

USO DE ÁCIDO TRANS-RETINÓICO EM DERME ESTUDO EXPERIMENTAL

Rogério de Oliveira Ruiz¹, Daniel José de M. Fozati²,
Nelson Brancaccio dos Santos³, Hamilton Aleardo Gonella⁴

RESUMO

O colágeno é a proteína mais encontrada no corpo humano. Existem diversos tipos, que são classificados em quatro grupos. Os tipos mais importantes e freqüentes são: tipos I, III e IV. Alguns fármacos, como a vitamina A, podem estimular os processos de síntese, levando a alterações na arquitetura da pele, modificando inclusive sua resistência a traumas. O uso de tretinoína tópica é consagrado na literatura para o tratamento da pele quando se deseja descompactação da epiderme e aumento das hidroxilações dos aminoácidos, incrementando a produção de colágeno. Este estudo foi realizado em dois grupos de cobaias, nos quais demarcamos na região dorsal três áreas denominadas 1, 2 e 3. As áreas 2 e 3 foram consideradas controles, enquanto a área 1 recebeu injeções intradérmicas semanais de ácido retinóico 0,1%. No primeiro grupo realizamos biópsias incisionais de pele após duas aplicações, e no segundo grupo após quatro aplicações. O estudo histológico dessas biópsias demonstrou aumento discreto na espessura dérmica na área tratada no 1º grupo e aumento de maior magnitude nas áreas tratadas com ácido retinóico no 2º grupo. Adotamos como critério de validação de nossa hipótese a análise das biópsias, seu estudo morfométrico e medição linear. Essa análise nos permite afirmar que houve aumento de fibras colágenas tipo I, indicando estímulo da colagênese e aumento da espessura dérmica.

Descritores: colágeno, tretinoína.

ABSTRACT

Collagen is the protein that predominates in the human body that is classified in 4 groups. The most important and frequent kinds are I, III and IV. The kinds I and III form the extracellular structure of the connective tissues, and the IV kind is responsible for the integrity of the basement membranes. The formation of the collagen occurs in the fibroblast because of several chemical reactions, as the hydroxylation of the proline and lysine amino acids. Some drugs, as the A vitamin, can stimulate these synthesis processes, causing alterations in the skin architecture. The use of tretinoin is consecrated in the literature of the skin treatment to increase the hydroxylation in the amino acids, which enlarges the collagen production. This study was carried out by using two rat groups which had three dorsal areas delimited, that we called 1, 2 and 3 area. The areas 2 and 3 were considered control areas; the area 1 received intradermal injections of 0,1% retinoic acid weekly. In the first group incisional biopsies were done after two applications. In the second one, the biopsies were done after four applications. The histologic study of these biopsies showed a increase of the collagen fiber number. We adopted the analysis of the biopsies as a criterion to validate our hypothesis. The analysis of the biopsies allow us to declare that there was an augmentation of the kind I collagen fibers, showing a stimulation of the collagen

formation. New studies in rats and anima nobile are necessary to improve the comprehension of the process involved in this stimulation.

Key-words: collagen, tretinoin.

INTRODUÇÃO

Com o envelhecimento fisiológico, a pele sofre alterações em sua arquitetura, que podem ser visualizadas pelo aparecimento de rugas e sulcos, sendo mais acentuados quanto maior o grau das modificações.

Para se obter melhoras na arquitetura da pele já se usaram tratamentos com substâncias tópicas, como ácido retinóico,^{1,2} alfa e beta-hidroxiácidos,^{3,4,5} *peelings* químicos ou físicos,^{6,7,8} além de infiltrações, em derme, estimuladoras de colágeno e colágeno heterólogo.^{9,10} Quando não se consegue resultados satisfatórios, lança-se mão de preenchimentos dérmicos com os mais diversos tipos de materiais, biológicos ou alopatóicos.¹¹

Pele

A pele, o maior órgão do corpo humano, possui funções diversas: proteção, trocas, sustentação, termorregulação e sensorial.^{12,13}

Divide-se em duas partes: epiderme e derme.

A derme é constituída por duas partes distintas: uma celular e outra não-celular. Anatomicamente pode ser dividida em camada papilar e camada reticular. A diferença entre essas camadas está na relação dos seus elementos. Na derme papilar há predomínio das células mononucleares, enquanto na reticular os elementos predominantes são fibras colágenas, elásticas e fibroblastos.^{14,15,16}

Na camada reticular, observam-se fibras colágenas, elásticas, reticulares e matriz extracelular amorfa.¹⁷

Os fibroblastos são células jovens, estreladas, que possuem prolongamentos citoplasmáticos.¹² Essas células são derivadas do mesênquima e responsáveis pela síntese e degradação dos componentes, fibrosos e não-fibrosos, da derme.^{18,19,20,21,22}

A matriz extracelular, produzida pelo fibroblasto, é composta por mucopolissacarídeos ácidos, como, por exemplo, ácido hialurônico, condroitin sulfato e dermatan sulfato.^{14,23,24}

Colágeno

O colágeno, a proteína mais abundante do corpo humano, representa 30% do total das proteínas existentes.

Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba, v. 8, n. 3, p. 17 - 24, 2006

1 - Cirurgião Plástico - SBCP

2 - Cirurgião Plástico - SBCP, Assistente do Serviço de Cirurgia Plástica "Linneu Mattos Silveira" - CCMB/PUC-SP

3 - Professor do Depto. de Morfologia e Patologia - CCMB/PUC-SP

4 - Professor do Depto. de Cirurgia - CCMB/PUC-SP

Recebido em 10/8/2006. Aceito para publicação em 25/8/2006.

O colágeno é sintetizado por diversos tipos celulares, como fibroblasto, osteoblasto, odontoblasto, condrócito e célula muscular lisa. Uma vez que este estudo enfoca somente a pele, os relatos a seguir dizem respeito ao fibroblasto.²⁵

Para melhor compreensão deste estudo, far-se-á uma revisão do processo de síntese do colágeno.

Síntese

As fibras colágenas são constituídas por uma escleroproteína denominada colágeno, cuja composição de aminoácidos é bem característica. O aminoácido glicina aparece no colágeno na proporção de 33,5%, enquanto que

prolina e hidroxiprolina estão presentes na proporção de 12 e 10%, respectivamente. O restante é formado por vários aminoácidos.²⁶

Formação das Cadeias

Um dos passos mais críticos na formação do colágeno é a formação da tríplice-hélice. Inicialmente, três cadeias pró- α são unidas pelo peptídeo terminal logo após sua translação, e assumem configuração globular (Figura 1).²⁷

À medida que essas cadeias se formam, ocorre a hidroxilação da prolina e da lisina. Hidroxiprolina e hidroxilisina livres não são incorporadas à cadeia proteica.²⁸

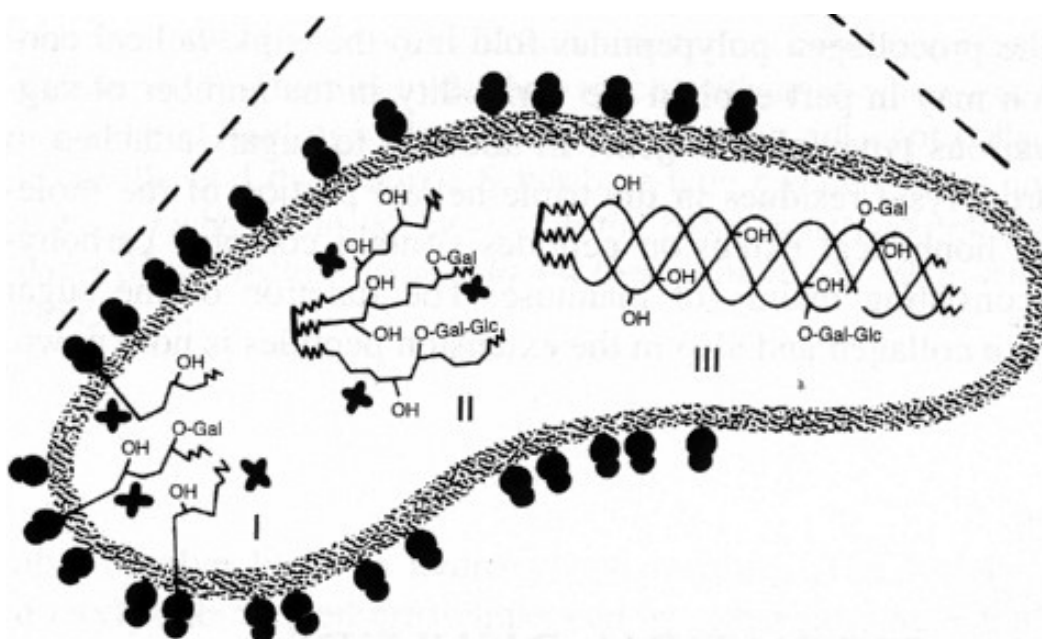


Figura 1. Formação das cadeias triplas dentro do fibroblasto, no retículo endoplasmático rugoso.

Hidroxilação

A hidroxilação da prolina fornece a hidroxiprolina; a da lisina, a hidroxilisina, graças à presença das enzimas prolina hidroxilase e lisina hidroxilase. Após fenômeno de glicosilação são transportadas através da membrana.²⁹

Para que ocorram as hidroxilações da prolina e lisina há necessidade das apoenzimas e de um segundo fator, denominado coenzima, composto pelas vitaminas A, E e C, radical Fe^{++} e oxigênio nascente.^{30,31,32,33}

Procolágeno

Cada cadeia alfa apresenta dois peptídeos de registro, um em cada extremidade. Esses peptídeos determinam o alinhamento das cadeias proteicas em grupos de três, facilitando a combinação dessas cadeias para formar uma molécula de procolágeno, que é precursora do tropocolágeno.³³ Outra função desses peptídeos é impedir a formação de fibrilas colágenas no interior das células.²¹

Cross-Link

Após a remoção dos peptídeos no espaço extracelular, a molécula de colágeno espontaneamente toma a forma de fibra, porém, essas fibras ainda não possuem uma boa resistência até que sejam formadas as ligações cruzadas entre as moléculas; são ligações covalentes.³⁴

Coloração

Observadas no microscópio óptico, as fibras colágenas são acidófilas, corando-se de róseo pela técnica da hematoxilina-eosina (Foto 1), de verde pelo tricômico de Mallory e de azul por Mason (Foto 2). Sofrem impregnação pela prata, corando-se de negro pela orseína (Foto 3). O uso do corante picosírius evidencia as fibras colágenas finas (tipo I) em verde e as largas (tipo III) em laranja. Este é considerado o melhor método para visualização das fibras colágenas (Foto 4).

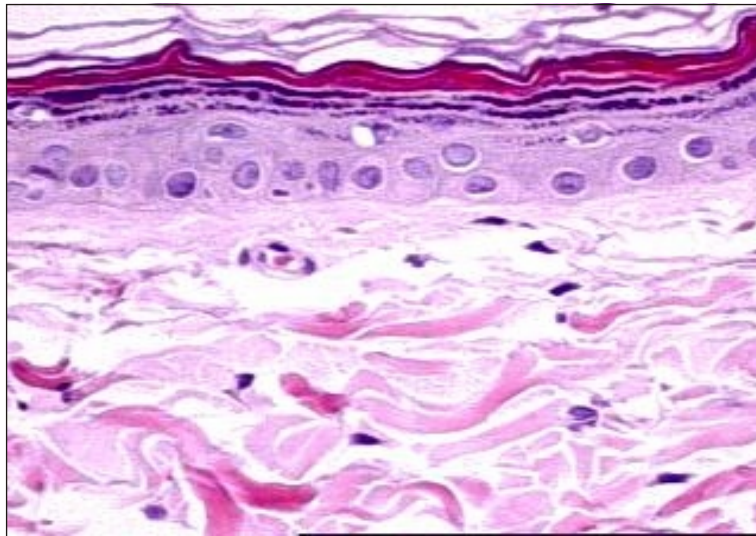


Foto 1. Fotomicrografia de corte histológico de pele de cobaia, corada por **hematoxilina-eosina**, em aumento de 200 X; observam-se as duas camadas de pele: epiderme e derme.

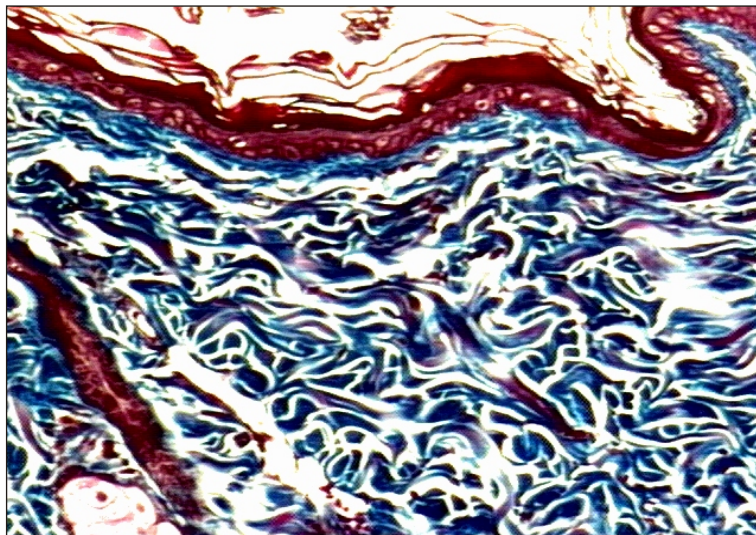


Foto 2. Fotomicrografia de corte histológico de pele de cobaia, corada pela técnica de Mason, em aumento de 200 X ao microscópio óptico; observam-se as fibras colágenas coradas em azul.

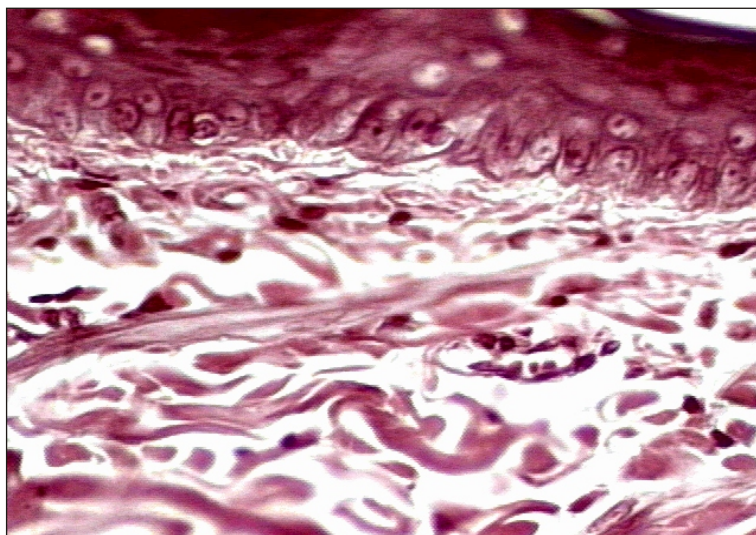


Foto 3. Fotomicrografia de corte histológico de pele de cobaia, corada por **orceína**, em aumento de 200 X; distinguem-se as fibras colágenas impregnadas pela prata.

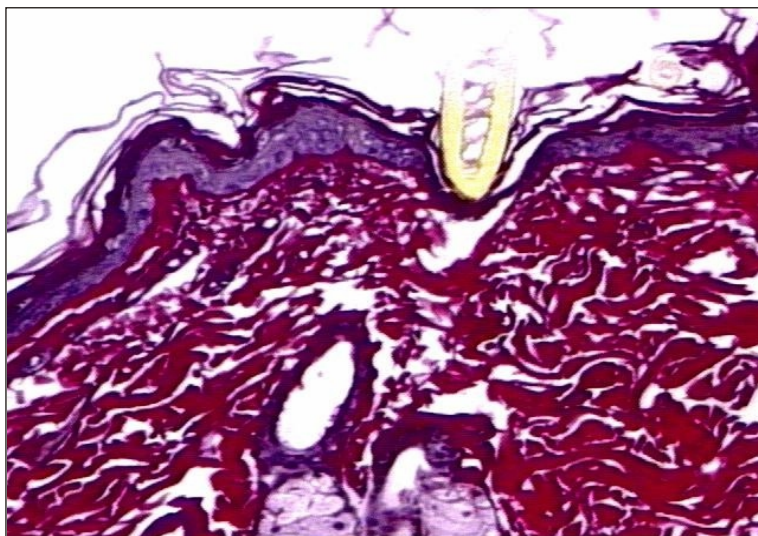


Figura 4. Fotomicrografia de corte histológico de pele de cobaia, corada por picrosirius em aumento de 200 X, onde distinguem-se as fibras colágenas jovens em verde e as maduras em laranja.

Vitamina A

Apesar do termo vitamina A denominar o retinol e seus ésteres, é também usado para descrever genericamente compostos que apresentem suas propriedades biológicas.³⁵

Existem alguns isômeros geométricos do retinol devido às possíveis configurações *cis* e *trans* da cadeia lateral, que possuem as ligações duplas. O retinol sintético é sempre *trans* e a conversão entre os isômeros ocorre prontamente no organismo.³⁶

As funções da vitamina A são mediadas pelas diferentes formas da molécula; o retinol e o ácido retinóico modulam as funções de crescimento, diferenciação e transformação epiteliais.³⁷

Os retinóides sistêmicos aumentam a síntese do colágeno e reduzem a produção da colagenase, inibindo a enzima que degrada o colágeno.^{38,39,40,41} A síntese da fibronectina é aumentada pelos retinóides, que podem estimular os fibroblastos e a migração epidérmica, eventos responsáveis pelo início da reepitelização.^{42,43}

O ácido retinóico, na sua forma de isômero *trans*, modula o colágeno tipo I, sendo inclusive observado tal estímulo em células quiescentes para a colagênese em peles envelhecidas e danificadas actinicamente. Nota-se, também, aumento na densidade das fibras de ancoragem na região da membrana basal, melhorando o colágeno tipo IV quando utilizada topicamente.^{33,44,45}

OBJETIVOS

Estudar a resposta das fibras colágenas e o aumento da espessura dérmica após infiltração em derme do isômero *trans* do ácido retinóico 0,1%.

MATERIALE MÉTODO

Em nosso estudo, utilizamos dez ratos machos adultos da raça Wistar com, aproximadamente, dez meses de idade e com peso de 350 gramas.

Demarcamos três áreas quadrangulares, medindo dois por dois centímetros no dorso dos ratos, com auxílio de máscara gabarito confeccionada em PVC transparente, assim denominadas áreas 1, 2 e 3. Após demarcação, as três áreas sofreram tricotomia.

Na derme da área 1 injetamos, em leque, o isômero *trans* do ácido retinóico num volume total de 0,5 ml.

Na área 2 introduzimos apenas a agulha, “punctura seca”, usando a mesma técnica.

A área 3 foi considerada área controle.

Iniciamos pela anti-sepsia local com algodão hidrófilo embebido em gluconato de clorexidina a 2%. Para todos os procedimentos utilizamos seringas de 1 ml e agulhas 13 x 3,5 mm.

Dividimos o grupo de cobaias em dois, contendo cinco cobaias cada, e os submetemos a sessões semanais de aplicação de ácido retinóico 0,1%.

No 15º dia após o início do tratamento, depois da segunda aplicação, retiramos fragmentos elípticos, medindo 2 mm por 0,5 mm, da região central dos três quadrados descritos do primeiro grupo de ratos. Os cinco ratos restantes foram submetidos ao mesmo procedimento no 37º dia após o início do tratamento, uma semana depois da quarta aplicação.

Todos os fragmentos foram preservados em formol e elaboraram-se lâminas para estudos histopatológicos, fixadas por meio de formalina e processadas segundo técnica de inclusão em parafina. Esses fragmentos foram submetidos a quatro processos de coloração: hematoxilina-eosina, Mason, orseína e picrosirius.

Todas as lâminas preparadas foram observadas ao microscópio óptico da marca Lambda, modelo LQT 2, com aumento de 40 vezes, 100 vezes e 200 vezes.

Avaliamos a espessura dérmica utilizando programa de computação que permite a mensuração linear. Nesse aplicativo, as medidas foram realizadas em pixels. Tomamos como referência a média ponderada de três medidas.

A contagem das fibras foi realizada por microscopia digital. Também aqui se considerou a média ponderada de três medidas.

RESULTADOS

	Tratado (pixels)	Controle (pixels)	Δ Porcentual
	699007	670716	4,218
	707934	608264	16,386
	791295	662313	19,475
	737193	600120	22,841
	633155	626213	1,109
Médias	713716,8	633525,2	12,806

Tabela 1. Medição linear da espessura dérmica do 1º grupo de cobaias, realizado por meio de computador em pixels, valores médios de três mensurações.

	Tratado (pixels)	Controle (pixels)	Δ
	925216	796426	16,171
	804331	682749	17,801
	1020078	722343	41,218
	779524	770423	1,181
	955763	693577	37,802
Médias	896982,4	733103,6	22,835

Tabela 2. Medição linear da espessura dérmica do 2º grupos de cobaias, realizado por meio de computador em pixels, valores médios de três mensurações.

	Δ Porcentual
1º Grupo	12,806
2º Grupo	22,835

Tabela 3. Aumento porcentual da espessura dérmica dos dois grupos de cobaias, morfometria.

	Tratado	Controle	Δ Porcentual
	51,943	41,934	23,869
	57,214	44,235	29,341
	45,186	48,634	1,135
	50,184	41,606	20,617
	51,352	49,791	2,782
Médias	51,976	45,240	14,889

Tabela 4. Variação em números absolutos da quantidade de fibras colágenas demonstrada pela morfometria, analisando os números, observamos um aumento de 14,889%.

	Tratado	Controle	Δ Porcentual
	59,576	42,097	41,521
	56,171	44,590	25,972
	61,342	47,989	27,825
	53,533	42,455	26,094
	62,239	50,867	22,356
Médias	58,572	45,600	28,754

Tabela 5. Variação em números absolutos da quantidade de fibras colágenas demonstrada pela morfometria, analisando os números, observamos um aumento de 28,754%.

DISCUSSÃO

Segundo Fitzpatrick,³³ o isômero *trans* do ácido retinóico modula colágeno tipo I *in vivo* e *ex vivo*. A presença deste isômero serve de estímulo para a colagênese em peles envelhecidas e com danos actínicos. Quando utilizado topicamente nota-se, também, aumento na densidade das fibras de ancoragem na membrana basal, melhorando o colágeno tipo IV.

Nosso estudo pretendeu agilizar este processo utilizando a via injetável, mais eficaz que a tópica, pois nesta via não há dispersão do fármaco pela barreira epidérmica.

Sabemos que a Vitamina A (retinol) tem como propriedade a ativação intranúcleo do ciclo dos retinóides, obtendo um comportamento celular adequado e, assim, uma maior produção de fibras colágenas e elásticas.^{46,47,48,49}

A vitamina A também apresenta seu poder antioxidante⁵⁰ e imunorregulador.⁵¹ Segundo Liao,⁵² o retinol, associado à proteína de ligação específica, chega ao núcleo celular, dissocia-se de seu transportador e liga-se à cromatina, modulando a expressão do gene. O retinol pode regular a síntese de proteínas específicas necessárias para a diferenciação dos tecidos epiteliais.^{53,54}

A deficiência da vitamina A aumenta a suscetibilidade ao desenvolvimento de tumores de pele.^{55,56} A integridade funcional e estrutural das células epiteliais em todo o corpo depende de um suprimento adequado de retinol, que tem papel importante na indução e controle na diferenciação epitelial. Graças a essas propriedades, há um interesse especial na interferência do retinol na carcinogênese.^{57,58}

O ácido retinóico, segundo Jardillier,⁵⁹ é mais eficaz que o retinol, pois para obtenção dos glicosaminoglicanos (que mantém a expressão das fibronectinas) não necessita glicolização.

Diversas publicações científicas relatam melhor aspecto, maior resistência e maior rapidez na cicatrização com o uso do ácido retinóico. Segundo Mandy,⁶⁰ o uso da tretinoína antes do peeling químico, como parte do programa profilático rotineiro do fotoenvelhecimento, acelera a reepitelização.⁶¹

Na pele de cobaias tratadas previamente com tretinoína, antes da aplicação do fenol a 50% e da dermoabrasão, o grupo que usou tretinoína apresentou regeneração epidérmica, demonstrada histologicamente 1,5 vez maior que o grupo controle uma semana após o procedimento. Com seis semanas, a espessura da epiderme era de quatro a cinco camadas celulares nos controles, e sete a oito camadas no grupo tratado.^{62,63}

A regeneração do colágeno mostrou-se mais rápida no grupo tratado, o que nos incentivou a utilização do ácido retinóico diretamente na derme para maior estimulação da síntese de colágeno pelos fibroblastos. A revisão desses trabalhos incentivou-nos a avaliar a espessura dérmica e o número de fibras colágenas existentes.

Demarcamos três áreas quadrangulares na região dorsal de dez ratos com auxílio de uma máscara transparente confeccionada em PVC. Denominamos áreas 1, 2 e 3 e iniciamos nosso experimento injetando o isômero *all trans* retinóico na área 1, com intervalos semanais. As áreas 2 e 3 foram consideradas controle, sendo que na área 2 realizamos punctura seca e na área 3 não houve procedimento.

Dividimos essa amostra em dois grupos com cinco ratos cada. Na segunda aplicação, interrompemos o protocolo no primeiro grupo e realizamos biópsia das regiões centrais nas áreas 1, 2 e 3. Os demais ratos continuaram sendo submetidos à sistematização acima descrita até a quarta aplicação, quando interrompemos o tratamento e realizamos biópsias uma semana após a última sessão.

As lâminas do estudo histológico foram submetidas a três colorações diferentes. A coloração de hematoxilina-eosina foi utilizada para analisar a estrutura do tecido, avaliando, assim, alterações na espessura da derme. A coloração de Mason para melhor visualização das fibras colágenas e a coloração pela orseína foi submetida ao método morfométrico por análise de imagens.

Foram realizados estudos morfométricos que, segundo Uitto,⁶⁴ comprovam a eficácia dessa técnica para a contagem de elementos microscópicos. Para a análise estatística foi usado o programa *Bioestat 2.0*.⁶⁵ Utilizamos desta técnica para mensurar a quantidade de fibras colágenas nas lâminas de pele de cobaias, o que nos demonstrou o aumento das mesmas após o procedimento proposto (Tabelas 4 e 5).

A análise microscópica dessas peles biopsiadas revelou: aumento discreto da espessura dérmica no 1º grupo e de maior magnitude no 2º grupo; segundo dr. Nelson Brancaccio dos Santos, patologista, houve melhora na orientação das fibras colágenas em ambos os grupos. À medida linear notou-se aumento significativo da espessura dérmica após a aplicação intradérmica do ácido retinóico (Tabelas 1 e 2).

Segundo Doillon,⁶⁶ em casos de restauração do colágeno (pós-trauma), 50% das cadeias preexistentes são refeitas em até 24 horas, porém, a síntese de procolágeno tipo I é realizada em 5 a 10 minutos. Isto significa que se formam novas cadeias triplas em pouco tempo. Contamos com esta

rapidez na formação de colágeno novo para recuperar a arquitetura da pele senil, aumentando a oferta de substrato para agilizar as hidroxilações dos aminoácidos, elevando, assim, a quantidade de fibras jovens.

Segundo Brody,⁵⁴ a vitamina A e/ou o betacaroteno em doses altas reverteram os efeitos dos glicocorticóides sobre a cicatrização das feridas em ratos. Este estudo vem confirmar a nossa opinião sobre a importância da vitamina A na estimulação da síntese de colágeno, ratificando nossa idéia primária no uso do ácido retinóico injetável.

Naturalmente, o envelhecimento retarda todos os estágios da cicatrização das lesões e o processo de reepitelização;⁶⁷ os fibroblastos proliferam mais lentamente, sintetizando menos colágeno, e as fibronectinas estão diminuídas, principalmente quando a pele apresenta lesão actínica.^{68,69,70}

Acreditamos que o uso *in vivo* do ácido retinóico, por via intradérmica, reverta os efeitos do envelhecimento biológico na síntese do colágeno, “rejuvenescendo” a arquitetura da pele. Novos estudos em *anima nobile* fazem-se necessários para confirmar nossa hipótese.

CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou que, após a infiltração intradérmica do isômero *trans* do ácido retinóico na pele de cobaias, houve aumento de fibras colágenas do tipo 1, indicando estímulo na síntese (neocolagênese), além da melhora na sua disposição espacial.

Os resultados observados são compatíveis com a literatura compilada, com visualização em tempo menor daquele relatado pelos autores com a utilização da via tópica de aplicação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cucé LC. Peeling de ácido retinóico seriado. 52 Congresso Brasileiro de Dermatologia, Brasília DF, 1997.
- Hung VC, Lee JY, Zitteli JA, Hebda BA. Topical tretinoin and epithelial wound healing. Arch Dermatol. 1989; 125:65-9.
- Murad H, Shamban AT, Premo PS. The use of glycolic acid as a peeling agent. Dermatol Clin. 1995; 13(2):285-307.
- Matarasso SL, Glogau RG. The role of chemical peeling in the treatment of photodamaged skin. J Dermatol Surg Oncol. 1991; 17:662-3.
- Van Scott EJ. Alpha hydroxy acids: procedures for use in clinical practice. Cutis. 1989; 43:222-8.
- Baker TJ. Chemical face peeling and rhytidectomy. A combined approach for facial rejuvenation. Plast Reconstr Surg. 1962; 29:199.
- Brody HJ, Hailey CW. Medium-depth chemical peeling of the skin: a variation of superficial chemosurgery. J Dermatol Surg Oncol. 1986; 12:1268-75.
- Slagel GA, McMarlin SL. Chemical face peels. J Assoc Milit Dermatol. 1984; 10:38-43.
- Beran SJ, Rohrich RJ. The potential role of autologous, injectable, dermal collagen (Autocollagen) and acellular dermal homograft (AlloDerm) in facial soft tissue augmentation. Aesthetic Surg J. 1998; 17(6):420-2.
- Charriere G, Bejot M, Schnitzler L, Ville G, Hartmann DJ. Reactions to a bovine collagen implant. Clinical and immunological study in 205 patients. J Am Acad Dermatol. 1989; 21:1203-8.
- Constantino PD, Lance A, Friedman CD. Synthetic biomaterials in facial plastic and reconstructive surgery. Facial Plast Surg. 1993; 9(1):1-15.
- Peyrefitte G, Martini MC, Chivot M. Cosmetologia, biologia geral, biologia da pele. São Paulo: Andrei; 1998. p.234,350,395-409.
- Silberberg J, Baer RL, Rosenthal SA. The role of Langerhans cells in allergic contact hypersensitivity. A review of findings in man and guinea pigs. J Invest Dermatol. 1976; 66:210-7.
- Arnold HLJ, Odom RB, James WD. Doenças da pele de Andrews: dermatologia clínica. São Paulo: Manole; 1994. p.1-14.
- Nicholls AC, Oliver J, Renouf DV, McPheat J, Palan A, Pope FM. Ehlers-Danlos syndrome type VII: a single base change that causes exon skipping in the type I collagen $\alpha 2(I)$ chain. Hum Genet. 1991; 87:193-8.
- Prockop DJ. Collagens: molecular biology, diseases and potentials for therapy. Annu Rev Biochem. 1995; 64:403-34.
- Shelley WB, Wood MG. Wrinkles due to idiopathic loss of mid-dermal elastic tissue. Br J Dermatol. 1977; 97:441.
- Smola H, Thiekotter G, Fusenig NE. Mutual induction of growth factor gene expression by epidermal-dermal cell interaction. J Cell Biol. 1993; 122:417.
- Kadler KE, Holmes DF, Trotter JA, Chapman JA. Collagen fibril formation. Biochem J. 1996; 316:1.
- Kühn K. Structure and biochemistry of collagen. Aesth Plast Surg. 1988; 9:141.
- Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982. p. 94.
- Tajima S, Pinnell SR. Collagen synthesis by human skin fibroblasts in culture: studies of fibroblasts explanted from papillary and reticular dermis. J Invest Dermatol. 1981; 77:410.
- Pierard GE. Skin in dermatoparaxis. Dermal microarchitecture and biochemical properties. J Invest Dermatol. 1976; 66:2.
- Schwartz E, Fleischmajer R. Association of elastin with oxytalan fibers of the dermis and with extracellular microfibrils of cultured skin fibroblasts. J Histochem Cytochem. 1986; 34:1063.
- Barbul A. Immune aspects of wound repair. Clin Plast Surg. 1990; 17:433.
- Reid KBM. C1q. Methods Enzymol. 1982; 82 pt A:319-24.
- Kühn K. The structure of collagen. In: Campbell PN, Greville GD, editors. Essays in biochemistry. London: Academic; 1966. p.59.
- Barnes MJ, Kodicek E. Biological hydroxylation and ascorbic acid with special regard to collagen metabolism. Vitam Horm. 1972; 30:1.
- Prockop DJ, Tuderman L. Posttranslational enzymes in the biosynthesis of collagen: extracellular enzymes. Methods Enzymol. 1982; 82 pt A:305-19.
- Modolin M, Bevilacqua RG. Cicatrização das feridas. In: Raia AA, Zerbini EJ, coordenadores. Clínica cirúrgica Alípio Corrêa Netto. 4a ed. São Paulo: Sarvier; 1988. v.1, p.135.
- Anderson CE, Finklestein JZ, Nussbaum E, Larson EJ, Halpern R, Uitto J, et al. Association of hemolytic anemia and early-onset pulmonary emphysema in three siblings. J Pediatr (St. Louis). 1984; 105:247.
- Prockop DJ, Berg RA, Kivirikko KI, Uitto J. Intracellular steps in the biosynthesis of collagen. In: Ramachandran GN, Reddi AH, editors. Biochemistry of collagen. New York: Plenum; 1976. p.163.
- Fitzpatrick TB, Freedberg EM. Fitzpatrick's dermatology in general medicine. 5th ed. McGraw-Hill; 1999. p.251-2,256.
- Rucker RB, Murray J. Cross-linking amino acids in collagen and elastin. Am J Clin Nutr. 1978; 31:1221.
- Bridges CDB. Retinoids in photosensitive systems. In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, editors. The retinoids. Orlando: Academic Press; 1984. vol. 2, p.125-76.

36. Chytil F, Ong DE. Cellular retinol and retinoic acid-binding proteins. *Adv Nutr Res.* 1983; 5:13-29.
37. Goodman DS. Vitamin A metabolism. *Fed Proc.* 1980; 39:2716-22.
38. Rosso GC, De Luca L, Warren CD, Wolf G. Enzymatic synthesis of mannosyl retinyl phosphate and guanosine diphosphate manose. *J Lipid Res.* 1975; 16:235-43.
39. Beach RS, Kenney MC. Vitamin A augments collagen production by corneal endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982; 114:395.
40. Forest N, Boy-Letevre ML, Duprey P, Grimaud JA, Jakob H, Paulin D. Collagen synthesis in mouse embryonal carcinoma cells: effect of retinoic acid. *Differentiation.* 1982; 23:153-63.
41. Abergel RP, Meeker CA, Oikarinen H, Oikarinen AI, Uitto J. Retinoid modulation of connective tissue metabolism in keloid fibroblast cultures. *Arch Dermatol.* 1985; 121:632-5.
42. Kenney MC, Shih LM, Labermeir U, Satterfield D. Modulation of rabbit keratocyte production of collagen, sulfated glycosaminoglycans and fibronectin by retinol and retinoic acid. *Biochim Biophys Acta.* 1986; 889:156-62.
43. Clark RAF. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations I. *J Am Acad Dermatol.* 1985; 13:701-25.
44. Williams ML, Elias PM. Nature of skin fragility in patients receiving retinoids for cosmetic effect. *Arch Dermatol.* 1981; 117:611-9.
45. Lee KH, Cherny-Chi Fu, Spencer MR, Tong TG, Poon R. Mechanism of action of retinyl compounds on wound healing III: effect of retinoic acid homologs on granuloma formation. *J Pharm Sci.* 1973; 62:896-9.
46. Kligman AM, Fulton JE, Plewing G. Topical acid Vitamin A in acne vulgaris. *Arch Dermatol.* 1969; 99: 469-76.
47. Escribano J, Grubb A, Mendez E. Identification of retinol as one of the Protein HC chromophores. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988; 155:1424-9.
48. Kligman AM, Grove GL, Hirose R, Leyden JJ. Topical tretinoin for photo aged skin. *J Am Acad Dermatol.* 1986; 15:836-59.
49. Personelle J, De Campos S, Ruiz RO, Ribeiro GQ. Injection of all-trans retinoic acid for treatment of thin wrinkles. *Aesthetic Plast Surg.* 1997; 21(3):196-204.
50. Chandhary LR, Nelson EC. Metabolism of all-trans-[11-3H] Retinil acetate in young rats testes. *Ann Nutr Metab.* 1986; 30:1-8.
51. Tong PS. Trans retinoic acid enhances the growth response of epidermis keratinocytes to epidermis growth factor Beta. *J Invest Dermatol.* 1990; 94:126-31.
52. Liau G, Ong DE, Chytil F. Interaction of the retinol/cellular retinol-binding protein complex with isolated nuclei and nuclear components. *J Cell Biol.* 1981; 91:63-8.
53. Fuchs E, Green H. Regulation of terminal differentiation of cultured human keratinocytes by vitamin A. *Cell.* 1981; 25:617-25.
54. Brody HJ. Peeling químico e resurfacing. 2a ed. Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso; 2000. p.38,41.
55. Bjelke E. Dietary vitamin A and human lung cancer. *Int J Cancer.* 1975; 15:561-5.
56. Lasnitzki I. The influence of A hypervitaminosis on the effect of 20-methylcholanthrene on mouse prostate glands grown in vitro. *Br J Cancer.* 1955; 9:434-41.
57. Moon RC, Itri LM. Retinoids and cancer. In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, editors. *The retinoids.* Orlando: Academic Press; 1984. p.327-71.
58. Sporn MB, Roberts AB. Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis. *Cancer Res.* 1983; 43:3034-40.
59. Jardillier JC, Rallet A. Metabolisme de la Vitamine A et des retinoids. *Bull Cancer (Paris).* 1986; 73:180-92.
60. Mandy SH. Tretinoin in the preoperative and postoperative of management of dermabrasion. *J Am Acad Dermatol.* 1986; 15:878-9.
61. Hung VC, Lee JY, Zitelli JA, Hebda PA. Topical tretinoin and epithelial wound healing. *Arch Dermatol.* 1989; 125:65-9.
62. Vagotis FL, Brundage SR. Histologic study of dermabrasion and chemical peel in an animal model after pretreatment with Retin-^a. *Aesthetic Plast Surg.* 1995; 19:246.
63. Jetten MA. Retinoids specifically enhance the number of epidermal growth factor receptors. *Nature.* 1980; 284:626-9.
64. Uitto J, Paul JL, Brockley K, Pearce RH, Clark JG. Elastic fibers in humanskin: quantitation of elastic fibers by computerized digital image analyses and determination of elastin by radioimmunoassay of desmosine. *Lab Invest.* 1983; 49:499.
65. Ayres M, Ayres Jr M, Ayres LD, Dos Santos AS. *BioEstat 2.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.* Belém: Sociedade Civil Mamirauá-CNPQ; 2000.
66. Doillon CJ, Dunn MG, Bender E, Silver FH. Collagen fiber formation in repair tissue: development of strength and toughness. *Coll Relat Res.* 1985; 5:481-92.
67. McKusick VA. *Heritable disorders of connective tissue.* 4th ed. St Louis: Mosby; 1972.
68. Goodson WH, Hunt TK. Wound healing and aging. *J Invest Dermatol.* 1979; 78:88.
69. Chapvil M, Koopmann CF. Age and other factors regulating wound healing. *Otolaryngol Clin North Am.* 1982; 15:259.
70. Connor HJ, Lowe NJ, Breeding JH, Chalet M. Inhibition of UVB carcinogenesis by retinoic acid. *Cancer Res.* 1983; 43:272-4.