



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

André Luiz de Campos Pessoa

**A inibição da fosfodiesterase-5 (PDE5) melhora a regeneração óssea nos
estágios precoces da necrose avascular traumática da cabeça do fêmur em
ratos**

Rio de Janeiro

2020

André Luiz de Campos Pessôa

A inibição da fosfodiesterase-5 (PDE5) melhora a regeneração óssea nos estágios precoces da necrose avascular traumática da cabeça do fêmur em ratos

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Jorge José de Carvalho

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

P475 Pessôa, André Luiz de Campos.

A inibição da fosfodiesterase-5 (PDE5) melhora a regeneração óssea nos estágios precoces da necrose avascular traumática da cabeça do fêmur em ratos / André Luiz de Campos Pessôa. – 2020.

72 f.

Orientador: Jorge José de Carvalho

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Fêmur – Teses. 2. Citrato de Sildenafil. 3. Inibidores da Fosfodiesterase 5. 4. Osteonecrose. 5. Necrose da Cabeça do Fêmur. I. Carvalho, Jorge José de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.718.4

Bibliotecária: Angela da Silva Velho CRB7/4780

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

André Luiz de Campos Pessôa

A inibição da fosfodiesterase-5 (PDE5) melhora a regeneração óssea nos estágios precoces da necrose avascular traumática da cabeça do fêmur em ratos

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 10 de junho de 2020.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jorge José de Carvalho (Orientador)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Willian Dias Belangero

Universidade Estadual de Campinas

Prof.^a Dra. Alessandra Alves Thole

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Liszt Palmeira de Oliveira

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. João Antônio Matheus Guimarães

Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia

Rio de Janeiro

2020

DEDICATÓRIA

Dedico à Teresa, Luísa e João, sem os quais nada disso faria sentido.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, sogros e cunhado, por terem me guiado com seus conselhos e exemplos, e que me deram todo apoio necessário para meu amadurecimento pessoal e profissional.

A todos professores que me formaram no profissional e pessoa que sou hoje, em especial aos Professores Jorge José de Carvalho e Nelson Elias, fontes de inspiração e exemplos de dedicação profissional.

A todos do Departamento de Histologia e Embriologia da UERJ.

A todos do Laboratório de Ultraestrutura e Biologia Tecidual, em especial aos biólogos Ana Lúcia Rosa do Nascimento, Victor Hugo Vieira de Oliveira Araújo e Mário José dos Santos Pereira, e à farmacêutica Bianca Torres Ciambarella, que contribuíram de forma fundamental para a realização desse projeto.

O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.

Fernando Pessoa

RESUMO

PESSÔA, André Luiz de Campos. *A inibição da fosfodiesterase-5 (PDE5) melhora a regeneração óssea nos estágios precoces da necrose avascular traumática da cabeça do fêmur em ratos*. 2020. 72 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

A necrose avascular da cabeça do fêmur (NACF) pós-traumática afeta pacientes jovens e pode levar à limitação funcional e substituição articular através da artroplastia, procedimento de alto custo. Propostas de métodos para otimizar a regeneração tecidual vêm sendo discutidas, ainda que experimentalmente. Os inibidores da fosfodiesterase-5 (PDE5) atuam na inibição da degradação da guanosina monofosfato 3',5'-cíclica (GMPc) na via do óxido nítrico (NO), aumentando sua biodisponibilidade e promovendo o recrutamento neovascular mediado pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e a indução à regeneração do tecido ósseo isquêmico. A hipótese do autor é que os inibidores da PDE5 atuam favorecendo a regeneração do tecido ósseo através de ações neoangiogênicas e osteogênicas. Trinta ratos machos Sprague-Dawley (SD) (6 meses de idade) foram submetidos à um modelo experimental de NACF traumática, divididos em 2 grupos de acordo com a administração de 5mg/Kg de citrato de sildenafil (grupo tratado) ou água destilada (grupo controle). Os ratos foram sacrificados ao 7º, 14º e 21º dias. Técnicas histológica (H&E, azul de toluidina e tricrômico de Goldner), histoquímica (*periodic acid-Schiff* [PAS]) e imunohistoquímica (VEGF e osteopontina) foram utilizadas para quantificar as respostas vascular e óssea. Foi observado aumento da imunomarcagem de VEGF ($p<0,01$) e de osteopontina ($p<0,01$) na epífise da cabeça femoral, aumento da imunomarcagem do VEGF na placa de crescimento epifisária ($p<0,01$), aumento de formação de tecido osteóide ($p<0,01$ ao 7º dia; $p<0,05$ ao 14º dia), e de coloração de glicoproteínas pelo PAS ($p<0,01$ ao 7º dia) no grupo tratado com citrato de sildenafil. O presente estudo demonstrou que o citrato de sildenafil otimizou a regeneração óssea pelo aumento da sinalização do VEGF e da expressão da osteopontina, com aumento da formação óssea (osteóide e deposição de macromoléculas de carboidratos) nos estágios iniciais seguidos ao trauma isquêmico. Logo, podemos considerar que o tratamento com o citrato de sildenafil melhora o prognóstico dos pacientes com NACF pós-traumática.

Palavras-chave: Citrato de sildenafil. Inibidores da fosfodiesterase-5. Osteonecrose. Necrose avascular. Mecanismo de trauma.

ABSTRACT

PESSÔA, André Luiz de Campos. *Phosphodiesterase-5 inhibition improves bone regeneration at early stages of traumatic avascular necrosis of the femoral head in rats*. 2020. 72 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Post-traumatic avascular necrosis of the femoral head (ANFH) affects young patients and may lead to functional limitation and joint replacement, with total hip arthroplasty, which is a costly procedure. Proposed methods to optimize ischemic tissue regeneration have been reported. Phosphodiesterase-5 inhibitors (PDE5) act by inhibiting the degradation of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate in the nitric oxide pathway, increasing its bioavailability and promoting vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated neovascular recruitment and the induction of tissue regeneration in ischemic bone. The author's hypothesis is that PDE5 inhibitors work by promoting bone tissue regeneration through neoangiogenic and osteogenic actions. Thirty male SD rats (6-month-old) were subjected to an experimental model of traumatic ANFH, divided into 2 groups, according to the administration of 5 mg/kg sildenafil citrate or water (control group). Rats were then sacrificed at 7, 14, and 21 days. Histological (H&E, blue toluidine, Goldner's trichrome), histochemical (periodic acid-Schiff [PAS]) and immunohistochemical (VEGF and osteopontin) techniques were used to quantify bone and vascular responses. Higher levels of VEGF ($p < 0.01$) and osteopontin ($p < 0.01$) immunostaining in the epiphysis, increased VEGF immunostaining in the epiphyseal growth plate ($p < 0.01$), greater formation of osteoid tissue ($p < 0.01$ on day 7; $p < 0.05$ on day 14), and higher levels of PAS staining ($p < 0.01$ on day 7) were observed in the sildenafil citrate-treated group. The present study demonstrated that sildenafil citrate optimized bone tissue regeneration by increasing VEGF signaling and osteopontin expression, with increased bone formation (osteoid and carbohydrate macromolecule deposition) in the early stages following traumatic ischemic insult. Thus, sildenafil citrate treatment may improve the prognosis of patients with osteonecrosis.

Keywords: Sildenafil citrate. Phosphodiesterase-5 inhibitors. Osteonecrosis. Avascular necrosis. Trauma mechanism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ilustração das principais artérias responsáveis pelo suprimento sanguíneo da cabeça do fêmur.....	13
Tabela 1 – Principais agentes etiológicos relacionados à NACF.....	18
Figura 2 – Via do óxido nítrico.....	22
Figura 3 – Exposição do fêmur proximal no per-operatório.....	35
Figura 4 – Representação gráfica do experimento.....	36
Figura 5 – Avaliação morfológica pelo H&E do efeito do citrato de sildenafil na epífise do fêmur de ratos após cirurgia para indução de osteonecrose.....	40
Figura 6 – Avaliação morfológica pelo Azul de Toluidina do efeito do citrato de sildenafil na epífise do fêmur de ratos após cirurgia para indução de osteonecrose.....	42
Figura 7 – Expressão de VEGF na epífise da cabeça femural de ratos submetidos ao modelo de osteonecrose induzido por trauma e tratados com citrato de sildenafil.....	44
Figura 8 – Expressão de VEGF na placa de crescimento femural da cabeça de ratos submetidos ao modelo de osteonecrose induzido por trauma e tratados com citrato de sildenafil.....	46
Figura 9 – Efeito do tratamento com citrato de sildenafil sobre a remodelação óssea na lesão vascular traumática em diferentes fases da osteonecrose.....	48
Figura 10 – Efeito do tratamento com citrato de sildenafil sobre o depósito de matriz não fibrilar na epífise femural após a lesão vascular traumática em diferentes fases da osteonecrose.....	50
Figura 11 – Efeito do tratamento com citrato de sildenafil sobre o processo de osteogênese na epífise femural após a lesão vascular traumática em diferentes fases da osteonecrose.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ATQ	Artroplastia total do quadril
BMP	Proteína morfogenética óssea
Ca ²⁺	Cálcio inorgânico
CEUA	Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais cNOS Óxido nítrico sintase constitutiva
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CYR61	Proteína rica em cisteína ligante
ECF	Epifisiólise da cabeça do fêmur
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EDRF	Fator de relaxamento dependente do endotélio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FGF	Fator de crescimento Fibroblastos
GAFs	<i>cGMP-binding PDEs, Anabaena adenyl cyclases, and Escherichia coli transcription factor FhlA</i>
GC	Guanilato ciclase
GCa	Guanilato ciclase ativa
GMPc	Guanosina monofosfato 3', 5'- cíclica
GMP	Guanosina monofosfato - 5'
GTP	Guanosina trifosfato
H&E	Hematoxilina e eosina
HIF-1 alfa	Fator hipóxia induzido-1 alfa
IGF	Fator de crescimento insulina-Like
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
L-NMMA	Monometil-L-arginina
Mc	Monofosfatos cíclicos
NACF	Necrose avascular da cabeça do fêmur
Nc	Nucleotídeos cíclicos
nNOS	Óxido nítrico sintase neural

NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
OPN	Osteopontina
PAS	<i>Periodic acid-Schiff</i>
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PDE5	Fosfodiesterase do tipo 5
PDE6	Fosfodiesterase do tipo 6
PDEs	Fosfodiesterases
PDE5i	Inibidores da fosfodiesterase-5
PKG	Proteína quinase G
SD	Sprague-Dawley
TFG- β	Fator de crescimento transformante Beta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular
VHL	Supressor tumoral de <i>Von Hippel-Lindaul</i>

SUMÁRIO

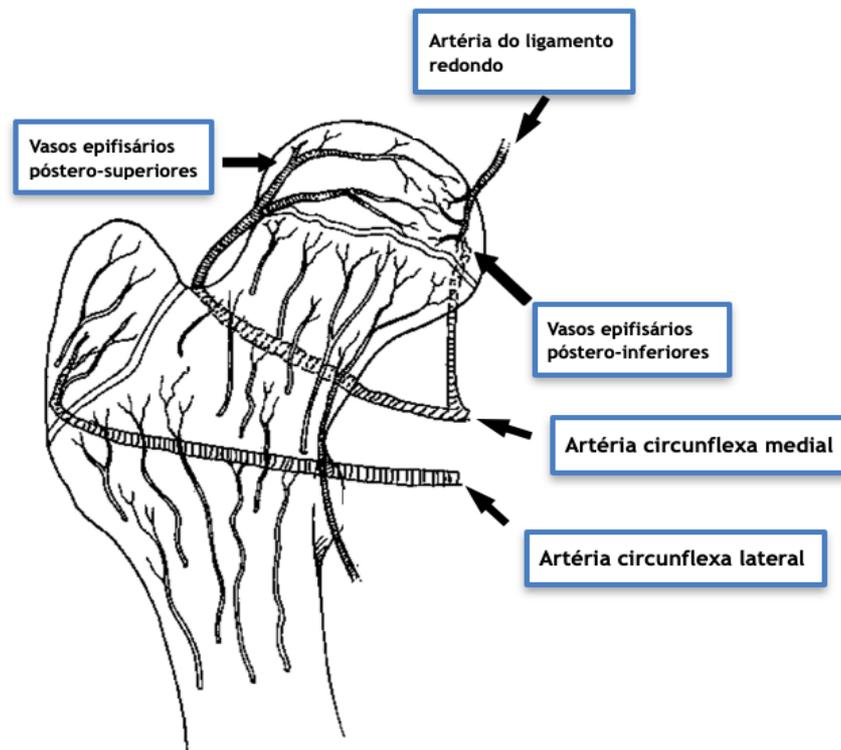
	INTRODUÇÃO.....	13
1	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
1.1	A osteonecrose.....	17
1.2	A via do Óxido Nítrico.....	22
1.3	Ações do Óxido Nítrico sobre o Tecido Ósseo.....	24
1.4	A Osteonecrose e a via do Óxido Nítrico.....	26
1.5	As Fosfodiesterases.....	28
1.6	A Fosfodiesterase-5.....	29
1.7	Os Inibidores da Fosfodiesterase-5.....	30
2	OBJETIVOS.....	32
2.1	Geral.....	32
2.2	Específicos.....	32
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1	Modelo Animal.....	33
3.2	Modelo Cirúrgico.....	33
3.3	Grupos Experimentais.....	35
3.4	Avaliação Histológica.....	36
3.5	Avaliação Imunohistoquímica.....	37
3.6	Avaliação Histoquímica.....	38
3.7	Análise Estatística.....	38
4	RESULTADOS.....	39

4.1	Análise do Papel do Citrato de Sildenafil na Morfologia da Epífise do Fêmur após o Desenvolvimento da Osteonecrose.....	39
4.2	Análise do Papel do Citrato de Sildenafil na Neoangiogênese após o Desenvolvimento da Osteonecrose.....	43
4.3	Avaliação do Tratamento com Citrato de Sildenafil sobre a Remodelação Óssea na Lesão Vascular Traumática em Diferentes Fases da Osteonecrose..	47
4.4	Avaliação do Efeito do Tratamento com Citrato de Sildenafil sobre a Produção de Carboidratos na Lesão Vascular Traumática em Diferentes Fases da Osteonecrose.....	49
4.5	Avaliação do Tratamento com Citrato de Sildenafil sobre a Osteogênese na Lesão Vascular Traumática em Diferentes Fases da Osteonecrose.....	51
5	DISCUSSÃO	53
	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS	62
	ANEXO - Aprovação do Comitê de Ética.....	72

INTRODUÇÃO

A necrose avascular da cabeça do fêmur (NACF) é uma doença de etiopatogenia complexa, frequentemente de apresentação asséptica, que resulta na interrupção completa ou parcial do aporte de oxigênio e nutrientes ao tecido ósseo com múltiplos mecanismos moleculares e celulares (apoptose, alteração da homeostase dos osteoblastos/osteoclastos, anormalidades dos lipídeos e/ou da coagulação e estresse oxidativo, por exemplo) que, associados ou não, levam à morte tecidual. Foi comparada à isquemia do miocárdio por semelhanças no seu mecanismo de lesão, outrora denominada como “doença coronária do quadril” (CHANDLER, 1948). A osteonecrose está relacionada a mecanismos traumáticos e atraumáticos, sendo este último comumente associado ao uso prolongado de corticóides e ao alcoolismo. Nas condições traumáticas, o fêmur proximal possui particularidades anatômicas da sua rede vascular arterial nutriente que o deixa vulnerável à doença isquêmica (Figura 1).

Figura 1 - Ilustração das principais artérias responsáveis pelo suprimento sanguíneo da cabeça do fêmur.



Legenda: As artérias circunflexas são responsáveis por 80% do suprimento vascular da cabeça do fêmur e fazem parte da rede de circulação extra-óssea. Fonte: O autor, 2020.

O mecanismo traumático afeta principalmente pacientes jovens entre a terceira e a quinta décadas, podendo levar à mau prognóstico a longo prazo caso ocorra complicações. Estima-se que anualmente sejam diagnosticados de 20.000 a 30.000 novos pacientes nos Estados Unidos da América com NACF que, observando sua história natural, poderia evoluir para osteoartrose avançada do quadril com piora da qualidade de vida e eventualmente levando à substituição articular cirúrgica através da artroplastia total do quadril (ATQ). Nos Estados Unidos da América de 5 a 12% das ATQs, procedimento de alta complexidade e elevado custo, são realizadas baseado-se nesse diagnóstico (VAN DER JAGT et al, 2015). Em algumas doenças características da infância e adolescência, como a doença de Legg-Calvè-Perthes e a epifisiólise da cabeça do fêmur (ECF), a relação etiopatológica com o mecanismo de trauma nem sempre é bem estabelecida (LEROUX et al, 2018). Na ECF, a necrose avascular é de risco reconhecido, especialmente na sua forma aguda e instável, com 5% resultando em ATQ em 20 anos de acompanhamento (MATHEW et al, 2019).

Fisiopatologicamente, após a isquemia óssea, uma região de espessamento ou esclerose óssea se forma às margens da área infartada. Se a necrose ocorrer numa região de carga mecânica da cabeça do fêmur, surgirão fraturas subcondrais tardiamente durante o processo de regeneração óssea. Com micro fraturas repetidas e carga continuada, a fratura original não consolida completamente e novas fraturas aparecerão. As fraturas secundárias se estendem entre o osso subcondral e o segmento ósseo necrosado, podendo levar ao seu colapso e tornando a cabeça femoral deformada e incongruente com a acetábulo. A cabeça não esférica articulando com o acetábulo produz atrito e erosão, com secundária condropatia. O ciclo se repete, tendo como história natural as alterações degenerativas articulares, no caso a coxartrose (GLIMCHER; KENZORA, 1979).

O óxido nítrico (NO), radical livre altamente reativo que se difunde rapidamente entre as células, tem função tanto citoprotetora quanto citotóxica (favorável em condições patológicas). Muitas ações do NO são mediadas via estimulação da enzima solúvel intracelular guanilato ciclase. A resultante, guanosina monofosfato 3', 5'-cíclica (GMPc), é responsável pelos múltiplos efeitos fisiológicos do NO, que incluem por exemplo, o relaxamento das células musculares lisas e a inibição da agregação plaquetária (GRANT; EL-FAKAHANY, 2004). Os níveis de GMPc intracelulares não são determinados apenas pela atividade da guanilato ciclase, mas também pela conversão de GMPc em guanosina monofosfato - 5' (GMP) via ação das fosfodiesterases (PDEs). Essas enzimas são responsáveis pela hidrólise do GMPc e do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), mensageiros intracelulares responsáveis por mediar

respostas a vários hormônios e neurotransmissores. Ao hidrolisar os monofosfatos cíclicos (Mc), as PDEs regulam vários processos fisiológicos importantes incluindo resistência vascular, débito cardíaco, motilidade visceral, resposta imunológica, inflamação, neuroplasticidade, visão e reprodução (GHOSH et al., 2009). Além disso, o NO é um reconhecido regulador da angiogênese através de várias respostas celulares que incluem (mas não se limitam) o aumento da sua proliferação e sobrevivência, da motilidade celular endotelial e da ativação das vias necessárias para atividade angiogênica.

Diferentes terapias têm sido pesquisadas com a finalidade de interferir na progressão da osteonecrose de forma preventiva, a fim de evitar ou amenizar a deformidade osteocondral residual da cabeça do fêmur. Nas NACF atraumáticas induzidas pelo corticóide, algumas substâncias têm sido avaliadas ainda que experimentalmente, como a pravastatina (JIANG et al., 2014), Coenzima Q10 (KÖMÜRÇÜ et al., 2014), ferulato de sódio (TIAN et al., 2013), edaravona (LI et al., 2013), sinvastatina (OLIVEIRA et al., 2007) e eritropoietina (CHEN et al., 2014); assim como a estimulação elétrica através do pulso de campo eletromagnético (LI et al., 2014). Nas osteonecroses induzidas por isquemia, a associação do ibandronato com a proteína morfogenética óssea (BMP) 2 mostrou-se eficaz na diminuição da deformidade da cabeça femoral enquanto estimulam a formação óssea em um modelo animal imaturo (VANDERMEER et al., 2011). Os resultados fornecem uma prova do conceito de que uma combinação de agentes anti-reabsortivos e anabolizantes podem melhorar significativamente a cicatrização óssea e diminuir a deformidade em consequência da osteonecrose isquêmica na cabeça femoral.

O citrato de sildenafil é um inibidor seletivo da fosfodiesterase do tipo 5 (PDE5), específica do GMPc (BOOLELL et al., 1996), portanto aumenta a biodisponibilidade tecidual do mesmo sem a necessidade da atividade da enzima óxido nítrico sintetase (NOS). É admitido portanto que esses fármacos sejam capazes de causar alterações hemodinâmicas em sítios onde a PDE5 encontra-se presente ocasionando alterações circulatórias sistêmicas (KERR; DANESH-MEYER, 2009). O efeito da terapia com o citrato de sildenafil também é dependente da atividade da proteína quinase G (PKG), demonstrando que o aumento da atividade angiogênica mediada pelo aumento do GMPc ocorre através da sinalização dessa via.

A via do NO, tendo o citrato de sildenafil como inibidor da hidrólise do GMPc e conseqüentemente ocasionando seu acúmulo e biodisponibilidade (potencializando a ação do NO), tem se mostrado promissor na cicatrização do tecido ósseo, seja pelo aumento do fluxo sanguíneo secundário à vasodilatação, acelerando assim a transição do calo cartilaginoso para

o calo ósseo (YAMAN et al., 2011) (HISTING et al., 2011), ou por ação celular direta, estimulando a formação óssea e inibindo sua reabsorção (RALSTON et al., 1995) (LOWIK et al., 1994) (KASTEN et al., 1994) (MACINTYRE et al., 1991) (DIWAN et al., 2000).

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 A Osteonecrose

O conceito da necrose do tecido ósseo foi descrito inicialmente por Hipócrates (MCCARTHY, 1982), tendo a primeira descrição clínica sido observada em 1792 por James Russell, em um caso de morte óssea sepse-induzida (NIXON, 1983). Quase um século após tal relato, foi descrito o infarto do tecido ósseo na ausência de infecção, caracterizando sua forma asséptica (AXHAUSEN, 1928).

A osteonecrose da cabeça do fêmur vem sendo relacionada com diversas condições clínicas, podendo ser etimologicamente dividida em dois grandes grupos: traumáticas e atraumáticas. Com relação à epidemiologia, as formas traumáticas estão mais frequentemente associadas às fraturas do colo de fêmur e às luxações do quadril. Ainda que a denominação mais frequente das formas atraumáticas seja idiopática, desordens metabólicas são a base de todos os pacientes. O metabolismo hepático está frequentemente alterado pela síndrome de base, pelo uso excessivo de álcool ou pela administração de esteróides no tratamento de uma doença imunológica ou autoimune, sendo essa última a principal causa das formas atraumáticas (relacionada ao uso de corticóides), tendo sido inicialmente descrita em 1957 (PIETROGRANDE; MASTROMARINO, 1957). Os principais agentes etiológicos da osteonecrose da cabeça do fêmur são demonstrados na tabela 1.

Tabela 1 - Principais agentes etiológicos relacionados à NACF.

Medicamentos, dieta e hábitos	Uso crônico de esteróides, bisfotonatos, alcoolismo, tabagismo, disbarismo, envenenamento por chumbo, choque elétrico
Condições musculoesqueléticas com comprometimento da integridade estrutural	Trauma, doença de Legg-Calvé-Perthes, displasia desenvolvimental do quadril, epifisiólise do fêmur proximal
Doenças do metabolismo	Embolia gordurosa, pancreatite, hepatopatia crônica, gravidez, doença de Fabry, doença de Gaucher, gota, hiperparatireoidismo, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, diabetes
Condições hematológicas	Anemia falciforme, hemofilia, hemoglobinopatias, talassemia, coagulação intravascular disseminada, trombofilia, hipofibrinólise, tromboflebite/trombose venosa.
Condições reumatológicas	Síndrome de anticorpos antifosfolípídeos, artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal, arterite necrotizante, polimiosite, sarcoidose
Doenças infecciosas	Síndrome da imunodeficiência adquirida, osteomielite, meningococemia, síndrome de estresse respiratório agudo
Doenças oncológicas, transplante e seus tratamentos	Transplante de órgãos, exposição à irradiação, hipertermia profunda regional, leucemia linfoblástica aguda.

Legenda: Relação dos sistemas e condições clínicas pertinentes à etiopatogenia da osteonecrose e suas respectivas doenças correlatas.

A fisiopatologia da necrose óssea é muito similar entre crianças e adultos. O que os diferencia é a maturidade da cartilagem. Enquanto as crianças possuem uma cartilagem epifisária de crescimento capaz de reparar a cabeça femoral, quaisquer deformidades que ocorram durante a evolução da doença tem um potencial para restauração, o que não ocorre no adulto porque a cartilagem epifisária é muito fina, justa articular e não tem potencial de crescimento. Assim, quanto mais jovem é a criança melhor o prognóstico (SCHOENECKER et al., 1993) (AYDIN et al., 2016).

A sequência de eventos que ocorrem na fisiopatologia da necrose óssea podem ser divididas em duas fases sucessivas: a isquemia e a sua regeneração.

O tempo exato a partir do qual a fase da isquemia ocorre é difícil de prever, mesmo nas formas atraumáticas, quando relacionadas com alguma doença, não é possível determinar por quanto tempo ela permaneceu silenciosa. Isso também se aplica às formas traumáticas, ainda que uma fratura seja sua origem, eventualmente é difícil explicar o porquê de fraturas mais graves ou de pior prognóstico para isquemia da cabeça femoral não evoluírem para tal e outras formas mais benignas sim.

Nos casos atraumáticos em crianças não é claro se a origem da isquemia está nos vasos que nutrem a epífise (NISHIO, YAKUSHIJI, 1962), no sangue transportado por elas (KLEINMAN, BLECK, 1981) ou na matriz cartilaginosa que envolvem os vasos penetrantes da cartilagem epifisária (PONSETI et al., 1983). Com relação a essa última hipótese, a composição alterada da cartilagem de crescimento poderia facilitar o rompimento dos canais vasculares que suprem a região epifisária da cabeça do fêmur.

Acredita-se que ao longo da interrupção do suprimento vascular, não ocorram alterações no tecido ósseo mineralizado e assim, as imagens radiológicas não se apresentam de forma alterada ou patológica, sendo necessários exames dinâmicos como a cintilografia óssea e a ressonância magnética para confirmação. Para que sinais radiológicos ocorram é necessário que os segmentos de osso morto sejam revascularizados, promovendo a migração de células tronco mesenquimais para área necrótica, assim as mesmas se multiplicam e se diferenciam em células formadoras de osso, os osteoblastos, que irão formar tecido ósseo novo aposicional com a subsequente reabsorção pelos osteoclastos. Esse evento constitui o primeiro passo para fase de regeneração.

À nível histológico, as células da medula óssea são a primeira população a morrer, seguidas pelos osteoblastos e osteócitos. O diagnóstico histológico é feito quando não se

observa a presença dos osteócitos nas suas lacunas. Preparos de microscopia eletrônica e colorações de DNA têm demonstrado que ainda que osteócito esteja na sua lacuna, ele pode encontrar-se inviável (GUERADO, 1988).

Quando o evento isquêmico e a necrose ocorrem, alguns mediadores moleculares mobilizam e encorajam células tronco mesenquimais para área necrótica. Para essa proposta, novos vasos penetrantes se formam a partir da cartilagem epifisária. Esse fenômeno representa um potencial para novas terapias (HOWELL et al., 2016).

Estudos experimentais em animais imaturos sobre regeneração do fluxo sanguíneo utilizando a técnica de Rhinelander demonstraram que essa revascularização é exagerada em relação ao fluxo normal prévio, antes do evento isquêmico (GUERADO, 1988). A cartilagem de reparo também cresce de maneira exagerada, de maneira que a cabeça do fêmur pode crescer de maneira desproporcional com relação ao acetábulo, resultando em eventual subluxação da mesma, sabidamente achado de mau prognóstico e sinal de cabeça em risco na doença de Legg-Calvè-Perthes (MUIRHEAD-ALLWOOD, CATTERALL, 1982).

No começo dessa fase de regeneração, dois diferentes fenômenos ocorrem no tecido ósseo necrosado. Por um lado, o osso compacto subcondral irá sustentar um balanço negativo de aposição-reabsorção óssea; osteoclastos originados dos monócitos coalescentes expressam o fenótipo de células gigantes multinucleadas e removem esse osso compacto que suporta a cartilagem, conhecido há 90 anos como “substituição rasteira” (*creeping substituton*) (PHEMISTER, 1930). Por outro lado, o tecido ósseo esponjoso situado no centro da cabeça do fêmur irá receber um balanço aposicional positivo. Um exame radiológico nessa fase poderá apresentar uma linha de radiolúscencia subcondral correspondente à fratura subcondral. Esse enfraquecimento ósseo subcondral não é capaz de suportar forças de compressão em áreas de carga, conseqüentemente a superfície articular da cabeça colapsa. É importante observar que o tecido cartilaginoso não é primariamente afetado até que a substituição do osso subcondral e o colapso ocorram.

O quadril de um adulto, nessa fase, eventualmente irá evoluir para artrose, enquanto o quadril de uma criança poderá ocorrer uma recuperação da altura da epífise colapsada na dependência da capacidade da cartilagem epifisária de sintetizar matriz cartilaginosa nova, fenômeno conhecido como "plasticidade biológica".

Atsumi et al., realizando angiografia superseletiva da artéria circunflexa medial em dezesseis quadris de adultos diagnosticados em estágio inicial de osteonecrose através de

cintilografia e seus quadris contralaterais não afetados, observaram que a revascularização foi obtida não apenas na cabeça necrosada mas também naquelas ainda não afetadas pelo insulto isquêmico. Também observaram, através de ressonância magnética, um difuso acometimento da cabeça e colo do fêmur com liposs substituição por tecido fibroblástico sem evidências de necrose do osso trabecular, o que seria creditado a estágio precoce da osteonecrose idiopática. Achados radiológicos clássicos (radiografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética) foram observados, em média, aos 14 meses no seguimento. Tais achados foram: a medula óssea é afetada precocemente após a isquemia e alterações na matriz óssea são provocadas apenas durante a fase de regeneração, pois o tecido ósseo aposicional neoformado e absorção do tecido ósseo morto requerem a ação de células sanguíneas transportadas através de novos vasos sanguíneos. Essa penetração de vasos novos ocupam o osso subcondral e o colapso ocorre quando essa zona de carga da cabeça do fêmur é substituída por tecido fibroso. O subsequente achatamento da cabeça do fêmur é facilmente observado como um evento secundário do colapso. Na sequência, a cartilagem articular justaposta, primariamente sadia, resultará em lesão e artrose. Profundamente no centro da cabeça femoral, devido a características da revascularização, ocorrerá um balanço positivo entre depósito de tecido ósseo aposicional em detrimento da absorção, num processo de formação de calo ósseo endcondral semelhante à cicatrização do tecido ósseo após fratura (ATSUMI, KUROKI, 1992).

As alterações histopatológicas que vão desde o dano vascular isquêmico até a deformidade residual da cabeça do fêmur, passando por todo processo de regeneração e reparo, é melhor documentado através de modelos experimentais, dado as limitações de acesso em modelos em humanos (KIM, 2012). Os achados relevantes nos estudos experimentais são que a indução da isquemia produz uma diminuição da força mecânica da cabeça femoral necrótica levando à deformidade na fase avascular inicial (KOOB et al., 2007) (PRINGLE et al., 2004). A diminuição das propriedades mecânicas da cabeça femoral necrótica parece ser multifatorial. Esses fatores incluem necrose da camada profunda da cartilagem articular (KIM et al., 2001), aumento do conteúdo mineral da cartilagem necrótica calcificada e do osso trabecular (HOFSTAETTER et al., 2010) e o acúmulo de micro lesões das trabéculas necróticas (ARUWAJOYE et al., 2013).

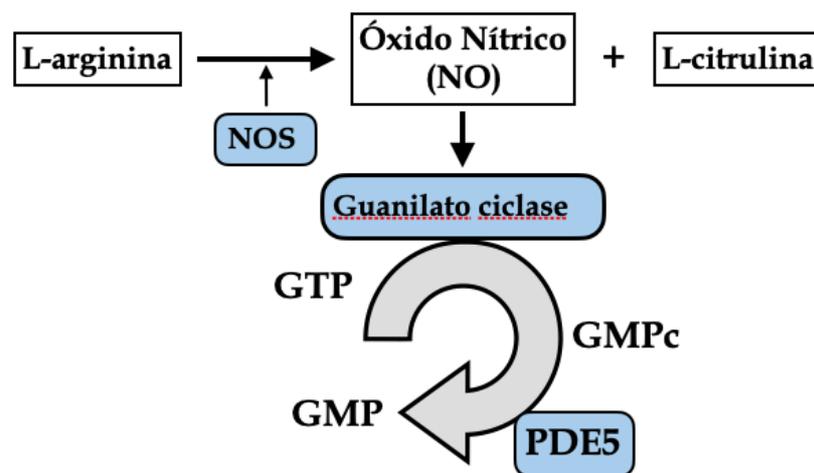
A cabeça femoral é enfraquecida na fase ativa da osteonecrose, assim o efeito da carga sobre a articulação do quadril no desenvolvimento da deformidade da cabeça femoral deve ser considerado. Repetidas cargas produzindo micro lesões no osso normal são detectadas e reparadas pelos osteoclastos e osteoblastos através do processo de remodelação (SEEMAN;

DELMAS, 2006). No tecido ósseo necrótico, as células de reparo não estão disponíveis, por isso na fase avascular existe um acúmulo de lesão tecidual (ARUWAJOYE et al., 2013). A revascularização da área necrótica de cabeça femoral, que acompanha a reabsorção osteoclástica do trabeculado ósseo necrosado, diminui ainda mais a resistência mecânica da cabeça do fêmur infartado. (PRINGLE et al., 2004). O desequilíbrio da reabsorção óssea produz áreas de radioluscência dentro da cabeça do fêmur necrosada e uma aparência fragmentada da cabeça femoral (KIM, 2012).

1.2 A via do Óxido Nítrico

O NO constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas (MORRIS; BILLIAR, 1994). Trata-se de um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, além de um elétron desemparelhado (a maioria das interações químicas do NO em sistemas biológicos é caracterizada pela estabilização desse elétron), termodinamicamente instável em relação a sua decomposição em oxigênio (BECKMAN; KOPPENOL, 1996). A síntese do NO resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina. Esta reação é catalisada pela enzima NOS. (Figura 2).

Figura 2. Via do óxido nítrico.



Legenda: Reação química de formação do NO, em que a L-arginina, um aminoácido semi-essencial, é transformada em L-citrulina e NO pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS): O autor, 2020

Foram purificadas diferentes isoformas da NOS em diferentes tecidos. Essas isoformas foram agrupadas em duas categorias: (a) NOS constitutiva (cNOS), cálcio-dependente, que está envolvida na sinalização celular, e (b) NOS induzível (iNOS), cálcio-independente e produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (MARLETTA, 1994) (MONCADA et al., 1991). A cNOS possui duas isoformas: NOS neural (nNOS ou tipo I), presente nos neurônios (BREDT; SNYDER, 1989), e a NOS endotelial (eNOS ou tipo III), presente normalmente nas células endoteliais vasculares e nas plaquetas (MONCADA et al., 1991).

Inicialmente subestimado, o NO era considerado apenas como membro de uma família de poluentes ambientais e potencialmente carcinógeno (JAMES, 1995), tendo despertado interesse científico nos meados da década de 80, quando diferentes pesquisas independentes confirmaram seus benefícios. Foi demonstrado que o relaxamento vascular induzido pela acetilcolina era dependente da presença do endotélio e que este efeito era mediado por um fator humoral lábil, mais tarde denominado como "fator de relaxamento dependente do endotélio" (EDRF) (FURCHQOTT; ZAWADZKI, 1980). Foi então proposto que o mecanismo pelo qual o EDRF causava o relaxamento vascular era mediado por um segundo mensageiro intracelular, a GMPc (RAPOPORT; MURAD, 1983). Outros autores sugeriram que EDRF e NO eram indistinguíveis na atividade biológica (PALMER et al., 1988), estabilidade química e susceptibilidade a inibidores ou potencialização, e que ambos tinham sua ação inibida pela hemoglobina e potencializada pela superóxido dismutase (IGNARRO, 1990). Foi evidenciado então que o mecanismo pelo qual estes compostos causavam vasodilatação envolvia a ativação da enzima guanilato ciclase (GC), mediada pelo NO, com o conseqüente acúmulo de GMPc (KATSUKI, 1977).

O NO produzido na célula endotelial difunde-se rapidamente para a célula muscular e para o lúmen vascular. Essa propriedade de difusão rápida e a facilidade com que o NO penetra em outras células é devido ao seu pequeno tamanho e pela sua característica lipofílica, aspectos cruciais para o entendimento das suas atividades biológicas (MONCADA et al., 1991). No interior da célula muscular, o NO interage com o ferro do grupo heme da enzima GC, acarretando uma alteração da conformação desta enzima e tornando-a ativa (GCa). A GCa catalisa a saída de dois grupamentos fosfato da molécula de guanosina trifosfato (GTP), levando à formação do GMPc. O sistema GC/GMPc parece ter uma importância central para a ação fisiológica do NO (LENHINGER, 1986) (SNYDER; BREDT, 1992). O aumento da concentração de GMPc na célula muscular resulta no seu relaxamento. O mecanismo de relaxamento envolve a diminuição da entrada de cálcio inorgânico (Ca^{2+}) para a célula, e a ação

sinérgica de inibição da liberação com aumento do sequestro de Ca^{2+} no retículo endoplasmático (GEWALTIG; KOJDA, 2002). A vasodilatação se mantém enquanto a difusão do NO para a musculatura lisa vascular estiver ocorrendo. Um aumento no fluxo de NO para a musculatura lisa vascular provoca maior relaxamento celular e maior vasodilatação. Se a formação de NO diminui, ocorre uma vasoconstrição moderada (WENNMALM, 1994). Esse efeito vasodilatador parece ser mantido por estímulos físicos do fluxo pulsátil e força mecânica de cisalhamento nas células endoteliais vasculares (WONG; MARSDEN, 1996).

1.3 Ações do Óxido Nítrico sobre o Tecido Ósseo

No tecido ósseo saudável, existe um contínuo equilíbrio entre absorção pelos osteoclastos do tecido ósseo antigo ou danificado e formação de tecido ósseo novo pelos osteoblastos, eventos regulados por uma variedade de hormônios e fatores locais atuando de maneira a manter a resposta fisiológica normal (homeostase) a despeito de estímulos externos e internos, denominada “remodelação óssea”. Os osteoblastos parecem iniciar o processo através da liberação na matriz óssea de metaloproteinases para degradar o material orgânico não-mineralizado e expor a superfície mineral para ação dos osteoclastos, aderindo à superfície óssea (WOESSNER, 1994). Os osteoclastos liberam ácido e enzimas proteolíticas como a catepsina, para degradação do tecido ósseo. Subsequentemente, essas células deixam a área e sofrem apoptose, sendo substituídas pelos osteoblastos, que irão formar matriz óssea nova com eventual calcificação, tornando-se osso maturo. Todo processo de remodelação óssea parece ter o envolvimento do NO. O NO potencializa a consolidação óssea, tendo sido observada a expressão da NOS (iNOS, eNOS e nNOS) durante seu processo (DIWAN et al., 2000).

O NO é um importante sinalizador molecular no tecido ósseo. As células ósseas expressam as enzimas NOS e podem produzir NO, estando claro que o mesmo tem papel importante como mediador parácrino e autócrino em resposta a diversos estímulos como citocinas pró-inflamatórias (LOWIK et al., 1994) (RALSTON ET AL., 1994), estresse mecânico (KLEIN-NULEND et al., 1998) e hormônios sexuais (ARMOUR et al., 1998). A utilização da monometil-L-arginina (L-NMMA), um análogo da L-arginina que compete com a L-arginina pelo sítio de ação da NOS e atua como inibidor não seletivo da produção de NO suprime a resposta osteogênica em modelos de indução mecânica da mesma, sugerindo que a liberação precoce do NO é um sinalizador na transdução deste estímulo, com subsequente formação óssea (FOX et al., 1996).

A síntese do NO envolve duas etapas. Na primeira, ocorre a hidroxilação de um dos nitrogênios guanidinos da L-arginina para gerar a NG-hidroxi-L-arginina (NHA). Esta reação utiliza NADPH e oxigênio e, provavelmente, envolve o complexo heme da NOS. Na segunda etapa, ocorre a conversão da NHA em NO e citrulina. Flavina adenina dinucleotídeo, flavina mononucleotídeo e a tetraidrobiopterina são utilizados como co-fatores na reação (DUSSE et al., 2003). Todas as isoformas de NOS podem ser inibidas por análogos da arginina N-substituídos, como a L-NMMA, N-imino-etil-Lornitina, NG-nitro-L-arginina e o metil éster correspondente, o NG-nitro-L-argininametil-éster (L-name). Aplicações *in vitro* da L-arginina aumentam a produção de NO e de colágeno tipo I em culturas de osteoblastos de humanos e animais (FINI et al., 2001) (TORRICELLI et al., 2002). A aplicação sistemática de precursores do NO levam ao aumento da formação óssea em fraturas de fêmur em ratos (CHOW et al., 1998), assim como o bloqueio do metabolismo arginina-NO, através da inibição da eNOS e iNOS, facilita o desenvolvimento da não-consolidação óssea em camundongos *Nos2^{-/-}* e *Nos3^{-/-}* (MEESTERS et al., 2016).

As três isoformas da NOS foram localizadas no tecido ósseo (RALSTON et al., 1994) (RALSTON et al., 1995) (RALSTON; GRABOWSKI, 1996), com quantidades de nNOS observadas em osteócitos ainda que não expressadas em células osteoblasto-like (MACPHERSON et al., 1999); a iNOS foi observada nos osteoblastos, células da medula óssea e fracamente nos osteoclastos; e a eNOS foi encontrada nas células do estroma da medula óssea, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. A produção de NO foi detectada em células primárias osteoblasto-like e em linhagens de células osteoblasto-like clonadas após estimulação de uma combinação de citocinas pró-inflamatórias (RALSTON et al., 1994) (LOWIK et al., 1994).

Enquanto a expressão da iNOS é marcadamente induzida após estimulação através de citocinas, a eNOS não é modificada por esse estímulo e está presente em níveis basais baixos, podendo-se concluir de uma maneira geral que a eNOS seria responsável pela mediação dos processos fisiológicos e a iNOS pelas respostas patológicas (RIANCHO et al., 1995) (GRABOWSKI et al., 1996) (HELFRICH et al., 1997).

A indução da eNOS pelo estrogênio em células osteoblasto-like, pode explicar parte da função protetora desse hormônio relacionada à perda óssea após a menopausa (ARMOUR; RALSTON, 1998). O efeito protetor do estrogênio em ratas com perda óssea induzidas por ooforectomia é diminuído pelos inibidores da NOS (WIMALAWANSA et al., 1996) e estudos *in vitro* demonstraram que o 17 β -estradiol induz a eNOS em células osteoblasto-like via receptor de estrogênio (ARMOUR; RALSTON, 1998).

A proliferação dos osteoblastos é reduzida, dependente da dose, pelos inibidores da NOS (RIANCHO et al., 1995). O NO também é ativo no processo de absorção óssea e atividade dos osteoclastos, inibindo a formação de novos osteoclastos tanto em altas quanto em baixas concentrações (RALSTON et al., 1995) (LOWIK et al., 1994) (KASTEN et al., 1994) (MACINTYRE et al., 1991). A liberação lenta e em baixas concentrações de NO estimula a replicação dos osteoblastos e a atividade da fosfatase alcalina (MANCINI et al., 2000), condizendo com o processo fisiológico estimulado pelo NO que é produzido pela eNOS, que inclui a neoformação de tecido ósseo induzido pelo estresse (PEAD; LANYON, 1989) e o efeito adjuvante do NO na consolidação óssea (DIWAN et al., 2000). Por outro lado, a liberação rápida e em altas concentrações de NO inibe a proliferação e induz a apoptose dos osteoblastos, estando de acordo com os efeitos reportados pelas altas concentrações de NO através da sua ativação pela iNOS mediadas pelas citocinas pró-inflamatórias (RALSTON et al., 1994) (DAMOULIS; HAUSCHKA, 1997) (HUKKANEN et al., 1995) (JILKA et al., 1998). Assim podemos observar a existência de um efeito bifásico do NO reportado *in vivo* junto ao tecido ósseo: (1) liberação lenta e moderada do autacóide é estimulante ao *strain* mecânico e à consolidação óssea, enquanto que (2) a liberação aumentada e acelerada induz à sua inibição e à apoptose. Desta forma teríamos uma possibilidade terapêutica da NO, sendo capaz de combinar efeito estimulante sobre a atividade dos osteoblastos com o efeito inibitório sobre a atividade dos osteoclastos, como por exemplo no tratamento da osteoporose (BRANDI et al., 1995) (VAN'T HOF; RALSTON, 1997).

1.4 A Osteonecrose e a via do Óxido Nítrico

Existe marcante e bem documentada relação com a osteonecrose da cabeça do femur induzida pelo uso crônico e contínuo de glucocorticóides e a via do NO. A supressão da produção dos precursores dos osteoblastos e osteoclastos, o aumento da apoptose dos osteoblastos e osteócitos, o prolongamento do tempo de vida do osteoclasto e a apoptose das células endoteliais são todos efeitos diretos do uso de glucocorticóides e tais efeitos contribuem com a fisiopatologia da osteonecrose. Os glucocorticóides também modulam mediadores vasoativos como a endotelina-1, noradrenalina e bradicinina, e diminuem a atividade do ativador de plasminogênio tecidual e aumenta o inibidor-1 do ativador de plasminogênio tecidual, assim, atuam como reguladores do fluxo sanguíneo local, modulando a resposta vascular às substâncias vasoativas. A vasoconstrição induzida nas artérias da cabeça femoral ocasiona isquemia e má perfusão tecidual. Os glucocorticóides também causam isquemia

através do aumento da pressão intraóssea que subsequentemente diminui o fluxo sanguíneo para cabeça do fêmur pela apoptose das células endoteliais, além de elevar o nível da adipogênese e da hipertrofia gordurosa no osso medular, eventos relacionados com a fisiopatologia da osteonecrose da cabeça do fêmur (KERACHIAN et al., 2009).

Os esteróides possuem um efeito vasoconstritor nas artérias epifisárias laterais da cabeça do fêmur, que poderia levar à isquemia e subsequente necrose óssea. Estudos experimentais em coelhos com osteonecrose secundária ao corticóide demonstraram menor quantidade de lacunas vazias à histomorfometria quando era administrado nitrato previamente ao início da administração do corticóide, sugerindo uma potencial medida preventiva na osteonecrose da cabeça do fêmur induzida pelos esteróides (DRESCHER et al., 2011).

O excesso de glucocorticóides também aumenta a inativação superóxido-induzida e suprime a produção do NO através da diminuição da expressão da eNOS. A eNOS estimula a produção de NO, que regula a “tensão” vascular agindo como vasodilatador, inibindo a adesão mononuclear às células endoteliais e prevenindo a agregação plaquetária. Um defeito nessa atividade pode levar a um aumento da resistência vascular e uma interrupção na regulação do fluxo sanguíneo, resultando em osteonecrose (KERACHIAN et al., 2009). A diminuição do NO induzido por glucocorticóide diminui a biodisponibilidade do mesmo e ocasiona uma disfunção endotelial levando à insuficiência da circulação periférica, podendo contribuir para patogênese da osteonecrose idiopática da cabeça do fêmur. Essa disfunção endotelial vascular induzida pelo glucocorticóide poderia ser um possível alvo para o tratamento da osteonecrose da cabeça do fêmur (AKAIKE; MATSUMOTO, 2007).

Polimorfismos genéticos também foram relacionados à osteonecrose vinculada à via do NO. Polimorfismos no gene da eNOS estão significativamente associados com o risco para desenvolvimento da osteonecrose da cabeça do fêmur em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (KIM et al., 2013). A frequência do polimorfismo no íntron 4 do eNOS está significativamente elevado nos pacientes com osteonecrose da cabeça do fêmur idiopática e secundária, sugerindo que o polimorfismo desse gene se relaciona ao risco aumentado para osteonecrose (GAGALA et al., 2013). Tal polimorfismo também está associado à baixa síntese de eNOS, sugerindo um fator de risco genético para a osteonecrose da cabeça do fêmur, e pode induzir sobre os efeitos protetores do NO na patogênese dessa doença (KOO et al., 2006). O polimorfismo do T-786C eNOS e a resultante redução da produção de NO está associada com a osteonecrose idiopática da cabeça do fêmur e da mandíbula, podendo contribuir com a patogênese da mesma e abrindo uma opção terapêutica para o uso de drogas precursoras do

NO, como a L-arginina (GLUECK et al., 2007) (GLUECK et al., 2010). Foram identificados polimorfismos na promoção do VEGF e no receptor para interleucina-23, tendo sido associados à osteonecrose na população Coreana (KIM et al., 2008).

A aplicação local de terapia de ondas de choque resulta em significativo aumento sérico dos níveis de NO e marcadores angiogênicos, osteogênicos e anti-inflamatórios na osteonecrose da cabeça do fêmur (WANG et al., 2011) (YIN et al., 2011).

1.5 As Fosfodiesterases

Os segundos mensageiros e nucleotídeos cíclicos (Nc) AMPc e GMPc intermediam a resposta celular de vários hormônios e neurotransmissores, modulando processos fisiológicos como a função dos hormônios esteróides, agregação plaquetária, apoptose, migração leucocitária, inflamação, regeneração axonal, memória e regulação circadiana. A sinalização do AMPc e GMPc *in vivo* envolve três tipos de enzimas: a ciclase, a fosfodiesterase e a proteína quinase Nc-dependente. As PDEs são as únicas enzimas que hidrolizam os Nc e assim contribuem na sinalização dessa via. Ao hidrolisar o Nc, as PDEs regulam processos fisiológicos como resistência vascular, débito cardíaco, motilidade visceral, resposta imune, inflamação, neuroplasticidade, visão e reprodução (GHOSH et al., 2009). O advento e reconhecimento das PDEs mostrou-se peculiarmente complexo desde o início da sua identificação (originalmente de uma enzima em 1958 para cinco isoenzimas em 1985), sendo sua superfamília protéica hoje contendo mais de 100 produtos distintos por possuírem diferentes fatores regulatórios, características catalíticas, distribuição tecidual, localização subcelular e sensibilidade para inibidores das PDEs diversos. Esses produtos protéicos são distribuídos em 11 famílias distintas (PDEs 1-11) derivados de 21 genes, sendo algumas famílias codificadas por um único gene, enquanto outras são produtos de múltiplos genes. As PDEs são caracterizadas com critérios enzimológicos como (1) especificidade de substrato (AMPc e GMPc), (2) afinidade de substrato e (3) ativação da calmodulina, por exemplo.

Todas PDEs possuem um lado catalítico conservado que interage com o Nc quebrando-o no seu respectivo 5'- nucleotídeo. Várias PDEs (2, 5, 6, 10 e 11) contém um lado Nc-ligante nos seus respectivos domínios regulatórios; esses correspondem em torno de ~120 aminoácidos conhecidos como GAFs (um acrônimo derivado das proteínas em que esses domínios foram originalmente identificados, ou seja, *cGMP-binding PDEs*, *Anabaena adenyl cyclases*, and *Escherichia coli transcription factor FhlA*). Para as PDEs 2, 5 e 6, o Nc ligante de um desses

GAFs na PDE pode agir como sequestrador de Nc sob condições adequadas. O lado alostérico do Nc-ligante das PDEs 2, 5, 6 e 11 se ligam preferencialmente ao GMPc. Essas características os tornam excelentes alvos para drogas que impactem a função das PDEs (FRANCIS et al., 2011).

1.6 A Fosfodiesterase-5

A PDE5 exerce um papel crítico na modulação da via de sinalização do segundo mensageiro sendo um inibidor seletivo e específico do GMPc (BOOLELL et al., 1996) (figura 2). É admitido, portanto, que fármacos que controlam sua ação sejam capazes de causar alterações hemodinâmicas em sítios em que a PDE5 encontra-se presente, ocasionando alterações circulatórias locais e sistêmicas (KERR; DANESH-MEYER, 2009).

Com relação à sua distribuição, a PDE5 é encontrada nas células do músculo liso de artérias e veias periféricas bem como na circulação coronariana e pulmonar, nas plaquetas e nas células endoteliais dos vasos sanguíneos (REFFELMANN; KLONER, 2009). Sua presença no tecido ósseo foi observada por YAMAN et al., que caracterizaram um efeito angiogênico favorecedor à cicatrização do tecido ósseo em modelo experimental de fratura em ratos, relacionando-o diretamente ao aumento do fluxo sanguíneo secundário à vasodilatação ocasionada pela ação do citrato de sildenafil, um inibidor da PDE5 (mediado pela via do NO). Esse efeito atingiu seu ápice com quatorze dias, acelerando portanto a transição do calo cartilaginoso para o calo ósseo (YAMAN et al., 2011). HISTING et al., considerando que a vascularização tecidual é um pré-requisito para a consolidação óssea (uma vez que sua redução é um dos principais parâmetros para o retardo da consolidação e para não-consolidação atrófica), utilizaram o citrato de sildenafil pela sua característica pró-angiogênica e sua ação regulatória sobre o VEGF e proteína rica em cisteína ligante (CYR61) com a finalidade de acelerar a consolidação e formação de tecido ósseo, aumentando sua rigidez biomecânica durante as duas primeiras semanas da consolidação, fase caracterizada pela alta atividade celular (HISTING et al., 2011).

1.7 Os Inibidores da Fosfodiesterase-5

A história farmacológica das drogas que inibem a PDE tem início que remota a sua mais antiga substância: a teofilina, utilizada terapêuticamente no tratamento da asma e tendo como principal mecanismo de ação a broncodilatação. Essa ação bioquímica da teofilina foi

caracterizada em 1958 e sua indicação como droga inibidora da PDE ocorreu efetivamente cerca de 20 anos posteriores (BOSWELL-SMITH et al., 2006).

Todos inibidores desenvolvidos competem com o substrato Nc no acesso ao lado catalítico da PDE. O domínio catalítico, conservado em todas PDEs nos mamíferos, compreende aproximadamente 270 aminoácidos, se localiza na porção carboxil-terminal das PDEs e exibe 24-51% da sequência dos aminoácidos identificados nas suas 11 famílias.

Os inibidores da PDE do tipo 5 (PDE5), cujo primeiro representante a ser administrado em seres humanos foi o Zaprinst® (1,4-Dihydro-5-(2-propoxyphenyl)-7H-1,2,3-triazolo(4,5-d) pyrimidin-7-one, Sigma-Aldrich® Co. LLC, Estados Unidos), foram desenvolvidos como drogas estabilizadoras de mastócitos para o tratamento de processos alérgicos. Percebeu-se que eles eram capazes de induzir o relaxamento da musculatura lisa da parede dos vasos e por esse motivo passaram a ser estudados como vasodilatadores no tratamento das patologias cardiovasculares (BOSWELL-SMITH et al., 2006).

Pioneiramente, o laboratório Pfizer lançou no mercado o citrato de sildenafil em teste clínico para o tratamento da angina. O resultado foi considerado frustrante quando comparado aos nitratos, medicamentos já bem estabelecidos no tratamento para angina, uma vez que o citrato de sildenafil estava limitado a uma meia-vida relativamente curta de 4 horas e de efeitos adversos limitantes como “visão azulada”, dor de cabeça e rubor, quando utilizado em doses acima de 50 mg. Entretanto, um dos efeitos colaterais mais relatados entre os participantes dos ensaios clínicos foi a promoção e manutenção da ereção peniana. Esses relatos associados à expectativa de que os inibidores da PDE5, como o citrato de sildenafil, poderiam ampliar a função sexual, estão de acordo com relatos de que a liberação natural de NO no tecido neural após a estimulação sexual ou através da disponibilidade de NO fornecido de forma exógena, aumentam a síntese de GMPc e funcionam como mediadores da ereção (IGNARRO et al., 1990). A partir de então passou-se a estudar os inibidores da PDE5 no tratamento da disfunção erétil (BOSWELL-SMITH et al., 2006).

O citrato de sildenafil, assim como o vardenafil, são comumente referenciados como sendo PDE5-seletivos ou PDE5-específicos, porém eles também podem potencialmente inibir a PDE do tipo 6 (PDE6) (ZHANG et al., 2005). Essa sobreposição da sua ação é responsável pelo efeito adverso envolvendo a transdução visual ou funções da glândula pineal. A restrição da expressão da PDE6 nas células fotorreceptoras e da glândula pineal minimizam as ações relacionadas ao leque de seletividade entre essas duas famílias, mas deve-se ter em mente quando se pretende investigar tecidos neuronais ou outros em que a PDE6 pode estar expressada

(BAZHIN et al., 2010). Assim, ainda que um inibidor apresente critérios para ser definido como sendo “específico” para uma PDE, a inibição parcial de outra PDE pode se fazer manifestar fisiologicamente (LUKOWSKI et al., 2010).

O citrato de sildenafil também atua no aumento da expressão do eNOS e iNOS, indicando que sua ação sobre a via do NO representa um importante mecanismo molecular na terapia com tal medicamento (SALLUM; YIN, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atuação do citrato de sildenafil sobre o tecido ósseo da cabeça do fêmur em ratos após uma lesão vascular traumática com consequente osteonecrose, na sua fase inicial, observando sua ação sobre a neoangiogênese e sobre a resposta do tecido ósseo durante o processo de regeneração.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1. Avaliar o efeito do tratamento com citrato de sildenafil sobre as alterações morfológicas na lesão vascular traumática em diferentes fases da osteonecrose;

2.2.2. Avaliar o efeito do tratamento com citrato de sildenafil sobre a neoangiogênese na epífise e na placa de crescimento epifisária na lesão vascular traumática em diferentes fases da osteonecrose;

2.2.3. Avaliar o efeito do tratamento com citrato de sildenafil sobre a remodelação óssea na lesão vascular traumática em diferentes fases da osteonecrose;

2.2.4. Avaliar o efeito do tratamento com citrato de sildenafil sobre a produção de carboidratos na lesão vascular traumática em diferentes fases da osteonecrose;

2.2.5. Avaliar o efeito do tratamento com citrato de sildenafil sobre a mineralização óssea na lesão vascular traumática em diferentes fases da osteonecrose.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os protocolos utilizados na elaboração do experimento estão de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo o mesmo sido aprovado pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEUA/UERJ), sob o Protocolo n° CEUA 028/2015. Anexo A, folha de aprovação do CEUA.

3.1 Modelo Animal

Todos os ratos foram acomodados adequadamente em gaiolas com temperatura controlada, ciclo claro/escuro de 12 horas e alimentação/hidratação com água filtrada *ad libitum*.

Foram utilizados 30 ratos da linhagem Sprague-Dawley, machos, com idade entre 24 e 28 semanas e peso aproximado entre 250g a 350g. A opção por ratos machos deveu-se a necessidade de eliminar a interferência dos efeitos protetores do estrogênio nas fêmeas sobre o tecido ósseo pela sua interferência sobre a via do NO, uma vez que a indução da eNOS pelo estrogênio (17 β -estradiol) em células de linhagem osteoblástica poderiam explicar parte da função protetora desse hormônio relacionada à perda óssea (ARMOUR; RALSTON, 1998). Também foi demonstrado que o estrogênio possui efeito protetor em ratas com perda óssea induzidas por ooforectomia via atuação sobre inibidores da NOS (WIMALAWANSA et al., 1996).

3.2 Modelo Cirúrgico

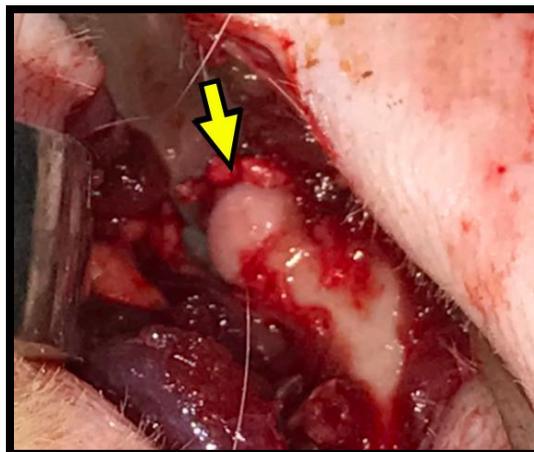
Os animais foram anestesiados com a associação de quetamina e xilazina na dosagem de 100 mg/Kg e de 10 mg/Kg, respectivamente, por administração intraperitoneal (DAMY et al., 2010) após assepsia local com álcool 70%.

A osteonecrose da cabeça do fêmur em modelos animais pode ser gerada a partir de lesão ocasionada por agentes farmacológicos e mecânicos, em geral através do uso de corticóides, endotoxinas, exposição hiperbárica, ligação de vasos ou sua destruição, embolismo, reações de hipersensibilidade, osteotomia femoral, luxação da articulação do quadril, lesão de congelação profunda, eletrocoagulação e uma combinação desses danos (CONZEMIUS et al., 2002).

Foi utilizado o modelo experimental cirúrgico de osteonecrose traumática da cabeça do fêmur proposto por Norman et al. (1998) e Peskin et al. (2001). O quadril submetido à experimentação cirúrgica foi o esquerdo. Após a tricotomia, assepsia, antissepsia e colocação de campos cirúrgicos com o rato em decúbito lateral direito, foi realizada incisão proximal e longitudinal ao quadril esquerdo ao nível do grande trocânter de aproximadamente 2 cm. O músculo glúteo máximo foi identificado e afastado posteriormente e os dois terços anteriores do glúteo médio liberados na sua inserção. A inserção da cápsula articular ântero-lateral foi seccionada ao nível do acetábulo, expondo a articulação do quadril (artrotomia). O ligamento redondo foi seccionado e a articulação do quadril luxada anteriormente (figura 3). Foram realizadas incisões circunferenciais com o bisturi na região do colo do fêmur, levando a uma destruição das artérias retinaculares. A articulação foi então reduzida e a cápsula e os músculos glúteos suturados com fio bioabsorvível 000. A pele foi suturada com monofilamento 000 (NORMAN et al., 1998) (PESKIN et al., 2001). Os ratos foram condicionados em gaiola estando livres para deambulação, com acesso livre à alimentação e água.

Para analgesia no período pós-operatório, foi utilizado meloxicam em dose única de 2 mg/kg, subcutâneo, imediatamente após o procedimento (BRENNAN et al., 2009).

Figura 3 – Exposição do fêmur proximal no per-operatório

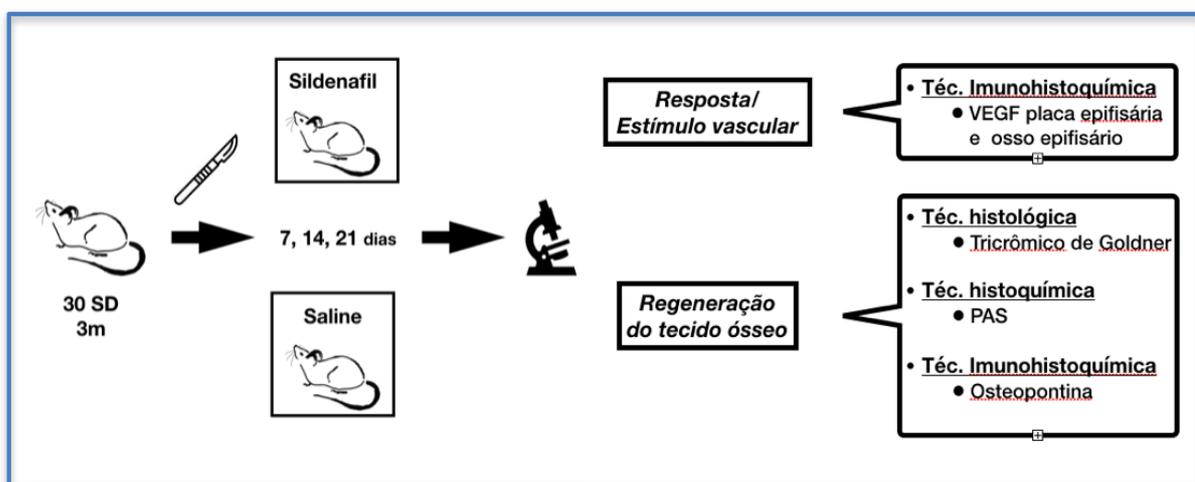


Legenda: Exposição do colo e da cabeça do fêmur no pré-operatório após artrotomia do quadril com luxação articular, podendo-se observar a cobertura articular de cartilagem hialina da epífise proximal do fêmur (seta amarela). Fonte: O autor, 2020.

3.3 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 2 grupos de acordo com a administração do medicamento, citrato de sildenafil (Viagra; Pfizer, New York City, NY, USA) (grupo tratado) ou do veículo (água filtrada) (grupo controle). O citrato de sildenafil foi diluído em água filtrada e administrado por gavagem uma vez ao dia a partir do primeiro dia pós-operatório até o seu sacrifício. A dose recomendada em humanos é de 0,7 a 1,5 mg/kg/dia. Devido ao metabolismo aumentado do citrato de sildenafil em roedores, com meia-vida de 1 hora (comparada a 4 horas em humanos), recomenda-se a dosagem de 3 a 20 mg/kg/dia. Altas doses do citrato de sildenafil (acima de 20 mg/Kg) podem levar a importantes efeitos vasodilatadores sistêmicos, ocasionando hipotensão, diminuição de perfusão tecidual e excessiva resposta anti-inflamatória (YAMAN *et al.*, 2011). Os animais receberam o citrato de sildenafil na dose de 5 mg/kg/dia. O grupo controle recebeu o mesmo volume de água filtrada por gavagem diariamente até o seu sacrifício. Os animais foram então sacrificados através da câmara de CO em igual número ao 7º, 14º e 21º dias (Figura 4).

Figura 4 - Representação gráfica do experimento



Legenda: Para realização do experimento dois grupos em igual número de ratos SD foram submetidos ao trauma provocado pela cirurgia no quadril esquerdo, e a análise da osteonecrose foi feita em três tempos diferentes tendo sido analisadas as respostas vascular e regenerativa do tecido ósseo. Fonte. O autor, 2020.

3.4 Avaliação Histológica

Os estudos histomorfométricos foram realizados na cabeça do fêmur esquerdo dos respectivos animais. O quadril esquerdo foi então dissecado e a cabeça do fêmur limpa de partes moles, preservando a inserção do ligamento redondo, este utilizado como padrão para a clivagem do corte histológico. A peça foi então imediatamente fixada em formaldeído à 10% por 48 horas. Todas amostras foram descalcificadas em ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) a 10% por 45 dias. O EDTA foi trocado a cada 48 horas. As amostras foram desidratadas em soluções graduais de etanol e clarificada em xylol. As amostras foram então embebidas em parafina e realizados cortes nos blocos de 4 micrômetros de espessura para realização das técnicas e análise histológica e imunohistoquímica. As medidas histológicas foram tomadas através da análise de 20 campos de seção da cabeça do fêmur proximal à placa de crescimento por lâmina, utilizando microscópio de luz (Olympus BX53, Olympus DP72 camera; Olympus, Tokyo, Japan). As imagens capturadas foram avaliadas utilizando a morfometria por pixel através do software Image-Pro Plus versão 7.0 (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA).

Foi realizada a análise por microscopia óptica de cortes corados com hematoxilina e eosina (H&E), azul de toluidina e tricrômico de Goldner. A osteonecrose foi definida como a presença difusa de lacunas vazias ou pela presença de núcleos picnóticos nas trabéculas ósseas, como descrita previamente (YAMAMOTO et al., 1997; ICHISEKI et al., 2011; GUERADO, 1988; OKAZAKI et al., 2009; TATEDA et al., 2012), e observadas pela coloração de azul de toluidina e H&E. A formação de tecido neoformado e não-calcificado (tecido osteóide) foi documentada pela coloração de tricrômico de Goldner. Para observação de tais características foram utilizados 20 campos da epífise proximal do fêmur por corte.

3.5 Avaliação Imunohistoquímica

Para avaliar a resposta proliferativa vascular foi realizada a imunomarcação do VEGF na epífise da cabeça do fêmur e a placa de crescimento epifisário. A imunohistoquímica também foi utilizada para avaliar a expressão da osteopontina (OPN), proteína não-colágena envolvida na organização da matriz extracelular pela coordenação da interação matriz-célula e mineral-matriz.

Para bloquear a atividade endógena da peroxidase, as seções foram imersas em peróxido de hidrogênio a 3% por 15 minutos e depois lavadas em solução salina tamponada (PBS). A recuperação do antígeno foi realizada incubando as seções em tampão citrato, pH 6,0, a 60° C por 20 minutos. As seções foram então incubadas em PBS contendo albumina de soro bovino a 3% por 20 minutos para bloquear ligações não-específicas. Após, as mesmas foram incubadas durante a noite a 4° C com anti-VEGF (sc-1876; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) ou anti-osteopontina (ab8448; Abcam, Cambridge, Reino Unido) diluídos na proporção de 1:200. Os anticorpos ligados foram detectados com o kit Vectastain® Universal Quick HRP (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), processados com diaminobenzidina e contracorados com hematoxilina Harris.

3.6 Avaliação Histoquímica

Foi utilizada a coloração pelo ácido periódico-Schiff [PAS (*Periodic Acid-Schiff*)], primariamente usado para identificar carboidratos (glicogênios, glicoproteínas e proteoglicanas) nos tecidos. É uma reação efetuada em duas etapas. Na primeira, grupos vicinais são oxidados a aldeídos e na segunda etapa os dialdeídos formados são demonstrados usando-se o reagente de Schiff, que é a fucsina básica. A cor produzida, entre púrpura e magenta brilhante, corresponde à evidenciação de carboidratos.

3.7 Análise Estatística

Todos os resultados foram reportados através da média \pm desvio padrão (SD). Para todas as análises quantitativas, os dados foram normalizados estatisticamente usando a análise da variância e o Teste-t de Student. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar os dois grupos. Valores do $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes em todos os casos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o GraphPad Prism versão 6.0 para Windows (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

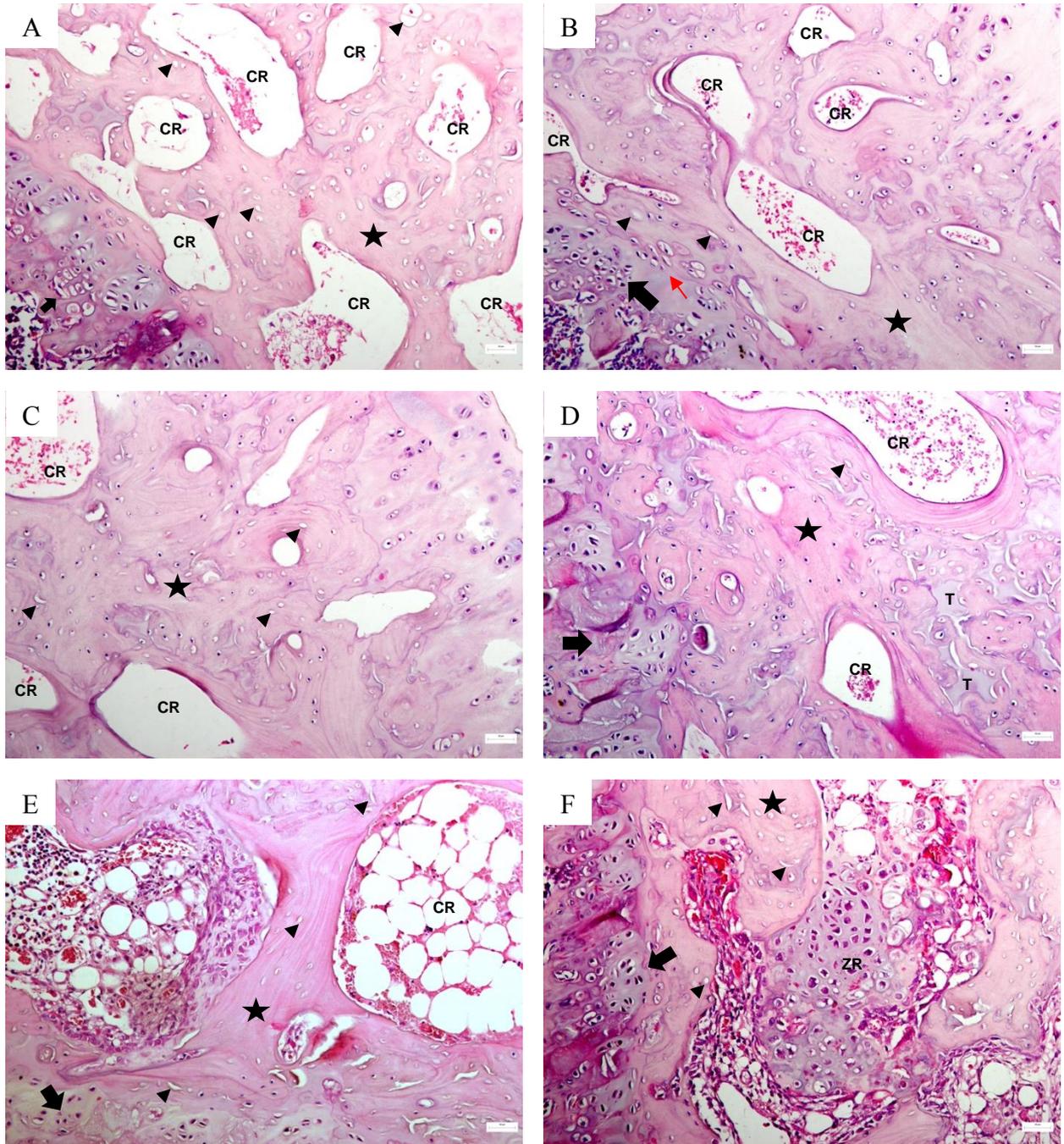
4. RESULTADOS

Não houve infecções ou complicações relacionadas ao procedimento cirúrgico e todos os ratos sobreviveram à cirurgia e ao tratamento.

4.1 Análise do Papel do Citrato de Sildenafil na Morfologia da Epífise do Fêmur após o Desenvolvimento da Osteonecrose.

Em um primeiro momento avaliamos qualitativamente as alterações morfológicas geradas no processo de osteonecrose no decorrer de 21 dias após a cirurgia. Observamos que, em 7 dias após a cirurgia, as epífises dos ratos não tratados (Controle) apresentavam o disco epifisário com características normais e zona de proliferação dispostas em fileiras (grupos isogênicos axiais), uma matriz óssea compacta reduzida, com presença de grandes canais de reabsorção com lacunas vazias e osteócitos com núcleo picnóticos ou arredondados (Figura 5A). O tratamento com citrato de sildenafil durante 7 dias foi responsável por alterar a estrutura da zona proliferativa, que apresentou uma pequena desorganização e induziu um aparente aumento do número de células da zona hipertrófica. Ainda observamos aumento da matriz óssea compacta com presença de osteócitos anucleados e redução do tamanho dos canais de reabsorção (Figura 5B). Quatorze dias após a cirurgia, os ratos do grupo controle apresentaram aumento da área do osso compacto com presença de osteócitos anucleados, porém aparentemente em número reduzido quando comparado ao grupo controle de 7 dias, e redução dos canais de reabsorção (Figura 5C). O tratamento com citrato de sildenafil acarretou em uma zona proliferativa completamente desorganizada, com sugestivo aumento dos osteócitos, poucos deles anucleados, canais de reabsorção aumentados e formação de trabéculas (Figura 5D). Vinte e um dias após a cirurgia, a epífise dos animais do grupo controle apresentaram a zona proliferativa com estrutura desorganizada, matriz do osso compacto reduzida, canais de reabsorção aumentados e presença de osteócitos anucleados (Figura 5E). O tratamento com citrato de sildenafil por 21 dias levou a reorganização da zona proliferativa, formação de matriz óssea compacta, ainda contendo alguns osteócitos anucleados e aumento da zona de reabsorção, sugerindo alta atividade de remodelamento (Figura 5F).

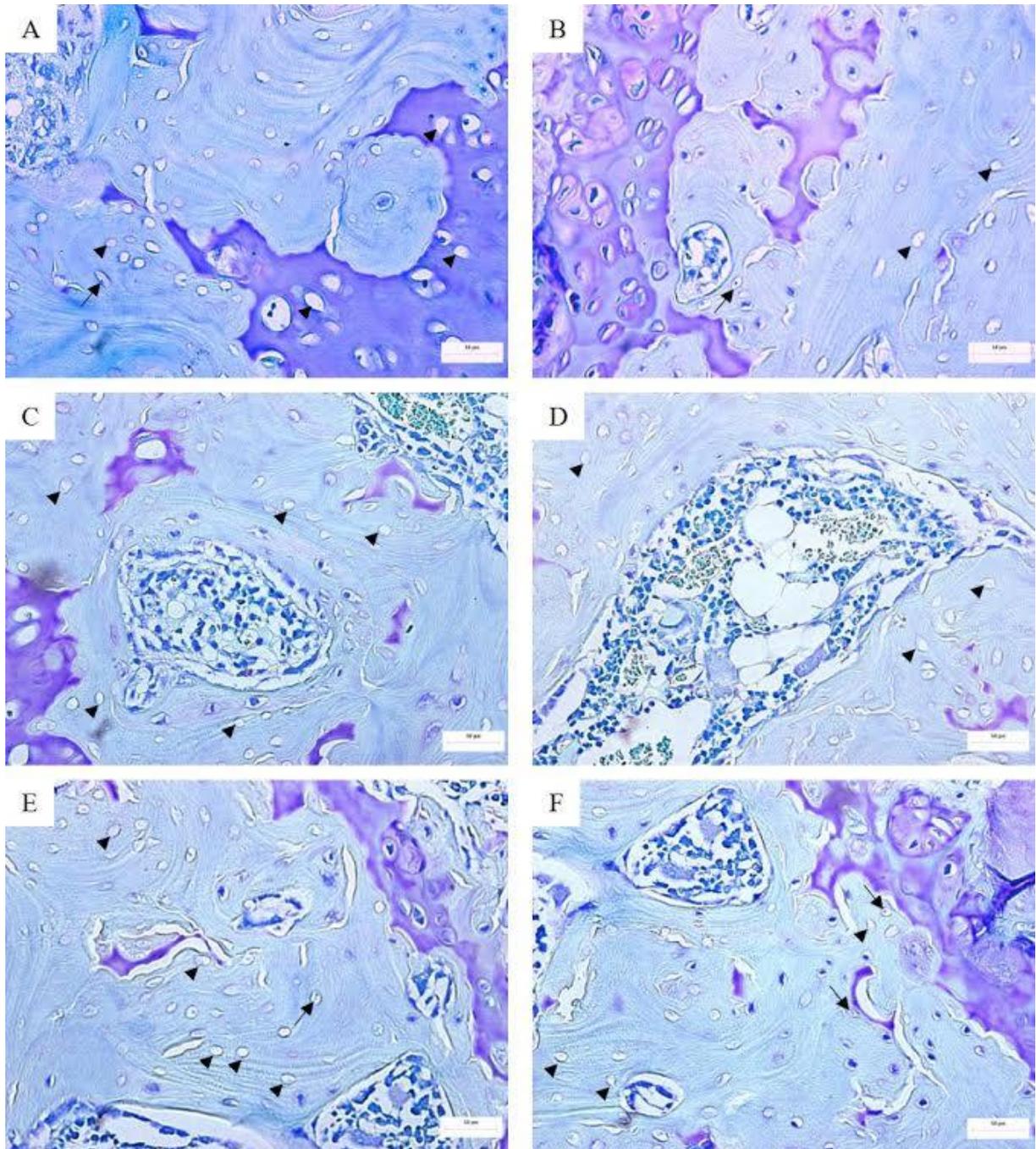
Figura 5: Avaliação morfológica pelo H&E do efeito do citrato de sildenafil na epífise do fêmur de ratos após cirurgia para indução de osteonecrose



Legenda: Fotomicrografias representativas da epífise do fêmur de ratos submetidos ao modelo de osteonecrose. (A) representa os ratos do grupo controle 7 dias após a cirurgia; (B) representa os ratos do grupo tratado com citrato de sildenafil 7 dias após a cirurgia; (C) representa os ratos do grupo controle 14 dias após a cirurgia; (D) representa os ratos do grupo tratado com citrato de sildenafil 14 dias após a cirurgia; (E) representa os ratos do grupo controle 21 dias após a cirurgia; (F) representa os ratos do grupo tratado com citrato de sildenafil 21 dias após a cirurgia; CR = canal de reabsorção; ZR = zona de reabsorção; seta larga indica camada proliferativa; seta delgada vermelha indica zona de hipertrofia; cabeça de seta indica osteócitos e estrela indica matriz óssea. Coloração: hematoxilina e eosina. Barra = 50 μ m.

Devido a observação de grande número de osteócitos anucleados na análise morfológica, fomos avaliar mais detalhadamente indícios de osteonecrose através da coloração de azul de toluidina. Este corante permite um detalhamento maior da presença de lacunas vazias e de núcleos picnóticos. Sete dias após a cirurgia o grupo controle mostrou células anucleadas ou com núcleo picnótico tanto na zona proliferativa, quanto na matriz óssea, sem indício de proliferação celular (Figura 6A), assim como no grupo tratado, porém de maneira menos acentuada (Figura 6B). O tratamento com citrato de sildenafil induziu a proliferação de células na zona proliferativa, enquanto a matriz óssea também apresentou osteócitos anucleados ou com núcleo picnótico. A avaliação de ambos os grupos em 14 (Figuras 6C e 6D) e 21 dias (Figuras 6E e 6F) após a indução da osteonecrose mostrou a presença de células anucleadas e com núcleo picnótico, sem indício de proliferação celular na zona proliferativa. Entretanto, o grupo tratado com citrato de sildenafil com 21 dias (Figura 6F) apresenta relevante aumento do número de osteócitos na matriz óssea comparada com o grupo controle (Figura 6E) do mesmo período, indicando uma recuperação da regeneração óssea devido ao tratamento.

Figura 6: Avaliação morfológica pelo Azul de Toluidina do efeito do citrato de sildenafil na epífise do fêmur de ratos após cirurgia para indução de osteonecrose.

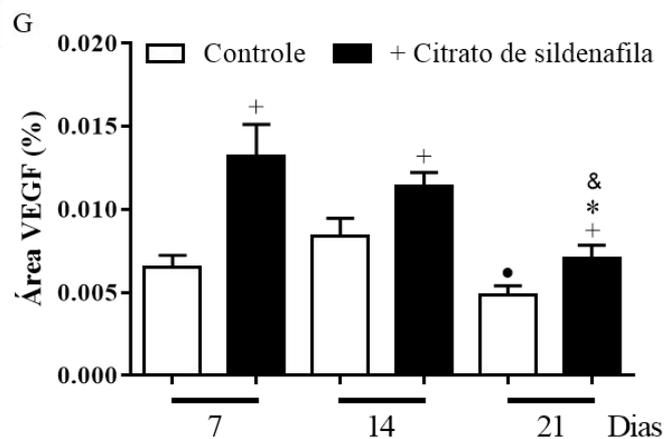
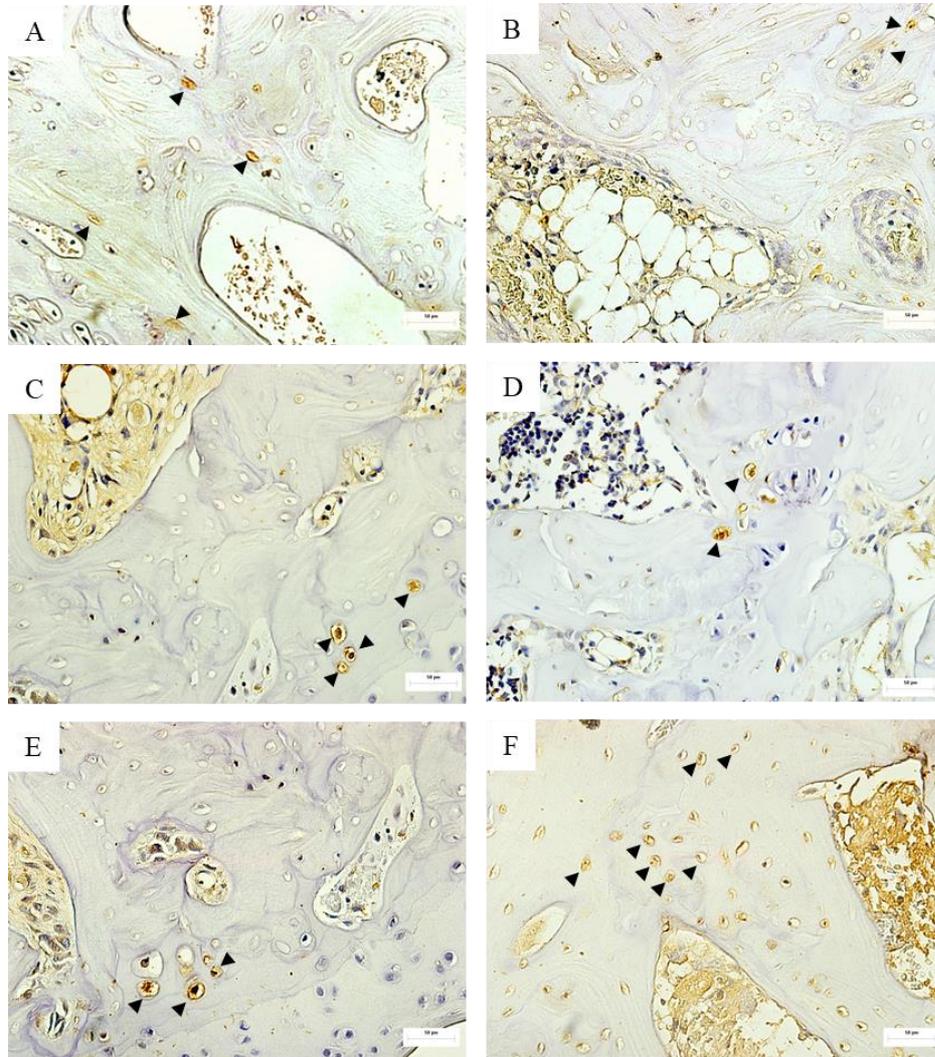


Legenda: Fotomicrografias representativas da epífise do fêmur de ratos submetidos ao modelo de osteonecrose. (A) representa os ratos do grupo controle 7 dias após a cirurgia; (B) representa os ratos do grupo tratado com citrato de sildenafil 7 dias após a cirurgia; (C) representa os ratos do grupo controle 14 dias após a cirurgia; (D) representa os ratos do grupo tratado com citrato de sildenafil 14 dias após a cirurgia; (E) representa os ratos do grupo controle 21 dias após a cirurgia; (F) representa os ratos do grupo tratado com citrato de sildenafil 21 dias após a cirurgia; seta delgada preta indica células com núcleo picnótico; cabeça de seta indica osteócitos anucleados. Coloração: azul de toluidina. Barra = 50 μ m.

4.2 Análise do Papel do Citrato de Sildenafil na Neoangiogênese após o Desenvolvimento da Osteonecrose

Sabendo que as alterações morfológicas causadas pela osteonecrose permitem a ativação do processo de reparo tecidual e que a angiogênese possui um papel fundamental para que esse processo se desenvolva, fomos avaliar a produção de VEGF, um importante indutor da angiogênese nos tecidos. Nossos resultados mostram imunomarcagem para VEGF em todo o tecido ósseo epifisário da cabeça femoral (Figura 7). Entretanto, os animais do grupo controle de 21 dias apresentaram uma expressão menor deste fator de crescimento ($0,0048 \pm 0,006$; Figuras 7E e 7G) em comparação aos animais do grupo controle de 14 dias ($0,0084 \pm 0,0011$; Figuras 7C e 7G). O tratamento com citrato de sildenafil induziu significativamente a expressão de VEGF em todos os tempos analisados (7 dias: $0,0132 \pm 0,0019$, figura 7B; 14 dias: $0,0114 \pm 0,0008$, figura 7D; 21 dias: $0,0071 \pm 0,0008$, Figura 7F) quando comparados com os seus respectivos controles (7 dias: $0,0065 \pm 0,0007$, Figura 7A; 14 dias: $0,0084 \pm 0,0011$, Figura 7C; 21 dias: $0,0048 \pm 0,006$, Figura 7E) (Figura 7G). Apesar deste aumento, a expressão de VEGF nos animais tratados continuou reduzindo gradativamente com o passar do tempo (Figura 7G).

Figura 7: Expressão de VEGF na epífise da cabeça femoral de ratos submetidos ao modelo de osteonecrose induzido por trauma e tratados com citrato de sildenafil.

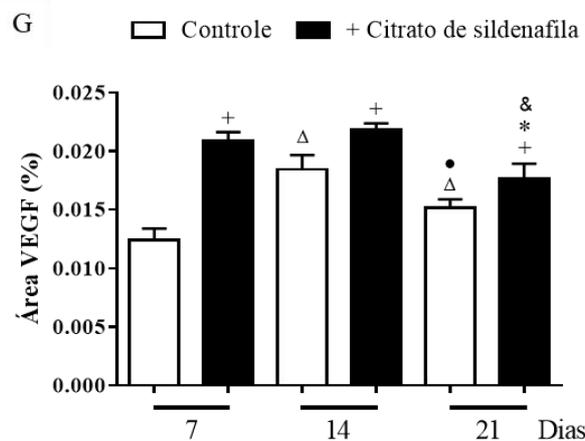
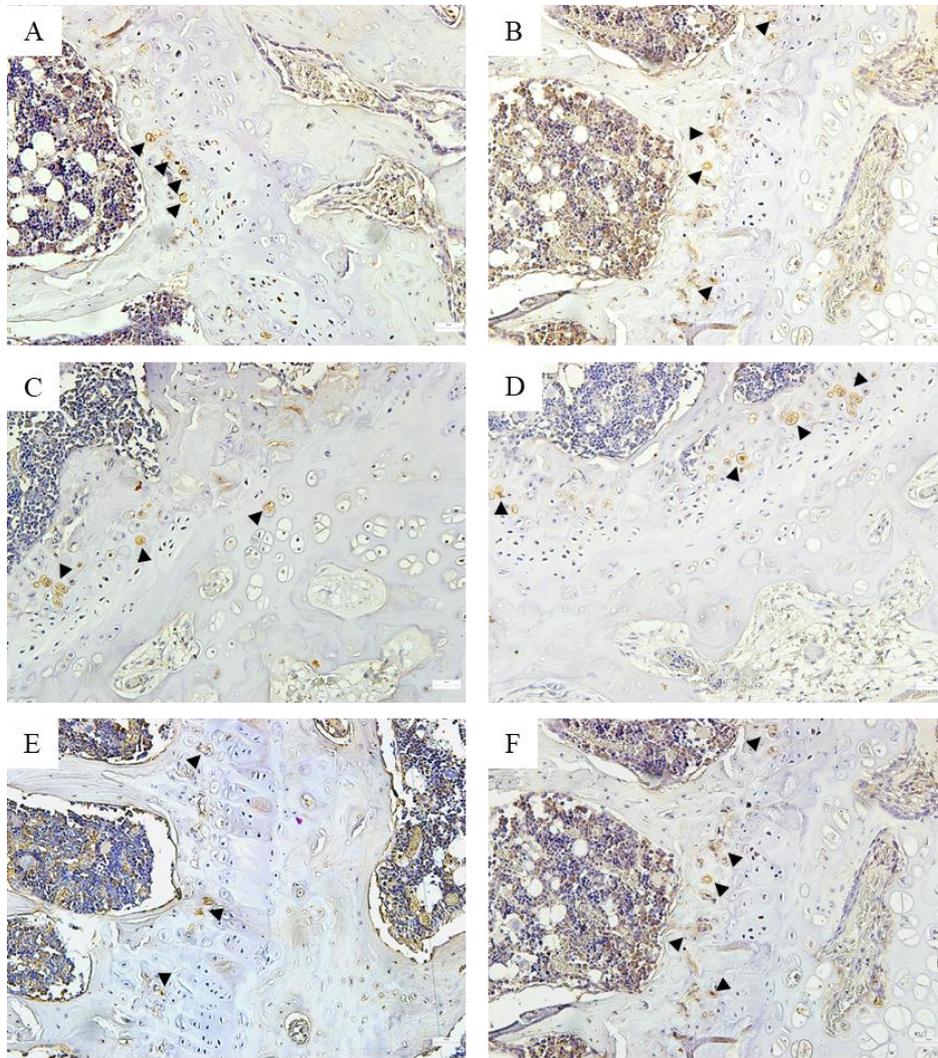


Legenda: Imunoperoxidase para VEGF. (A) representa os ratos do grupo controle 7 dias após a cirurgia; (B) representa os ratos do grupo tratado com citrato de sildenafil 7 dias após a cirurgia; (C) representa os ratos do grupo controle 14 dias após a cirurgia; (D) representa os ratos do grupo tratado com citrato de sildenafil 14 dias após a cirurgia; (E) representa os ratos do grupo controle 21 dias após a cirurgia; (F) representa os ratos do grupo tratado com citrato de sildenafil 21 dias após a cirurgia. Cabeça de setas representam a marcação para VEGF.

Barra = 50 μ m. (G) Análise morfométrica da expressão de VEGF. + $p < 0,05$ comparado com seus respectivos controles; * $p < 0,05$ comparado com o grupo tratado com citrato de sildenafil por 7 dias; ● $p < 0,05$ comparado ao grupo controle com 14 dias; & $p < 0,05$ comparado ao grupo tratado com sildenafil por 14 dias.

Também avaliamos a expressão de VEGF na placa de crescimento epifisário, região do osso responsável pela proliferação celular e conseqüente crescimento ósseo. Observamos um aumento significativo da expressão de VEGF na placa de crescimento epifisária com o passar do tempo nos animais do grupo controle (7 dias: $0,0124 \pm 0,0010$, Figura 8A; 14 dias: $0,0184 \pm 0,0012$, Figura 8C; 21 dias: $0,0151 \pm 0,007$, Figura 8E). O tratamento com o citrato de sildenafil aumentou a expressão deste fator nesta região quando comparado com os seus respectivos controles (7 dias: $0,0209 \pm 0,0007$, figura 8B; 14 dias: $0,0219 \pm 0,0005$, figura 8D; 21 dias: $0,0177 \pm 0,0013$, Figura 8F), porém reduziu a expressão de VEGF com o desenvolvimento do processo de osteonecrose quando comparados com a expressão de VEGF dos ratos tratados e avaliados 7 e 14 dias após a cirurgia (Figura 8G), havendo diminuição da imunomarcção do VEGF aos 21 dias.

Figura 8: Expressão de VEGF na placa de crescimento femoral da cabeça de ratos submetidos ao modelo de osteonecrose induzido por trauma e tratados com citrato de sildenafil.



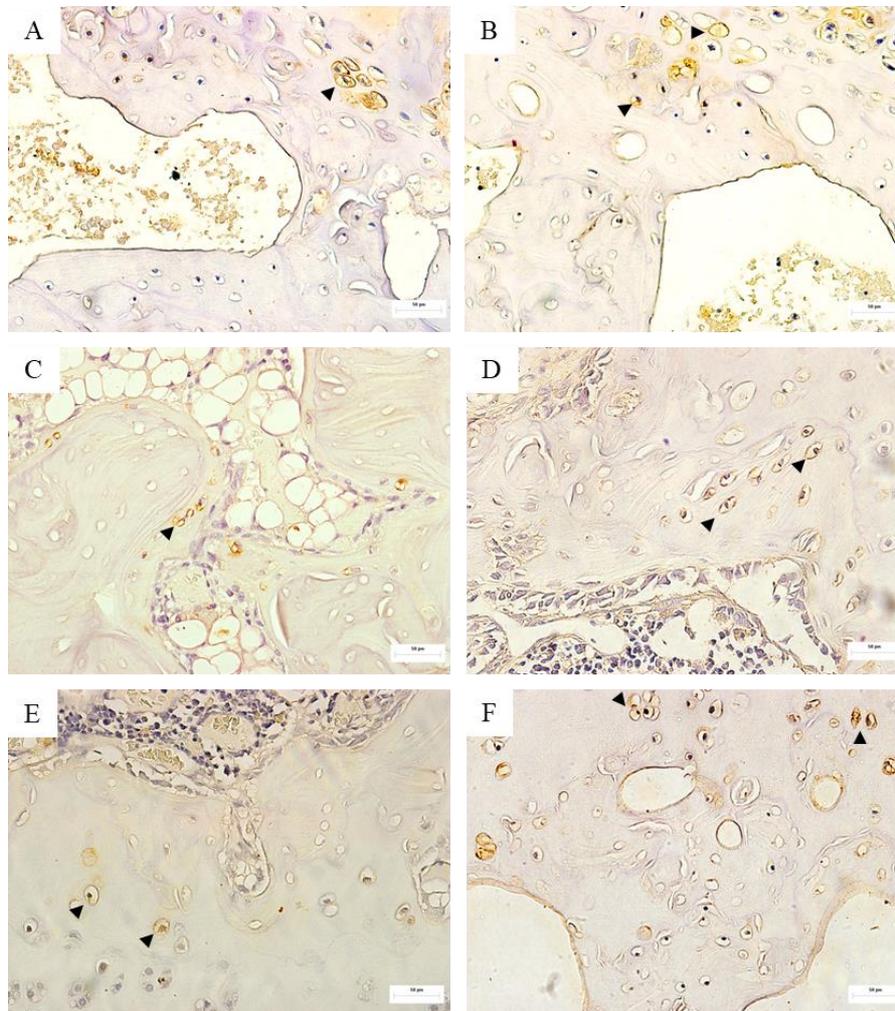
Legenda: Imunoperoxidase para VEGF. (A) representa os ratos do grupo controle (GC) 7 dias após a cirurgia; (B) representa os ratos do grupo tratado (GT) com citrato de sildenafil 7 dias após a cirurgia; (C) representa os ratos do GC 14 dias após a cirurgia; (D) representa os ratos do GT com citrato de sildenafil 14 dias após a cirurgia; (E)

representa os ratos do GC 21 dias após a cirurgia; (F) representa os ratos do GT com citrato de sildenafil 21 dias após a cirurgia. Cabeça de setas representam a marcação para VEGF. Barra = 50 μ m. (G) Análise morfométrica da expressão de VEGF. + $p < 0,05$ comparado com seus respectivos controles; Δ $p < 0,05$ comparado ao GC com 7 dias; \bullet $p < 0,05$ comparado ao GC com 14 dias; * $p < 0,05$ comparado com o GT com citrato de sildenafil por 7 dias; & $p < 0,05$ comparado ao GT com sildenafil por 14 dias.

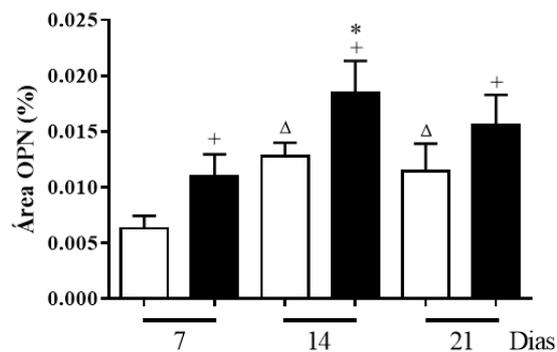
4.3 Avaliação do Tratamento com Citrato de Sildenafil sobre a Remodelação Óssea na Lesão Vascular Traumática em Diferentes Fases da Osteonecrose

Até o momento nossos resultados apontam para um papel relevante do citrato de sildenafil na remodelação óssea. Neste contexto, avaliamos a expressão de OPN, uma citocina importante no processo de oncogênese e remodelação. A imunomarcagem da OPN também foi observada na epífise da cabeça do fêmur, e mostrou um aumento gradativo com o passar do tempo tanto nos animais do grupo controle (7 dias: $0,0063 \pm 0,0011$, Figura 9A; 14 dias: $0,0128 \pm 0,0012$, Figura 9C; 21 dias: $0,0114 \pm 0,0025$, Figura 9E), quanto nos animais do grupo tratado com sildenafil (7 dias: $0,0110 \pm 0,0019$, figura 9B; 14 dias: $0,0184 \pm 0,0029$, figura 9D; 21 dias: $0,01551 \pm 0,0027$, Figura 9F). Apresentando seu pico de expressão com 14 dias. Novamente, o tratamento com citrato de sildenafil foi capaz de aumentar a produção deste mediador em todos os tempos analisados quando comparamos com o controle (Figura 9 G).

Figura 9: Efeito do tratamento com citrato de sildenafil sobre a remodelação óssea na lesão vascular traumática em diferentes fases da osteonecrose.



G Controle + Citrato de sildenafil



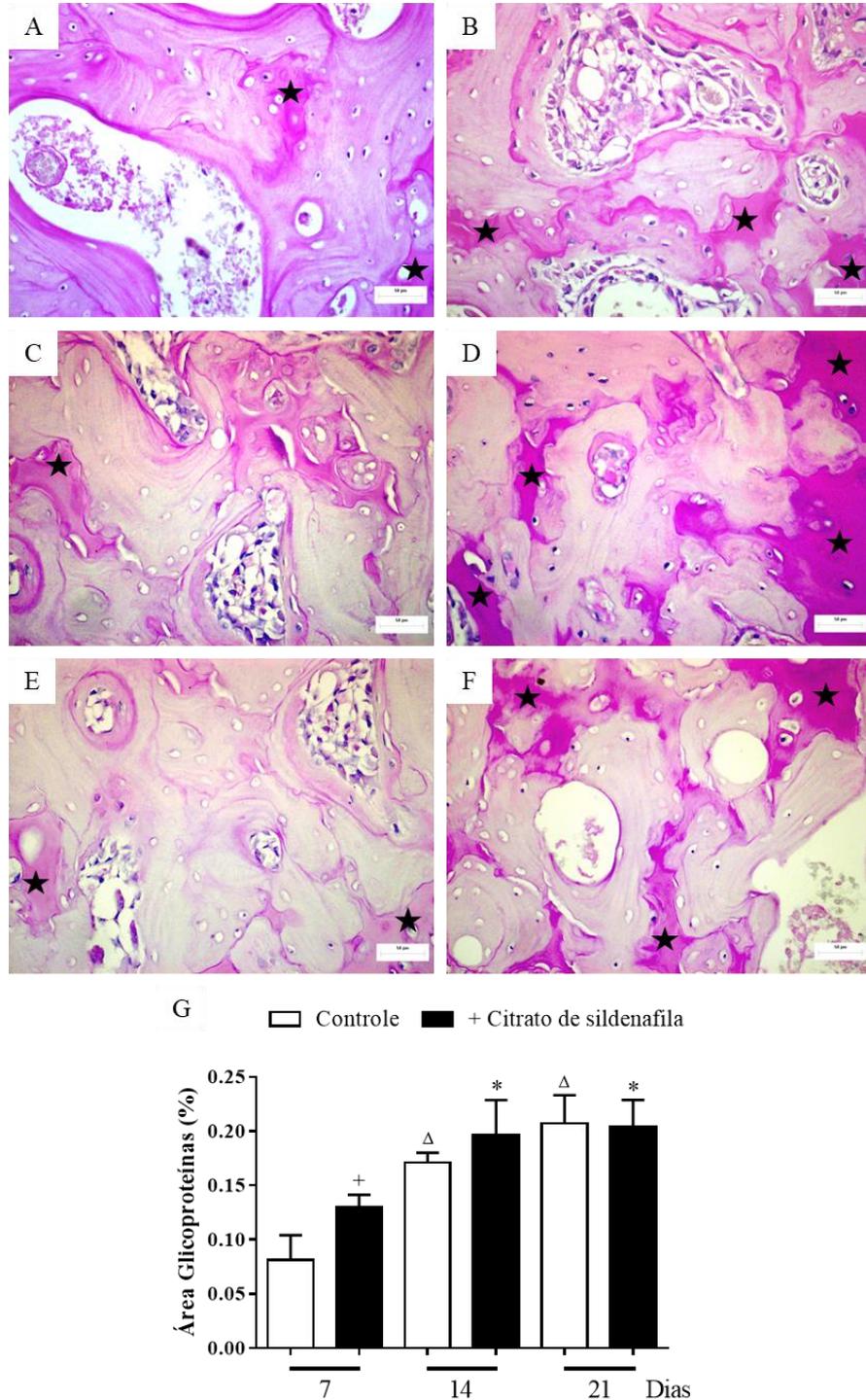
Legenda: Imunoperoxidase para osteopontina. (A) representa os ratos do grupo controle 7 dias após a cirurgia; (B) representa os ratos do grupo tratado com citrato de sildenafil 7 dias após a cirurgia; (C) representa os ratos do grupo controle 14 dias após a cirurgia; (D) representa os ratos do grupo tratado com citrato de sildenafil 14 dias após a cirurgia; (E) representa os ratos do grupo controle 21 dias após a cirurgia; (F) representa os ratos do grupo tratado com citrato de sildenafil 21 dias após a cirurgia. Cabeça de setas representam a marcação para OPN. Barra

= 50 μm . (G) Análise morfométrica da expressão de OPN. + $p < 0,05$ comparado com seus respectivos controles; $\Delta p < 0,05$ comparado ao grupo controle com 7 dias; * $p < 0,05$ comparado com o grupo tratado com citrato de sildenafil por 7 dias.

4.4. Avaliação do Efeito do Tratamento com Citrato de Sildenafil sobre a Produção de Carboidratos na Lesão Vascular Traumática em Diferentes Fases da Osteonecrose

Dando continuidade as nossas análises, sabemos que no processo de reparo tecidual há síntese de componentes fibrilares e não fibrilares da matriz, como colágeno e glicoproteínas, respectivamente. Para avaliar o componente não fibrilar utilizamos a análise histoquímica pela técnica do ácido periódico de Schiff (PAS), que demonstra os carboidratos presentes nestes componentes. Observamos que o depósito de glicoproteínas aumentou aos 14 ($0,1708 \pm 0,0093$) e 21 dias ($0,2071 \pm 0,0260$) após a cirurgia nas epífises femurais de ratos do grupo controle (Figuras 10C e 10E, respectivamente), quando comparado com as epífises dos animais do mesmo grupo com 7 dias após a cirurgia ($0,0813 \pm 0,0227$; Figura 10A). O mesmo perfil de aumento em 14 ($0,1966 \pm 0,0321$) e 21 dias ($0,2040 \pm 0,0249$) (Figuras 10D e 10F, respectivamente) foi observado quando comparado com o período inicial de 7 dias ($0,1294 \pm 0,0119$; Figura 10B) foi observado quando comparamos o depósito de glicoproteínas durante a evolução pós-cirúrgica dos animais tratados com citrato de sildenafil. Entretanto, o depósito significativo na produção e no depósito de glicoproteínas só ocorreu de maneira significativa em 7 dias (Figura 10G).

Figura 10: Efeito do tratamento com citrato de sildenafila sobre o depósito de matriz não fibrilar na epífise femoral após a lesão vascular traumática em diferentes fases da osteonecrose



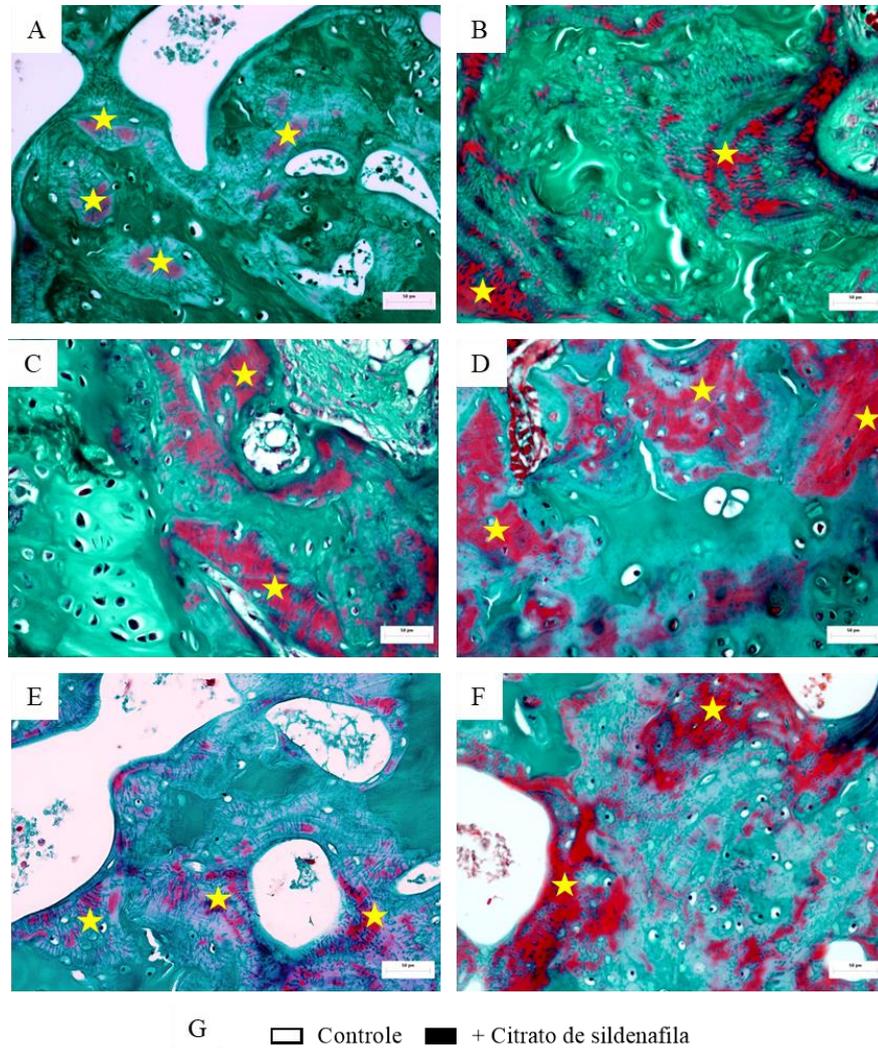
Legenda: Histoquímica do Ácido periódico de Schiff (PAS). (A) representa os ratos do grupo controle 7 dias após a cirurgia; (B) representa os ratos do grupo tratado com citrato de sildenafila 7 dias após a cirurgia; (C) representa os ratos do grupo controle 14 dias após a cirurgia; (D) representa os ratos do grupo tratado com citrato de sildenafila 14 dias após a cirurgia; (E) representa os ratos do grupo controle 21 dias após a cirurgia; (F) representa os ratos do grupo tratado com citrato de sildenafila 21 dias após a cirurgia. Estrelas representam depósito de glicoproteínas. Barra = 50 μ m. (G) Análise morfométrica da expressão de OPN. + $p < 0,05$ comparado com seus respectivos

controles; $\Delta p < 0,05$ comparado ao grupo controle com 7 dias; * $p < 0,05$ comparado com o grupo tratado com citrato de sildenafil por 7 dias.

4.5 Avaliação do Tratamento com Citrato de Sildenafil sobre a Osteogênese na Lesão Vascular Traumática em Diferentes Fases da Osteonecrose

A primeira etapa do reparo tecidual no osso é o processo de formação de tecido osteóide (osso neoformado e não calcificado) e para avaliarmos a formação de tecido osteóide no osso epifisário utilizamos a coloração com tricrômico de Goldner, onde o tecido mineralizado é corado em verde claro e o tecido osteóide por vermelho. Como podemos observar na figura 11, em 14 dias após a cirurgia observamos um aumento de tecido osteóide no grupo controle ($16,00 \pm 1,48$; Figura 11C) quando comparamos com o grupo controle em 7 dias ($10,21 \pm 1,58$; Figura 11A), entretanto, esse aumento não persistiu até 21 dias após a cirurgia ($14,22 \pm 2,95$; Figura 11E). O tratamento com citrato de sildenafil foi capaz de aumentar o tecido osteóide e mantê-lo até o 21º pós-cirurgia quando comparado com os animais analisados em 7 dias (7 dias: $13,87 \pm 0,63$, Figura 11B; 14 dias: $22,80 \pm 3,32$, Figura 11D e 21 dias: $21,45 \pm 4,06$, Figura 11F). Este aumento também foi significativo quando comparamos com os seus respectivos controles em 14 e 21 dias (Figura 11G). Esse resultado indica que o tratamento com citrato de sildenafil é capaz de acelerar o processo de formação óssea.

Figura 11: Efeito do tratamento com citrato de sildenafil sobre o processo de osteogênese na epífise femoral após a lesão vascular traumática em diferentes fases da osteonecrose



Legenda: Coloração por tricrômico de Glodner evidenciando a matriz óssea calcificada em verde claro, tecido cartilaginoso em verde escuro e tecido osteoide em vermelho. (A) representa os ratos do grupo controle 7 dias após a cirurgia; (B) representa os ratos do grupo tratado com citrato de sildenafil 7 dias após a cirurgia; (C) representa os ratos do grupo controle 14 dias após a cirurgia; (D) representa os ratos do grupo tratado com citrato de sildenafil 14 dias após a cirurgia; (E) representa os ratos do grupo controle 21 dias após a cirurgia; (F) representa os ratos do grupo tratado com citrato de sildenafil 21 dias após a cirurgia. Estrelas representam matriz óssea neoformada. Barra = 50 μ m. (G) Análise morfométrica da área de tecido osteoide + $p < 0,05$ comparado com seus respectivos controles; $\Delta p < 0,05$ comparado ao grupo controle com 7 dias; * $p < 0,05$ comparado com o grupo tratado com citrato de sildenafil por 7 dias.

5. DISCUSSÃO

No desenvolvimento do tecido ósseo existem dois tipos de formação: a intramembranosa e a endocondral. A formação óssea começa quando as células mesenquimais formam condensações em regiões dos futuros ossos. Na formação óssea intramembranosa, como nos ossos chatos do crânio, essas condensações celulares se diferenciam em osteoblastos que formam a matriz extra-celular (osteóide) ricos em colágeno do tipo I. Na formação óssea endocondral, essas condensações celulares se diferenciam em condrócitos que formam modelos ou moldes de cartilagem dos futuros ossos. Os modelos de cartilagem se desenvolvem através da proliferação dos condroblastos e da produção de matriz extra-celular. Os condrócitos na região central desses modelos param de proliferar, hipertrofiam e sintetizam colágeno tipo X. Esses condrócitos hipertrofiados diretamente adjacentes às células pericondrais são substituídos pela migração dos osteoblastos que irão formar um colar ósseo ao redor da região central do osso em desenvolvimento. Eles expressam altos índices de VEGF que atuam como fatores quimiotáticos para invasão de osteoclastos, células vasculares endoteliais e progenitores hematopoiéticos na cartilagem hipertrófica. A matriz cartilaginosa produzida promove uma área de suporte para as células progenitoras osteoblásticas que invadem a cartilagem através dos brotos vasculares sanguíneos e produzem a matriz óssea trabecular mineralizada. O anel pericondral é uma estrutura considerada como parte da cartilagem epifisária. Na porção epifisária da placa de crescimento, ao longo do osso trabecular, uma camada de tecido ósseo formada acima da camada germinativa foi sugerida como responsável parcialmente pela ossificação desta área, formada pela migração de condrócitos a partir desta camada, agindo de maneira independente aos diversos insultos, traumáticos ou atraumáticos (DELGADO-MARTOS et al., 2013). Esta teoria poderia justificar a maior imunomarcagem do VEGF nesta região no presente estudo, o que colaboraria para a resposta favorável dos inibidores da PDE5 à regeneração do tecido ósseo após o mecanismo de trauma.

Ao contrário de vários órgãos, o tecido ósseo se cura em resposta à uma lesão ou tratamento cirúrgico. O reparo ósseo é um processo que utiliza um potencial regenerativo endógeno que levará à restauração original da estrutura sem o aumento do volume ósseo. Ainda que compartilhe certa similaridade com o reparo ósseo, a regeneração óssea é um processo complexo envolvendo elementos externos para promover a formação de tecido novo mineralizado e que leva à um aumento do volume ósseo. A adequada comunicação entre os vasos sanguíneos e as células ósseas garantem que as células mantenham a proximidade física

e também uma co-dependência funcional. Os osteoblastos estão localizados em proximidade às células endoteliais e a invasão vascular é um pré-requisito para a formação do osso endocondral e para a consolidação das fraturas, sendo assim, fatores produzidos pelas células endoteliais podem afetar a função dos osteoblastos ou a sua diferenciação e vice e versa, uma vez que os osteoblastos são aptos a produzir fatores parácrinos que influenciam a função das células endoteliais tendo o VEGF como principal fator angiogênico (DECKERS et al., 2000).

As PDEs são as únicas enzimas que hidrolizam o GMPc, controlando a sinalização da via do NO (ANDERSSON, 2018). Assim, os inibidores das PDEs aumentam a biodisponibilidade do GMPc, um importante mediador da angiogênese induzida pela isquemia tecidual, agindo como segundo mensageiro ocasionando relaxamento dos vasos e aumentando o fluxo sanguíneo ao tecido isquêmico (SONG et al., 2017). A habilidade de manter a via de sinalização intracelular do NO depende da atividade do GMPc, assim, inibidores da PDE5 podem ser efetivos na conversão de osteoclastos em osteoblastos, no aumento da maturação dos osteoblastos, no aumento da calcificação do osso e no aumento da angiogênese no tecido ósseo via preservação dos níveis elevados de GMPc (TOGRAL et al., 2015). Inibidores da PDE5 aumentam a densidade mineral óssea e a espessura da placa de crescimento epifisária assim como a angiogênese no osso medular em ratos com osteoporose secundárias ao uso de glucocorticóides, efeitos relacionados à atividade aumentada dos osteoblastos e à destruição óssea diminuída após o tratamento com os inibidores da PDE5 (HUYUT et col., 2018), o que explicaria a maior imunomarcagem do VEGF através da placa de crescimento epifisária no grupo tratado com citrato de sildenafil no presente estudo.

As PDE5 foram inicialmente observadas no tecido ósseo por Yaman et al. (2011) que caracterizaram seu efeito angiogênico levando à cicatrização em defeitos ósseos em modelo experimental em ratos, relacionando esse efeito diretamente ao aumento do fluxo sanguíneo secundário à vasodilatação induzida pelo citrato de sildenafil. Esse fenômeno foi atribuído à intervenção na via do NO (YAMAN et al., 2011). Histing *et al.* (2011), considerando que a vascularização e consequente boa perfusão tecidual é pré-requisito para a consolidação óssea, uma vez que sua redução é um dos principais parâmetros para o retardo da consolidação óssea e para pseudoartrose atrófica, utilizaram o citrato de sildenafil devido ao seu efeito pró-angiogênico e sua ação regulatória através do VEGF durante as duas primeiras semanas da consolidação óssea, fase caracterizada pela alta atividade celular, um modelo experimental de fratura fechada do fêmur em murinos. O princípio do tratamento foi acelerar a consolidação e formação de tecido ósseo, aumentando assim a rigidez biomecânica do calo ósseo. Esses efeitos

não são derivados exclusivamente da ação vascular endotelial, mas também da ação direta sobre o tecido ósseo (HISTING et al., 2011). O modelo utilizado no presente estudo foi o preconizado por Norman *et al.* (1998) que indicaram o crescimento do tecido de granulação nos espaços intertrabeculares durante o processo de restauração como parte do evento impulsionado pela migração indiferenciada de células mesenquimais dos canais ósseos, endosteo, periósteo e tecido hematopoiético do tecido ósseo ao redor dos vasos sanguíneos do espaço trabecular (NORMAN et al., 1998). Num ambiente de reparo favorável, essas células adquirem potencial para se diferenciarem em fibroblastos, osteoblastos, condroblastos e angioblastos (BUCKWALTER et al., 1996).

Vários fatores de crescimento que atuam no desenvolvimento ósseo e no reparo ósseo pós-natal também regulam a expressão do VEGF, particularmente nas células osteoblásticas. Esses fatores incluem membros da superfamília do fator de crescimento transformante Beta (TGF- β) como o TGF- β 1 e o TGF- β 2, a BMP 2, 4 e 7, fator de crescimento insulina-Like (IGF), vitamina D3 e fator de crescimento fibroblastos (FGF) 2. Fatores inflamatórios como a prostaglandina E1 e a E2, interleucina (IL)-1, IL-6 e IL-8, que estão aumentadas durante a fase inflamatória de reparo ósseo, também induzem a expressão de VEGF (ZELZER et al., 2005). Sob estresse mecânico, os osteoblastos liberam VEGF, que por sua vez estimula as respostas biológicas. Todos esses fatores regulatórios do VEGF têm atuação crítica no desenvolvimento e na homeostase óssea, sugerindo que a modulação dos níveis de VEGF nos osteoblastos podem promover a base para estratégias do controle do reparo e regeneração óssea (HU, 2016). O VEGF também induz a diferenciação em culturas de osteoblastos (DECKERS et al., 2000) e estimula a migração quimiotática e proliferação de osteoblastos humanos primários (MAYR-WOHLFART et al., 2002).

Nas células vasculares endoteliais o VEGF primariamente se liga a dois receptores tirosina quinase: receptor do VEGF (VEGFR) tipo 1 (VEGFR-1) e VEGFR do tipo 2 (VEGFR-2). O VEGFR-2 é o principal mediador mitogênico e angiogênico, responsável pelos efeitos de aumento da permeabilidade do VEGF. São receptores do VEGF: VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, neuropilina 1 e a neuropilina 2. Os osteoblastos expressam VEGFR-1 e VEGFR-2 em culturas de células e *in vivo* pela hibridização *in situ*. Estudos em culturas celulares *in vitro* sugerem que o VEGFR-2 atua tanto na diferenciação quanto na sobrevivência do osteoblasto. Durante a regeneração óssea induzida pela técnica de osteogênese por distração, análises imunohistológicas e por qRT-PCR demonstraram que o VEGFR-2 parece ser predominantemente expressado pelo endotélio vascular e células hematopoiéticas

(MATSUBARA et al., 2012). O VEGF pode diretamente aumentar a reabsorção óssea osteoclástica e a longevidade dos osteoclastos maduros via sinalização VEGFR-2 (NAKAGAWA et al., 2000). Estudos com o VEGF derivado do osteoblasto confirmam que o VEGF é um estimulador da osteoclastogênese. No entanto, em contraste com seu mecanismo de atuação na diferenciação osteoblástica intracelular, esse efeito sobre os osteoclastos é baseado em mecanismos parácrinos (LIU et al., 2012). Pode-se dizer então que o VEGF derivado do osteoblasto regula o balanço entre a osteoblastogênese e adipogênese no osso medular e estimula a diferenciação osteoclástica.

A inibição do VEGF pela administração de uma proteína VEGFR solúvel em camundongos de 24 dias de idade, inibiram a invasão de vasos sanguíneos na zona hipertrófica das placas de crescimento dos ossos longos e resultam no impedimento da formação trabecular óssea e da expansão dessa zona hipertrófica (GERBER et al., 1999). Além de ser importante para vascularização óssea, o VEGF também é um fator crítico para sobrevivência dos condrócitos. As regiões epifisárias de alguns ossos longos em camundongos que expressam apenas a isoforma VEGF188 apresentaram áreas contendo apoptose dos condrócitos (MAES et al., 2004). No presente estudo foi observado aumento da imunomarcagem do VEGF na placa de crescimento da cabeça do fêmur nos animais do grupo tratado com citrato de sildenafil quando comparado ao grupo controle de forma significativa ao 7º, 14º e 21º ($p < 0,001$), sinalizando para a influência do VEGF sobre controle da viabilidade dos condrócitos em condições anaeróbicas.

Os osteoblastos representam grande parte da fonte de VEGF no tecido ósseo. Os níveis de VEGF nas células osteoprecursoras, incluindo células progenitoras mesenquimais, diminuem com a idade ou com o anabolismo e essa redução pode estar associada com o aumento do risco de fraturas ou falhas na regeneração dos processos osteometabólicos, assim, intervenções que aumentem os níveis de VEGF, especificamente nos osteoblastos, têm um efeito positivo nos casos de cicatrização de defeitos ósseos e na osteoporose relacionada com o envelhecimento (HU, 2016).

O VEGF é o regulador chave da angiogênese fisiológica durante o desenvolvimento embrionário, do crescimento pós-natal e da homeostase. É responsável pelo aumento da proliferação, migração, manutenção e promoção da permeabilidade vascular (LIU, 2014). Inclui cinco membros de uma família comprovadamente específica e crítica na formação de vasos sanguíneos. Precocemente no desenvolvimento embrionário, a formação vascular ocorre por um processo referido como vasculogênese, através do qual as células endoteliais se

diferenciam e proliferam *in situ* em um tecido previamente avascular, que então coalescem para formar uma rede tubular primitiva. O remodelamento angiogênico é referido como o processo pelo qual essa rede inicialmente formada é modificada através do seu amadurecimento, para formar ramificações interconectadas características da vasculatura amadurecida. Durante esse processo, as paredes dos vasos se fortalecem e as células endoteliais se integralizam às células de suporte locais (por ex., células da musculatura lisa e pericitos) e à matriz ao redor. Um processo diferente é denominado brotamento angiogênico, que envolve a germinação de vasos previamente existentes em um tecido previamente avascular. Em alguns casos funciona como se vasos formados fossem desestabilizados para permitir um subsequente brotamento vascular. Esses vasos precisam de etapas de desenvolvimento. O VEGF mantém sua posição principal na formação vascular, e é requerido na iniciação da formação de vasos imaturos pela vasculogênese ou no brotamento angiogênico (YANCOPOULOS et al., 2000).

O VEGF é regulado por vários fatores, incluindo o crescimento e fatores de transcrição, hormônios e estímulos mecânicos. A hipóxia é considerada o maior fator regulador da sua expressão, especialmente em tecidos tumorais e ósseos. Em condições aeróbicas baixas, o fator hipóxia induzido-1 (HIF-1 alfa) está muito elevado sob tensão baixas de oxigênio em células tumorais e/ou em osteoblastos, e isso promove a transcrição de vários fatores angiogênicos, incluindo o VEGF. Sob condições aeróbicas normais, o HIF-1alfa é hidroxilado e é alvo da degradação proteassomal pelo supressor tumoral de Von Hippel-Lindaul (VHL). A deleção do HIF-1alfa em osteoblastos causa redução da expressão do VEGF, levando à interrupção tanto da angiogênese quanto da osteogênese, enquanto a deleção do VHL em osteoblastos aumenta a expressão tanto de HIF-1alfa quanto de VEGF, levando à promoção da formação óssea e da angiogênese (BENTOVIM et al. 2002).

Estudos prévios demonstraram o aumento dos níveis de VEGF após a administração de citrato de sildenafil relacionados ao aumento da perfusão como consequência da promoção da neovascularização (KONERU et al., 2008). Assim, a observação do aumento da imunomarcagem do VEGF no tecido ósseo sob condições de hipóxia é esperado, e esse aumento como resultado do tratamento com o citrato de sildenafil é consistente com achados prévios de que o mesmo estimula a neovascularização através da inibição da degradação do GMPc, com a perpetuação do estímulo celular via segundo mensageiro e transcrição do VEGF nos osteoblastos após a hipóxia tecidual. No presente estudo, o pico dos níveis de VEGF na epífise da cabeça do fêmur ocorreu ao 7º dia no grupo tratado ($p < 0,01$), com subsequente decréscimo, porém mantendo-se estatisticamente mais predominante também ao 14º e 21º dias

(respectivamente, $p < 0,05$ e $p < 0,01$). Este pico inicial precedeu o pico de expressão da OPN que ocorreu ao 14º dia, assim como a formação de tecido osteóide e de matriz (respectivamente 14º e 21º dias), o que confirma a importância da neoangiogênese induzida pelo inibidor da PDE5 no processo de regeneração óssea.

Esses achados sugerem que o VEGF poderia regular a formação óssea atuando sobre os osteoblastos, em associação à promoção da angiogênese e da formação óssea endocondral. Evidências indicam que o VEGF produzido por linhagens celulares osteoblásticas ajudam na manutenção da homeostase óssea pós-natal pela promoção da diferenciação osteoblástica e da inibição da diferenciação para os adipócitos. Camundongos com deficiência condicional de VEGF nas células progenitoras osteoblásticas exibem uma progressiva redução da massa óssea e um aumento da gordura da medular óssea, de início ao redor da terceira semana após o nascimento (LIU et al., 2012). Importante observar que essas alterações são similares às aquelas associadas com a osteoporose idade-dependente (osteoporose do tipo II). As células tronco mesenquimais humanas possuem um potencial de diferenciação multi-linhagem que possibilita a trans-diferenciação de adipócitos em condrócitos e vice e versa. Essa plasticidade possui implicações terapêuticas importantes. O entendimento desses fatores e conhecimento das vias de diferenciação poderiam ter relevância, por exemplo, no desenvolvimento de terapias para o controle de perda óssea na osteoporose, uma vez que a diminuição do volume ósseo na osteoporose é acompanhado por um aumento do tecido adiposo medular (VERMA et al., 2002)

Proteínas não-colágenas, principalmente representadas pela osteocalcina e OPN, formam a matriz extracelular óssea e exibem ações multifuncionais. Elas sinalizam funções ósseas fisiológicas e mecânicas e são produzidas tardiamente durante a formação óssea, durante o processo de mineralização. Elas também controlam a manutenção da massa óssea e a extensão e orientação da mineralização, estando envolvidas na organização da matriz extracelular e coordenação da interação matriz-célula e matriz-mineral. Assim regulam vários aspectos da estrutura óssea e sua morfologia, afetando as propriedades mecânicas do osso (BAILEY et al., 2017).

A OPN, uma glicoproteína fosforilada ácida, é altamente expressada em vários tecidos nos mamíferos, como no cérebro, pulmões, placenta, trato gastrointestinal, rins e tecidos angiogênicos incluindo endotélio. Também é expressada em vários tipos celulares como nas células ósseas, neurônios, células epiteliais, pericitos, fibroblastos, hepatócitos, células tubulares, células da musculatura lisa vascular e células do sistema imunológico (células T e B, natural killer, células T natural killer, células dendríticas, macrófagos e neutrófilos) (WEIN et

al., 2019). Evidências acumuladas sugerem que a osteopontina atua em múltiplas funções e em diferentes processos celulares incluindo angiogênese, mineralização, hematopoiese, inflamação, doenças autoimunes, obesidade, tumorigênese e metástases. Em adição ao processo de mineralização, a hematopoiese e a angiogênese estão diretamente relacionadas à fisiologia óssea regulada pela osteopontina, assim a formação de novos vasos a partir de vasos pré-existent torna-se um evento crítico para o desenvolvimento e cicatrização do tecido ósseo, e não apenas para o suprimento de nutrientes e oxigênio às células osteogênicas, atuando no recrutamento de células precursoras em sítios de osteogênese, como acontece nos tecidos isquêmicos (WEIN et al., 2019).

A OPN é, portanto, uma proteína pleiotrópica envolvida em processos de remodelamento fisiológico tecidual (angiogênese, formação e reabsorção óssea e cicatrização de feridas). Também está implicada no desenvolvimento de algumas condições patológicas como câncer, doenças autoimunes, infecções, asma, doenças cardiovasculares, renais e hepáticas. A OPN regula a imunidade celular, incluindo componentes inatos e adaptativos. Estimula a produção de anticorpos pelas células B, regula a migração dos macrófagos, a capacidade para fagocitose, produção de óxido nítrico e produção de interleucina 17 pelo linfócito T Helper; induz a maturação das células dendríticas, promove a ativação das células T e pode aumentar o processo inflamatório Th1-mediado. Regula ainda a supressão imune, adesão e quimiotaxia (KALETA, 2017).

No presente estudo, após o pico inicial da expressão do VEGF observou-se uma resposta secundária aumentada da proliferação tecidual óssea (formação de tecido osteóide e de matriz) no grupo tratado com citrato de sildenafil quando comparado ao grupo controle ao 7º e 14º dias ($p < 0,01$). Assim, altos níveis da expressão de OPN na epífise da cabeça femoral após insultos isquêmicos indicam não apenas uma resposta à regeneração do tecido ósseo através da regulação da formação de massa óssea, orientação da mineralização e organização da matriz celular, mas também a sinalização angiogênica através da regulação endotelial, especialmente nas fases iniciais isquêmicas onde existe uma resposta humoral e celular mais pronunciada. O aumento da formação de tecido osteóide também foi observado em associação com e diretamente relacionado ao aumento da expressão da OPN, evidenciado pela maior coloração com o tricrômico de Goldner no grupo tratado com sildenafil quando comparado ao grupo controle ao 7º ($p < 0,01$) e 14º dias ($p < 0,05$).

Também foi observado altos níveis da coloração pelo PAS no tecido conjuntivo do osso isquêmico no grupo tratado com o citrato de sildenafil, que confirma seu efeito no reparo

tecidual. A técnica do PAS é principalmente utilizada para evidenciar estruturas contendo altas proporções de carboidratos (glicogênio, glicoproteínas e proteoglicanas), tipicamente encontrados em tecidos conjuntivos. A observação do aumento da sua coloração através da histoquímica foi associada com a formação de tecido ósseo, confirmado pela coloração do tricrômico de Goldner, que marca sobretudo tecido osteóide.

O presente estudo demonstrou que certas substâncias de prescrição confiável e utilizadas em determinadas doenças específicas podem ser exploradas de forma transdisciplinar. O princípio de aumento da biodisponibilidade do GMPc através dos inibidores da PDE é de grande utilidade multidisciplinar, especialmente para substâncias comprovadamente seguras do ponto de vista clínico e já testadas e aprovadas pelas agências reguladoras nacionais e internacionais. Por exemplo, uma vez comprovado o aumento da marcação do VEGF na cabeça femoral, que poderia indicar um aumento da perfusão tecidual nessa região através da modulação da permeabilidade vascular endotelial, o citrato de sildenafil poderia ser utilizado como droga adjuvante, permitindo maior acesso de outras substâncias aos tecidos isquêmicos ou até tecidos tumorais (GREISH et al., 2018). Assim, o uso de inibidores da PDE como adjuvante no tratamento de doenças com base fisiopatológica de origem isquêmica, incluindo as musculoesqueléticas, parece ser uma estratégia razoável e reproduzível.

CONCLUSÕES

Ao avaliarmos o dano tecidual observamos morfológicamente uma menor presença de lacunas vazias e núcleos picnóticos na epífise da cabeça do fêmur no grupo tratado, o que acreditamos ter relação com o estímulo do citrato de sildenafila à neoangiogênese observada pela maior imunomarcção do VEGF na epífise e na placa epifisária, que implicaria em melhor perfusão em resposta à isquemia, assim como na resposta celular óssea à sua regeneração confirmada através da maior imunomarcção da osteopontina. Como consequência houve maior aposição de tecido ósseo neoformado pela coloração com tricrômico de Goldner (tecido osteoide) e maior síntese de componentes não fibrilares da matriz, como glicoproteínas (evidenciado pela técnica do PAS), sinalizando para uma melhor resposta regenerativa tecidual.

Assim, em conjunto nossos resultados confirmam a hipótese de que o citrato de sildenafila contribui com a regeneração do tecido ósseo em ambientes isquêmicos e mau perfundidos secundários ao trauma da cabeça do fêmur, sugerindo este medicamento como um adjuvante na regeneração óssea.

REFERÊNCIAS

- AKAIKE, M.; MATSUMOTO, T. Glucocorticoid-induced reduction in NO bioavailability and vascular endothelial dysfunction. **Clinical Calcium**, v. 17, n. 6, p. 864–870, 2007.
- ANDERSSON, K. E. PDE5 inhibitors – pharmacology and clinical applications 20 years after sildenafil discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, p. 2554–2565, 2018.
- ARMOUR, K. E.; RALSTON, S. H. Estrogen Upregulates Endothelial Constitutive Nitric Oxide Synthase Expression in Human Osteoblast-like Cells. **Endocrinology**, v. 139, n. 2, p. 799–802, 1998.
- ARUWAJOYE, O. O.; PATEL, M. K.; ALLEN, M. R. Microcrack density and nanomechanical properties in the subchondral region of the immature piglet femoral head following ischemic osteonecrosis. **Bone**, v. 52, p. 632, 2013.
- ATSUMI, T.; KUROKI, Y. Role of impairment of blood supply of the femoral head in the pathogenesis of idiopathic osteonecrosis. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 277, p. 22–30, 1992.
- AXHAUSEN, G. Über anamische Infarkte am Knochensystem und ihre Bedeutung für die Lehre von den primären Epiphyseonkrosen. **Archiv für klinische chirurgie**, v. 151, p. 72–98, 1928.
- AYDIN, B. K.; SOFU, H.; KONYA, M. N.; ER, T.; SAHIN, V. Clinical and radiographic outcomes after femoral varus derotation osteotomy for Legg-Calvé-Perthes disease at 25 years follow-up: what are the determinants of outcome in the long term? **Hip International**, v. 26, p. 301–306, 2016.
- BAILEY, S.; KARSENTY, G.; GUNDBERG, C.; *et al.* Osteocalcin and osteopontin influence bone morphology and mechanical properties: Functional adaptation in *Oc^{-/-} Opn^{-/-}* mice. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1409, n. 1, p. 79–84, 2017.
- BAZHIN, A. V.; TAMBOR, V.; DIKOV, B.; PHILIPPOV, P. P.; SCHADENDORF, D.; EICHMULLER, S. B. cGMP phosphodiesterase 6, transducin and Wnt5a/Frizzled-2-signaling control cGMP and Ca(2+) homeostasis in melanoma cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 817–828, 2010.
- BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **American Journal of Physiology**, v. 271, n. C, p. 1424–1437, 1996.
- BENTOVIM, L.; AMARILIO, R.; ZELZER, E. HIF1 is a central regulator of collagen hydroxylation and secretion under hypoxia during bone development. **Development**, v. 139, p. 4473–4483, 2012.
- BOOLELL, M.; ALLEN, M. J.; BALLARD, S. A.; *et al.* Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. **International journal of impotence research**, v. 8, p. 47–52, 1996.

BOSWELL-SMITH, V.; SPINA, D.; PAGE, C. P. Phosphodiesterase inhibitors. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. S252–S257, 2006.

BRANDI, M. L.; HUKKANEN, M.; UMEDA, T.; et al. Bidirectional regulation of osteoclast function by nitric oxide synthase isoforms. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 92, p. 2954–2958, 1995.

BREDDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 86, p. 9030–9033, 1989.

BRENNAN, M. P.; SINUSAS, A. J.; HORVATH, T. L.; COLLINS, J. G.; HARDING, M. J. Correlation between body weight changes and postoperative pain in rats treated with meloxicam or buprenorphine. **Lab Animal**, v. 38, n. 3, p. 87–93, 2009.

BUCKWALTER, J. A.; GLIMCHER, M. J.; COOPER, R. R.; RECKER, R. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. **Instructional Course Lecture**, v. 45, p. 371–386, 1996.

CHANDLER, F. A. Coronary disease of the hip. **Journal of International College of Surgeons**, v. 11, p. 34–36, 1948.

CHEN, S.; LI, J.; PENG, H.; ZHOU, J.; FANG, H. Administration of erythropoietin exerts protective effects against glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head in rats. **International journal of molecular medicine**, v. 33, n. 4, p. 840–848, 2014.

CONZEMIUS, M. G.; BROWN, T. B.; ZHANG, Y.; ROBINSON, R. A. A new animal model of femoral head osteonecrosis: one that progresses to human-like mechanical failure. **Journal of Orthopedic Research**, v. 20, p. 303–309, 2002.

DAMOULIS, P. D.; HAUSCHKA, P. V. Nitric oxide acts in conjunction with proinflammatory cytokines to promote cell death in osteoblasts. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 12, p. 412–422, 1997.

DAMY, S. B.; CAMARGO, R. S.; CHAMMAS, R.; FIGUEIREDO, L. F. P. Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicações em cirurgia experimental. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 1, p. 103–111, 2010.

DECKERS, M.; KARPERIEN, M. Expression of Vascular Endothelial Growth Factors and Their Receptors during Osteoblast Differentiation. **Endocrinology**, v. 141, n. 5, p. 8, 2000.

DELGADO-MARTOS, M. J.; FERNÁNDEZ, A. B.; CANILLAS, F.; et al. Does the epiphyseal cartilage of the long bones have one or two ossification fronts? **Medical Hypotheses**, v. 81, p. 695–700, 2013.

DIWAN, A. D.; WANG, M. X.; JANG, D.; ZHU, W.; MURRELL, G. A. Nitric oxide modulates fracture healing. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 15, n. 2, p. 342–351, 2000.

DRESCHER, W.; BECKMANN, R.; KASCH, R.; et al. Nitrate patch prevents steroid-related bone necrosis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 29, n. 10, p. 1517–1520, 2011.

FINI, M.; TORRICELLI, P.; GIAVARESI, G.; et al. Effect of L-lysine and L-arginine on primary osteoblast cultures from normal and osteopenic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomédecine & Pharmacothérapie**, v. 55, n. 4, p. 213–220, 2001.

FOX, S. W.; CHAMBERS, T. J.; CHOW, J. W. M. Nitric oxide is an early mediator of the increase in bone formation by mechanical stimulation. **American journal of physiology**, v. 270, p. E955–E960, 1996.

FRANCIS, S. H.; CONTI, M.; HOUSLAY, M. D. (Orgs.), **Phosphodiesterases as Drug Targets**, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011.

FURCHQOTT, R. T.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373–376, 1980.

GAGALA, J.; BURACZYNSKA, M.; MAZURKIEWICZ, T.; KSIAZEK, A. Endothelial nitric oxide synthase gene intron 4 polymorphism in non-traumatic osteonecrosis of the femoral head. **International Orthopaedics**, v. 37, n. 7, p. 1381–1385, 2013.

GERBER, H.; HILLAN, K. J.; RYAN, A. M.; et al. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. **Development**, v. 126, p. 1149–1159, 1999.

GEWALTIG, M. T.; KOJDA, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. **Cardiovascular Research**, v. 55, p. 250–260, 2002.

GHOSH, R.; SAWANT, O.; GANPATHY, P.; PITRE, S.; KADAM, V. Phosphodiesterase inhibitors: their role and implications. **International Journal of PharmTech Research**, v. 1, n. 4, p. 1148–1160, 2009.

GLIMCHER, M. J.; KENZORA, J. E. The biology of osteonecrosis of the human femoral head and its clinical implications: II. The pathological changes in the femoral head as an organ and in the hip joint. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 140, p. 273–312, 1979.

GLUECK, C. J.; FREIBERG, R. A.; OQHENE, J.; FONTAINE, R. N.; WANG, P. Association between the T-786C eNOS polymorphism and idiopathic osteonecrosis of the head of the femur. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 89, n. 11, p. 2460–2468, 2007.

GLUECK, C. J.; MCMAHON, R. E.; BOUQUOT, J. E.; KHAN, N. A.; WANG, P. T-786C polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene and neuralgia-inducing cavitation osteonecrosis of the jaws. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 109, n. 4, p. 548–553, 2010.

GRABOWSKI, P. S.; MACPHERSON, H.; RALSTON, S. H. Nitric oxide production in cells derived from the human joint. **Brazilian Journal of Rheumatology**, v. 35, p. 207–212, 1996.

GRANT, M. K. .; EL-FAKAHANY, E. E. Therapeutic interventions targeting the nitric oxide system: Current and potential uses in obstetrics, bone disease and erectile dysfunction. **Life Sciences**, v. 74, n. 14, p. 1701–1721, 2004.

GREISH, K.; FATEEL, M.; ABDELGHANY, S.; et al. Sildenafil citrate improves the delivery and anticancer activity of doxorubicin formulations in a mouse model of breast cancer. **Journal of Drug Targeting**, v. 26, n. 7, p. 610–615, 2018.

GUERADO, E. Studies on the pathogenesis of Legg-Calvé-Perthes 'Syndrome. An experimental Model. **Doctoral thesis**. Madrid, University Autonoma, 1988.

HELFRICH, M. H.; EVANS, D. E.; GRABOWSKI, P. S.; et al. Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone and bone cell cultures. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 12, p. 1108–1115, 1997.

HISTING, T.; MARCINIAK, K.; SCHEUER, C.; et al. Sildenafil accelerates fracture healing in mice. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 29, n. 6, p. 867–873, 2011.

HOFSTAETTER, J. G.; ROSCHGER, P.; KLAUSHOFER, K. Increased matrix mineralization in the immature femoral head following ischemic osteonecrosis. **Bone**, v. 46, p. 379–385, 2010.

HOWELL, D. W.; DURAN, C. L.; TSAI, S. P.; BONDOS, S. E.; BAYLESS, K. J. Functionalization of ultrathin thorax materials with vascular endothelial growth factor enhances angiogenic activity. **Biomacromolecules**, v. 17, p. 3558–3569, 2016.

HU, Kai; OLSEN, Bjorn R. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. **Bone**, v. 91, p. 30–38, 2016.

HUKKANEN, M.; HUGHES, F. J.; BUTTERY, L. D.; et al. Cytokine-stimulated expression of inducible nitric oxide synthase by mouse, rat and human osteoblast-like cells and its functional role in osteoblast metabolic activity. **Endocrinology**, v. 136, p. 5445–5453, 1995.

HUYUT, Z.; BAKAN, N.; YILDIRIM, S.; ALP, H. H. Effects of the phosphodiesterase-5 (PDE-5) inhibitors, avanafil and zaprinast, on bone remodeling and oxidative damage in a rat model of glucocorticoid-induced osteoporosis. **Medical Science and Monitor Basic Research**, v. 24, p. 47–58, 2018.

IGNARRO, L. J. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 1990, n. 30, p. 535–560, 1990.

JAMES, S. L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 533–547, 1995.

JIANG, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, H.; et al. Pravastatin prevents steroid-induced osteonecrosis in rats by suppressing PPAR γ expression and activating Wnt signaling pathway. **Experimental Biology and Medicine**, v. 239, n. 3, p. 347–355, 2014.

JILKA, R. L.; WEINSTEIN, R. S.; BELLIDO, T.; PARFITT, A. M.; MANOLAGAS, S. C. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): Modulation by growth factors and cytokines. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 13, p. 793–802, 1998.

KALETA, B. Sildenafil, a Phosphodiesterase Type 5 Inhibitor, Downregulates Osteopontin in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 65, p. 347–353, 2017.

KASTEN, T. P.; COLLIN-OSDOBY, P.; PATEL, N.; et al. Potentiation of osteoclast bone-resorption activity by inhibition of nitric oxide synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 9, p. 3569–3573, 1994.

KATSUKI, S. A. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. **Journal of Cyclic Nucleotide Research**, v. 3, p. 23–25, 1977.

KERACHIAN, M. A.; SEGUIN, C.; HARVEY, E. J. Glucocorticoids in osteonecrosis of the femoral head: a new understanding of the mechanisms of action. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 114, p. 121–128, 2009.

KERR, N. M.; DANESH-MEYER, H. V. Phosphodiesterase inhibitors and the eye. **Ophthalmology**, v. 37, p. 514–523, 2009.

KIM, H. K. Pathophysiology and new strategies for the treatment of Legg-Calvé-Perthes disease. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 94, p. 659–669, 2012.

KIM, H. K.; SU, P. H.; QIU, Y. S. Histopathologic changes in growth-plate cartilage following ischemic necrosis of the capital femoral epiphysis: an experimental investigation in immature pigs. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 83, p. 688–697 2001.

KIM, H. S.; BAE, S. C.; KIM, T. H.; KIM, S. Y. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the risk of osteonecrosis of the femoral head in systemic lupus erythematosus. **International Orthopaedics**, v. 37, n. 11, p. 2289–2296, 2013.

KIM, T. H.; HONG, J. M.; LEE, J. Y. Promoter polymorphisms of the vascular endothelial growth factor gene is associated with an osteonecrosis of the femoral head in the Korean population. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 16, p. 287–291, 2008.

KLEINMAN, R. G.; BLECK, E. E. Increased blood viscosity in patients with Legg-Perthes' disease: a preliminary report. **Journal of Pediatric Orthopaedics**, v. 1, p. 131–136, 1981.

KLEIN-NULEND, J.; HELFRICH, M. H.; STERCK, J. G. H.; et al. Nitric oxide response to shear stress by human bone cell cultures is endothelial nitric oxide synthase dependent. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 250, n. 1, p. 108–114, 1998.

KONERU, S.; PENUMATHSA, V.; THIRUNAVUKKARASU, R.; et al. Sildenafil-mediated neovascularization and protection against myocardial ischaemia reperfusion injury in rats: Role of VEGF/angiopoietin-1. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, p. 2651–2664, 2008.

KÖMÜRÇÜ, E.; OKTAY, M.; KAYMAZ, B.; et al. Preventive effects of coenzyme Q10 (CoQ10) on steroid-induced osteonecrosis in rats. **Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica**, v. 48, n. 2, p. 217–222, 2014.

KOOB, T. J.; PRINGLE, D.; GEDBAW, E. Biomechanical properties of bone and cartilage in growing femoral head following ischemic osteonecrosis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 25, p. 750, 2007.

KOO, K. H.; LEE, J. S.; LEE, Y. J.; et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in patients with nontraumatic femoral head osteonecrosis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 24, n. 8, p. 1722–1728, 2006.

LENHINGER, A. L. Princípios de bioquímica. São Paulo: Sarvier, 1986.

LEROUX, J.; ABU AMARA, S.; LECHEVALLIER, J. Legg-Calvé-Perthes disease. **Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research**, v. 104, p. S107–S112, 2018.

LI, G. Y.; FENG, Y.; CHENG, T. S.; YIN, J. M.; ZHANG, C. Q. Edaravone, a novel free radical scavenger, prevents steroid-induced osteonecrosis in rabbits. **Rheumatology**, v. 52, n. 3, p. 438–447, 2013.

LI, J. P.; CHEN, S.; PENG, H.; ZHOU, J. L.; FANG, H. S. Pulsed electromagnetic fields protect the balance between adipogenesis and osteogenesis on steroid-induced osteonecrosis of femoral head at the pre-collapse stage in rats. **Bioelectromagnetics**, v. 35, n. 3, p. 170–180, 2014.

LIU, Yanqiu; OLSEN, Bjorn R. Distinct VEGF Functions During Bone Development and Homeostasis. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 62, n. 5, p. 363–368, 2014.

LOWIK, C. W. G. M.; NIBBERINQ, P. H.; VAN DE RUIT, M.; PAPAPOULOS, S. E. Inducible production of nitric oxide in osteoblast-like cells and in fetal mouse bone explants is associated with suppression of osteoclastic bone resorption. **Journal of Clinical Investigation**, v. 93, p. 1465–1472, 1994.

LUKOWSKI, R.; RYBALKIN, S. D.; LOGA, F.; LEISS, V.; BEAVO, J. A.; HOFMANN, F. Cardiac hypertrophy is not amplified by deletion of cGMP-dependent protein kinase I in cardiomyocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, p. 5646–5651, 2010.

MAES, C.; STOCKMANS, I.; MOERMANS, K.; et al. VEGF isoforms are essential for establishing epiphyseal vascularization and regulating chondrocyte development and survival. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 2, p. 188–199, 2004.

MACPHERSON, H.; NOBLE, B. S.; RALSTON, S. H. Expression and functional role of nitric oxide synthase isoform in human osteoblast-like cells. **Bone**, v. 24, p. 179–185, 1999.

MACINTYRE, I.; ZAIDI, M.; ALAM, A. S.; et al. Osteoclastic inhibition: an action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 7, p. 2936–2940, 1991.

MANCINI, L.; MORADI-BIDHENDI, N.; BECHERINI, L.; MARTINETI, V.; MACINTYRE, I. The Biphasic Effects of Nitric Oxide in Primary Rat Osteoblasts Are cGMP Dependent. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 274, n. 2, p. 477–481, 2000.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, v. 78, p. 927–930, 1994.

MATHEW, S. E.; LARSON, A. N. Natural History of Slipped Capital Femoral Epiphysis. **Journal of Pediatric Orthopaedics**, v. 39, p. S23–S27, 2019.

MATSUBARA, H.; HOGAN, D. E.; MORGAN, E. F.; et al. Vascular tissues are a primary source of BMP2 expression during bone formation induced by distraction osteogenesis. **Bone**, v. 51, n. 1, p. 168–180, 2012.

MAYR-WOHLFART, U.; WALTENBERGER, J.; HAUSSER, H.; et al. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. **Bone**, v. 30, n. 3, p. 472–477, 2002.

MCCARTHY, E. F. Aseptic necrosis of bone. An historic perspective. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 168, p. 216–221, 1982.

MEESTERS, D. M.; NEUBERT, S.; WIJNANDS, K. A. P.; et al. Deficiency of inducible and endothelial nitric oxide synthase results in diminished bone formation and delayed union and nonunion development. **Bone**, v. 83, p. 111–118, 2016.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, p. 109–142, 1991.

MORRIS, S. M.; BILLIAR, T. R. New insights into regulation of inducible nitric oxide synthesis. **American Journal of Physiology**, v. 266, p. E829–839, 1994.

MUIRHEAD-ALLWOOD, W.; CATTERALL, A. The treatment of Perthes' disease. The results of a trial of management. **Journal of Bone and Joint Surgery Br**, v. 64, p. 282–285, 1982.

NAKAGAWA, M.; KANEDA, T.; ARAKAWA, T.; et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. **FEBS Letters**, v. 473, n. 2, p. 161–164, 2000.

NISHIO, A.; YAKUSHIJI, K. Legg-Calvé-Perthes disease histology and treatment. **Yonago Acta Medica**, v. 6, p. 1–4, 1962.

NIXON, J. E. Avascular necrosis of bone: a review. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 76, p. 681–692, 1983.

NORMAN, D.; REIS, D.; ZINMAN, C.; MISSELEVICH, I.; BOSS, J. H. Vascular Deprivation-Induced Necrosis of the Femoral Head of the Rat. An Experimental Model of Avascular Osteonecrosis in the Skeletally Immature Individual or Legg-Perthes Disease. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 79, p. 173–181, 1998.

OLIVEIRA, L. P.; PENTEADO, L. O. S.; CARVALHO, J. J.; MESQUITA, K. C. Efeitos da sinvastatina na hipertrofia lipídica da medula óssea induzida pelo uso de corticóides em ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 42, n. 11/12, p. 373–381, 2007.

- PALMER, R. M. J.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, p. 664–666, 1988.
- PEAD, M. J.; LANYON, L. E. Indomethacin modulation of load-related stimulation of new bone formation in vivo. **Calcified Tissue International**, v. 45, p. 34–40, 1989.
- PIETROGRANDE, V.; MASTROMARINO, R. Osteopatia de prolungato trattamento cortisoneo. **Ortop Traumatol**, v. 25, p. 793, 1957.
- PESKIN, B.; SHUPAK, A.; LEVIN, D.; *et al.* Chondrolysis in rats with vascular deprivation-induced osteonecrosis of the femoral neck. **European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology**, v. 11, n. 1, p. 15–20, 2001.
- PHEMISTER, D. B. Repair of bone in the presence of aseptic necrosis resulting from fracture transplantation and vascular disorders. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 12, p. 769–87, 1930.
- PONSETI, I. V.; MAYNARD, J. A.; WEINSTEIN, S. L.; IPPOLITI, E. G.; POUS, J. G. Legg-Calvé-Perthes disease. Histochemical and ultrastructural observations of the epiphyseal cartilage and physis. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 65, p. 797–807, 1983.
- PRINGLE, D.; KOOB, T. J.; KIM, H. K. Indentation properties of growing femoral head following ischemic necrosis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 22, p. 122–130, 2004.
- RALSTON, S. H.; GRABOWSKI, P. S. Mechanisms of Cytokine Induced Bone Resorption: Role of Nitric Oxide, Cyclic Guanosine Monophosphate, and Prostaglandins. **Bone**, v. 19, n. 1, p. 29–33, 1996.
- RALSTON, S. H.; HO, L. P.; HELFRICH, M. H.; *et al.* Nitric oxide: a cytokine-induced regulator of bone resorption. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 10, n. 7, p. 1040–1049, 1995.
- RALSTON, S. H.; TODD, D.; HELFRICH, M. H.; BENJAMIN, N.; GRABOWSKI, P. S. Human osteoblast-like cells produce nitric oxide and express inducible nitric oxide synthase. **Endocrinology**, v. 135, n. 1, p. 330–336, 1994.
- RAPOPORT, R. M.; MURAD, F. Agonist induced endothelium dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cyclic GMP. **Circulation Research**, v. 52, p. 352–357, 1983.
- REFFELMANN, T.; KLONER, R. A. Phosphodiesterase 5 inhibitors: are they cardioprotective? **Cardiovascular Research**, v. 83, p. 204–212, 2009.
- RIANCHO, J. A.; ZARRABEITIA, M. T.; FERNANDEZ-LUNA, J. L.; GONZALEZ-MACIAS, J. Mechanisms Controlling Nitric Oxide Synthesis in Osteoblasts. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 107, p. 87–92, 1995.
- SALLUM, F.; YIN, C. Sildenafil induces delayed preconditioning through inducible nitric oxide synthase-dependent pathway in mouse heart. **Circulation Research**, v. 92, p. 595–597, 2003.

SCHOENECKER, P. L.; STONE, J. W.; CAPELLI, A. M. Legg-Perthes disease in children under 6 years old. **Orthopedic Reviews**, v. 22, p. 201–208, 1993.

SEEMAN, E. Bone quality: the material and structural basis of bone strength and fragility. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 26, p. 1–8, 2008.

SNYDER, S. H.; BREDT, D. S. Biological roles of nitric oxide. **Scientific American**, v. 5, p. 28–35, 1992.

SONG, Q.; NI, J.; JIANG, H.; SHI, Z. Sildenafil improves blood perfusion in steroid-induced avascular necrosis of femoral head in rabbits via a protein kinase G-dependent mechanism. **Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica**, v. 51, p. 398–403, 2017.

TIAN, L.; DANG, X. Q.; WANG, C. S.; et al. Effects of sodium ferulate on preventing steroid-induced femoral head osteonecrosis in rabbits. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 14, n. 5, p. 426–437, 2013.

TOGRAL, G.; ARIKAN, S. M.; KORKUSUZ, P.; et al. Positive effect of tadalafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, on fracture healing in rat femur. **Eklemler Hast Cerrahisi**, v. 26, p. 137–144, 2015.

TORRICELLI, P.; FINI, M.; GIAVARESI, G.; et al. L-arginine and L-lysine stimulation on cultured human osteoblasts. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomédecine & Pharmacothérapie**, v. 56, n. 10, p. 492–497, 2002.

VAN DER JAGT, D.; MOKETE, L.; PIETRZAK, J.; ZALAVRAS, C. G. Osteonecrosis of the femoral head: Evaluation and treatment. **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 23, p. 69–70, 2015.

VANDERMEER, J. S.; KAMIYA, N.; AYA-AY, J.; et al. Local administration of ibandronate and bone morphogenetic protein-2 after ischemic osteonecrosis of the immature femoral head: a combined therapy that stimulates bone formation and decreases femoral head deformity. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 93, n. 10, p. 905–913, 2011.

VAN'T HOF, R. J.; RALSTON, S. H. Cytokine-induced nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclast progenitors and suppressing osteoclast activity. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 12, p. 1797–1804, 1997.

VERMA, S.; RAJARATNAM, J. H.; DENTON, J.; et al. Adipocytic proportion of bone marrow is inversely related to bone formation in osteoporosis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 55, n. 9, p. 693–698, 2002.

WANG, C.-J.; YANG, Y.-J.; HUANG, C.-C. The effects of shockwave on systemic concentrations of nitric oxide level, angiogenesis and osteogenesis factors in hip necrosis. **Rheumatology International**, v. 31, n. 7, p. 871–877, 2011.

WEIN, M.; HUELTER-HASSLER, D.; NELSON, K.; et al. Differential osteopontin expression in human osteoblasts derived from iliac crest and alveolar bone and its role in early stages of angiogenesis. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 37, p. 105–117, 2019.

WENNMALM, A. Endothelial nitric oxide and cardiovascular disease. **Journal of Internal Medicine**, v. 235, p. 317–327, 1994.

WIMALAWANSA, S. J.; DE MARCO, G.; GANGULA, P.; YALLAMPALLI, C. Nitric Oxide Donor Alleviates Ovariectomy-Induced Bone Loss. **Bone**, v. 18, n. 4, p. 301–304, 1996.

WOESSNER JR, J. F. The family of matrix metalloproteinases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 732, p. 11–21, 1994.

WONG, G. K. T.; MARSDEN, P. A. Nitric oxide synthases: regulation in disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 11, p. 215–220, 1996.

YANCOPOULOS, G. D.; DAVIS, S.; GALE, N. W.; RUDGE, J. S.; WIEGAND, S. J.; HOLASH, J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. **Nature**, v. 407, n. 14, p. 242–248, 2000.

YAMAN, F.; ATILGAN, S.; GÜNES, N.; et al. Phosphodiesterase-5 inhibitors may facilitate bone defect recovery. **European Review for Medical and Pharmacological sciences**, v. 15, n. 11, p. 1301–1305, 2011.

YIN, T. C.; WANG, C. J.; YANG, K. D.; WANG, F. S.; SUN, Y. C. Shockwaves enhance the osteogenic gene expression in marrow stromal cells from hips with osteonecrosis. **Chang Gung Medical Journal**, v. 34, n. 4, p. 367–374, 2011.

ZELZER, E.; OLSEN, B. R. Multiple Roles of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Skeletal Development, Growth, and Repair. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 65, p. 169–187, 2004

ZHANG X, Feng Q, Cote RH. Efficacy and selectivity of phosphodiesterase-targeted drugs in inhibiting photoreceptor phosphodiesterase (PDE6) in retinal photoreceptors. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 46, p. 3060–3066, 2005.

ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/028/2015 sobre "Efeito do citrato de sildenafi na prevenção da osteonecrose isquêmica da cabeça do fêmur em ratos" sob a responsabilidade de Jorge José de Carvalho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA), em 28/07/2015. Este certificado expira em 28/07/2019.

Rio de Janeiro, 28 de Julho de 2015.

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ