Enxerto osteocondral autógeno associado ao IGF-1 em lesão induzida na cartilagem articular de coelhos

Autogenous Osteochondral Graft Associated with IGF-1 in Induced Articular Cartilage Lesion in Rabbits

Fernando Yoití Kitamura Kawamoto¹, Leonardo Augusto Lopes Muzzi¹,
Antônio Carlos Cunha Lacrete Junior¹, Djeison Lutier Raymundo¹, Endrigo Gabellini Leonel Alves²,
Willer Guimarães e Silva¹ & Ruthnéa Aparecida Lázaro Muzzi¹

ABSTRACT

Background: Articular cartilage has a limited capacity for regeneration and of the various treatments proposed, none have reached appropriate therapeutic effectiveness. This study aimed to evaluate autogenous osteochondral grafts in intact or macerated format, in association with or without insulin-like growth factor type-1 (IGF-1) in the repair of osteochondral defects induced in the femoral trochlear groove of rabbits.

Materials, Methods & Results: Seventeen healthy White New Zealand rabbits were selected for this study. The rabbits were female, six months old, and had an average body weight of 4.5 kg. All 34 stifle joints were subjected to autogenous osteochondral grafting in the femoral trochlear groove. The joints were divided into four groups designated as intact osteochondral graft with IGF-1 (INT + IGF), intact osteochondral graft with physiological solution (INT + FIS), macerated osteochondral graft with IGF-1 (MAC + IGF), and macerated osteochondral graft with physiological solution (MAC + FIS). Serial evaluations were performed by orthopedic and radiographic examination. After 6 and 12 weeks postoperatively, the grafted area was subjected to macroscopic, histological, and immunohistochemical analyses. Although no statistically significant differences were found between the groups in relation to clinical, macroscopic, histological, and immunohistochemical aspects, a tendency of IGF-1 to promote tissue repair was evident. In the radiographic evaluation, the articular surface and the recipient site in both groups with IGF-1 showed significantly more effective filling ($P \leq 0.05$). Regardless of the group, collagen type 2 production, as assessed by immunohistochemistry, was found to be appropriate on the grafted articular surface.

Discussion: In extensive cartilage lesions, the use of intact osteochondral grafts may be infeasible due to donor site morbidity. An alternative is the use of macerated osteochondral grafts, which cover a larger area and act as a support and cellular source in the repair process. Growth factors have been evaluated in association with grafted tissues to aid tissue repair, and IGF-1 is currently prominent. In the radiographic analysis of the present study, when comparing sites subjected to osteochondral grafting, presence of the whole graft evidenced adequate local filling in all groups. However, graft integration was apparently rapid and effective in the INT + IGF and MAC + IGF groups from the sixth and ninth weeks of the procedure, respectively. In the macroscopic evaluation at the twelfth week, graft integration with the original cartilaginous tissue was more evident, especially in both groups treated with IGF-1. It is likely that the property of IGF-1 to increase chondrogenesis in the cartilage repair of articular lesions in vivo may have contributed to these results in radiographic and macroscopic examinations. Histological examination showed no significant difference between groups in the same period of time; however, it was observed that addition of IGF-1 promoted a more evident tissue reaction and cellular activation, potentiating the process of reabsorption and repair in the grafted tissue. Immunohistochemical analysis showed similar immunoreactivity for collagen type 2 in all groups as early as the sixth week. However, a small portion of these tissues cannot be considered true hyaline cartilage due to the absence of some typical features. In summary, addition of IGF-1 to the autogenous osteochondral graft seemed to stimulate reabsorption and replacement processes in the grafted tissue. The grafts showed adequate ability to repair articular cartilage, displaying formation of collagen type 2 similar to that in the original tissue.

Keywords: insulin-like growth factor I, osteoarthritis, cartilage, collagen type 2.

Descritores: fator de crescimento semelhante à insulina I, osteoartrite, cartilagem, colágeno tipo 2.

<http://dx.doi.org/10.22456/1679-9216.85843>

Received: 17 March 2018

Accepted: 27 July 2018

Published: 20 September 2018

¹Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brazil. ²Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de Uberaba (UNIUBE), Uberaba, MG. CORRESPONDENCE: L.A.L. Muzzi [lalmuzzi@dmv.ufla.br - Tel.: +55 (35) 38291719]. Universidade Federal de Lavras - UFLA. C.P. 3037. CEP 37200-000 Lavras, MG, Brazil.

INTRODUÇÃO

O reparo de lesões da cartilagem articular é atualmente um dos maiores desafios para os cirurgões ortopédicos [2]. A cartilagem lesionada possui a característica de não possibilitar a recuperação do tecido cartilaginoso original, mas sim preencher o defeito com tecido fibrocartilaginoso [2,16,21,22] que posteriormente pode resultar em distúrbios incapacitantes do membro [4,6,18].

A utilização do enxerto osteocondral autógeno possibilita a implantação da cartilagem hialina de forma direta no interior do defeito, em um procedimento único, permitindo o movimento articular precoce e o apoio do membro lesionado [7,14,24]. Alguns fatores de crescimento têm sido avaliados em associação aos tecidos enxertados, tendo destaque para a utilização do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), que estimula a proliferação de vários tipos celulares e auxilia na formação de tecido novo [1,11,12,15,16,20,25].

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do enxerto osteocondral de origem autógena, em formato íntegro ou macerado, associado ou não ao IGF-1, no reparo de defeitos osteocondrais induzidos na troclea femoral de coelhos. Formulou-se a hipótese de que o IGF-1 associado ao enxerto osteocondral, principalmente no formato íntegro, promoveria melhor reparação da lesão induzida.

MATERIAIS E MÉTODOS

Metodologia

Foram selecionados 17 coelhos da linhagem Nova Zelândia, fêmeas, hípidas, com 6 meses de idade e peso corporal médio de 4,5 kg. As 34 articulações foram submetidas à enxertia osteocondral autógena no sulco troclear femoral. Estas foram divididas aleatoriamente em quatro grupos, denominados como enxerto osteocondral íntegro com IGF-1¹ (INT+IGF), enxerto osteocondral íntegro com solução fisiológica (INT+FIS), enxerto osteocondral macerado com IGF-1 (MAC+IGF) e enxerto osteocondral macerado com solução fisiológica (MAC+FIS). Devido à possibilidade de absorção e distribuição sistêmica do IGF-1 e para evitar uma possível interferência do tratamento de uma articulação com o IGF-1 sobre a articulação contralateral sem o medicamento, realizou-se a seleção de 9 animais que receberam os enxertos associados

ao IGF-1 em ambos os membros (INT+IGF em um membro e MAC+IGF no membro contralateral), assim como 8 animais que receberam os enxertos sem acréscimo do IGF-1 em ambos os membros (INT+FIS em um membro e MAC+FIS no membro contralateral).

A artrotomia fêmoro-tíbio-patelar foi realizada seguindo as recomendações de Madry *et al.* [12]. Com auxílio de uma trefina manual, colheu-se um cilindro de enxerto osteocondral de 3,0 mm de diâmetro e 5,0 mm de profundidade do sulco troclear. O enxerto osteocondral obtido em um membro foi utilizado no membro contralateral. Nos animais dos Grupos INT+IGF e INT+FIS, os enxertos foram mantidos íntegros e nos Grupos MAC+IGF e MAC+FIS, os enxertos foram macerados com auxílio de uma cizalha. Os mesmos foram introduzidos nos orifícios ósseos por meio de pressão digital. Ressalta-se que, antes da introdução dos enxertos, nos Grupos INT+IGF e MAC+IGF, o local receptor do enxerto foi enriquecido com a instilação de 0,2 mL (10 µg) de IGF-1 (IGF-1 100 µg)¹ e, nos Grupos INT+FIS e MAC+FIS, com 0,2 mL de solução fisiológica. A sutura da ferida cirúrgica foi realizada de maneira rotineira.

Exame radiográfico

O exame radiográfico na projeção mediolateral das articulações operadas foram realizados imediatamente após a cirurgia e nas 3, 6, 9 e 12 semanas de pós-operatório. As imagens foram avaliadas de forma cega por um avaliador e pontuadas quanto ao preenchimento da superfície articular e do leito receptor da enxertia. A pontuação variou de 0 a 3, sendo (0) ausência de preenchimento, (1) preenchimento escasso ($\leq 50\%$), (2) preenchimento moderado ($>50\%$ e $\leq 90\%$) e (3) preenchimento intenso ($>90\%$ e $\leq 100\%$).

Os animais foram eutanasiados com seis e 12 semanas após o procedimento de enxertia. À necropsia, as articulações submetidas ao procedimento cirúrgico foram dissecadas. Realizou-se o registro fotográfico e a avaliação macroscópica da enxertia e da região articular adjacente, utilizando-se um sistema de pontuação inversa desenvolvido por Orth *et al.* [17] em 2011. O resultado final variou de zero ponto (cartilagem sem alterações) a 12 pontos (sem sinais de reparação tecidual) [Tabela 1].

Exame histológico

Foram colhidas amostras da região enxertada do sulco troclear, as quais foram processadas de forma rotineira para exame histológico pela coloração de

Tabela 1. Sistema de pontuação para avaliação macroscópica da articulação submetida à enxertia osteocondral.

Categoria	Pontos
1. Contratura	
Não	0
Sim	1
2. Efusão	
Não	0
Sim	1
3. Aderências intra-articulares	
Não	0
Sim	1
4. Sinovite	
Não	0
Sim	1
5. Osteófitos	
Não	0
Sim	1
6. Coloração do tecido reparador	
Normal	0
Translúcido	1
Escuro	2
7. Superfície do tecido reparador	
Liso	0
Fibrilado	1
Degenerado	2
8. Integração com a cartilagem adjacente	
Completa integração	0
Bordas demarcadas	1
9. Preenchimento do defeito	
Saliente	1
Nivelado com a cartilagem adjacente	0
50% de reparação da profundidade do defeito	1
0% de reparação da profundidade do defeito	2

Fonte: adaptado de Orth *et al.* [17].

hematoxilina e eosina. As amostras foram avaliadas em microscópio de luz em análise cega por dois avaliadores, sendo utilizado um sistema de pontuação histológica modificada de Sellers *et al.* [19] e Wakitani *et al.* [23]. A pontuação total variou de zero ponto (cartilagem sem alterações) a 31 pontos (sem tecido de reparação) [Tabela 2].

Exame imuno-histoquímico

O exame imuno-histoquímico com anticorpos monoclonais foi realizado para a detecção de colágeno do tipo 2. A coloração resultante da imunorreatividade ao colágeno tipo 2 no tecido de reparação foi comparada com o tecido articular normal adjacente, o qual funcionou como controle interno positivo. Utilizou-se um sistema de pontuação para classificação, seguindo o seguinte padrão: (0) sem imunorreatividade, (1) imunorreatividade fraca, (2) imunorreatividade moderada, (3) imunorreatividade similar e (4) imunorreatividade forte [12,17]. As secções histológicas foram classificadas por três avaliadores por análise de forma cega.

Análise estatística

Para comparação dos diferentes grupos experimentais, os dados foram submetidos à análise não paramétrica por meio do teste de Kruskal-Wallis. No caso de significância, após o ranqueamento dos casos, as médias ranqueadas foram comparadas por meio do teste de Duncan. Devido às características das respostas das variáveis, os dados foram apresentados utilizando-se a mediana e distância interquartilica (DI), citando a diferença estatística quando houver, sendo considerado $P \leq 0,05$. Todo procedimento estatístico foi realizado no programa SPSS 16.0.

RESULTADOS

Em todos os animais avaliados não foram observados deficiência de apoio dos membros pélvicos, presença de efusão articular e crepitação à palpação, ou aumento da sensibilidade dolorosa à extensão e flexão das articulações submetidas à enxertia. Na análise radiográfica, após 6 semanas do procedimento, o Grupo INT+IGF mostrou resultados significativamente melhores do que os demais, frequentemente com o preenchimento total do defeito. Após 9 e 12 semanas, os dois grupos com adição de IGF-1 apresentaram resultados significativamente superiores (Tabela 3) [Figura 1].

Após 6 semanas, nos grupos INT+FIS e MAC+FIS os defeitos encontravam-se, na maioria dos exemplares, totalmente preenchidos por tecido de coloração translúcida, com superfície demonstrando graus variados de fibrilação e bordas demarcadas. Nos grupos INT+IGF e MAC+IGF, metade das amostras apresentou os defeitos totalmente preenchidos e a outra metade parcialmente, com tecido de coloração variando de normal a escuro, e bordas demarcadas. Após 12

Tabela 2. Sistema de pontuação para avaliação histológica da reparação da enxertia osteocondral.

Categoria	Pontos	Categoria	Pontos
1. Preenchimento do defeito em relação à superfície da cartilagem normal adjacente		4. Arquitetura do tecido dentro defeito (não incluindo as margens)	
111-125%:	1	Ausência de espaços vazios (normal)	0
91-110%	0	1 a 3 pequenos espaços vazios	1
76-90%	1	1 a 3 grandes espaços vazios	2
51-75%	2	> 3 grandes espaços vazios	3
26-50%	3	Fendas ou fibrilações	4
<25%	4		
2. Integração do tecido de reparação com áreas de cartilagem articular		5. Arquitetura de superfície	
Continuidade e integração normal	0	Superfície normal	0
Celularidade reduzida	1	Fibrilação ou irregularidade discreta	1
Gap ou falta de continuidade de um lado	2	Fibrilação ou irregularidade moderada	2
Gap ou falta de continuidade nos dois lados	3	Fibrilação ou interrupção/ruptura grave	3
3. Morfologia celular		6. Percentual de novo osso subcondral	
Cartilagem hialina	0	90-100%	0
Maior parte com cartilagem hialina	1	75-89%	1
Maior parte com fibrocartilagem	2	50-74%	2
Maior parte não constituída por cartilagem	3	25-49%	3
Não há cartilagem	4	<25%	4

Fonte: adaptado de Sellers *et al.* [19] e Wakitani *et al.* [23].

Tabela 3. Valores medianos e de distância interquartilica (DI) do escore total de avaliação do exame radiográfico.

Grupo experimental	Escore de avaliação ao exame radiográfico			
	3 sem	6 sem	9 sem	12 sem
INT+IGF	2 (DI=1) ^{a,B}	3 (DI=0) ^{a,A}	3 (DI=0) ^{a,A}	3 (DI=0) ^{a,A}
INT+FIS	2 (DI=1) ^{a,A}	2 (DI=1) ^{d,A}	2 (DI=1) ^{c,A}	2 (DI=1) ^{c,A}
MAC+IGF	2 (DI=0) ^{a,C}	2 (DI=1) ^{b,B}	3 (DI=0) ^{a,A}	3 (DI=0) ^{a,A}
MAC+FIS	1,5 (DI=1) ^{a,A}	2 (DI=2) ^{c,A}	2,5 (DI=1) ^{b,A}	2,5 (DI=1) ^{b,A}

Valores seguidos por diferentes letras minúsculas sobrescritas nas colunas diferem estatisticamente ao teste de Duncan (para médias ranqueadas) com $\alpha=5\%$. Valores seguidos por diferentes letras maiúsculas sobrescritas nas linhas diferem estatisticamente ao teste de Duncan (para médias ranqueadas) com $\alpha=5\%$. As letras seguem a ordem alfabética e designam os valores em ordem decrescente, nesta tabela quanto maior o valor melhor é o preenchimento.

semanas, todos apresentaram o defeito preenchido por tecido de reparação nivelado com a cartilagem original, coloração variando entre normal e translúcido, com superfície articular lisa ou discretamente fibrilada. Nos grupos INT+FIS e MAC+FIS de maneira geral, as bordas encontravam-se demarcadas. Contudo, nos

grupos INT+IGF e MAC+IGF, grande parte das amostras apresentava integração do tecido reparador com a cartilagem adjacente (Tabela 4) [Figura 2].

Na análise microscópica em 6 semanas após a cirurgia, a pontuação média dos parâmetros histológicos individuais mostrou valores significativamente maiores para

Tabela 4. Valores medianos e de distância interquartilica (DI) do escore individual dos parâmetros da avaliação macroscópica

Categoria	INT+IGF		INT+FIS		MAC+IGF		MAC+FIS	
	6 sem.	12 sem.	6 sem.	12 sem.	6 sem.	12 sem.	6 sem.	12 sem.
Contratura	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)
Efusão	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)
Aderências	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)
Sinovite	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)
Osteófitos	0 (DI=1)	0 (DI=0)	0,5 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=1)	0 (DI=0)	1 (DI=0) ^A	0 (DI=0) ^B
Coloração	1,5 (DI=2)	1 (DI=1)	1 (DI=0)	1 (DI=1)	1 (DI=0)	1 (DI=1)	1 (DI=0) ^A	0 (DI=1) ^B
Superfície	1 (DI=0)	1 (DI=1)	1 (DI=0)	0 (DI=1)	1 (DI=0)	0 (DI=1)	1 (DI=0)	1 (DI=1)
Integração	1 (DI=1)	0 (DI=1)	1 (DI=0)	1 (DI=0)	1 (DI=0) ^A	0 (DI=0) ^B	1 (DI=0)	1 (DI=1)
Preenchimento	0,5 (DI=1)	0 (DI=0)	0,5 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=1)	0 (DI=0)

Valores seguidos por diferentes letras maiúsculas sobscritas nas linhas diferem estatisticamente ao teste de Duncan (para médias ranqueadas) com $\alpha=5\%$. As letras seguem a ordem alfabética e designam os valores em ordem decrescente, nesta tabela quanto menor o valor melhor é o escore individual.

o osso subcondral nos Grupos INT+IGF e MAC+IGF, indicando uma menor porcentagem de formação deste. Após 12 semanas, o mesmo valor diminuiu nos grupos citados e se elevou no Grupo INT+FIS (Tabela 5). Em relação ao escore total da avaliação microscópica, não houve diferença significativa entre os grupos analisados no mesmo período de tempo. Comparando-se os mesmos grupos entre 6 e 12 semanas, observou-se uma melhora significativa na pontuação total dos aspectos microscópicos no Grupo INT+IGF (Tabela 6).

Na caracterização histológica após 6 semanas de cirurgia, em todos os grupos o preenchimento do defeito variou de total a parcial com tecido constituído em sua maior parte por cartilagem hialina ou, menos frequentemente, por fibrocartilagem. Foi verificada a existência de algumas fendas e vazios em alguns animais, pertencentes principalmente aos Grupos INT+IGF e MAC+IGF. Observaram-se áreas de reabsorção de tecido ósseo e cartilaginoso por osteoblastos em todos os grupos. Havia ainda proliferação de tecido conjuntivo fibroso, em algumas áreas se diferenciando para cartilagem, na região subcondral e encobrendo o enxerto, principalmente no Grupo INT+IGF. Após 12 semanas de enxertia, houve preenchimento total em quase todos os defeitos, sendo recobertos por tecido constituído predominantemente por cartilagem hialina. Foram ainda observados resquícios de tecidos ósseos e cartilaginosos, entremeados na região de cartilagem articular ou de osso subcondral, principalmente nas amostras dos grupos com enxerto macerado. A integração no local das bordas dos enxertos apresentava-se adequada, sendo mais evidente nos grupos com IGF-1 (Figura 3).

Figura 1. Imagens radiográficas em projeção mediolateral da articulação fêmoro-tíbio-patelar de coelhos representativas do pós-operatório de 12 semanas. A- Enxerto íntegro com IGF-1. B- Enxerto íntegro com solução fisiológica. C- Enxerto macerado com IGF-1. D- Enxerto macerado com solução fisiológica. As setas indicam o local receptor do enxerto. Notar nas imagens A e C uma radiodensidade mais homogênea no local enxertado quando comparado às imagens B e D, correspondendo a um preenchimento mais intenso do osso subcondral e da superfície articular.

Figura 2. Aspecto macroscópico demonstrativo do local receptor do enxerto osteocondral autólogo na tróclea femoral de coelhos. Pós-operatório de 6 semanas (linha superior) e 12 semanas (linha inferior). A e C- Enxerto íntegro com solução fisiológica. A' e C'- Enxerto macerado com solução fisiológica. B e D- Enxerto íntegro com IGF-1. B' e D'- Enxerto macerado com IGF-1. Observar o preenchimento do defeito, a coloração do tecido, a superfície articular e a integração do tecido reparador com a cartilagem adjacente.

Tabela 5. Valores medianos e de distância interquartílica (DI) do escore individual dos parâmetros da avaliação microscópica.

Categoria	INT+IGF		INT+FIS		MAC+IGF		MAC+FIS	
	6 sem.	12 sem.	6 sem.	12 sem.	6 sem.	12 sem.	6 sem.	12 sem.
Preenchimento	1 (DI=4)	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)	0 (DI=0)
Integração	1,5 (DI=2)	1 (DI=0)	0 (DI=0)	1 (DI=1)	0 (DI=0)	1 (DI=2)	1 (DI=2)	0,5 (DI=1)
Morfologia celular	2,5 (DI=2)	1 (DI=0)	2 (DI=0) ^A	1 (DI=1) ^B	0 (DI=0)	1 (DI=1)	1,5 (DI=2)	1 (DI=1)
Arquitetura do tecido	1,5 (DI=4)	0 (DI=2)	0 (DI=0)	2 (DI=2)	4 (DI=1)	0 (DI=3)	1,5 (DI=3)	1,5 (DI=4)
Arquitetura de superfície	2 (DI=3)	2 (DI=1)	0,5 (DI=1)	2,5 (DI=2)	3 (DI=3)	2 (DI=2)	1,5 (DI=1)	1,5 (DI=2)
Osso subcondral	2 (DI=2) ^{a,A}	1 (DI=1) ^{b,B}	0 (DI=0) ^{b,B}	1 (DI=0) ^{a,A}	3 (DI=0) ^{a,A}	1 (DI=0) ^{a,B}	1 (DI=2) ^b	0 (DI=1) ^c
Tidemark	1 (DI=1)	1 (DI=0)	1,5 (DI=1)	1 (DI=1)	1 (DI=0)	1 (DI=2)	1 (DI=1)	1,5 (DI=1)

Valores seguidos por diferentes letras minúsculas sobrescritas diferem estatisticamente entre os grupos no mesmo período de tempo ao teste de Duncan (para médias ranqueadas) com $\alpha=5\%$. Valores seguidos por diferentes letras maiúsculas sobrescritas diferem estatisticamente no mesmo grupo em períodos de tempo diferentes, ao teste de Kruskal-Wallis com $\alpha=5\%$. As letras seguem a ordem alfabética e designam os valores em ordem decrescente, nesta tabela quanto menor o valor melhor é o escore individual.

Tabela 6. Valores medianos e de distância interquartílica (DI) do escore total de avaliação microscópica.

Grupo experimental	Escore de avaliação microscópica	
	6 sem.	12 sem.
INT+IGF	11,5 (DI=10) ^A	6 (DI=8) ^B
INT+FIS	4,5 (DI=1) ^A	8,5 (DI=3) ^A
MAC+IGF	12 (DI=6) ^A	8 (DI=8) ^A
MAC+FIS	8 (DI=6) ^A	7,5 (DI=5) ^A

Valores seguidos por diferentes letras maiúsculas sobrescritas nas linhas diferem estatisticamente ao teste de Duncan (para médias ranqueadas) com $\alpha=5\%$. As letras seguem a ordem alfabética e designam os valores em ordem decrescente, nesta tabela quanto menor o valor melhor é o escore total.

Tabela 7. Valores medianos e de distância interquartílica (DI) da avaliação da imuno-histoquímica.

Grupo experimental	Escore de avaliação imuno-histoquímica	
	6 sem.	12 sem.
INT+IGF	2,5 (DI=2)	3 (DI=1)
INT+FIS	3 (DI=1)	3 (DI=1)
MAC+IGF	3 (DI=2)	3 (DI=1)
MAC+FIS	3 (DI=1)	3 (DI=1)

A categoria 3 indica imunorreatividade semelhante ao tecido original.

Pela análise de imuno-histoquímica, após 6 e 12 semanas da cirurgia, não houve diferença significativa entre os grupos e entre os períodos avaliados em relação à imunorreatividade do tecido de reparação formado no defeito da cartilagem para a presença de colágeno tipo 2. Observou-se que, na grande maioria dos casos, a imunorreatividade era semelhante ao tecido cartilaginoso original (Tabela 7).

DISCUSSÃO

Em lesões muito extensas, o uso de enxertos osteocondrais íntegros pode se tornar inviável devido à morbidade do local doador. Desta forma, uma alternativa seria a utilização do enxerto osteocondral macerado, que recobre uma área maior e atua como suporte e fonte celular no processo de reparação [10,13,14]. No presente estudo, foram obtidos resultados satisfatórios com a utilização deste tipo de enxerto, associado ou não ao IGF-1.

Na análise radiográfica, ao comparar os locais submetidos à enxertia, observou-se que a presença do enxerto íntegro denotava um preenchimento local adequado, havendo uma aparente integração de forma rápida e efetiva na presença do IGF-1 a partir da sexta semana do procedimento. O grupo IGF-1 com enxerto macerado também apresentou bons resultados, com preenchimento total após a nona semana. Estas observações podem estar supostamente relacionadas com a ação do hormônio sobre o local receptor, uma vez que promove o efeito mitótico sobre os condrócitos [12,25]. Singh *et al.* [20] utilizando autoenxerto osteocartilaginoso associado a um *scaffold* enriquecido com IGF-1 em coelhos, observaram na avaliação radiográfica do grupo com IGF-1 aos 45 dias uma reação óssea mais saliente em relação à superfície articular. No presente estudo não foi observado nenhum tipo de reação indesejada no local enxertado, incluindo migração ou reabsorção do enxerto. Apesar da avaliação histológica

Figura 3. Imagens histológicas da região de enxertia osteocondral na tróclea femoral de coelho, coradas com hematoxilina e eosina. A- Tecido ósseo e cartilaginoso do enxerto (letra E interna) sendo reabsorvido e substituído, notar proliferação intensa de tecido conjuntivo fibroso (letra F interna) com algumas áreas de diferenciação para cartilagem, na região subcondral e sobre o enxerto (Obj: 10x). B- Tecido de reparação constituído predominantemente por cartilagem hialina (Obj: 4x). C- Áreas de reabsorção de tecido ósseo e cartilaginoso por osteoclastos. A seta indica a integração entre o enxerto e a cartilagem original (Obj: 4x). D- Presença de resquícios de tecido ósseo (setas) entremendo a cartilagem neoformada (Obj: 10x). E- Osteoclastos (setas) na área de cartilagem e osso, com intensa proliferação de tecido fibroso se diferenciando em cartilagem e neovascularização (asteriscos) na região de osso subcondral (Obj: 10x). F- Integração normal entre o tecido de reparação e cartilagem original [seta] (Obj: 10x). G- Observar na região de osso subcondral, reações discretas com proliferação de tecido conjuntivo fibroso (asterisco) em continuidade com tecido cartilaginoso ativo (ponta de seta) e presença de condroblastos (seta) (Obj: 10x). H- Tecido de reparação neoformado, constituído principalmente de cartilagem hialina (Obj: 10x).

exibir reabsorção e substituição dos enxertos, este processo não foi percebido nas imagens radiográficas.

Nesta pesquisa, após 6 semanas, em todos os grupos, as bordas da superfície do enxerto e da cartilagem adjacente encontravam-se bem demarcadas e com 12 semanas, notou-se que, principalmente nos grupos com IGF-1, a integração com o tecido cartilaginoso original era mais evidente. Acredita-se que a propriedade do IGF-1 de aumentar a condrogênese na reparação cartilaginosa de lesões articulares *in vivo* [16,25] possa ter contribuído para este achado. A administração exógena de IGF-1 pode influenciar as células-tronco autóctones para a região óssea esponjosa de uma lesão aguda, fornecendo uma importante fonte de células pluripotentes [16]. Fitzpatrick *et al.* [3] utilizaram somente o autoenxerto osteocondral no tratamento de osteocondrite dissecante em cães relataram a presença de demarcação evidente do local receptor após 12 a 18 semanas. Madry *et al.* [12], utilizando implantes com lacZ, IGF-1 ou IGF-1/FGF-2 em defeitos osteocondrais no sulco troclear de coelhos, observaram que após 3 semanas, as margens do defeito ainda eram visíveis e o tecido formado era translúcido, não havendo diferença macroscópica entre os tratamentos. No presente trabalho foi utilizado um sistema detalhado de pontua-

ção e observou-se pela microscopia que a utilização de IGF-1 melhorou a resposta tecidual de reparação do enxerto osteocondral autólogo, principalmente no grupo com utilização do enxerto íntegro, em que foi alcançada a significância estatística entre 6 e 12 semanas após a enxertia na análise do escore total de avaliação microscópica.

Na avaliação histológica, mesmo não sendo atingida a diferença significativa entre os grupos no mesmo período de tempo, notou-se uma tendência de que a adição do IGF-1 tenha tornado a reação tecidual e a ativação celular mais evidentes, potencializando o processo de reabsorção e reparação. Singh *et al.* [20] descreveram que inicialmente a utilização de *scaffold* enriquecido com IGF-1 apresentou a propensão de estimular a proliferação de condroblastos para o processo de reparação ou auxiliar na manutenção da cartilagem enxertada e, mais tardiamente, a formação de cartilagem reduziu e aparentemente convergiu para tecido ósseo. Nos achados da atual pesquisa, na sexta semana, principalmente no Grupo INT+IGF, o enxerto foi recoberto por um tecido de reparação de morfologia variada e, ao contrário do citado anteriormente, em 12 semanas já havia sido substituído por tecido predominantemente constituído por cartilagem hialina. De maneira oposta, Jakob *et al.* [5] não citaram nenhuma destas alterações.

Alguns trabalhos científicos demonstraram que o IGF-1 eleva a síntese de colágeno tipo 2 e proteoglicanos [1,11,25]. O colágeno tipo 2 é a base da cartilagem hialina e um importante componente da rede fibrilar de colágenos, que permite a cartilagem aprisionar o proteoglicano formado, proporcionando força de tensão ao tecido [21]. Pela análise de imunohistoquímica realizada neste estudo, a imunorreatividade para o colágeno tipo 2 mostrou-se semelhante em todos os grupos avaliados, evidenciando uma quantidade adequada deste componente já na sexta semana de avaliação. Estes achados nos grupos que utilizaram enxerto íntegro eram esperados, pois se acreditava que esse tecido seria integrado. Contudo, ocorreu a reorganização da superfície cartilaginosa nos enxertos macerados e íntegros, ambos com adequada presença do colágeno tipo 2, mostrando o potencial de reparação cartilaginosa dos enxertos utilizados. Entretanto, apesar da imunorreatividade ser positiva para o colágeno tipo 2 na maioria das secções analisadas, uma parte destes tecidos não pode ser considerada cartilagem hialina verdadeira devido à ausência de algumas características típicas, incluindo a complexa arquitetura do osso subcondral e a organização zonal dos condrócitos [13].

A aplicação intra-articular de proteínas terapêuticas é limitada pela falta de retenção no interior da cartilagem, rápida eliminação no espaço articular [9] e escassez intrínseca de condrócitos para servir como células alvo [11]. No estudo realizado, a aplicação direta do IGF-1 no defeito osteocondral representou uma opção simples e acessível, e associada ao enxerto osteocondral autógeno, atuou como uma forma de tratamento em uma única intervenção invasiva. Liu *et al.* [8], avaliando o efeito da injeção intra-articular de IGF-1 associado ao ácido hialurônico na cartilagem e osso subcondral na reparação de osteoartrite induzida na articulação temporomandibular de coelhos, observou que a aplicação única de IGF-1 isolado não apresentou nenhum efeito aparente devido sua vida biológica curta e dispersão rápida. De forma semelhante, outros estudos realizados em ratos, cães e coelhos constataram um efeito terapêutico mínimo pelo uso periódico do

IGF-1 isolado na reparação da cartilagem e osso subcondral osteoartríticos [8]. Apesar do possível efeito fugaz da instilação direta de IGF-1 no local receptor, foi observado nesta pesquisa que os grupos com adição deste fator de crescimento apresentaram reação e proliferação celulares mais intensas, incentivando o processo de reparação tecidual.

Algumas limitações desse trabalho podem ser ressaltadas. Mesmo sendo utilizados coelhos, o período de tempo para realização das análises, que foi de até 12 semanas, pode ter sido insuficiente para afirmar sobre a viabilidade definitiva dos enxertos, sendo que o desfecho mecânico e estrutural só pode ser determinado com estudos em longo prazo. Além disso, o reduzido número de animais utilizados em cada período de observação pode ter influenciado a obtenção de resultados mais precisos e o alcance da significância estatística. Vale ressaltar ainda que alguns fatores podem influenciar a adaptação e a incorporação de enxertos transplantados, incluindo micro movimentação e fixação da enxertia, mediadores químicos, estabelecimento da vascularização, processos inflamatórios e características do osso subcondral.

CONCLUSÃO

A adição do IGF-1 ao enxerto osteocondral autógeno parece incentivar os eventos de reabsorção e substituição do tecido enxertado, favorecendo o processo de reparação da cartilagem articular lesionada. Os enxertos osteocondrais autógenos, independentemente do formato íntegro ou macerado, apresentam adequada capacidade de reparação da cartilagem articular, com formação de colágeno tipo 2 semelhante ao tecido original.

MANUFACTURER

¹BioVision Inc. Milpitas, CA, USA

Acknowledgements. À FAPEMIG e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Ethical approval. Este projeto de pesquisa foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Lavras e aprovado com protocolo nº 010/11.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest.

REFERENCES

- 1 Clark A., Milbrandt T.A., Hilt J.Z. & Puleo D.A. 2014. Retention of insulin-like growth factor I bioactivity during the fabrication of sintered polymeric scaffolds. *Biomedical Materials*. 9(2): 1-8.
- 2 Cotter E.J., Wang K.C., Yanke A.B. & Chubinskaya S. 2018. Bone marrow aspirate concentrate for cartilage defects

- of the knee: from bench to bedside evidence. *Cartilage*. 9(2): 161-170.
- 3 Fitzpatrick N., Van Terheijden C., Yeadon R. & Smith T.J. 2010.** Osteochondral autograft transfer for treatment of osteochondritis dissecans of the caudocentral humeral head in dogs. *Veterinary Surgery*. 39(8): 925-935.
- 4 Gugjoo M.B., Amarpal, Abdelbaset-Ismail A., Aithal H.P., Kinjavdekar P., Pawde A.M., Kumar G.S. & Sharma G.T. 2017.** Mesenchymal stem cells with IGF-1 and TGF- 1 in laminin gel for osteochondral defects in rabbits. *Bio-medicine & Pharmacotherapy*. 93: 1165-1174.
- 5 Jakob R.P., Franz T., Gautier E. & Mainil-Varlet P. 2002.** Autologous osteochondral grafting in the knee: indication, results, and reflections. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1(401): 170-184.
- 6 Kim K., Lam J., Lu S., Spicer P.P., Lueckgen A., Tabata Y, Wong M.E., Jansen J.A., Mikos A.G. & Kasper F.K. 2013.** Osteochondral tissue regeneration using a bilayered composite hydrogel with modulating dual growth factor release kinetics in a rabbit model. *Journal of Controlled Release*. 168(2): 166-178.
- 7 Krusche-Mandl I., Schmitt B., Zak L., Apprich S., Aldrian S., Juras V., Friedrich K.M., Marlovits S., Weber M. & Trattnig S. 2012.** Long-term results 8 years after autologous osteochondral transplantation: 7T gagCEST and sodium magnetic resonance imaging with morphological and clinical correlation. *Osteoarthritis and Cartilage*. 20(5): 357-363.
- 8 Liu S., Wu J., Liu X, Chen D., Bowlin G.L., Cao L., Lu J., Li F., Mo X. & Fan C. 2015.** Osteochondral regeneration using an oriented nanofiber yarn-collagen type I/hyaluronate hybrid/TCP biphasic scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. 103(2): 581-592.
- 9 Loffredo F.S., Pancoast J.R., Cai L., Vannelli T., Dong J.Z., Lee R.T. & Patwari P. 2014.** Targeted delivery to cartilage is critical for *in vivo* efficacy of insulin-like growth factor 1 in a rat model of osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology*. 66(5): 1247-1255.
- 10 Lu Y., Dhanaraj S., Wang Z., Bradley D.M., Bowman S.M., Cole B.J. & Binette F. 2006.** Minced cartilage without cell culture serves as an effective intraoperative cell source for cartilage repair. *Journal of Orthopaedic Research*. 24(6): 1261-1270.
- 11 Madry H., Kaul G., Cucchiariini M., Stein U., Zurakowski D., Remberger K., Menger M.D., Kohn D. & Trippel S.B. 2005.** Enhanced repair of articular cartilage defects *in vivo* by transplanted chondrocytes overexpressing insulin-like growth factor I (IGF-I). *Gene Therapy*. 12(15): 1171-1179.
- 12 Madry H., Orth P., Kaul G., Zurakowski D., Menger M.D., Kohn D. & Cucchiariini M. 2010.** Acceleration of articular cartilage repair by combined gene transfer of human insulin-like growth factor I and fibroblast growth factor-2 *in vivo*. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*. 130(10): 1311-1322.
- 13 Marmotti A., Bruzzone M., Bonasia D.E., Castoldi F., Rossi R., Piras L., Maiello A., Realmuto C. & Peretti G.M. 2012.** One-Step osteochondral repair with cartilage fragments in a composite scaffold. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 20(12): 2590-2601.
- 14 Maruyama M., Satake H., Suzuki T., Honma R., Naganuma Y., Takakubo Y. & Takagi M. 2017.** Comparison of the effects of osteochondral autograft transplantation with platelet-rich plasma or platelet-rich fibrin on osteochondral defects in a rabbit model. *The American Journal of Sports Medicine*. 45(14): 3280-3288.
- 15 Morisset S., Frisbie D.D., Robbins P.D., Nixon A.J. & McIlwraith C.W. 2007.** IL-1ra/IGF-1 gene therapy modulates repair of microfractured chondral defects. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 462: 221-228.
- 16 Nixon A.J., Fortier L.A., Williams J. & Mohammed H. 1999.** Enhanced repair of extensive articular defects by insulin-like growth factor-I-laden fibrin composites. *Journal of Orthopaedic Research*. 17(4): 475-487.
- 17 Orth P., Kaul G., Cucchiariini M., Zurakowski D., Menger M.D., Kohn D. & Madry H. 2011.** Transplanted articular chondrocytes co-overexpressing IGF-I and FGF-2 stimulate cartilage repair *in vivo*. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 19(12): 2119-2130.
- 18 Rodríguez-Merchán E.C. 2012.** The treatment of cartilage defects in the knee joint: microfracture, mosaicoplasty, and autologous chondrocyte implantation. *American Journal of Orthopedics*. 41(5): 236-239.
- 19 Sellers R.S., Peluso D. & Morris E.A. 1997.** The effect of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 (rh-BMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*. 79(10): 1452-1463.
- 20 Singh N.K., Singh G.R., Amarpal, Kinjavdekar P., Sharma A.K., Mohanty T.R., Kumar S., Chae H.S., Yoo Y.M. & Ahn C.N. 2007.** Articular cartilage repair with autografting under the influence of insulin-like growth factor-1 in rabbits. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine*. 54(4): 210-218.

- 21 Singh N.K., Singh G.R., Jeong D.K. & Lee S.J. 2013.** Healing of full-thickness articular cartilage defects treated with cultured autologous chondrogenic satellite cells isolated from chondral stem cell niche in rabbits. *Journal of Surgical Research*. 183(2): 629-638.
- 22 Tiwary R., Pal A., Aithal H.P., Kinjavdekar P., Pawde A.M. & Singh R. 2013.** Effect of IGF-1 and uncultured autologous bone-marrow-derived mononuclear cells on repair of osteochondral defect in rabbits. *Cartilage*. 5(1): 43-54.
- 23 Wakitani S., Goto T., Pineda S.J., Young R.G., Mansour J.M., Caplan A.I. & Goldberg V.M. 1994.** Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *The Journal of Bone Joint Surgery. American Volume*. 76(4): 579-592.
- 24 Walczak B.E., Nies M.S., Trask D.J., Hetzel S., Roney P.J., Squire M.W. & Baer G.S. 2018.** Osteochondral graft size is significantly associated with increased force and decreased chondrocyte viability. *The American Journal of Sports Medicine*. 46(3): 623-631.
- 25 Zhang Z., Li L., Yang W., Cao Y., Shi Y., Li X. & Zhang Q. 2017.** The effects of different doses of IGF-1 on cartilage and subchondral bone during the repair of full-thickness articular cartilage defects in rabbits. *Osteoarthritis and Cartilage*. 25(2): 309-320.