteoprogenitoras, osteoblastos e osteócitos. A geração e o estímulo dessas células são regulados por citocinas e fatores de crescimento. As células osteoprogenitoras são células-tronco mesenquimais pluripotentes localizadas na vizinhança de todas as superfícies ósseas. Quando estimuladas por fatores de crescimento como as proteínas morfogênicas ósseas, sofrem divisão celular e produzem descendentes que se diferenciam em osteoblastos (ROBBINS; COTRAN, 2005).

Os osteoblastos e células de revestimento da superfície se localizam alinhados ao longo das superfícies ósseas e sintetizam, transportam e arrumam as diversas proteínas da matriz. Eles também iniciam o processo de mineralização. Os osteoblastos expressam receptores celulares de superfícies que se ligam a diversos hormônios, citocinas, fatores de crescimento e proteínas extracelulares da matriz. Os

osteoblastos metabolicamente ativos possuem uma duração de vida de aproximadamente três meses, quando sofrem apoptose, são circundadas por matriz e se transformam em osteócitos, ou se tornam células de revestimento superficial quiescentes e achatadas (BURKITT; YOUNG; HEATH, 1997; ROBBINS; COTRAN, 2005; YOUNG; HEATH, 2000).

Os osteócitos são mais numerosos do que qualquer outro tipo de célula formadora de osso. Estão localizadas em lacunas dentro de trabéculas ósseas formadas. Possuem prolongamentos citoplasmáticos que se conectam uns aos outros e representam osteoblastos inativos aprisionados dentro do osso. São células associadas à nutrição das trabéculas (BURKITT; YOUNG; HEATH, 1997; YOUNG; HEATH, 2000). Estudos demonstram que esta rede pode ser importante no controle das flutuações segundo a segundo nos níveis séricos de cálcio e fósforo, alterando a concentração destes minerais no compartimento extracelular local (ROBBINS; COTRAN, 2005).

Os osteoclastos participam do processo de reabsorção do tecido ósseo. Ele é derivado das células progenitoras hematopoiéticas que também dão origem aos monócitos e macrófagos. As citocinas e os fatores de crescimento são cruciais para a diferenciação e a maturação dos osteoclastos em humanos. Isto assegura uma rígida conjugação entre a formação e a reabsorção óssea vital para o sucesso do sistema esquelético e proporciona um mecanismo para que uma ampla variedade de mediadores biológicos (hormônios, citocinas, fatores de crescimento) influencie a homeostase do tecido ósseo. São células gigantes e multinucleadas, extensamente ramificadas, possuem uma duração de vida limitada, aproximadamente duas semanas. Os osteoclastos penetram na matriz óssea, através da ação enzimática, formando depressões conhecidas como superfícies de reabsorção ou lacunas de Howship. Conforme o osso é degradado, as substâncias são liberadas no microambiente, o que inicia a sua renovação (BURKITT; YOUNG; HEATH, 1997; ROBBINS; COTRAN, 2005; YOUNG; HEATH, 2000).

As proteínas do osso incluem o colágeno tipo I e uma família de proteínas não colágenas que são derivadas principalmente dos osteoblastos. O colágeno tipo I forma o arcabouço da matriz e é responsável por 90 % do peso do componente orgânico. Os osteoblastos depositam colágeno tanto em uma onda aleatória, conhecida como osso trançado, ou de uma forma ordenada de camadas designadas osso lamelar. As proteínas não colágenas do osso se ligam a matriz e são

agrupadas de acordo com sua função como proteínas de adesão, proteínas de ligação ao cálcio, proteínas de mineralização, citocinas e fatores de crescimento. As citocinas e os fatores de crescimento controlam a proliferação, maturação e metabolismo celular do osso (ROBBINS; COTRAN, 2005).

Os osteoblastos e osteoclastos atuam em coordenação e são considerados como a unidade funcional do osso conhecida como unidade multicelular básica. Os processos de formação e reabsorção óssea são conjugados e o equilíbrio entre estes processos determina a massa esquelética em qualquer momento do tempo (ROBBINS; COTRAN, 2005).

Existem dois tipos de osso: trabecular e cortical. O osso trabecular está presente principalmente nas vértebras, no crânio, na pélvis e na porção ultradistal do rádio. Já o osso cortical predomina nos ossos longos, no colo femoral e no rádio distal. O osso trabecular apresenta maior metabolismo, sendo, mais suscetível às alterações da massa óssea (VAN DER SLUIS; DE MUINCK KEIZER-SCHRAMA, 2001).

As superfícies internas e externas do osso são recobertas por células osteogênicas e tecido conjuntivo constituindo o endóstio e o perióstio, respectivamente. Na sua porção mais profunda o perióstio é mais celular e apresenta células osteoprogenitoras, morfológicamente parecida com fibroblastos. As células osteoprogenitoras multiplicam-se por mitose e diferenciam-se em osteoblastos, desempenhando papel importante no crescimento dos ossos e na reparação das fraturas. O endóstio é constituído por uma camada de células osteogênicas achatadas, revestindo as cavidades do osso esponjoso, canal medular, canais de Havers e os de Volkman (BURKITT; YOUNG; HEATH, 1997; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; YONG; HEATH, 2000).

O hormônio da paratireóide (PTH), a 25-OH vitamina D e a 1,25-(OH)<sub>2</sub> vitamina D são os principais reguladores da homeostase do cálcio (VAN DER SLUIS; DE MUINCK KEIZER-SCHRAMA, 2001).

## 2.2 REPARO ÓSSEO

No tecido ósseo os osteoblastos e osteoclastos irão agir na reconstrução e remodelação do tecido lesado. Os osteoclastos agem reabsorvendo osso necrótico e aquele que necessita de remodelação, induzindo os osteoblastos a depositarem osteóide que quando mantido imóvel durante o processo de cicatrização, torna-se uma estrutura calcificada por deposição de mineral. Quando ocorre a fratura do osso e suas extremidades livres afastam-se por mais de um milímetro, a cicatrização ocorre por segunda intenção, ou seja, durante a fase fibroblástica, deve haver uma grande deposição de colágeno destinado a preencher o espaço formado. Os fibroblastos e os osteoclastos produzem uma grande quantidade de matriz fibrosa cicatricial que se estende além das extremidades livres do osso, formando o calo ósseo (PETERSON et al., 2003).

O reparo ósseo é um processo altamente regulado que pode ser separado em estágios histológicos, bioquímicos e biomecânicos superpostos (ROBBINS; COTRAN, 2005).

As etapas de cicatrização do tecido ósseo possuem uma fase inflamatória que é identificada pela formação de um coágulo sanguíneo após a ruptura de vasos que envolvem as superfícies ósseas no local da lesão. O sangue coagulado gera uma rede de fibrina, que ajuda a selar o defeito e cria uma estrutura para o influxo de células inflamatórias e fibroblastos, além de novos capilares. Concomitantemente, plaquetas desgranuladas e células inflamatórias liberam prostaglandinas e outras citocinas, que ativam as células osteoprogenitoras no periósteo, cavidade medular e tecidos moles circundantes, estimulando a produção de osteoblastos e osteoclastos. Assim, ocorre um processo inflamatório agudo com grande mobilização de neutrófilos e macrófagos. Esta fagocitose tem como objetivo iniciar a remoção do coágulo das regiões necrosadas e dos osteócitos mortos. Imediatamente após, dá-se início à fase reparadora com o surgimento de um grande número de fibroblastos produtores de colágeno tipo III responsáveis pela formação do calo fibroso, onde as fibras colágenas envolvem a região lesionada. As células osteoprogenitoras ativadas depositam trabéculas subperiostal de osso trançado que se orientam perpendicularmente ao eixo cortical e dentro da cavidade medular. Em alguns casos as células mesenquimais ativadas nos tecidos moles e o osso ao redor também se

diferenciam em condroblastos que formam fibrocartilagem e cartilagem hialina. A cartilagem recém formada sofre ossificação endocondral, formando uma rede de osso que conecta as trabéculas reativas depositadas na cavidade medular e abaixo do periósteo. Dessa forma, ocorre o calo ósseo, que tem uma textura própria, mais celular e menos mineralizada, indicando a rapidez do processo de ossificação e justificando a denominação de osso imaturo. Na fase remodeladora, o calo ósseo passa por uma série de processos de reabsorção e neoformação, até que o formato e o perfil do osso se restabeleçam. A cavidade medular também é restaurada, e depois que este processo se completa pode ser impossível demonstrar o local da lesão prévia (GUIMARÃES, 1982; POSPÍSILOVÁ, 1982; ROBBINS; COTRAN, 2005).

O osso, quando lesado, tem a capacidade de regenerar e retornar à estrutura tecidual original, sem a formação de tecido cicatricial (HOLLINGER et al., 1997).

Compreende-se por regeneração a substituição das células lesadas por outras da mesma morfologia e função. No tecido ósseo, defeitos com dimensões pequenas reparam-se com facilidade, sem deixar cicatriz fibrosa, em virtude de disporem de mecanismo reparador semelhante ao da osteogênese embriológica, porém em defeitos maiores esse mecanismo não ocorre (SEAL; OTERO; PANITCH, 2001).

O osso quando fraturado é capaz de sofrer reparação, fenômeno que demonstra sua permanente vitalidade. A homeostase do tecido ósseo é controlada por fatores mecânicos e humorais, locais e gerais (KATCHBURIAN; ARANA, 1999; TEN CATE, 1994).

O padrão e o tempo de reparo variam de acordo com a espécie animal e com a localização anatômica, havendo, portanto, diferença no tamanho do defeito ósseo. A capacidade regenerativa da calvária de animais experimentais como ratos, pode ser considerada melhor do que em humanos. Devido à grande área de inserções musculares, o suprimento sanguíneo da calvária de humanos é inferior comparando-se à calvária de animais. Como resultado, pequenos defeitos na calvária de humanos adultos não reparam espontaneamente (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986). Turnbull e Freeman (1974) observaram que defeitos de 2 mm de diâmetro, confeccionados em calvária de ratos Wistar, falharam na cicatrização em um período de 12 semanas.

Imobilização inadequada permite um movimento constante de modo que os constituintes normais do calo não se formam. Conseqüentemente, o calo pode ser composto principalmente por tecido fibroso e cartilagem, perpetuando a instabilidade e resultando no retardo da consolidação ou não-consolidação. Um obstáculo sério para o reparo ósseo é a infecção. A infecção deve ser eliminada antes que a consolidação ocorra. O reparo ósseo também pode ser prejudicado com níveis inadequados de cálcio ou fósforo, infecções sistêmicas, diabetes, insuficiência vascular e deficiências vitamínicas (ROBBINS; COTRAN, 2005).

Os fatores que interferem na formação óssea podem ser divididos em dois grupos: intrínsecos e extrínsecos. Os primeiros incluem fatores hereditários, de raça, sexo e hormonais; os fatores extrínsecos, por sua vez, dizem respeito a aspectos nutricionais, fatores mecânicos, hábitos, presença de doenças crônicas e uso de medicamentos (CASSIDY, 1999).

### 2.3 ISOTRETINOÍNA

A isotretinoína, ácido retinóico 13-cis ou ácido 13-cis-acutane, é uma molécula de ocorrência natural encontrada no plasma de todos os indivíduos. É um produto metabólito da vitamina A (ou retinol) e dos carotenos da provitamina A, encontrados na dieta principalmente no fígado, leite, queijo e folhas verdes. Pode também ser sintetizada, constituindo um isômero da tretinoína. Os retinóicos são compostos naturais ou sintéticos que possuem propriedades funcionais da vitamina A e pode afetar a diferenciação e o crescimento celular (DEW; WARDLAW; ONG, 1993; ELLIS; KENT, 2001; WIEGAND; CHOU, 1998).

Ellis e Kent (2001) relataram a variabilidade dos efeitos biológicos, resultantes dos profundos efeitos sobre o DNA (ácido desoxirribonucléico). A atividade da isotretinoína é mediada através da ligação dos receptores nucleares nos retinóicos. Esses receptores são a super família dos fatores de transcrições do DNA nuclear que incluem: esteróides, vitamina D e receptores do hormônio da tireóide. A isotretinoína age, portanto, como hormônios, produzindo uma variedade de modificações celulares, através da transcrição do DNA. Os receptores do retinóico

se ligam a regiões reguladoras do DNA, chamadas de elemento de resposta aos hormônios, que afetam diretamente e indiretamente a transcrição de muitos genes.

O crescimento e o desenvolvimento ósseo normal requerem níveis adequados de vitamina A e seus derivados (KAMM, 1982). A vitamina A antagoniza a capacidade da vitamina D em manter níveis normais de cálcio no sangue medido em humanos. A interação metabólica da vitamina A com hormônios reguladores de cálcio tem importância clínica. Doses excessivas de isotretinoína alteram a concentração de cálcio, fosfatase inorgânica e hidroxivitamina 25-OHD (vitamina D) no sangue (JOHANSSON; MELHUS, 2001).

Rohde et al. (1999) avaliaram a atividade de reabsorção óssea da vitamina A em dependência da vitamina D em ratos. A isotretinoína foi determinante no aumento do risco de fraturas esqueléticas. Relataram que a isotretinoína tem um efeito direto sobre os ossos, causando desmineralização ou reabsorção. Os autores sustentaram essa afirmação após a realização de um estudo em ratos ingerindo quantidades variadas de vitamina A e D, observando que, os animais alimentados com doses excessivas pela vitamina A mostraram privação nos níveis de vitamina D, refletida principalmente pela elevação dos níveis de cálcio no soro, em função da reabsorção óssea. Os autores justificaram a ação antagônica da vitamina A sobre a vitamina D em ratos, pelo fato de que ambas necessitem da mesma proteína ligante (RXR - receptor X retinóico) para realizar sua atividade de transcrição. Sendo assim, em animais que recebem altas doses de vitamina A, o ácido all-trans-retinóico (um dos seus metabólicos) pode dominar ou ocupar mais as proteínas RXR que estão disponíveis, comprometendo a ação da vitamina D.

Devido à isotretinoína ser um análogo da vitamina A, muitos dos seus efeitos colaterais são semelhantes aos achados clínicos na síndrome da hipervitaminose A (ELLIS; KENT, 2001). A deficiência e o excesso de vitamina A causam anormalidades no crescimento ósseo longitudinal dos mamíferos. Como a isotretinoína é sintetizada a partir da vitamina A acredita-se que ela também regule a condrogênese em placas de crescimento (DE LUCA et al., 2000).

A isotretinoína foi liberada para uso corrente em setembro de 1982, desde então adquiriu grande importância para os dermatologistas (AZULAY et al., 1985; GOLDSMITH et al., 2004). Ela é conhecida comercialmente no Brasil pelo nome de Roacutan® (DEW; WARDLAW; ONG, 1993). Segundo Frankel et al. (1986), a isotretinoína está sendo utilizada com doses mais altas e com maior frequência no

tratamento dermatológico e os profissionais devem estar familiarizados com seus efeitos colaterais.

A isotretinoína possui uma meia vida de 22 horas e a biodisponibilidade é de aproximadamente 25%, o que pode ser aumentada uma ou duas vezes se administrada concomitantemente com alimentos. O pico da concentração sanguínea é de quatro horas após ingestão, e depois de um mês a isotretinoína não é mais detectável no sangue, retornando a normalidade no risco de má formação fetal (ELLIS; KENT, 2001).

O retinol é absorvido a partir do trato gastrointestinal e metabolizado no fígado originando o retinal, e este é irreversivelmente oxidado em ácido retinóico. Os dois isômeros, ácido retinóico e isotretinoína têm estrutura química idêntica, mas diferem na geometria molecular, conseqüentemente diferem na meia vida, sendo de 0,9 horas para o ácido retinóico e 20 horas para isotretinoína. A isotretinoína e o ácido retinóico são metabolizados em oxo-isotretinoína e oxo-ácido-retinóico, respectivamente. A isotretinoína e seus metabólitos são eliminados aproximadamente em 19 a 20 horas na urina e fezes. Para determinar as concentrações do retinóico fisiológico no plasma na gravidez, foi realizado um experimento multicêntrico, em nove países, analisando várias amostras sangüíneas coletadas no primeiro trimestre de gravidez em mais de 160 mulheres. O resultado foi avaliado pelas concentrações do retinóico no plasma nas mães, que conseqüentemente determinaram as concentrações no embrião. As concentrações média de isotretinoína e oxo-isotretinoína no primeiro trimestre foram de 1.41ng/mL e 2.44 ng/mL, respectivamente. O período de segurança com contraceptivos em mulheres com possibilidade de gravidez após cessar a terapia com isotretinoína oral é inicialmente determinado pela eliminação da isotretinoína e seus metabólitos. A oxo-isotretinoína apresentou o valor endógeno mais longo (10 dias) e o ácido retinóico mais curto (dois dias). O estudo mostrou que as concentrações de isotretinoína em dose não teratogênica do plasma foram alcançadas em até duas semanas após o final do tratamento com a isotretinoína. Assim o experimento clínico definiu um período de um mês para fornecer margem de segurança adequada (WIEGAND; CHOU, 1998).

### 2.3.1 Aplicação da Isotretinoína

A isotretinoína é o tratamento ideal para acne severa cística ou recalcificante, quando o tratamento não for responsivo à terapia habitual com antibióticos (ABROMS et al., 2006; AZULAY et al., 1985). É, atualmente, o medicamento mais utilizado para o tratamento de acne severa, promovendo a diminuição da queratinização e do tamanho das glândulas sebáceas (FLEICHER et al., 2003). Segundo Sampaio e Pimentel (1985), a introdução da isotretinoína representa um grande avanço na terapia das acnes graves.

A acne em toda sua variável expressão clínica acomete cerca de 80% dos jovens e representa uma das doenças de maior prevalência na dermatologia, sendo a acne *fulminans* a variante mais grave da acne vulgar. É caracterizada pela presença de lesões intensamente inflamatórias e manifestações sistêmicas de intensidade e frequência variáveis. Acomete, preferencialmente, homens jovens com antecedentes de acne vulgar. O início é explosivo e geralmente associam-se com febre alta, manifestações músculo-esqueléticas e articulares. Apesar da gravidade do quadro, o diagnóstico precoce e a adequada intervenção terapêutica, no qual se preconiza administrar corticóide sistêmico, mais 0,5 a 1,0 mg/kg/dia de isotretinoína por duas semanas. Após a regressão, suspende-se o uso do corticóide e mantém-se a isotretinoína por mais 4 a 6 semanas, até a regressão completa das lesões, permitindo assim controle efetivo da enfermidade e minimização do risco de recidivas (ROMITI et al., 1999).

Para Mclane (2001), pacientes com acne nodular severa recalcitante, que não respondem a terapia convencional com antibiótico tópico e sistêmico, têm poucas alternativas de tratamento que não seja a isotretinoína oral. Desde 1982, a isotretinoína tem sido usada no tratamento de acne severa recalcitante em mais de 90% dos pacientes, com dose de 0,5 a 2,0 mg/dia, 2x/dia, durante 15 a 20 semanas, com completa remissão da doença na maioria dos casos. O Roacutan® é aceito como o tratamento ideal para acne severa recalcitante nodular, pois reduz o número de bactérias resistentes na pele, deixando menor número de cicatrizes inestéticas como ocorria com antibiótico sistêmico.

A isotretinoína também tem demonstrado ser eficiente agente quimioterápico em pacientes com xeroderma pigmentoso, síndrome do carcinoma da célula basal

nevóide, prurigem pigmentosa bolhosa, receptores de transplante de órgão ou de medula óssea como também em pacientes que não possuem essas desordens mas estão ativamente desenvolvendo câncer de pele (CAMPBELL; DIGIOVANNA, 2006; DEW; REQUENA CABALLERO et al., 2005; WARDLAW; ONG, 1993).

Ellis e Kent (2001) ainda citam o uso da isotretinoína durante 4 a 6 meses para o tratamento de acne rosácea, desordens de cornificação, psoríase, condições dermatológicas variadas, condições cosméticas de fotoenvelhecimento e quimioprolifaxia no câncer de pele.

A isotretinoína recebeu aprovação do *Food and Drug Administration* (FDA) para ser utilizada no tratamento de acne severa refratária ou resistente a outras terapias no tratamento de desordem de cornificação e na quimioprevenção de câncer de pele, em indivíduos de alto risco que estejam desenvolvendo múltiplos carcinomas de células basais e escamosas (GOLDSMITH et al., 2004).

Valentic, Elias e Weinstein (1983) relataram que a isotretinoína é utilizada com muita eficácia no tratamento de várias doenças caracterizadas pela queratinização anormal. Consideram-na ser o mais potente inibidor de secreções de sebo e eficiente no tratamento de acne nódulo-cística severa, através da remissão prolongada de seus efeitos.

A formação óssea no organismo humano tem lugar não somente durante o processo de desenvolvimento embriogênico (cartilagem da placa de crescimento em processo de formação óssea endocondral) e crescimento, mas também, ao longo da vida do indivíduo, através dos processos fisiológicos de remodelamento ósseo (BALCERZAK et al., 2003). A biomineralização é um processo altamente regulado que desempenha um papel importante durante o desenvolvimento dos tecidos esqueléticos. Tem sido demonstrado que a isotretinoína estimula a diferenciação terminal e o crescimento de mineralização em placas de condrócitos. Wang e Kirsch (2002) forneceram evidências que o tratamento com isotretinoína influencia o crescimento na placa de condrócitos, causando uma série de eventos que levam à mineralização pelo aumento na concentração de cálcio seguida pela regulação para maior da expressão genética de anexins (proteínas que possuem matrizes vesiculares responsáveis pela mineralização) e da fosfatase alcalina. Os autores atentam para o fato de que apenas vesículas de matrizes isoladas das células tratadas com isotretinoína que continham as anexins foram capazes de captar o cálcio e se mineralizar, em contrapartida vesículas isoladas de células não tratadas

ou tratadas com isotretinoína que continham nenhuma ou pouca anexina não foram capazes de absorver o cálcio e se mineralizar.

### **2.3.2 Efeitos colaterais da Isotretinoína**

Embora a eficácia clínica seja comprovada, a isotretinoína possui uma longa lista de efeitos colaterais que se assemelham aos sintomas da hipervitaminose A (DEW; WARDLAW; ONG, 1993; ERDOGAN et al., 2006).

A isotretinoína pode acarretar vários efeitos secundários como: problemas pessoais de relacionamento, depressão, suicídio, dano ao fígado, sistema músculo-esqueléticos e, principalmente, alterações teratogênicas. A isotretinoína cada vez mais é amplamente prescrita, com mais de quatro milhões de prescrições por ano nos Estados Unidos, sendo que metade das mulheres está em idade de reprodução (ABROMS et al., 2006). No Brasil, no ano de 2007, 60 a 70 mil pacientes usaram a isotretinoína para o tratamento de acne (SAMPAIO; BAGATIN, 2008).

Para Campbell e Digiovanna (2006) baixas doses de isotretinoína (0,25 mg/kg/dia) são eficientes para o tratamento de acne severa, e se necessário, a dose pode ser aumentada, subsequentemente, de acordo com a resposta do paciente. Os autores preconizaram monitoramento laboratorial incluindo teste de gravidez, colesterol, teste da função hepática e avaliação dos níveis de triglicérides antes e durante o tratamento. Concluem que a toxicidade da isotretinoína depende da dose, descrevendo alguns efeitos colaterais como mucocutâneo, mialgia, artralgia e a teratogenicidade.

Ellis e Kent (2001) descreveram múltiplos efeitos colaterais, mucocutâneo e sistêmico, como alterações oftalmológicas, neuromusculares, gastrointestinais, aumento dos lipídeos, hiperostose e teratogenicidade. Relataram que os efeitos mucocutâneos mais observados como queilite, ressecamento, sangramentos nasais e conjuntivites são toleráveis, tratáveis e dependentes da dose. Os autores acrescentaram que, utilizando a mesma dose fracionada (2x/ao dia) os efeitos colaterais são minimizados.

Segundo Azulay et al. (1985), os efeitos colaterais causados com a utilização da isotretinoína são dose-dependentes, como artralgia, mialgias, dor óssea,

hiperostose esquelética, diminuição da densidade mineral óssea e alterações laboratoriais, como elevação do triglicérido, do colesterol, da creatinquinase, das plaquetas e diminuição dos leucócitos ou hemácias.

Valentic, Elias e Weinstein (1983) descreveram a ocorrência de hipercalcemia em um paciente jovem com 19 anos fazendo uso de isotretinoína com doses médias a altas por períodos extensos. Antes de iniciar a terapia, as concentrações de cálcio, triglicéridios, bem como a contagem das células sanguíneas para avaliar a função hepática, estavam dentro do limite de normalidade e a reversibilidade da hipercalcemia em 36 horas após cessar a terapia, favorece a hipótese de que a droga era responsável pela hipercalcemia. Os autores recomendam que a determinação da concentração de cálcio seja parte de teste laboratorial em todos os pacientes tratados com a isotretinoína, e que o médico alerte para os efeitos colaterais relacionados com os aumentos das concentrações de cálcio no sangue como, reabsorção mineral acelerada nos ossos trabeculares e corticais (aumento da atividade dos osteoclastos), osteólises focais e calcificação do tecido focal.

Milstone, Insogna e Leachman (2005) acreditam que a isotretinoína tem efeitos significativos mensuráveis e potencialmente clínicos sobre a homeostase esquelética, sugerindo que a administração de curta duração não tem efeito adverso na densidade óssea mineral. Mas ponderaram que é prematuro concluir que não há efeito significativo clínico da isotretinoína em nenhuma parte do esqueleto em curta duração

Desenvolvimento anormal de ossos e cartilagens é uma característica de toxicidade da isotretinoína (MOORE; WANG, 1945). Experimentos *in vitro* mostram que a isotretinoína age diretamente sobre a cartilagem nos ossos do embrião, interfere na formação de colágeno, perturba a diferenciação normal dos osteoblastos, aumenta o número de osteoclastos e aumenta a taxa de liberação de cálcio no osso (RAISZ, 1965).

Aumento significativo de osteoclastos, diminuição significativa de tecido osteóide, taxa de remodelação mais baixa, alterações patológicas no tecido ósseo através de alterações no metabolismo do cálcio, foram observados no estudo de Frankel et al. (1986), em animais que receberam altas doses por longo tempo de tratamento com a isotretinoína.

O crescimento e o desenvolvimento ósseo normal requerem níveis adequados de vitamina A. Pesquisas publicadas nos últimos 70 anos têm

demonstrado os efeitos de altas doses de isotretinoína no crescimento e na mineralização óssea, através de fraco crescimento ósseo, radioluscência, perda de conteúdo mineral, fraturas espontâneas e remodelação óssea acelerada (KAMM, 1982).

O efeito colateral mais observado no tecido ósseo em pacientes que fazem o uso de isotretinoína por longo período de tempo e altas doses é a hiperostose, sendo menos evidente quando utilizadas doses padrão (CAREY et al., 1988; KILCOYNE et al., 1986; TÖRÖK et al., 1988).

Downs (2003) relatou que a ingestão a longo prazo de quantidades levemente elevadas de isotretinoína próximas dos níveis recomendados podem contribuir para a diminuição da densidade mineral óssea, osteoporose, hipercalcemia e foi associado com a duplicação da probabilidade de fraturas. Em 2001, o Instituto Médico de Nutrição sugeriu a necessidade de baixar o nível máximo tolerável atualmente aceito e que homens e mulheres consumam entre 700 a 900 RE por dia com limite máximo de 3.000 RE. A atividade da vitamina A é expressa em RE (Equivalente Retinol) e 1 RE é igual a 3.33 UI (Unidades Internacionais) de vitamina A.

Melhus et al. (1998) observaram grande associação entre o risco de fratura do quadril e ingestão de isotretinoína em mulheres suecas. Os autores concluíram que para uma ingestão de isotretinoína maior do que 1.500 RE/dia, comparada com a ingestão de menos de 500 RE/dia, a densidade mineral óssea foi reduzida em até 14% e o risco de fratura no quadril foi aumentado em duas vezes.

A isotretinoína antagoniza a capacidade da vitamina D em manter níveis normais de cálcio no sangue em humanos. Johansson e Melhus (2001) mencionaram que o metabólito ativo da vitamina D desempenha um papel importante na absorção do cálcio intestinal, sendo o cálcio importante na formação óssea e na manutenção da densidade mineral óssea. Concluíram que a isotretinoína além de causar diretamente reabsorção óssea, pode levar indiretamente a diminuição da densidade óssea pela interferência da ação da vitamina D. De modo semelhante, Scheven e Hamilton (1990) constataram, em seus estudos, que a isotretinoína antagoniza a capacidade da vitamina D em manter normais os níveis séricos de cálcio, o que estimula a formação de osteoclastos e suprime a atividade osteoblástica, podendo contribuir para acelerar a reabsorção óssea nos casos de doses excessivas de isotretinoína.

Kawahara et al. (2002) realizaram um estudo de suplementação da vitamina A em 80 homens saudáveis. Os homens receberam um suplemento de isotretinoína ou um placebo para tomar diariamente ao longo de seis semanas. Os resultados foram obtidos através de marcador de remodelação óssea medidos nas amostras de sangue. Os autores concluíram que a suplementação da isotretinoína não afeta a remodelação óssea, porém os próprios autores observaram que a isotretinoína em longo prazo pode ter efeitos esqueléticos adversos.

### **2.3.3 Tratamento com isotretinoína X Dose X Efeitos colaterais**

A Academia Americana de Dermatologia realizou uma conferência sobre o uso seguro e ideal da isotretinoína descrevendo novas propostas para regulamentação do seu uso. Recomendam que a prescrição deve ser debatida entre paciente e profissional e informados os riscos, a severidade, potencial de cicatrização, alterações terapêuticas, segurança e custos. Aconselham iniciar com doses de 0,5 mg/kg/dia nas primeiras quatro semanas de tratamento para evitar efeitos colaterais, antes de iniciar a dosagem completa de 1mg/kg/dia. Alertam que não há doses seguras de exposição durante a embriogênese sendo que, a taxa de malformação com o uso da isotretinoína é de 20% comparado com 2% sem tratamento com isotretinoína. O monitoramento periódico dos triglicerídeos e do colesterol no sangue, bem como das anormalidades esqueléticas, é recomendado (GOLDSMITH et al., 2004).

Sampaio e Pimentel (1985) acompanharam 25 pacientes com idade entre 15 e 31 anos, de ambos os sexos, que realizaram tratamento para acne com a dose inicial de 1mg/kg/dia de isotretinoína tomada na refeição e, após melhora do quadro clínico, a dose foi reduzida para 0,5 mg/kg/dia. Os resultados foram considerados excelentes, mas alguns efeitos colaterais foram observados tais como: secura nos lábios, queilite, descamação, conjuntivite, além de aumento dos triglicerídeos, do colesterol, da fosfatase alcalina e alterações do esqueleto. Eles concluíram que os efeitos terapêuticos são excelentes com doses 1,0 e 0,5 mg/kg/dia; por outro lado, os efeitos colaterais são mais pronunciados com doses maiores. Finalizam relatando que a isotretinoína é eliminada no período de 48 horas a cinco dias, porém, a sua

metabolização hepática indica a necessidade de evitar gravidez no período de 4 a 8 semanas após a interrupção da droga devido a sua ação teratogênica.

Leachman et al. (1999) estudaram o efeito da isotretinoína com doses de 1 mg/kg/dia durante o tratamento de 6 meses em 18 pacientes com acne cística, com idade entre 17 a 25 anos e compararam com sujeitos saudáveis (controle) da mesma idade de 17 a 26 anos. A densidade óssea média foi mais baixa em todos os sítios analisados quando comparado ao grupo controle. Quatro pacientes tiveram densidade diminuída de mais de 9% no triângulo de Ward (é uma área quadrada que apresenta a menor densidade da região proximal do fêmur, caracterizada por predomínio de osso trabecular) após 6 meses de terapia. Os níveis séricos de cálcio não mudaram em ambos os grupos. Os autores concluem que há uma perda de densidade óssea mesmo na ausência de alterações mensuráveis de cálcio, sendo provável um efeito direto da isotretinoína sobre o osso.

Digiovanna et al. (2004) realizaram um estudo multicêntrico, com uma amostra de 217 adolescentes com idade entre 12 a 17 anos fazendo uso de isotretinoína em dose única de 1 mg/kg/dia por 16 a 20 semanas. Avaliaram os efeitos da isotretinoína na densidade óssea mineral da espinha lombar e quadril em pacientes com acne severa recalcitante e nodular. A densidade foi medida no início e no final da terapia por análise radiográfica. Os resultados mostraram não haver alteração média significativa na densidade óssea mineral da espinha lombar ou no quadril. A eficiência esperada para o tratamento da acne foi observada, não ocorrendo hiperostose em nenhum paciente. Os autores concluíram que o tratamento com isotretinoína de 16 a 20 semanas na dose recomendada para acne severa não tem efeito significativo sobre a densidade óssea mineral na espinha lombar e no quadril.

Margolis (1996) avaliou 20 pacientes adultos tratados com isotretinoína para acne severa vulgaris, com idade entre 19 a 35 anos, durante seis meses com dose total de 122 mg/kg/dia por 20 semanas. Esses pacientes haviam parado de crescer uma média de 10 anos antes do estudo. Foram feitas mensurações com radiografias na espinha lombar e do quadril para avaliar a mineralização óssea antes e depois do tratamento. Não foram observadas alterações significativas na densidade óssea mineral da espinha lombar, no colo do fêmur, no triângulo de Ward ou no fêmur proximal.

Mclane (2001) realizou dois experimentos relativos à segurança da dose terapêutica. No primeiro teste, foram avaliados 67 pacientes utilizando isotretinoína, com dose única de 1 mg/kg/dia com alimento, por 16 a 20 semanas. No segundo estudo, avaliaram 300 pacientes que receberam isotretinoína na dose de 1mg/kg 2x/dia, manhã e noite com as refeições (totalizando 2mg/kg/dia). Com o intuito de avaliar os efeitos colaterais realizaram uma escala analógica visual de 0 a 10, sendo 0 não presente e 10 extremamente observável. O sangue foi coletado para análise de níveis de lipídeos e outros parâmetros sanguíneos. Obtiveram como resultado que a diferença dos tratamentos nos dois casos não resultou em diferenças significativas no perfil das reações adversas. As maiores incidências dos efeitos adversos foram reações mucocutâneas e lábios rachados em quase todos os pacientes. Metade dos pacientes relatou pele seca e erupções faciais, nariz seco, olhos irritados ou secos, opacidade da córnea, visão noturna diminuída, dor de cabeça e reações gastrointestinais. Outros efeitos como, dores musculares, dor óssea e nas articulações foram relatados em aproximadamente 50% dos pacientes quando perguntados e 15% espontâneos. Os autores relataram que não tiveram alterações importantes nos valores médios em qualquer um dos parâmetros hematológicos e nenhum dos valores enzimáticos do fígado mudou significativamente. Do total analisado, 25,6% dos pacientes tratados tiveram alterações significativas dos triglicerídeos que retomavam valores normais depois de 2 a 4 semanas e os valores de colesterol (lipídeos) não tiveram muitas alterações.

A terapia com a isotretinoína tem sido associada com várias alterações esqueléticas dependentes da idade, dose e duração do tratamento. Digiovanna (2001) relataram que 10% dos pacientes tratados com terapias padrões para acne desenvolvem alterações como hiperostose. As alterações foram mais acentuadas em pacientes mais velhos, com doses mais altas (3-4 mg/kg) e com períodos mais longos (2 a 6 anos).

Para avaliar a formação óssea endocondral em associação com a isotretinoína De Luca et al. (2000) testaram os efeitos agudos em ratos, administrando uma única dose de 300mg/kg de peso nos animais. Os autores observaram após 48 horas da administração do medicamento, uma redução significativa na placa de crescimento tibial dos roedores, por diminuição do pico de crescimento das zonas ósseas proliferativas e hipertróficas.

Altas doses de isotretinoína, a longo prazo, podem contribuir para o risco de fratura, bem como, níveis de vitamina A significativamente baixos são prejudiciais aos ossos e podem aumentar o risco de fratura. As fraturas de ossos longos em animais foram o ponto-chave para avaliar os malefícios potenciais da isotretinoína (ERDOGAN et al., 2006). Johansson et al. (2002) realizaram um estudo em ratos no qual demonstraram que uma ingestão de 1/3 de qualquer dose relatada na literatura causa lesões esqueléticas e é capaz de reduzir a densidade mineral óssea.

Michaëlsson et al. (2003) encontraram uma associação entre níveis de isotretinoína no sangue e risco de fraturas. Avaliaram através de um estudo longitudinal em 2.322 homens que foram acompanhados durante mais de 30 anos, em 266 fraturas documentadas no grupo. O estudo concluiu que o risco de fratura era mais alto em homens que fizeram ingestão de altas doses de isotretinoína.

Com o intuito de examinar o efeito da isotretinoína a curto prazo na densidade óssea lombar, Kocijancic (1995) submeteu 15 pacientes a seis meses de tratamento com isotretinoína nas doses médias de 0,4mg/kg/dia. O aumento médio na densidade óssea foi de 3% comparado ao ganho ósseo normal no grupo controle em adolescentes e adultos com idade média de 19,8 anos. Concluiu a partir desses resultados que a isotretinoína não tem efeito significativo na densidade óssea lombar.

Ballew, Galuska e Gillespie (2001) realizaram um estudo longitudinal no período entre 1988 e 1994 para avaliar a relação entre altas concentrações de retinall no sangue e densidade mineral óssea reduzida. Coletaram dados sobre a densidade óssea mineral e ésteres do retinal no sangue em jejum (marcadores de potencial excessivo de vitamina A). A densidade óssea mineral foi medida em quatro locais usando o teste de absormetria de raio X com energia dupla. Foram excluídos participantes com condições que alterassem o metabolismo da vitamina A. O estudo incluiu 5790 indivíduos entre homens e mulheres. Concluíram que não houve associação significativa entre as altas concentrações de ésteres de retinal no nível sanguíneo em jejum e a baixa densidade óssea mineral.

Feskanich et al. (2002) realizaram uma análise prospectiva de 18 anos sobre a ingestão de isotretinoína e fratura no quadril entre mulheres na pós-menopausa. Um total de 72.337 participantes variando entre 34 a 77 anos. Os autores constataram, após analisar e ajustar as variáveis, que o risco de fratura no quadril foi quase dobrado entre mulheres com ingestão de isotretinoína em torno de 2.000 R.E

por dia ou mais, comparados com as mulheres que tinham ingestão menor de 500 R.E por dia.

Promislow et al. (2002) avaliaram quase 1.000 idosos, homens e mulheres entre 55 e 92 anos, que fizeram ingestão de isotretinoína. A densidade óssea mineral foi mensurada no início do estudo e depois de quatro anos de tratamento. Os autores determinaram que a densidade óssea mineral foi ideal quando a ingestão de isotretinoína variava entre 600 a 900 RE por dia, indicando que tanto ingestão de isotretinoína acima ou abaixo deste intervalo podem comprometer a saúde óssea. Os autores observaram que a perda óssea anual estava associada com níveis de consumo menores do que níveis maiores toleráveis que atualmente é de 3.000 RE por dia.

Frankel et al. (1986) compararam os efeitos da hipervitaminose A em ratos, através da administração oral de isotretinoína nas doses de 30mg, 15mg e 7,5mg, sobre o nível sérico de cálcio, seus hormônios reguladores e fósforo inorgânico. Os autores concluíram que as alterações biológicas causadas por intoxicação com a isotretinoína são dose-dependentes, quanto maior a dose, maior os efeitos colaterais. Sugerem que em longo tempo de intoxicação com a isotretinoína causam alterações patológicas pela sua ação no tecido ósseo e altera o metabolismo dos hormônios reguladores de cálcio, através da diminuição na síntese dos reguladores, levando a quadro de hipercalcemia.

Ferguson et al. (2005) avaliaram o comportamento depressivo em ratos, que usavam isotretinoína nas doses de 7,5 mg/kg. Essa dose é considerada a menor para o tratamento de acne severa que produz níveis séricos da medicação equivalentes aqueles em humanos que utilizam como terapia padrão a isotretinoína a 1mg/kg/dia. Sessenta ratos foram tratados com cápsula de isotretinoína diluídas em óleo de soja para produzir suspensões. Na avaliação, foi realizado teste produzindo ruídos emitidos por rádios, obtendo um barulho estressante e, posteriormente, os ratos foram colocados em cilindros de água para nadar durante 10 minutos, avaliando-se a mobilidade dos animais. Os resultados nesse trabalho foram pouco expressivos no comportamento depressivo, contrariando relatos publicados com a hipótese de depressão associada à administração de isotretinoína.

Bérgoli (2009) avaliou o efeito da administração diária de 7,5 mg/kg de isotretinoína por via oral, para o tratamento de acne vulgar cística sobre reparo alveolar após exodontia de incisivos superiores, em ratos. Foram utilizados 32 ratos

distribuídos em grupo controle (12 ratos) e grupo experimental (20 ratos). Cada grupo foi dividido em quatro subgrupos de acordo com os períodos de observação em 7, 21, 28 e 90 dias após a extração. Os animais do grupo experimental receberam doses diárias de isotretinoína por um período de 30 dias antes da cirurgia e continuaram recebendo até os respectivos dias de eutanásias. Os animais do grupo experimental foram submetidos à coleta de sangue periférico através do plexo venoso orbital para análise do nível sérico de cálcio antes de iniciarem uso da medicação e no dia da eutanásia. As peças operatórias obtidas foram processadas e submetidas a cortes histológicos e corados em HE. As lâminas histológicas foram analisadas de forma descritiva sob microscopia de luz. Os resultados mostraram que houve aceleração no processo de reparo alveolar em todos os períodos no grupo experimental, quando comparados com o grupo controle. O nível sérico de cálcio teve uma diminuição estatisticamente significativa entre a 1ª e a 2ª coleta de sangue. Os autores concluíram com base nos resultados, que os animais do grupo experimental mostraram uma cicatrização alveolar mais acelerada do que os animais do grupo controle, indicando que a ingestão diária de isotretinoína em dose correspondente para o tratamento de acne cística acelerou o reparo alveolar.



*Problema/Hipóteses*

---

### 3 PROBLEMA/HIPÓTESES

#### 3.1 PROBLEMA

A ingestão diária de isotretinoína, em doses terapêuticas para tratamento de acne cística severa, interfere no processo de reparo ósseo de defeitos confeccionados em calotas cranianas de ratos?

#### 3.2 HIPÓTESES

$H_0$ : A ingestão diária de isotretinoína não interfere no processo de reparo ósseo em calotas de ratos.

$H_1$ : A ingestão diária de isotretinoína retarda o processo de reparo ósseo em calotas de ratos.

$H_2$ : A ingestão diária de isotretinoína acelera o processo de reparo ósseo em calotas de ratos.



*Proposição*

---

## 4 PROPOSIÇÃO

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da ingestão diária de isotretinoína sobre o reparo ósseo, nos defeitos confeccionados em calotas cranianas, em ratos.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever o processo de neoformação óssea em calota de ratos, com e sem ingestão diária de isotretinoína, por meio de análise microscópica descritiva;
- comparar, através de análise histomorfométrica, o percentual de neoformação óssea em calota de ratos, com e sem ingestão diária de isotretinoína, nos intervalos de tempo de 21, 28 e 90 dias após a confecção do defeito ósseo;
- analisar, através de coleta de sangue periférico e análise bioquímica, os níveis séricos de Cálcio, antes e após o uso da isotretinoína.



*Metodologia*

---

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS DA PESQUISA

Esta pesquisa foi desenvolvida após aprovação do seu projeto pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), protocolado sob o número 0014/08 (Anexo A). Pelo comitê de Ética para o uso de animais (CEUA) através do registro 09/00090 (Anexo B). Nesta pesquisa, foram respeitados os princípios éticos na experimentação animal, bem como as normas para a prática didático-científica da vivisseção dos mesmos, de acordo com a Lei n.º 6.638, de 08 de Maio de 1979 (Anexo C) e os Princípios Éticos na Experimentação Animal, segundo o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA; Anexo D).

### 5.2 CARACTERIZAÇÃO

A pesquisa foi realizada junto ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração CTBMF, da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), como parte integrante da Linha de pesquisa: Diagnóstico e terapêutica aplicada.

### 5.3 ANIMAIS

Foram utilizados 33 ratos albinos machos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), com aproximadamente 60 dias e peso corporal médio inicial de 250 gramas e clinicamente sadios. Os animais foram procedentes do biotério da Universidade Federal de Pelotas e a pesquisa realizada no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Farmácia da PUCRS. Durante todo o período experimental, os

animais foram alimentados com dieta sólida através de ração Nuvital-plus ®<sup>3</sup> e água ad libidum.

#### 5.4 ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS

Os animais selecionados foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: Grupo Controle e Grupo Experimental.

**Grupo Controle:** 15 ratos sem ingestão de isotretinoína. Os animais foram distribuídos em três subgrupos (cinco ratos por subgrupo) de acordo com o período de observação do reparo ósseo: 21, 28 e 90 dias.

**Grupo Experimental:** 18 ratos com ingestão diária de isotretinoína, durante 30 dias. Após este período, os animais foram distribuídos em três subgrupos (seis ratos por subgrupo) de acordo com os mesmos períodos de observação que o grupo controle, com o uso contínuo de isotretinoína até a morte do animal (Quadro 1).

Grupos	Período de Observação		
	21 dias	28 dias	90 dias
Grupo Controle	5 animais	5 animais	5 animais
Grupo Experimental	6 animais	6 animais	6 animais

Quadro 1 - Distribuição dos animais de acordo com os grupos controles e experimental e com o período de observação após o defeito ósseo.  
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2009).

Durante todo tempo do experimento, os animais foram mantidos em estante ventilada, em caixas de polipropileno, regularmente higienizadas e com assoalho forrado por serragem de pinho estéril, com temperatura controlada. As caixas foram numeradas, conforme o grupo que pertenciam os animais, com no máximo cinco

<sup>3</sup> Nuvital® Nutrientes S/A, Brasil

animais por caixa, identificados através de pintura na cauda com caneta de tinta permanente, onde o número de marcas indicava o número do respectivo animal.

Os procedimentos de manipulação e alimentação foram realizados diariamente, durante todo o período do experimento, seguindo a dieta padrão do biotério, trocando-se a serragem e lavando-se as caixas com água corrente e sabão, a cada 48 horas.

Os ratos do grupo controle foram pesados em balança de precisão antes de iniciar o tratamento e no dia da eutanásia. Os animais do grupo experimental, em função de receberam doses diárias de isotretinoína de acordo com o peso corporal, foram pesados antes de iniciar o tratamento e semanalmente até o dia da eutanásia, para ajustar a dose do medicamento.

## 5.5 ADMINISTRAÇÃO ORAL DA ISOTRETINOÍNA

Isotretinoína na forma farmacêutica de pó, fornecida pela farmácia Pharma&CIA<sup>4</sup>( Anexo E) foram produzidas através da diluição do seu conteúdo em óleo de girassol para obter as suspensões. Trinta frascos a cada 30 dias contendo a medicação em quantidade pré-estabelecida foram preparados de acordo com a quantidade e peso dos animais do grupo experimental.

O pó de isotretinoína e o óleo de girassol foram armazenados em frascos escuros, mantidos em geladeira até o momento de sua utilização. Cada suspensão foi preparada imediatamente antes da administração, em função da alta sensibilidade ao ar, calor e luz, especialmente em suspensão. No momento da administração foram preparadas, adicionando o óleo de girassol com auxílio de uma seringa dosadora dentro do recipiente contendo o pó da isotretinoína até alcançar a concentração desejada (7,5mg/kg de peso, conforme FERGUNSON et al., em 2005). O frasco era agitado para promover melhor diluição e a suspensão era imediatamente administrada aos animais. Este procedimento de reconstituição foi

---

<sup>4</sup> Farmácia de manipulação, Porto Alegre, Brasil

realizado diariamente, iniciando 30 dias antes do procedimento cirúrgico, até o dia de eutanásia do último grupo experimental.

A isotretinoína foi administrada por via oral, por meio da técnica de gavagem, nos períodos anteriormente descritos, com auxílio de uma seringa de 2 ml e uma cânula de metal própria para essa finalidade (Figura 1).



Figura 1 - Administração oral de isotretinoína por gavagem.  
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2009).

## 5.6 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no laboratório de Farmacologia da Faculdade de Farmácia (PUCRS). Todos os procedimentos foram realizados com instrumental, campos e aventais cirúrgicos esterilizados em autoclave, bem como gorro, máscara, óculos de proteção e luvas cirúrgicas. Após pesagem em balança de precisão, os ratos foram anestesiados com Cloridrato de Ketamina<sup>5</sup> 10% 50mg/kg (0,05ml/100g) e Cloridrato de Xilazina<sup>6</sup> 5 mg/kg (0,025ml/100g), por via intraperitoneal. Confirmada a anestesia, verificada por meio de teste de reflexo de retirada ao estímulo, os animais foram submetidos à tricotomia em região da calota

<sup>5</sup> Dopalen , Agribands Brasil Ltda, [www.vetbrands.com.br/bulas/Bula\\_Dopalen.pdf](http://www.vetbrands.com.br/bulas/Bula_Dopalen.pdf)

<sup>6</sup> Anasedan ®, Agribands Brasil Ltda, [www.vetbrands.com.br/bulas/Bula\\_Anasedan\\_Pet.pdf](http://www.vetbrands.com.br/bulas/Bula_Anasedan_Pet.pdf)

craniana, com auxílio de aparador elétrico<sup>7</sup> de pelos, na região compreendida entre os pavilhões auriculares externos. Com a pele exposta e livre de pelos, procedeu-se a anti-sepsia da região com solução de digluconato de clorexidina 0,12% e, campos cirúrgicos fenestrados, previamente adaptados, foram colocados nos animais. Com o animal posicionado em decúbito ventral, o acesso cirúrgico à região da calota craniana foi obtido por meio de uma incisão cutânea coronal linear, na pele e tecido subcutâneo de aproximadamente 1,5 cm de extensão, compreendida entre as orelhas, sempre com apoio em base óssea utilizando lâmina de aço<sup>8</sup> número 15 montada em cabo de bisturi Bard Parker número 3 (Figura 2A).

Após esse procedimento, os tecidos moles da cabeça foram separados com o auxílio de dois afastadores Senn Muller, permitindo a visualização do periósteo, que subsequentemente foi incisado, divulsionado com descolador de Molt e afastado juntamente com tecidos moles adjacentes, expondo a superfície externa da calota craniana (Figura 2B). Com uma seringa descartável de 20 mL foi feita irrigação da região com soro fisiológico a 0,9%, secando-se posteriormente com gaze estéril.

A cavidade foi confeccionada no osso parietal do lado direito, lateralmente a sutura sagital mediana, com auxílio de um motor elétrico<sup>9</sup> em baixa rotação com brocas esféricas de 2mm, correspondente ao tamanho dos defeitos confeccionados (Figura 2C). As perfurações foram realizadas sob irrigação abundante de solução fisiológica estéril de cloreto de sódio a 0,9%. Para evitar calor excessivo e necrose óssea, a broca foi pressionada levemente em movimentos intermitentes no sentido superoinferior, permitindo a inserção de todo o seu diâmetro (2 mm) no tecido ósseo para romper as corticais externa e interna da calota craniana, sem lesar as meninges.

Em seguida o periósteo, o tecido sucutâneo e a pele foram suturados, com pontos simples interrompidos, com fio monofilamentar de nylon (4-0)<sup>10</sup>, montado em agulha atraumática semicircular de 1,5 cm de comprimento e secção triangular, com auxílio de um porta-agulha Mayo Hegar e um pinça Adson Brown. A região foi limpa com gaze umedecida em soro fisiológico, para remoção dos resíduos de sangue coagulados e os animais foram colocados na posição de decúbito ventral em suas

---

<sup>7</sup> Aparador Elétrico de Barba e Bigode. Panasonic® - ER389K

<sup>8</sup> BD Lâmina – Curitiba – PR/Brasil.

<sup>9</sup> Beltec Indústria e Comércio de Equipamentos Odontológicos LTDA, Araraquara – SP/Brasil

<sup>10</sup> Mononylon® Somerville SA

gaiolas correspondentes para recuperação da anestesia. Para controle pós-operatório todos os animais receberam analgésico paracetamol<sup>11</sup> (80 mg/kg), via intramuscular, nos primeiros três dias pós-operatórios.

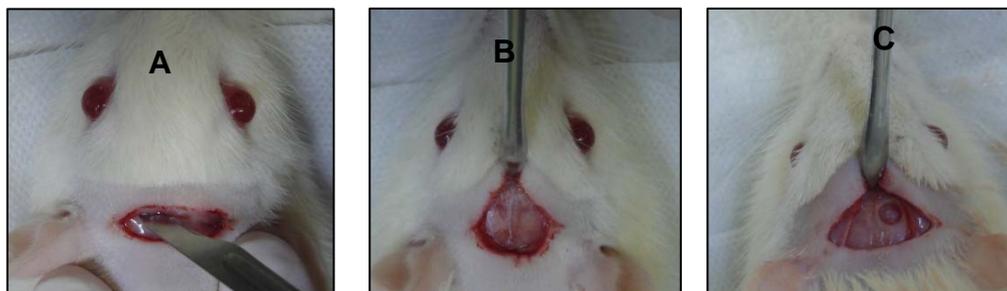


Figura 2 - (A) Incisão, (B) Descolamento (C) Confeção da cavidade cirúrgica.  
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2009).

Os animais foram eutanasiados aos 21, 28 e 90 dias após o procedimento cirúrgico, através de inalação contínua em câmara isoflurano, até que a morte dos animais pudesse ser constatada pela ausência dos sinais vitais.

## 5.7 PREPARO DAS AMOSTRAS

Para obtenção das peças cirúrgicas foi realizada uma incisão na região mais posterior dos tecidos moles da cabeça, com lâmina de aço número 15 e cabo de bisturi Bard-Parker número 3, com o intuito de não danificar a região óssea de interesse. O tecido mole da calvária foi removido com o auxílio de uma tesoura Metzenbaum e uma pinça Adson Brown, promovendo uma ampla exposição óssea da calota craniana, incluindo o osso parietal. Posteriormente foi realizada a osteotomia com a broca tronco-cônica 702, em baixa rotação, sob irrigação constante de solução fisiológica, a uma distância de, no mínimo, 4mm da cavidade e completada com o auxílio de um cinzel reto, visando minimizar possíveis danos

---

<sup>11</sup>Tylenol® JANSSEN-CILAG Farmacêutica.

gerados no osso pelo atrito da broca e assim procedeu-se a remoção completa da área operada e foram constituídas as peças cirúrgicas.

Os espécimes obtidos foram colocados em vidros previamente etiquetados, contendo solução de formalina tamponada a 10%, e mantidos por um período de 48 horas, tempo necessário para a fixação, até o momento de sua preparação. O processamento histológico foi desenvolvido no Instituto de Patologia (Laboratório de Diagnóstico) de Porto Alegre, seguindo a rotina laboratorial padronizada. Após o período de fixação, os espécimes foram descalcificados com uma solução de ácido nítrico a 5%, trocado diariamente, por 2 a 4 dias, de acordo com a espessura óssea. Após a descalcificação, foi obtido um corte de 6 micrometros de espessura de cada espécime na região central do defeito, corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) (Figuras 3 e 4). Foi obtido o terceiro corte seqüencial a partir da margem do bloco a cada lado, sendo obtido um corte de cada animal, representativo da área central do defeito, ou seja, no maior diâmetro (2mm).

As lâminas foram codificadas de modo que o examinador não soubesse a qual grupo ou subgrupo elas pertenciam, sendo caracterizado um estudo cego.

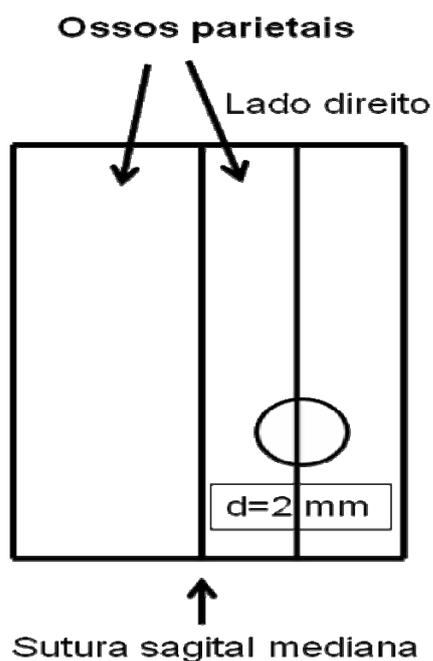


Figura 3 - Desenho esquemático do corte da peça operatória para confecção das Lâminas histológicas. - Cânula de Vidro.  
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2009).



Figura 4 - Peça cirúrgica obtida do osso parietal direito, cortada no centro da ferida operatória, no sentido longitudinal.  
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2009).

## 5.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA

As descrições histológicas foram realizadas por Patologista Bucal experiente<sup>12</sup>. O estudo das lâminas foi realizado com o emprego da microscopia óptica<sup>13</sup>, visando o estudo do processo de reparo ósseo. Para tal, foi utilizado o aumento microscópico de 40X. Os aspectos histológicos das peças ósseas do grupo experimental, bem como das peças ósseas do grupo controle foram descritas levando-se em consideração a neoformação de tecido ósseo. Todas as lâminas foram codificadas, possibilitando desta forma, a identificação a qual grupo de estudo pertenceria cada lâmina analisada.

<sup>12</sup> Vinicius Carrard – Especialista em Patologia Bucal

<sup>13</sup> Microscópio Óptico, marca Olympus, modelo BX50

O processo de reparo ósseo foi descrito e avaliado comparativamente entre os grupos estudados, evidenciando os eventos teciduais ocorridos. Foram observados prioritariamente:

- a) neoformação óssea nas margens do defeito;
- b) neoformação óssea no centro do defeito.

## 5.9 PROCEDIMENTO DE CAPTURA DE IMAGENS E ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

As lâminas obtidas de cada animal foram submetidas ao exame microscópico através do sistema computacional de captura e análise de imagem, utilizando o software de manipulação de imagens<sup>14</sup>. Sob um foco fixo e com clareza de campo, a imagem do microscópio foi capturada pela câmera de vídeo<sup>15</sup> acoplada ao microcomputador<sup>16</sup>, em um aumento de 40X, transformada em sinal elétrico na forma analógica, e transmitida para a tela do computador, onde a imagem foi digitalizada, sendo constituída por um conjunto de *pixels*<sup>17</sup> (1 pixel = 6,5 µm).

Após a captura das imagens em formato *JPEG*, em um total de 33 cortes histológicos correspondentes a todos os grupos do estudo (controle e experimental), as mesmas foram direcionadas ao programa de histomorfometria. Através deste programa, foi possível mensurar a área total do defeito e a área de neoformação óssea, através da delimitação do contorno com o auxílio do cursor *mouse*, gerando assim a proporção de osso neoformado, ou seja, o processo de evolução do reparo ósseo (Figuras 5 e 6).

---

<sup>14</sup> Programa IMAGE J, versão 1.41 desenvolvido por MediaCybernetics.

<sup>15</sup> Marca Sony (CCD-Iris – Color Vídeo Câmera, modelo DXX-107A).

<sup>16</sup> Marca Compaq (Pentium 4, CPU 1.8 GHz, 128 MB de memória RAM, HD 40 GB, sistema operacional Microsoft Windows versão 2002).

<sup>17</sup> Pixel (picture element) – menor unidade gráfica de uma unidade digital (ROMANS, 1995).

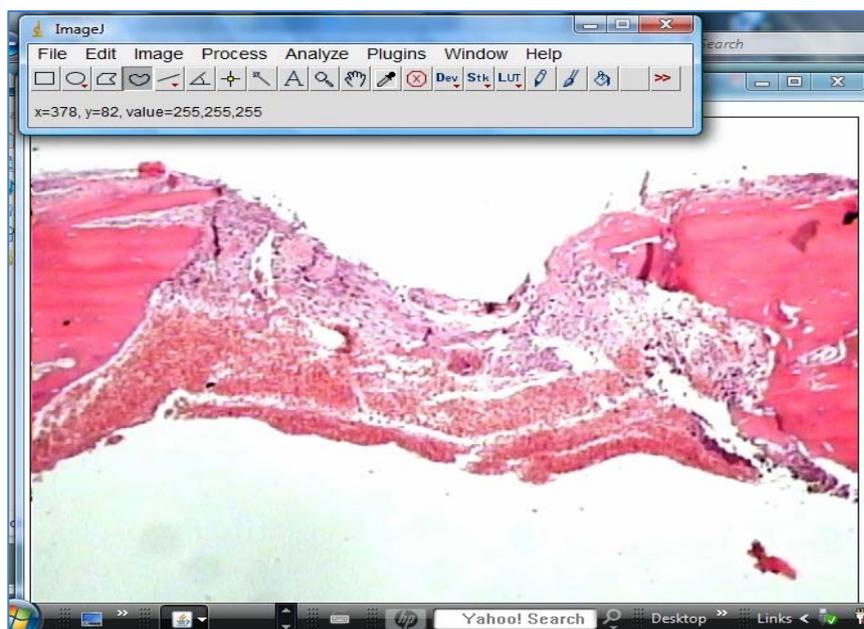


Figura 5 - Procedimento de histomorfometria utilizando o programa Image J, versão 1.41®.  
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2009).

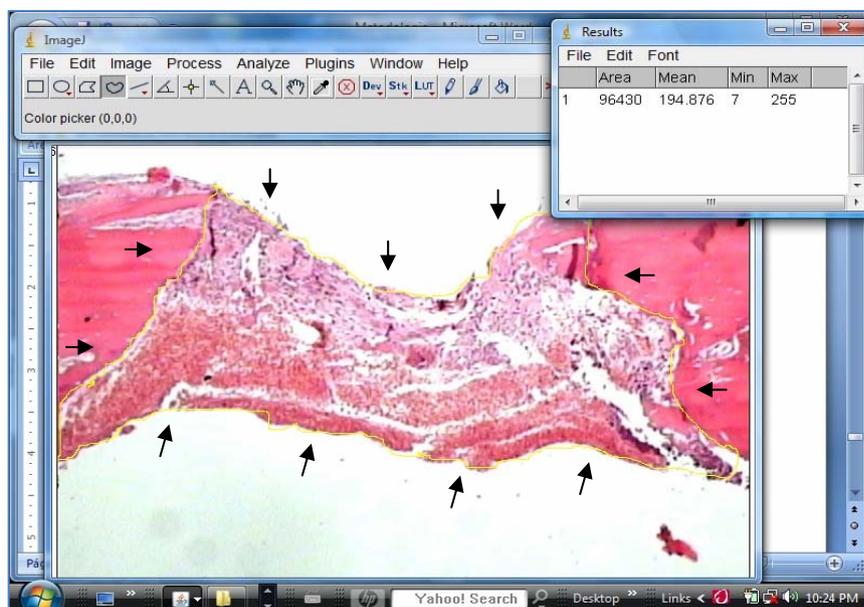


Figura 6 - Programa Image J versão 1.41®, usado para medir área do defeito circundado pela linha amarela e setas. Resultado expresso no quadrado superior direito da figura.  
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2009).

Os valores obtidos de cada trabécula óssea neoformada foram transferidos para uma tabela, na qual se registraram e calcularam a formação óssea total em cada lâmina analisada. Todos esses valores foram transportados para o programa Microsoft Excel<sup>18</sup>, inseridos nas tabelas definitivas e submetidos à análise estatística por meio do programa SPSS<sup>19</sup>.

Após a aquisição da imagem, realizou-se, com o auxílio do mouse, a delimitação do contorno das regiões desejadas (osso neoformado), e o valor dessas áreas, em  $\mu\text{m}^2$ , foi quantificado através do sistema computacional de captura e análise de imagem - Image J, versão 1.41®. Foi quantificada também a área inicial de cada defeito para obter a proporção de osso neoformado:

$$\text{Proporção de Osso Neoformado} = \frac{\text{Área de Osso Neoformado}}{\text{Área Total do Defeito}}$$

## 5.10 COLETA DE SANGUE PARA AVALIAÇÃO DO NÍVEL SÉRICO DE CÁLCIO

A coleta de sangue periférico foi realizada no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Farmácia (PUCRS). Somente os ratos do grupo experimental foram submetidos a este procedimento.

Foram realizadas duas coletas em cada animal. A primeira ocorreu antes do início da administração da isotretinoína e a outra no dia da eutanásia do animal. Assim, se fez a comparação dos níveis séricos de cálcio de cada animal antes e após o uso do medicamento.

A primeira coleta foi realizada sob anestesia geral, semelhante ao realizado para o procedimento cirúrgico já relatado. O sangue foi coletado através da punção do plexo venoso retro ocular. Após confirmação do efeito anestésico, foi imobilizada a cabeça do animal pinçando o crânio entre o polegar e o indicador da mão

---

<sup>18</sup> Programa EXCEL desenvolvido pela *Microsoft*®.

<sup>19</sup> Statistical Package for Social Science. Versão 11.5. Produzido por programa SPSS® Inc. 233 South Wacker Drive, 11th floor Chicago, IL 6060.

esquerda e introduzido uma cânula de vidro (Figura 7) no canto medial do olho, em um ângulo de 90° em relação à linha média, mantendo a cânula paralela à bancada até iniciar o gotejamento do sangue coletado em um tubo a vácuo identificado para cada animal (Figura 8). Uma amostra de sangue de 1 mL (quantidade necessária para análise bioquímica) foi obtida.

Após a coleta, os tubos contendo o sangue dos animais foram levados para uma centrífuga<sup>20</sup> (Figuras 9 e 10), onde foram centrifugadas a 5000 rpm durante 5 minutos, separando plasma e soro. Em seguida os tubos foram armazenados em isopor refrigerado e levados até o laboratório de Análises Clínicas do Hospital São Lucas PUCRS onde foram analisados os níveis séricos de cálcio.

O mesmo procedimento foi realizado no dia da eutanásia do animal, estando este sob anestesia geral, antes do óbito.



Figura 7 - Cânula de Vidro.  
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2009).



Figura 8 - Coleta de sangue no plexo venoso orbital.  
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2009).

<sup>20</sup> Centrífuga Excelsa baby I®-Fanem- São Paulo, Brasil



Figura 9 - Tubo contendo sangue.  
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2009).



Figura 10 - Centrífuga.  
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2009).

## 5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística deste trabalho foi realizada através de tabelas, gráficos, estatísticas descritivas (média e desvio-padrão) e alguns testes estatísticos para comparação intragrupo e intergrupos destacados a seguir.

Com o objetivo de comparar o percentual de neoformação óssea entre os grupos Experimental e Controle (teste intergrupos), foi realizado o teste não-paramétrico Mann-Whitney (este teste deve ser aplicado aos dados provenientes de dois grupos independentes, seu objetivo é verificar a existência de diferença significativa entre os valores dos grupos) (VIEIRA, 2003)<sup>21</sup>.

<sup>21</sup> VIEIRA, Sônia. Bioestatística: Tópicos Avançados. Rio de Janeiro: Campus, 2003.

Para a comparação entre os períodos de tempo 21, 28 e 90 dias do mesmo grupo (teste intragrupo: Experimental ou Controle), foi utilizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis (este teste serve para testar a hipótese de que vários grupos ou subgrupos têm a mesma distribuição, ou são significativamente distintos).

Para a comparação dos níveis de cálcio antes e após administração de isotretinoína (teste intragrupo: grupo experimental) por se tratarem de dados pareados utilizou o teste não-paramétrico de Wilcoxon (este teste tem por objetivo a comparação de um par de valores verificando a existência ou não de diferença significativa entre estes)

Os resultados foram considerados significativos a um nível de significância máximo de 5% ( $p \leq 0,05$ ). Para esta análise o software utilizado foi o SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) versão 10.0.



*Resultados*

---

## **6 RESULTADOS**

### **6.1 DESCRIÇÕES DA OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA DOS DEFEITOS ÓSSEOS**

Os resultados obtidos das 33 lâminas, através da microscopia óptica dos grupos controle e experimental em cada período de observação, através do padrão de ossificação dos defeitos ósseos (osso neoformado), de forma descritiva, foram os seguintes:

Em todos os grupos e períodos de observação, o defeito ósseo apresenta-se nítido, com rompimento completo da díploe. Não foram observados episódios de necrose ou reabsorção óssea.

#### **6.1.1 Grupo controle 21 dias**

Em todas as lâminas observa-se defeito ósseo nítido, com discreta neoformação óssea nas margens do defeito ósseo. A maior parte do defeito apresenta com tecido conjuntivo desorganizado rico em células inflamatórias e lacuna preenchendo quase a totalidade do defeito ósseo. Pequena área de neoformação óssea no centro do defeito (Figura 11).

#### **6.1.2 Grupo experimental 21 dias**

Em todas as lâminas desse grupo observa-se nitidez do defeito ósseo. Áreas de neoformação óssea próximo as bordas dos defeitos e ausência de neoformação óssea no centro do defeito, predominando um tecido conjuntivo frouxo com células

do infiltrado inflamatório. Nota-se com nitidez a linha de reversão, ou seja, a linha que separa a borda do defeito com o osso neoformado (Figura 12).

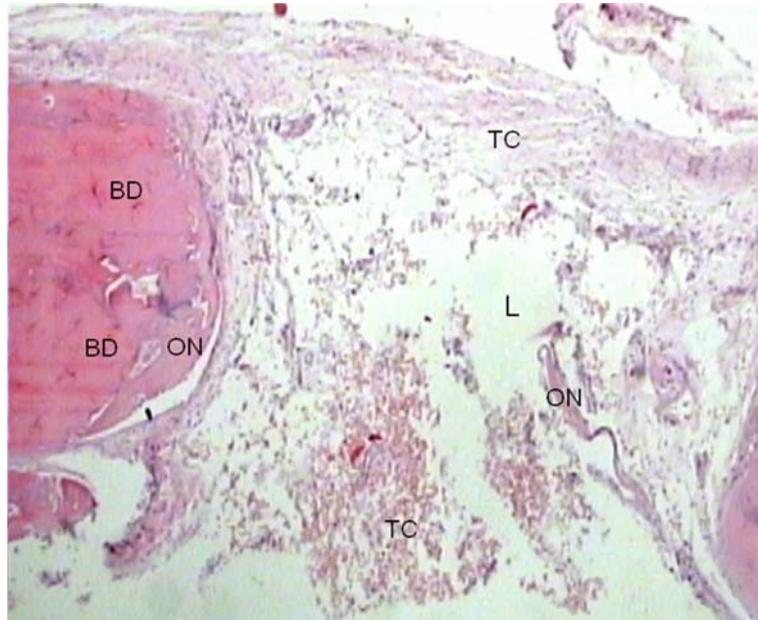


Figura 11 - Defeito Controle com 21 dias de observação. BD - borda do defeito; ON - osso neoformado; TC - tecido conjuntivo; L - lacuna. H.E. Original: 40X.  
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2009).

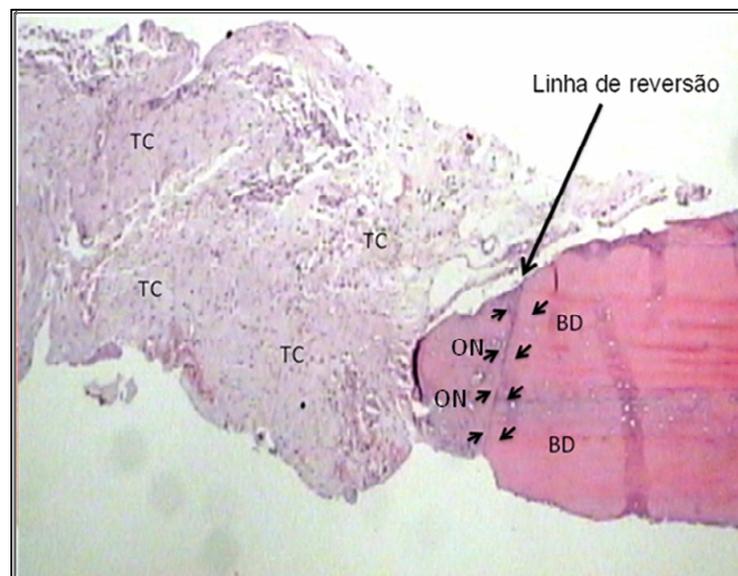


Figura 12 - Defeito experimental com 21 dias de observação. BD - borda do defeito; ON - osso neoformado; TC - tecido conjuntivo. H.E. Original: 40X.  
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2009).

### **6.1.3 Grupo controle 28 dias**

Neste grupo, na maioria das lâminas, observa-se a neoformação óssea na margem do defeito. Essa neoformação é inexistente no centro do defeito, onde se identifica tecido conjuntivo bem organizado com infiltrado inflamatório crônico (Figura 13).

### **6.1.4 Grupo experimental 28 dias**

Observa-se grande quantidade de neoformação óssea no defeito em quase todas as lâminas deste grupo, iniciando nas margens do defeito até as regiões centrais. Em dois casos do presente grupo, observa-se a presença de tecido conjuntivo mais organizado e infiltrado inflamatório crônico no centro do defeito (Figura 14).

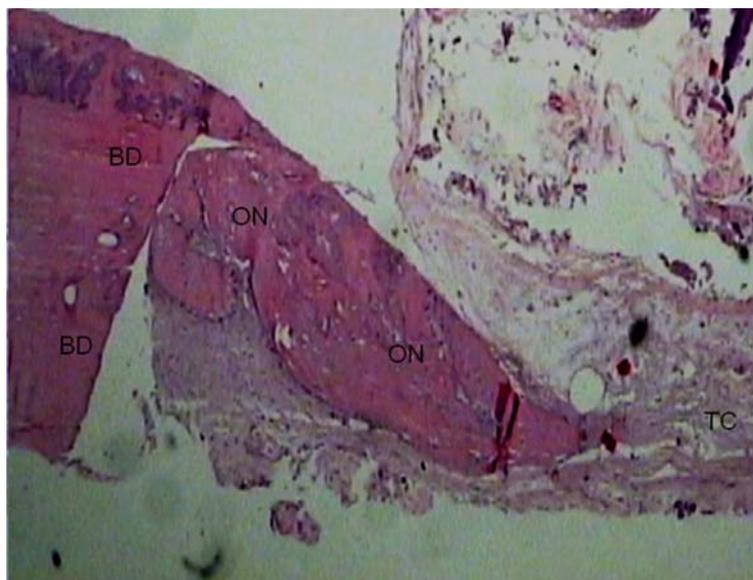


Figura 13 - Defeito controle com 28 dias de observação. BD – borda do defeito; ON – osso neofomado; TC – tecido conjuntivo. H.E. Original: 40X.  
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2009).

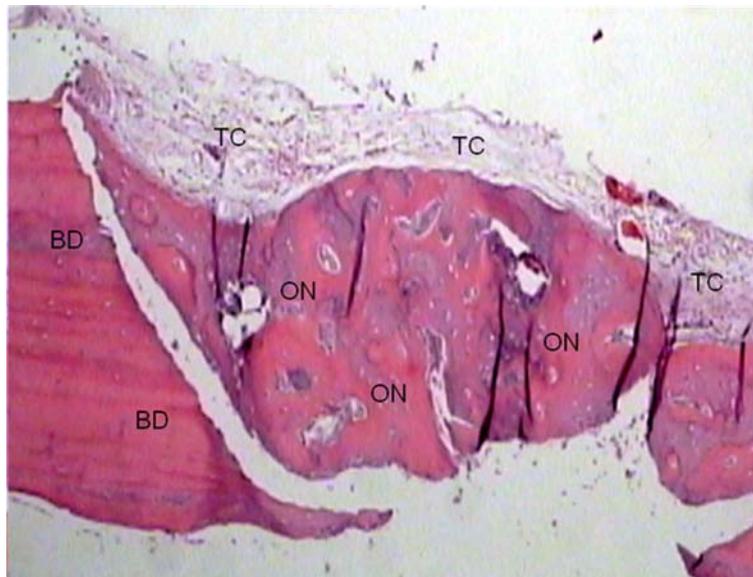


Figura 14 -- Defeito experimental com 28 dias de observação. BD – borda do defeito; ON – osso neofomado; TC – tecido conjuntivo. H.E. Original: 40X.  
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2009).

### **6.1.5 Grupo controle 90 dias**

Neste grupo observa-se que na maioria das lâminas ocorreu neoformação óssea menor que o grupo experimental, com tecido conjuntivo bem organizado no centro do defeito (Figura 15).

### **6.1.6 Grupo experimental 90 dias**

A maioria das lâminas deste grupo mostra grande quantidade de neoformação óssea, com pequena ou inexistente quantidade de tecido conjuntivo organizado no centro do defeito (Figura 16).

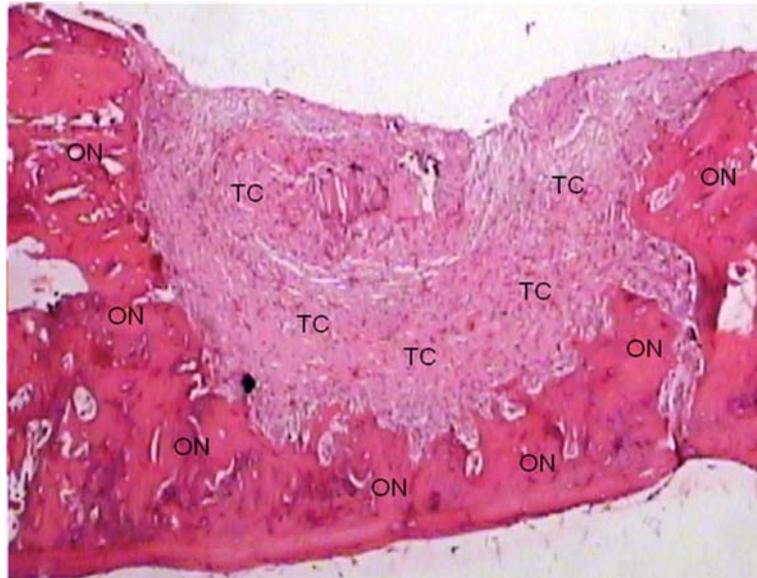


Figura 15 - Defeito controle com 90 dias de observação. ON – osso neofomado TC – tecido conjuntivo. H.E. Original: 40X.  
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2009)

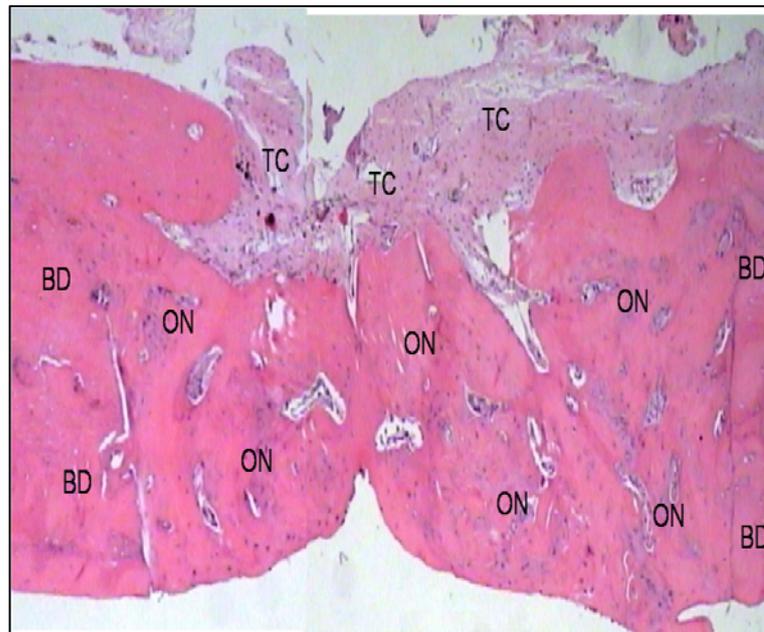


Figura 16 - Defeito experimental com 90 dias de observação.  
ON – osso neofomado. TC – tecido conjuntivo. H.E. Original: 40X.  
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2009).

## 6.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA DESCRITIVA DAS MENSURAÇÕES DA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA

### 6.2.1 Comparação da porcentagem da área de neoformação óssea em relação à área total do defeito, entre os grupos de estudo em cada período de observação.

A Tabela 1 e o Gráfico 1 mostram o percentual de formação óssea comparando os grupos estudados (experimental X controle), nos respectivos tempos de observação. Os maiores percentuais de neoformação óssea foram encontrados nos grupos experimentais (isotretinoína). No grupo experimental, aos 21 dias houve 25,37% de osso neoformado, aos 28 dias, 41,78% e aos 90 dias, 57,51% de preenchimento da cavidade com novo osso. No grupo controle os valores foram menores. Aos 21 dias observou-se 17,10% de neoformação óssea, aos 28 dias, 34,42% e, aos 90 dias de experimento 48,49%.

Tabela 1 - Comparação da porcentagem de neoformação óssea entre os grupos de estudo em cada período de observação.

Grupo	n	Porcentagem de neoformação óssea (%)			Z	p
		Média	Desvio-padrão	Rank Médio		
Tempo 21 dias						
Isotretinoína	6	25,37	9,14	7,33	-1,461	0,177
Controle	5	17,10	9,23	4,40		
Tempo 28 dias						
Isotretinoína	6	41,78	7,00	7,50	-1,643	0,126
Controle	5	34,42	7,70	4,20		
Tempo 90 dias						
Isotretinoína	6	57,51	11,62	6,83	-0,913	0,429
Controle	5	48,49	16,40	5,00		

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2009).  $p \leq 0,05$

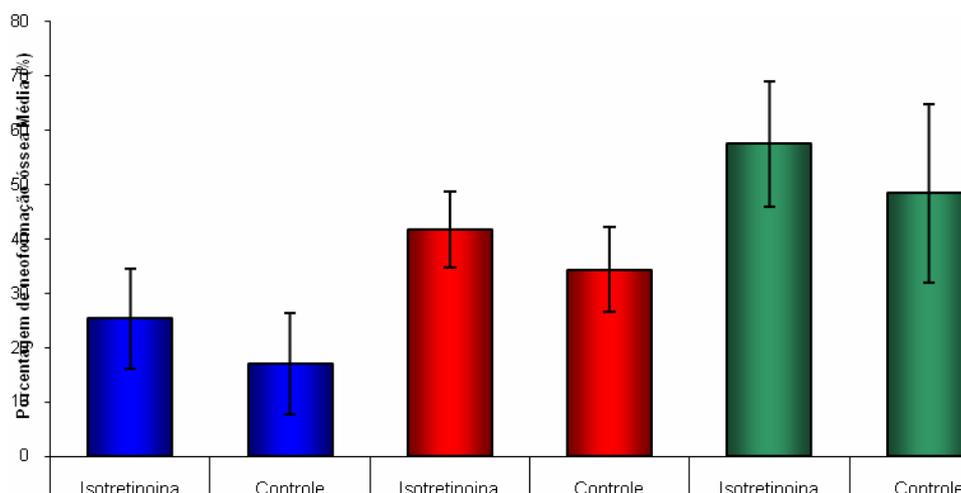


Gráfico 1 - Comparação da porcentagem de neoformação óssea entre os grupos, em cada período de observação.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2009).

Através dos resultados do teste não-paramétrico Mann-Whitney verifica-se que não existem diferenças significativas entre os grupos para nenhum dos tempos estudados.

### 6.2.2 Comparação da porcentagem de neoformação óssea entre os períodos de observação em cada grupo de estudo

Através dos resultados do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis verifica-se que existem diferenças significativas entre os tempos para ambos os grupos estudados (Tabela 2, Gráfico2) Observa-se que:

**Grupo Isotretinoína:** Todos os períodos de tempo diferem entre si, onde 21 dias apresenta os menores valores, seguido pelo tempo 28 dias e por fim com os maiores valores o tempo 90 dias;

**Grupo Controle:** O tempo 21 dias apresenta valores significativamente inferiores ao tempo 90 dias. O tempo 28 dias não diferiu de nenhum outro grupo.

Tabela 2 - Comparação da porcentagem de neoformação óssea entre os períodos de observação em cada grupo de estudo.

<i>Tempo</i>	<i>n</i>	<i>Porcentagem de neoformação óssea (%)</i>			<i>Z</i>	<i>p</i>
		Média	Desvio-padrão	Rank Médio		
<b>Grupo Isotretinoína</b>						
21 dias	6	25,4 <sup>A</sup>	9,1	4,0	13,135	0,001
28 dias	6	41,8 <sup>B</sup>	7,0	9,3		
90 dias	6	57,5 <sup>C</sup>	11,6	15,2		
<b>Grupo Controle</b>						
21 dias	5	17,1 <sup>A</sup>	9,2	3,8	7,460	0,024
28 dias	5	34,4 <sup>AB</sup>	7,7	8,8		
90 dias	5	48,5 <sup>B</sup>	16,4	11,4		

\* Médias seguidos de mesma letra não diferem entre si  
 Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2009).  $p \leq 0,05$

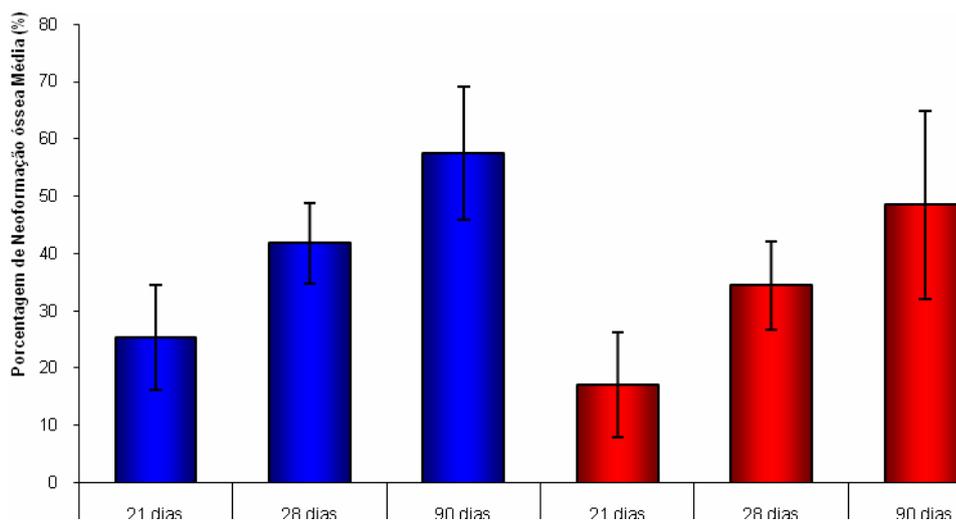


Gráfico 2 - Comparação da porcentagem de neoformação óssea entre os períodos de observação em cada grupo de estudo.  
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2009).

Observa-se que a neoformação óssea foi maior no grupo da isotretinoína do que o grupo controle em todos os tempos, sendo que essa diferença não foi estatisticamente significativa (Gráfico 2).

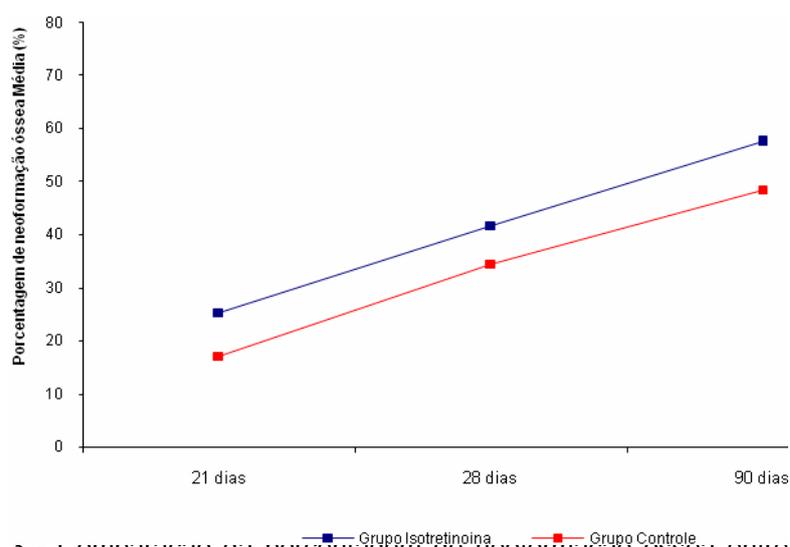


Gráfico 3 - Comparação da porcentagem de neoformação óssea entre os períodos de observação em cada grupo de estudo.  
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2009).

### 6.2.3 Comparação dos níveis de cálcio antes e após a administração de isotretinoína no grupo experimental

Para a comparação dos níveis de cálcio antes e após administração de isotretinoína, por se tratarem de dados pareados utilizou o teste não-paramétrico de Wilcoxon. Este teste tem por objetivo a comparação de um par de valores verificando a existência ou não de diferença significativa entre estes. O software utilizado para esta análise foi o SPSS versão 10.0 e o nível de significância máximo adotado foi 5% ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação entre níveis séricos de cálcio antes e após a administração de isotretinoína no grupo experimental.

Comparação	n	Níveis séricos de cálcio (mg/dL)		Rank Médio	Z	p
		Média	Desvio-padrão			
Tempo:						
21 dias						
Antes	5	10,28	0,20	3,00	-2,023	0,043
Após	5	9,22	0,53	0,00		
Tempo:						
28 dias						
Antes	5	10,10	0,07	3,00	-2,032	0,042
Após	5	9,44	0,15	0,00		
Tempo:						
90 dias						
Antes	5	10,36	0,47	3,00	-2,032	0,042
Após	5	9,66	0,24	0,00		

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2009).  $p \leq 0,05$

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Wilcoxon verifica-se que existe diferença significativa entre os níveis de cálcio para todos os períodos. Observa-se que houve uma redução significativa nos níveis séricos de cálcio após a administração de isotretinoína em todos os tempos estudados (Gráfico 4).

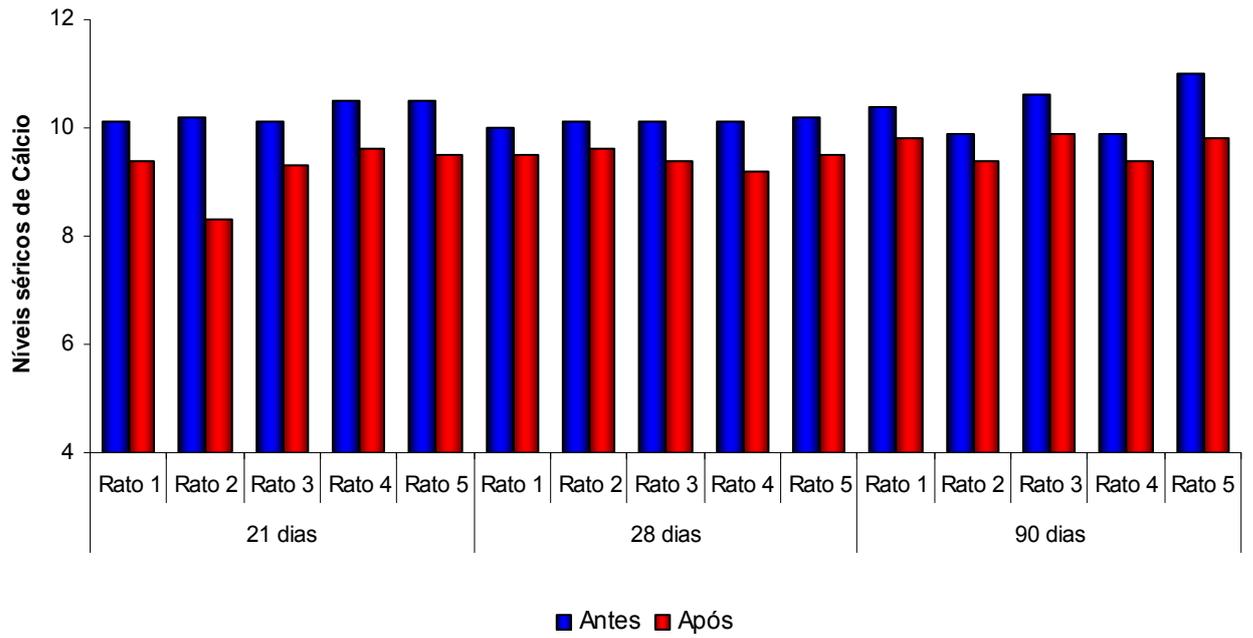


Gráfico 4 - Comparação entre níveis séricos de cálcio antes e após a administração de isotretinoína no grupo experimental.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2009).



*Discussão*

---

## 7 DISCUSSÃO

A isotretinoína é um produto metabólico sintético da vitamina A, e cada vez mais é amplamente prescrita no tratamento dermatológico para o tratamento de desordens de cornificação, acne cística severa, acne nodular severa recalcitante, pacientes com xeroderma pigmentoso, quimioprevenção de câncer de pele, síndrome do carcinoma de célula basal nevíde, receptores de transplante de órgão ou de medula óssea, múltiplos carcinomas de células basais e escamosas, doenças de queratinização anormal (AZULAY et al., 1985; CAMPBELL; DIGIOVANNA, 2006; GOLDSMITH et al., 2004; FLEISCHER et al., 2003; FRANKEL et al., 1986; MCLANE, 2001; VALENTIC; ELIAS; WEINSTEIN, 1983). Apesar dos inúmeros benefícios e indicações dessa droga, diversos efeitos colaterais podem estar associados a sua aplicação, como danos ao fígado, elevação do triglicérido e do colesterol, hipercalcemia, anemia, aumento do número de plaquetas e diminuição dos leucócitos ou hemácias (AZULAY et al., 1985) e principalmente, aqueles no sistema músculo-esquelético (CAREY et al., 1988; FESKANICH et al., 2002; DIGIOVANNA et al., 2004; ELLIS; KENT, 2001; FRANKEL et al., 1986; JOHANSSON et al., 2002; KAWARA et al., 2002; KILCOYNE et al., 1986; MICHAËLSSON et al., 2003; MILSTONE; INSOGNA; LEACHMAN, 2005; PROMISLOW et al., 2002; TÖRÖK et al., 1988; VALENTIC; ELIAS; WEINSTEIN, 1983;).

O tecido ósseo tem propriedades de remodelação, através de suas células, osteoblastos, osteoclastos (PETERSON et al., 2003), porém existem fatores que interferem na formação óssea, no remodelamento e no reparo ósseo como os fatores extrínsecos, e, dentre eles, o uso de medicamentos (CASSIDY, 1999). Por ser um dos tecidos mais abordados na área da Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial (CTBMF), através de exodontias, implantes, cirurgia ortognática, traumas, dentre outros, fica evidente a preocupação do cirurgião em identificar as alterações ósseas decorrentes do uso da isotretinoína, e conhecer de que forma elas ocorrem. Até o momento, os mecanismos pelos quais a isotretinoína interfere no metabolismo ósseo ainda não foram esclarecidos (MARGOLIS et al., 1996; RODHE; DE LUCA, 2003).

Como visto anteriormente, altas doses de vitamina A e seus derivados tem sido relacionadas com alterações antagônicas no metabolismo ósseo, seja ocasionando reabsorções ósseas através do aumento significativo de osteoclastos e diminuição de tecido osteóide (FRANKEL et al., 1986) ou por meio de alterações hiperostóticas, ou calcificação de tendões e ligamentos, e fechamento prematuro das epífises (CAREY et al., 1988; DIGIOVANNA, 2004; KILCOYNE et al., 1986; LEACHMAN, 1999; TÖRÖK et al., 1988).

A seleção do modelo experimental (ratos) foi realizada com base na literatura, permitindo maior padronização quanto à dose, ao tempo de observação e ao tamanho da amostra. Com isso, a metodologia foi bem fundamentada, com suporte na literatura, permitindo discussão e comparações de forma mais segura (FERGUSON et al., 2005; FRANKEL et al., 1986; RHODE et al., 1999; RHODE; DE LUCA, 2003;).

O tamanho dos defeitos ósseos foram estabelecidos com base nos relatos de Schmitz e Hollinger (1986) que relataram que defeitos de 2mm deveriam cicatrizar espontaneamente no período de 12 semanas (cerca de 90 dias), não sendo considerados defeitos críticos. Comparando os defeitos ósseos entre os animais que ingeriram isotretinoína e os do grupo controle, observou-se que, aos 21 dias, houve maior neoformação óssea nas cavidades experimentais. Neste período de observação, a média de neoformação óssea foi de 25,37% no grupo experimental comparado com 17,10% no grupo controle. Aos 28 dias, o grupo com isotretinoína continua com valores maiores, 41,78% comparado com 34,42% no grupo controle. No último tempo, aos 90 dias no grupo da isotretinoína obtiveram-se valores 57,51% que foi maior que o grupo controle 48,49% (Tabela 1, Gráfico 1, p. 76). Observa-se então que os valores numéricos da área, através da análise histomorfométrica, tiveram porcentagem média de neoformação óssea superiores nos grupos com isotretinoína em relação ao grupo controle (porém, sem significância estatística), o que corrobora os estudos de Kamm (1982) e Bérgoli (2009) que descreveram que animais com excesso de isotretinoína sintética têm acelerada a reparação óssea. No entanto, observou-se que em ambos os grupos o reparo ósseo não se completou em um período de 90 dias. No estudo de Turnbull e Freeman (1974), os defeitos de 2mm também não cicatrizaram durante este mesmo período de observação. A partir dos resultados, pode-se considerar, portanto, um defeito de 2mm em calota craniana

de ratos como defeito crítico, pois não cicatrizaram completamente em 12 semanas, como determinaram Schmitz e Hollinger (1986) .

O momento ideal para abordagem no tecido ósseo frente a pacientes que fazem uso da isotretinoína é essencial para um prognóstico de reabilitação. A isotretinoína é absorvida no trato gastro-intestinal e metabolizada no fígado, com uma meia vida de 20 horas, sendo eliminada em aproximadamente 19 a 20 horas na urina e nas fezes. A biodisponibilidade é de aproximadamente 25%, que pode ser aumentada uma ou duas vezes se administrada com o alimento. O pico da concentração sanguínea é de quatro horas após a ingestão e depois de um mês a isotretinoína não é mais detectável no sangue. (ELLIS; KENT, 2001; WIEGAND; CHOU, 1998). No entanto, muitos estudos demonstraram que os efeitos colaterais dessa droga dependem da dose e do tempo de uso, e podem permanecer após a suspensão do medicamento (AZULAY et al., 1985; CAMPBELL; DIGIOVANNA, 2006; DIGIOVANNA, 2001; ELLIS; KENT, 2001; FRANKEL et al., 1986). Dessa forma, é preciso identificar se houve alterações no tecido ósseo que será alvo de procedimentos cirúrgicos, mesmo após a suspensão da isotretinoína, e se essas alterações irão limitar, contra-indicar ou postergar a intervenção.

Toxicidade ao longo do tratamento envolvendo o sistema esquelético deve ser monitorada com exames de imagens e avaliação laboratorial dos níveis séricos de cálcio antes e durante o tratamento (CAMPBELL; DIGIOVANNA, 2006).

No presente estudo, o microscópico revelou ser um importante instrumento para a descrição do reparo ósseo e avaliação quantitativa da neoformação óssea. A análise histomorfométrica utilizada permitiu, com auxílio de um programa de manipulação de imagem biomédicas de domínio público (*software Image J®*), detectar a presença de osso no defeito, mensurar o osso neoformado e comparar o tamanho da área de neoformação, entre os grupos experimental e controle.

Na presente pesquisa, foi administrada 7,5 mg/kg/dia de isotretinoína, dose mínima equivalente à dose padrão administrada em humanos para o tratamento de acne severa (1mg/Kg/dia) (FERGUNSON et al., 2005; FRANKEL et al., 1986). Os animais do grupo experimental receberam o medicamento por um período inicial de 30 dias antes da confecção das cavidades ósseas e permaneceram fazendo uso do medicamento até os períodos de observação de 21, 28 e 90 dias, para simular a intervenção cirúrgica durante a terapia com uso da isotretinoína.

O risco de alterações na saúde óssea está relacionado com deficiência ou excesso de vitamina A (PROMISLOW et al., 2002). A densidade óssea mineral é considerada ideal quando a ingestão de isotretinoína varia entre 600 e 900 RE/dia (PROMISLOW et al., 2002). O estudo de FESKANICH et al. (2002) evidenciou um risco de fratura com ingestões menores do que 500 RE/dia, no entanto, o risco foi quase dobrado com ingestões de isotretinoína em torno de 2.000 RE/dia.

Em pacientes que fazem uso de altas doses (3-4 mg/kg) de isotretinoína tem sido observadas tanto hiperostose (CAREY et al., 1988; KILCOYNE et al., 1986; TÖRÖK et al., 1988), como reabsorção óssea mineral acelerada (VALENTIC; ELIAS; WEINSTEIN 1983), sendo menos evidentes ou sem efeito com doses recomendadas (padrão) 1mg/kg/dia (DIGIOVANNA et al., 2004). A mesma dose, administrada de forma fracionada 2x/dia podem diminuir os efeitos colaterais (ELLIS; KENT, 2001).

Há relatos de que a administração de curta duração da isotretinoína não tem efeitos adversos sobre o esqueleto, especificamente sobre a densidade mineral óssea (MILSTONE; INSOGNA; LEACHMAN, 2005), porém em longo tempo de uso (2 a 6 anos) as alterações podem ser acentuadas, através da ocorrência de hiperostose (CAREY et al., 1988; DIGIOVANNA et al., 2004; KILCOYNE et al., 1986; TÖRÖK et al., 1988;), alterações patológicas no tecido ósseo resultantes de alterações no metabolismo do cálcio e aumento do risco de fraturas (FRANKEL et al., 1986; JOHANSSON et al., 2002; KAWAHARA et al., 2002). No presente estudo, foram observadas alterações ósseas, com aceleração do reparo ósseo em defeitos confeccionados em calotas cranianas de ratos, após ingestão de isotretinoína, mesmo utilizando dose terapêutica padrão para o tratamento de acne cística severa.

A coleta de cálcio no sangue foi realizada antes e após a administração de isotretinoína, em cada período de observação, ou seja, 21, 28 e 90 dias. Todos os resultados ficaram dentro dos valores de referência, entre 8,4 a 10,2 mg/dL. Através dos resultados estatísticos verificou-se que existe diferença significativa entre os níveis de cálcio para todos os períodos. Observou-se que houve uma redução significativa nos níveis séricos de cálcio após a administração de isotretinoína em todos os tempos estudados o que corrobora o estudo de Frankel et al. (1986) no qual ratos com doses de 7,5 mg/Kg de isotretinoína, tiveram os níveis de cálcio no sangue significativamente mais baixos. No entanto, contrariando os estudos de

Downs (2003); Valentic, Elias e Weinstein (1983) nos quais a ingestão de quantidades tóxicas de isotretinoína acarretou hipercalcemia e reabsorção óssea, em virtude dos íons de cálcio terem sido retirados dos ossos e lançados na corrente sangüínea ocasionando diminuição da densidade mineral óssea (JOHANSSON; MELHUS, 2001). Inversamente proporcional, a aceleração do reparo ósseo estaria relacionada à hipocalcemia, através da remoção do cálcio da corrente sanguínea para o tecido ósseo, semelhante aos eventos hiperostóticos.

A coleta de cálcio no sangue foi realizada somente no grupo experimental uma vez que estudos prévios já demonstraram que a hipervitaminose A interfere nos hormônios reguladores e conseqüentemente nos níveis séricos de cálcio (FRANKEL et al., 1986; JOHANSSON; MELHUS, 2001). No entanto, seria importante que em outros estudos estes testes sejam também realizados no grupo controle para determinar se estas alterações não ocorreriam em ratos no período pós-operatório de cirurgia de defeitos ósseos em calota craniana.

No presente estudo, a ausência de significância estatística da proporção de neoformação óssea entre os grupos experimental e controle levam à confirmação da hipótese nula ( $H_0$ ), na qual a isotretinoína não interfere no reparo ósseo. No entanto, mesmo que não estatisticamente significativo, a análise microscópica descritiva evidenciou um aumento no percentual de neoformação óssea em todos os períodos de observação nos animais submetidos à ingestão oral de isotretinoína. Este aumento de neoformação óssea denota uma aceleração no processo de reparo ósseo na calota craniana. Acredita-se que com o aumento do tamanho da amostra poder-se-ia confirmar a hipótese 2 ( $H_2$ ), ou seja, aceleração do reparo ósseo e rejeitar  $H_0$  e  $H_1$ , necessitando estudos adicionais. Dentro das mesmas condições experimentais, Bérgholi (2009) concluiu, após análise microscópica descritiva, que houve uma aceleração do processo de reparo alveolar de incisivos de ratos após exodontia. Porém, o autor não realizou análise histomorfométrica, não permitindo testes estatísticos entre os grupos. Acredita-se que o mecanismo de aceleração de neoformação óssea (na calota ou no alvéolo dental) seja semelhante ao que ocorre nas hiperostoses, calcificação de ligamentos ou fechamento prematuro das epífises, pois em todos estes casos parece haver uma maior exigência metabólica local. Cabe ressaltar que esta pesquisa quantificou a neoformação óssea em cavidades previamente confeccionadas apenas em calotas, onde o processo de reparo exige

maior metabolismo local e sistêmico. Outros sítios ósseos não foram analisados para detectar possíveis reabsorções, hiperostoses, ou outras alterações. Não se sabe também se as mudanças no tecido ósseo ocorrem isoladamente, sequencialmente ou simultaneamente, podendo constituir objeto de estudo em futuras investigações.

É de suma importância que o profissional tenha conhecimento sobre os efeitos da isotretinoína nos casos de enxertia, implantes, fraturas, cirurgias ortognáticas, movimentação ortodôntica, tratamentos periodontais, que necessitam do metabolismo e da reparação do tecido ósseo para o sucesso do tratamento. Sugere-se que, a partir desta pesquisa, outros estudos sejam continuados na região craniofacial, observando o reparo em outros ossos da face e com outros períodos de administração e com outras doses de isotretinoína.



*Conclusões*

---

## 8 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que:

- a) a administração diária de isotretinoína na dose padrão para o tratamento de acne vulgar promoveu uma aceleração no processo de reparo ósseo observado na análise microscópica descritiva;
- b) houve um maior percentual de neoformação óssea no grupo submetido a administração oral de isotretinoína, não significativo estatisticamente;
- c) houve redução significativa nos níveis séricos de cálcio após administração diária de isotretinoína na dose de 7,5 mg/kg/dia nos períodos observados.



## *Referências*

---

## REFERÊNCIAS

ABROMS, L. et al. what is the best approach to reducing birth defects associated with isotretinoin? **PLoS Med.**, San Francisco, v.3, n.11, p.1978-1983, Nov. 2006.

AZULAY, D. R. et al. Tecido de granulação exuberante (Efeito collateral da terapêutica com isotretinoína. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 60, n. 4, jul/ago,1985.

BALCERZAK, M. et al. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v.50, n.4, p. 1019-1038, 2003.

BALLEW C.; GALUSKA D.; GILLESPIE, C. High serum retinyl esters are not associated with reduced bone mineral density in the Third National Health And Nutrition Examination Survey, 1988-1994. **J. Bone. Miner. Res.**, Washington, v. 16, n. 12, p. 2306-23012, Dec. 2001.

BÉRGOLI, R, D. Efeito da isotretinoína no reparo alveolar após exodontia estudo em ratos. 2009. 86 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia)–Faculdade de odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

BURKITT, H. G.; YOUNG, B.; HEATH, J. W. **Wheater's functional histology: a text and color atlas**. 3. ed. Hong Kong: Longman Group, 1997.

CAMPBELL, R. M.; DIGIOVANNA, J. J. Skin cancer chemoprevention with systemic retinoids: an adjunct in the management of selected high-risk patients. **Dermatol. Ther.**, Copenhagen, v. 19, n. 5, p. 306-14, Sect./Oct. 2006.

CAREY B.M. et al. Skeletal toxicity with isotretinoin therapy: a clinico-radiological evaluation. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v.119, n. 5, p. 609-14, Nov. 1988.

CASSIDY, J. T. Osteopenia and osteoporosis in children. **Clin. Exp. Rheumatol.**, Pisa, v. 17, n. 2, p. 245-250, Mar./Apr. 1999.

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. **Legislação**. São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br/etica.htm#topo#topo>>. Acesso em: 21 mar. 2006.

DE LUCA, F. et al. Retinoic acid is a potent regulator of growth plate chondrogenesis. **Endocrinology**, Chevy Chase, MD, v. 141, n.1, p. 346-353, Jan. 2000.

DEW, S. E.; WARDLAW, S. A.; ONG, D. E. Effects of pharmacological retinoids on several vitamin A-metabolizing enzymes. **Cancer Res.**, Baltimore, Md, v. 53, n. 13, p. 2965-2969, 1 July 1993.

DIGIOVANNA, J. J. Isotretinoin effects on bone. **J. Am. Acad. Dermatol.**, St. Louis, Mo., v. 45, n. 5, Supl. 1, p. S176-S182, Nov. 2001.

\_\_\_\_\_. et al. Effect of a single course of isotretinoin therapy on bone mineral density in adolescent patients with severe, recalcitrant, nodular acne. **J. Am. Acad. Dermatol.**, St. Louis, Mo., v. 51, n. 5, p. 709-717, Nov. 2004.

DOWNS, C. Excessive vitamin A consumption and fractures: how much is too much? **Nutrit. Bytes**, Los Angeles, v. 9, n. 1, 1 Jan. 2003. Disponível em: <<http://repositories.cdlib.org/uclabiolchem/nutritionbytes/vol9/iss1/art1>>. Acesso em: 03 ago. 2007.

ERDOGAN, B. S. et al. The effects of isotretinoin treatment on bone mineral density in patients with nodulocystic acne. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, Amsterdam, v.20, n. 8, p. 1006-1007, Sep. 2006.

ELLIS C. N.; KRACH, K. J. Uses and complications of isotretinoin therapy. **J. Am. Acad. Dermatol.**, St. Louis, Mo., v. 45, n. 5, p. S150-S157, Nov. 2001.

FESKANICH, D. et al. Vitamin A intake and hip fractures among postmenopausal women. **JAMA**, Chicago, v. 287, n. 1, p. 47-54, 02 Jan. 2002.

FERGUSON, S. A. et al. Chronic oral treatment with 13-cis-retinoic acid (isotretinoin) or all-trans-retinoic acid does not alter depression-like behaviors in rats. **Toxicol. Sci.**, Orlando, FL,, v. 87, n.2, p. 451-459, Oct. 2005.

FLEISCHER, A. B. et al. Are there racial and sex differences in the use of oral isotretinoin for acne management in the United States? **J. Am. Acad. Dermatol.**, St. Louis, Mo., v. 49, n. 4 p. 662-666, Oct. 2003.

FRANKEL, T. L. et al. Hypervitaminosis A and calcium-regulating hormones in the rat. **J. Nutr.**, Bethesda, MD, v. 116, n. 4, p. 578-587, Apr. 1986.

GOLDSMITH, L. A. et al. American Academy of Dermatology Consensus Conference\* on the Safe and Optimal Use of Isotretinoin: Summary and recommendations. **J. Am. Acad. Dermatol.**, St. Louis, Mo, v.50. n. 6. p. 900-906, June 2004.

GUIMARÃES, S. A. C. **A patologia básica da cavidade bucal**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1982.

HOLLINGER, J. O. et al. Role of bone substitutes. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, New York, NY, n. 324, p.55-65, Mar. 1996.

JOHANSSON, S. et al. Subclinical hypervitaminosis A causes fragile bones in rats.. **Bone**, New York, v. 31, n. 6, p. 685-689, Dec., 2002.

JOHANSSON, S.; MELHUS, H. Vitamin A antagonizes calcium response to vitamin D in man. **J. Bone. Miner. Res.**, Washington, v. 16, n.10, p. 1899-1905, Oct. 2001.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: \_\_\_\_\_. **Histologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 111-128.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 488.

KAMM, J. J. Toxicology, carcinogenicity, and teratogenicity of some orally administered retinoids. **J. Am. Acad. Dermatol.**, St. Louis, MO, v. 6, pt. 4, Supl. 2, p. 652-659, Apr. 1982.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. Tecido ósseo. In: \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. **Histologia e embriologia oral: texto-atlas-correlações clínicas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 21-38.

KAWAHARA, T. et al. Short-term vitamin A supplementation does not affect bone turnover in man. **J. Nutr.**, Bethesda, MD, v. 132, n. 6, p. 1169-1172, June 2002.

KILCOYNE, R. F. et al. Minimal spinal hyperostosis with low-dose isotretinoin therapy. **Invest. Radiol.**, Hagerstown, MD, v. 21, n. 1, p. 41-44, Jan. 1986.

KOCIJANCIC, M. 13-cis-retinoic acid and bone density. **Int. J. Dermatol.**, Philadelphia, v. 34, n. 10, p. 733-734, Oct. 1995.

KOCHHAR, D.M.; CHRISTIAN, M.S. Tretinoin: a review of the nonclinical development toxicology experience. **J. Am. Acad. Dermatol.**, St. Louis, MO, v. 36, n.3, Supl. 1, p. S47-S59, Mar. 1997.

LEACHMAN, S. A. et al. Bone densities in patients receiving isotretinoin for cystic acne. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v. 135, n.8, p. 961-965, Aug. 1999.

MARCHETTI, M. et al. in vitro metabolism of three major isomers of retinoic acid in rats. **Drug Metab. Dispos.**, [Bethesda, Md], v. 25, n. 5, p. 637-646, Jan. 1997.

MARGOLIS, D. J.; ATTIE, M.; JAMES, J. Effects of isotretinoin on bone mineralization during routine therapy with isotretinoin for acne vulgaris. **Arch. Dermatol**, Chicago, v. 132, n.7, p.769-774, July 1996.

MCLANE, J. Analysis of common side effects of isotretinoin. **J. Am. Acad. Dermatol.**, St. Louis, MO, v.45, n.5, p. S188-194, Nov. 2001..

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.**, Philadelphia, v.129, n. 10, p. 770-778, Nov. 1998.

MICHAËLSSON, K. et al. Serum retinol levels and the risk of fracture. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 348, n. 4, p. 287-294, Jan. 2003.

MILSTONE, L. M; INSOGNA K. L.; LEACHMAN, S. A. Isotretinoin does have an adverse effect on bone mineral density. **J. Am. Acad. Dermatol.**, St. Louis, MO, v. 53, n.1, p.181, July 2005.

MOORE, T.; WANG, Y. L. Hypervitaminosis A. **Biochem. J.**, London, v. 39, n. 3, p. 222-228, 1945.

PETERSON, L. J. et al. Reparação das feridas. In: HUPP, J. R. **Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003. p. 57-67.

POSPÍSILOVÁ, J. Healing of wounds. **Acta Chir Plast.**, Prague, v. 24, n. 4, p. 293-303, 1982.

PROMISLOW, J. H. et al. Retinol intake and bone mineral density in the elderly: the Rancho Bernardo Study. **J. Bone. Miner. Res.**, Washington, v. 17, n. 8, p. 1349-1358, Aug. 2002.

RAISZ, L. G. Bone resorption in tissue culture. Factors influencing the response to parathyroid hormone. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v. 44, p. 103-116, 1965.

REQUENA CABALLERO, et al. Vesiculous prurigo pigmentosa in a 13-year-old girl: good response to isotretinoin. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, Amsterdam, v.19, n. 4, p. 474-476, July 2005.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Patologia**: bases patológicas da doenças. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ROHDE C. M.; DE LUCA, H. Bone resorption activity of all-trans retinoic acid is independent of vitamin D in rats. **J. Nutr.**, Bethesda, MD, v. 133, n. 3, p. 777-83, Mar. 2003.

ROHDE, C. M. et al. Vitamin A antagonizes the action of vitamin D in rats. **J. Nutr.**, Bethesda, MD, v. 129, n. 12, p. 2246-2250, Dec. 1999.

ROMITI, R.; JANSEN, T.; PLEWIG, G. Acne fulminans. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 75, n. 5, p. 611-617, set./out. 2000.

SAMPAIO, S. A. P.; PIMENTEL, E. R. A. Isotretinoína no tratamento da acne vulgar. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 60, n. 5, p. 349-52, set/out, 1985.

SAMPAIO, S. A. P.; BAGATIN, E. Experiência de 65 anos no tratamento de acne e de 26 anos com isotretinoína oral. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v.83, v.4, p. 361-367, jul./ago. 2008.

SCHEVEN, B. A.; HAMILTON, N. J. Retinoic acid stimulate osteoclast formation by different mechanisms. **Bone**, New York, v. 11, n. 1, p. 53-59, July, 1990.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, New York, n. 205, p. 299-308, April. 1986.

SEAL, B. L.; OTERO, T. C.; PANITCH, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. **Mater. sci. eng. R, rep.**, Lausanne v. 34, n. 4-5, p.147-230, Oct. 2001.

TEN CATE, A. R. **Histologia bucal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

TÖRÖK, L. et al. Bone-scintigraphic examinations in patients treated with retinoids: a prospective study. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 120, n. 1, p. 31-36, Jan. 1989.

TURNBULL, R. S.; FREEMAN, E. Use of wounds in the parietal bone of the rat for evaluating bone marrow for grafting into periodontal defects. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, v.9, n. 1, p. 39-43, 1974.

VALENTIC, J. P.; ELIAS, A. N.; WEINSTEIN, G. D. Hypercalcemia associated with oral isotretinoin in the treatment of severe acne. **JAMA**, Chicago, v. 250, n. 14, p. 1899-1900, Oct. 1983.

VAN DER SLUIS, I. M.; MUINCK KEIZER-SCHRAMA, S. M. Osteoporosis: in childhood: bone density in children in health and disease. **J. Pediatr. Endocrinol. Metab.**, London, v. 14, n. 7, p. 817-832, July/Ago. 2001.

WANG, W.; KIRSCH, T. Retinoic acid stimulates annexin-mediated growth plate chondrocyte mineralization. **J. Cell Biol.**, New York, v. 157, n. 6, p. 1061-1069, June, 2002.

WIEGAND, U. W.; CHOU, R. C. Pharmacokinetics of oral isotretinoin. **J. Am. Acad. Dermatol.**, St. Louis, Mo., v.39, n.2, pt. 3, S8-12, Aug. 1998.

YOUNG, B.; HEATH, J. W. **Wheater histologia funcional**: texto e atlas em cores. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 172-92.



*ANEXOS*

---

**ANEXO A – APROVAÇÃO DO PROJETO DE TESE PELA COMISSÃO  
CIENTÍFICA E DE ÉTICA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA PONTIFÍCIA  
UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL (PUCRS)**



*Comissão Científica e de Ética  
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

---

Porto Alegre 24 de março de 2009

**O Projeto de: Tese**

**Protocolado sob nº:** 0014/08  
**Intitulado:** Efeito da isotretinoína no reparo de defeitos ósseos em calota craniana estudo em ratos  
**Pesquisador Responsável:** Profa. Dra. Daniela Nascimento Silva  
**Pesquisadores Associados** Henrique Telles Ramos de Oliveira; Roberta Dalmolim Bergoli  
**Nível:** Doutorado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 09 de abril de 2008.

*Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEUA/PUCRS*

**Prof. Dr. Eraldo Luiz Batista Júnior**  
Presidente da Comissão Científica e de Ética da  
Faculdade de Odontologia da PUCRS

## ANEXO B – APROVAÇÃO DO PROJETO DE TESE PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA USO DE ANIMAIS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS



Ofício 055/09 - CEUA

Porto Alegre, 21 de maio de 2009.

Senhora Pesquisadora:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 09/00090, intitulado: **"Efeito da isotretinoína no reparo de defeitos ósseos em calota craniana - estudo em ratos"**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Relatórios do andamento do projeto devem ser entregues a este Comitê.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Anamaria Feijó  
Coordenadora do CEUA – PUCRS

Ilma. Sra.  
Prof. Dr. Daniela Nascimento Silva  
Faculdade de Odontologia  
N/Universidade

PUCRS

**Campus Central**  
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60 sala 314  
CEP: 90610-000  
Fone/Fax: (51) 3320-3345  
E-mail: [ceua@pucrs.br](mailto:ceua@pucrs.br)

## **ANEXO C - LEI N.º 6.638, DE 08 DE MAIO DE 1979**

**Lei n.º 6.638 , de 08 de Maio de 1979.**

**Estabelece normas para a prática Didático-Científico da vivissecção de animais e determina outras providências.**

**ART. 1º** - Fica permitida, em todo o território nacional, a vivissecção de animais, nos termos desta Lei.

**ART. 2º** - Os biotérios e os centros de experiências e demonstrações com animais vivos deverão ser registrados em Órgão competente e por ele autorizados a funcionar.

**ART. 3º** - A vivissecção não será permitida:

1. Sem o emprego de anestesia;
2. Em centros de pesquisas e estudos não registrados em órgão competente;
3. Sem a supervisão de técnico especializado;
4. Com animais que não tenham permanecido mais de quinze dias em biotérios legalmente autorizados;
5. Em estabelecimento de ensino de primeiro e segundo grau e em quaisquer locais freqüentados por menores de idade.

**ART. 4º** - O animal só poderá ser submetido às intervenções recomendadas nos protocolos das experiências que constituem a pesquisa ou os programas de aprendizado cirúrgico quando, durante ou após a vivissecção, receber cuidados especiais.

1. Quando houver indicação, o animal poderá ser sacrificado sob estrita obediência às prescrições científicas.

2. Caso não sejam sacrificados, os animais utilizados em experiência ou demonstrações somente poderão sair do biotério trinta dias após a intervenção, desde que destinados a pessoas ou entidades idôneas que por eles queiram responsabilizar-se.

**ART. 5º** - Os infratores estão sujeitos:

1. Às penalidades cominadas no artigo 64, caput, do Decreto Lei nº 3.688 de 03.10.1941, no caso de ser a primeira infração;
2. À interdição e cancelamento do registro do biotério ou do centro de pesquisa, no caso de reincidência.

**ART. 6º** - O poder Executivo, no prazo de noventa dias, regulamentará a presente Lei, especificando:

1. O órgão competente para o registro e a expedição de autorização dos biotérios e centros de experiências e demonstração com animais vivos;
2. As condições gerais exigíveis para o registro e o funcionamento dos biotérios; III - Órgão e autoridades competentes para a fiscalização dos biotérios e centros mencionados no inciso I.

**ART. 7º** - Esta Lei entrará em vigor na data publicada.

**ART. 8º** - Revogam-se as disposições em contrário.

*Assinado: João Figueiredo, Petrônio Portella, E. Portella e Ernani Guilherme Fernandes da Motta.*<sup>22</sup>

---

<sup>22</sup> BRASIL. Lei n.º 6.638, de 08 de Maio de 1979. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br/etica.htm#topo#topo>>. Acesso em: 21 março 2006.

## **ANEXO D – PRINCÍPIOS ÉTICOS NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DO COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (COBEA)**

### Princípios éticos na experimentação animal

A evolução contínua das áreas de conhecimento humano, com especial ênfase àquelas de biologia, medicina humana e veterinária, e a obtenção de recursos de origem animal para atender necessidades humanas básicas, como nutrição, trabalho e vestuário, repercutem no desenvolvimento de ações de experimentação animal, razão pela qual se preconizam posturas éticas concernentes aos diferentes momentos de desenvolvimento de estudos com animais de experimentação.

Postula-se:

Artigo I - É primordial manter posturas de respeito ao animal, como ser vivo e pela contribuição científica que ele proporciona.

Artigo II - Ter consciência de que a sensibilidade do animal é similar à humana no que se refere a dor, memória, angústia, instinto de sobrevivência, apenas lhe sendo impostas limitações para se salvaguardar das manobras experimentais e da dor que possam causar.

Artigo III - É de responsabilidade moral do experimentador a escolha de métodos e ações de experimentação

Animal

Artigo IV - É relevante considerar a importância dos estudos realizados através de experimentação animal quanto a sua contribuição para a saúde humana em animal, o desenvolvimento do conhecimento e o bem da sociedade.

Artigo V - Utilizar apenas animais em bom estado de saúde.

Artigo VI - Considerar a possibilidade de desenvolvimento de métodos alternativos, como modelos matemáticos, simulações computadorizadas, sistemas biológicos "in

vitro", utilizando-se o menor número possível de espécimes animais, se caracterizada como única alternativa plausível.

Artigo VII - Utilizar animais através de métodos que previnam desconforto, angústia e dor, considerando que determinariam os mesmos quadros em seres humanos, salvo se demonstrados, cientificamente, resultados contrários.

Artigo VIII - Desenvolver procedimentos com animais, assegurando-lhes sedação, analgesia ou anestesia quando se confirmar o desencadeamento de dor ou angústia, rejeitando, sob qualquer argumento ou justificativa, o uso de agentes químicos e/ou físicos paralisantes e não anestésicos.

Artigo IX - Se os procedimentos experimentais determinarem dor ou angústia nos animais, após o uso da pesquisa desenvolvida, aplicar método indolor para sacrifício imediato.

Artigo X - Dispor de alojamentos que propiciem condições adequadas de saúde e conforto, conforme as necessidades das espécies animais mantidas para experimentação ou docência.

Artigo XI - Oferecer assistência de profissional qualificado para orientar e desenvolver atividades de transportes, acomodação, alimentação e atendimento de animais destinados a fins biomédicos.

Artigo XII - Desenvolver trabalhos de capacitação específica de pesquisadores e funcionários envolvidos nos procedimentos com animais de experimentação, salientando aspectos de trato e uso humanitário com animais de laboratório<sup>23</sup>.

---

<sup>23</sup> COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios éticos na experimentação animal. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br/etica.htm#topo#topo>>. Acesso em: 21 março 2006.

## ANEXO E – FARMÁCIA MANIPULAÇÃO

Bula para manipulação do pó de isotretinoína e preparação da suspensão com lote de origem do medicamento.



Profa. Dra. Daniela Nascimento Silva

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Odontologia  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Projeto de Dissertação: **EFEITO DA ISOTRETINOÍNA NO REPARO ALVEOLAR APÓS EXODONTIA – ESTUDO EM RATOS**

**SEGUNDA ETAPA:  
ADMINISTRAÇÃO EM COBAIS COM PESO ESTIMADO DE 400G.**

**ISOTRETINOÍNA**

**FORMA FARMACÊUTICA E APRESENTAÇÃO:**

**Suspensão oral 3,0 mg/ml** : frasco para 20 ml, acompanhado de dosador e veículo para reconstituição ( dose única) – caixa com 30 frascos.

**COMPOSIÇÃO:**

Cada 1 ml da suspensão oral reconstituída de ISOTRETINOÍNA contém:

ISOTRETINOÍNA 3,0 mg  
Veículo ( óleo de girassol) q.s.p 1,0 ml

**VALIDADE do pó de isotretinoína: 19/03/2009**

**VALIDADE da suspensão: para uso imediato, extemporânea.**

PHARMAA COM. DE MED. F. AVIAMENTO DE FÓRMULAS LTDA.  
Av Benjamin Constant, 1879 – CEP 90550-005 Bairro Floresta Porto Alegre/RS  
CNPJ 91019232/0001-17 Inscrição Estadual 096.0887679



## **MODO DE PREPARO DA SUSPENSÃO ORAL**

A ISOTRETINOÍNA suspensão oral deve ser preparada da seguinte forma:

1. Agite o frasco para dispersar o pó.
2. Abra o frasco e adicione aos poucos os 20 ml do veículo (óleo de girassol), agitando o frasco com cuidado.
3. Após adição completa do óleo de girassol, feche o frasco com o batoque e agite-o vigorosamente.
4. Insira a seringa de insulina e puxe o êmbolo até a dose desejada, sendo que cada ml tem 3mg.
5. Após a reconstituição, a suspensão oral deve ser utilizada de imediato, e a quantidade restante deve ser descartada.

**AGITE A SUSPENSÃO ANTES DE USAR.**

## **ADMINISTRAÇÃO**

Considerando:

1. A dose preconizada no projeto: 7,5 mg/kg
2. O peso de cada rato em torno de 400g
3. A concentração da suspensão oral de isotretinoína 3 mg/ml

Administrar diariamente: 1,0 ml da suspensão para cada rato do grupo experimental de setembro-outubro 2008.

**DADOS DA MATÉRIA PRIMA:**

**- Isotretinoína**

D.C.B.: 05110  
Lote: IF061110                      Fornecedor: PHARMA NOSTRA  
Data de Fab.: Novembro/2006      Data de Val.: Novembro/2009

**- Veículo: óleo de girassol**

Lote: 0104/08                      Fornecedor: Mapric  
Data de Fab.: Agosto/2008      Data de Val.: Fevereiro/2010

**Documentação:** segue o procedimento padrão adotado pela empresa. Todos os registros gerados durante o processo (fichas de pesagem e de controle qualidade do processo) ficam arquivados durante dois anos.

