

Marcus Vinicius Danieli

**Tratamento de lesões osteocondrais do joelho pela
aplicação do gel de plaquetas**

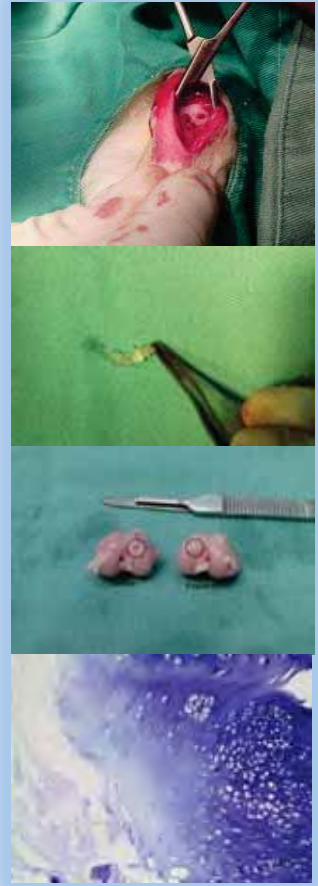
Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina da
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu-SP, para
obtenção do título de Mestre em
Pesquisa e Desenvolvimento
(Biotecnologia Médica).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elenice Deffune

Botucatu-SP

2012

Dedicatória



À minha esposa e meus filhos

Agradecimientos



Ao meu professor e amigo Dr. Hamilton da Rosa Pereira, que me estimulou a iniciar esta pesquisa e que, dessa forma, implantou o desejo de continuar pesquisando sempre. E, além disso, ensinou o mais importante na ortopedia e em todos os momentos: Honestidade.

A Prof^a. Dr^a. Elenice Deffune, pelo exemplo de dedicação, conhecimento e bom humor, mesmo diante de grandes desafios.

Ao Prof. Dr. Sergio Luis Felisbino, pelo apoio e disposição na avaliação histológica das peças deste trabalho.

Aos meus pais, pelos valores e conhecimentos que me transmitiram e agora utilizo tanto no meu trabalho como na criação de meus filhos.

Aos funcionários do Laboratório de Cirurgia Experimental, pela atenção, comprometimento e disponibilidade nos momentos que precisei durante o andamento deste trabalho.

Ao funcionário Alessandro Fagner Ferreira pelo grande apoio e disposição para auxílio na coleta de sangue dos coelhos e preparo do gel de plaquetas.

Ao meu colega de trabalho e das horas de lazer Carlos “Sangalo” Carneiro, que, sem oposição, me auxiliou na resolução de problemas durante a execução do projeto.

A secretária Janisse, por toda sua simpatia e disposição, nos auxiliando com as dúvidas e dificuldades encontradas durante o ano.

Aos funcionários da Biblioteca pelo exímio e excepcional serviço prestado, rápido e eficiente. Pessoas prestativas e sempre simpáticas no atendimento.

A Deus e seus anjos da guarda, que me guiaram nas viagens frequentes que realizei e que sempre me trouxeram de volta com saúde e disposição.

E, principalmente, a minha família - Verlaine, Julia e Daniel - pela paciência, amor e apoio, e por sempre me animarem a continuar a busca por ser uma pessoa melhor.

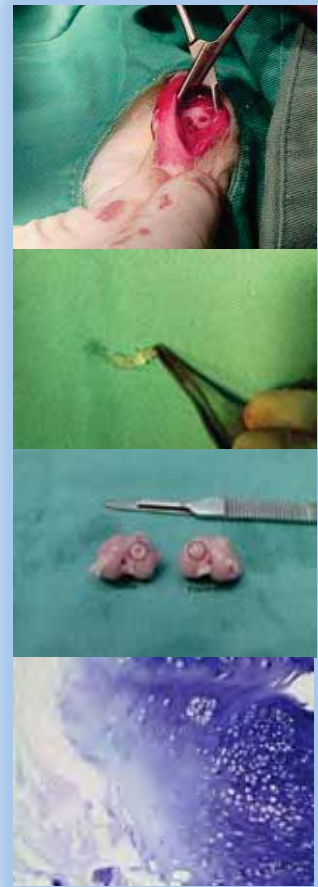
Epígrafe



"Quanto mais conhecemos, mais amamos."

Leonardo da Vinci

Resumo



Resumo

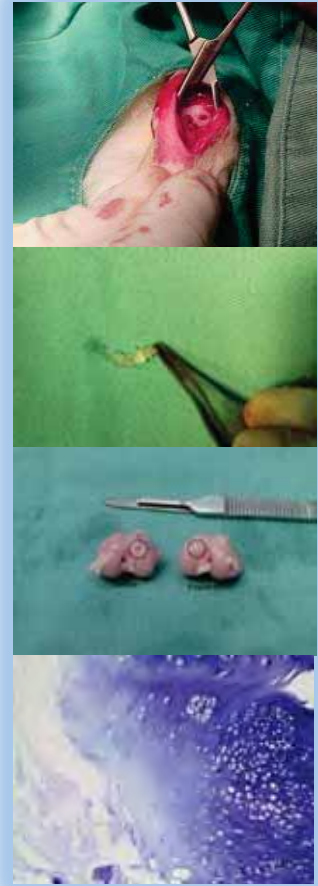
Foi realizado estudo experimental em coelhos para avaliar o efeito da aplicação do gel de plaquetas no reparo de lesões osteocondrais, comparada com o mesmo tipo de lesão não tratada. Foram utilizados 30 coelhos machos com idade mínima de três meses e peso acima de 2kg. Foi colhido sangue dos animais para preparo do gel de plaquetas e depois estes foram operados para realização de uma lesão osteocondral, com trefina, no côndilo femoral medial, de ambos os joelhos, de 3,5mm de diâmetro e 4,0mm de profundidade. A lesão do joelho esquerdo foi preenchida com o gel de plaquetas e o joelho direito foi usado como controle, sem tratamento. Após 180 dias realizou-se a eutanásia dos animais. As peças foram analisadas e seu tecido de reparo classificado macroscopicamente e depois histologicamente. Utilizou-se uma tabela de escore histológico que avalia os seguintes critérios: morfologia celular, regularidade da superfície, metacromasia, espessura condral e integração do tecido de reparo ao tecido normal.

Foi observado que o grupo tratado com gel de plaquetas obteve uma melhor cicatriz na avaliação macroscópica, e na avaliação histológica o único critério que não apresentou diferença estatística foi a metacromasia, sendo que o grupo tratado com gel foi melhor em todos os outros, inclusive no escore total.

Desta forma conclui-se que o grupo tratado com gel de plaquetas obteve melhor reparo macroscópica e histologicamente, com 180 dias, quando comparado com o mesmo tipo de lesão não tratada.

Palavras-chave: Plasma Rico em Plaquetas, Cartilagem Articular, Lesões, Medicina Regenerativa.

Abstract



Abstract

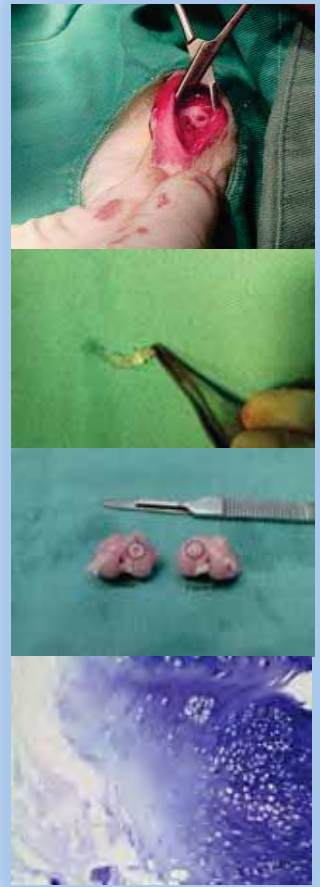
An experimental study was performed on rabbits to evaluate the application effects of Platelet Gel for the repair of osteochondral injuries compared to the same, yet not treated, type of injuries. Thirty male rabbits were used, with minimum age of 3 months and weight over 2kg. The animals' blood was collected to prepare the Platelet Gel; afterwards, these animals were operated in order to make an osteochondral injury with 3.5mm in diameter and 4.0mm in depth, with trephine, at the medial condyle of femur of both knees. The left knee injury was filled with the Platelet Gel and the right knee was used as control, without treatment. After 180 days, euthanasia was performed on the animals. The pieces were analyzed and the repair tissue was macroscopically and, subsequently, histologically classified. One has used a Histological Grading Scale, which evaluates the following criteria: cell morphology, surface regularity, metachromasy, chondral thickness, and repair tissue integration with the normal tissue.

It was observed that the group treated with Platelet Gel obtained better repair tissue under macroscopic evaluation; and, under histologic evaluation, the only criteria which did not present statistical difference was the metachromasy, being that the group treated with gel was better at all others, including the total score.

Thus, one concludes that the group treated with Platelet Gel obtained better repair, macroscopically and histologically, after 180 days, in comparison to the same non-treated type of injury.

Keywords: Platelet-rich plasma, articular cartilage, injuries, regenerative medicine.

Lista de Figuras

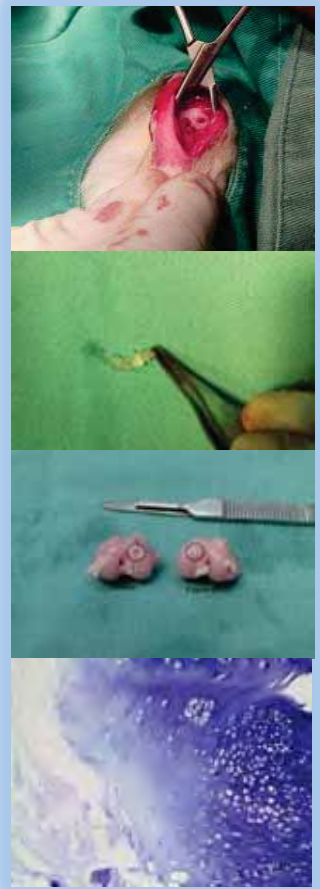


Lista de Figuras

- Figura 1 - Aspecto da lesão condral antes (A) e depois (B) da aplicação do gel de plaquetas 35
- Figura 2 - Aspecto do gel de plaquetas antes de sua aplicação na lesão condral 36
- Figura 3 - Aspecto macroscópico do tecido de cicatrização dos joelhos do coelho 2. Notar a deficiência de cicatrização no lado direito e a melhor aparência no esquerdo 42
- Figura 4 - Aspecto histológico das lâminas do coelho número 2 coradas com azul de toluidina (aumento 4 vezes). A) Lado direito: notar degeneração gordurosa no tecido cicatricial (*) e presença de tecido predominantemente fibroso (seta menor); B) Lado esquerdo: maior presença de condrócitos (**), tecido cicatricial hipertrófico (seta maior) e deficiência de integração lateral (estrela) 43
- Figura 5 - Aspecto histológico das peças do coelho 8, coradas com azul de toluidina. A) Joelho direito (aumento 4 vezes): notar tecido fibrocartilaginoso com superfície irregular; B) Joelho esquerdo (aumento 4 vezes): tecido mais cartilaginoso, melhor organizado e superfície mais lisa; C) Joelho direito (aumento 20 vezes): presença de maior quantidade de células alongadas (fibroblastos); D) Joelho esquerdo (aumento 20 vezes): presença de condrócitos em organização e superfície lisa 44

- Figura 6 - Aspecto histológico da lâmina do joelho esquerdo do coelho 7, corado com azul de toluidina (aumento 4 vezes). Observar o tecido cicatricial bem organizado..... 45
- Figura 7 - Aspecto histológico da lâmina do coelho 21, corado com azul de toluidina (aumento 4 vezes). A) Lado direito; B) Lado esquerdo. Observar a cicatriz profunda, com matriz exuberante e muitos condrócitos em ambos os lados, mas melhor organizada no lado esquerdo(B) 46
- Figura 8 - Aspecto histológico da lâmina do joelho direito do coelho 24 corada com azul de toluidina (aumento 4 vezes). Notar o tecido de cicatrização bem organizado, mas com superfície irregular e deficiência de integração nas laterais 47
- Figura 9 - Aspecto histológico da lâmina do joelho esquerdo do coelho 20 corado com azul de toluidina (aumento 20 vezes). Observar a grande quantidade de condrócitos desorganizados no tecido de cicatrização..... 48

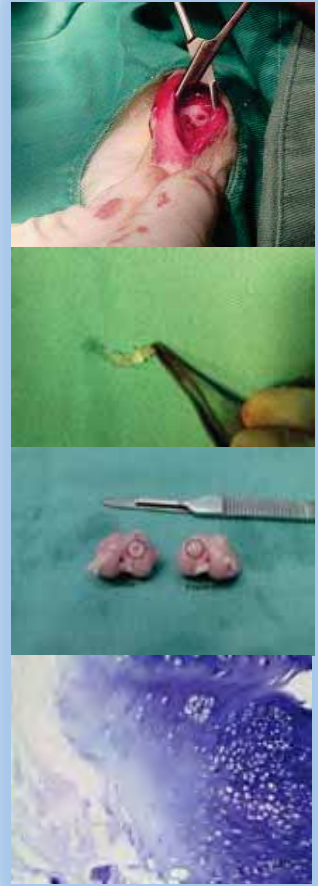
Lista de Tabelas



Lista de Tabelas

Tabela 1 - Escala de Graduação Histológica	38
Tabela 2 - Média e Desvio Padrão dos Escores histológicos do tecido de reparo do lado esquerdo (tratado)	49
Tabela 3 - Média e Desvio Padrão dos Escores histológicos do tecido de reparo do lado direito (não tratado)	49

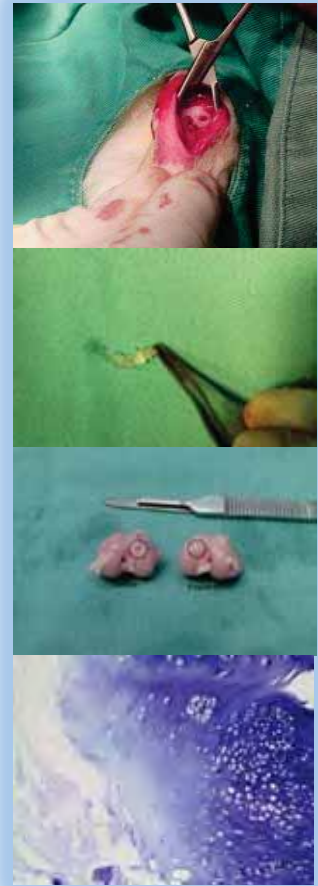
Lista de Gráficos



Lista de Gráficos

Gráfico 1 – Classificação macroscópica do tipo de reparo de acordo com o lado	41
Gráfico 2 – Média e desvio padrão do escore histológico da morfologia celular	50
Gráfico 3 – Média e desvio padrão do escore histológico da metacromasia	50
Gráfico 4 – Média e desvio padrão do escore histológico da regularidade da superfície	51
Gráfico 5 – Média e desvio padrão do escore histológico da espessura condral	51
Gráfico 6 – Média e desvio padrão do escore histológico da integração lateral	52
Gráfico 7 – Média e desvio padrão do escore histológico total	52

Lista de Abreviaturas



Lista de Abreviaturas

et al. = colaboradores

Kg = quilogramas

mg = miligramas

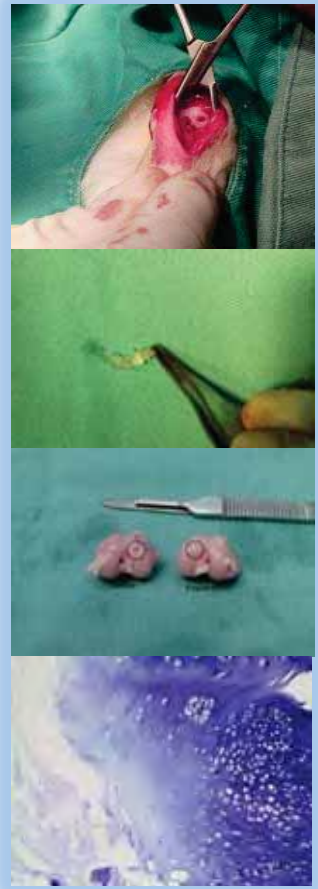
ml = mililitros

mm = milímetros

PRP = Plasma rico em plaquetas

RPM = rotações por minuto

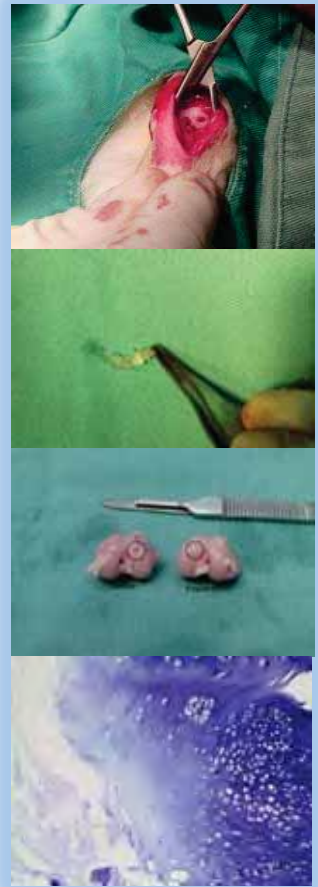
Sumário



Sumário

Resumo	10
Abstract	13
Lista de Figuras	16
Lista de Tabelas	19
Lista de Gráficos	21
Lista de Abreviaturas	23
1.Introdução	27
2.Material e Métodos	33
2.1.Técnica Cirúrgica	34
3.Resultados	40
4.Discussão	54
5.Conclusão	63
6.Bibliografia	65
Anexos	72

Introdução



1. Introdução

Em 1743, Hunter disse que “de Hipócrates até o presente é aceito universalmente que a cartilagem ulcerada é uma situação problemática e, uma vez destruída, ela não se repara” (Fuller & Ghadially, 1972). Mais tarde, em 1853, Sir James Paget declarou que uma cartilagem lesada nunca se restaura (Fuller & Ghadially, 1972). Mesmo atualmente, com toda nossa tecnologia e conhecimento, nossos tratamentos para lesão da cartilagem articular não evoluíram a ponto de conseguirmos seu reparo eficiente. Isso porque o tecido condral é constituído por poucas células e uma rica e complexa matriz extracelular - composta de proteoglicanas e colágeno tipo II - todavia não possui nervos, nem drenagem linfática ou vasos sanguíneos, esses últimos essenciais para a formação de um coágulo e assim iniciar o processo de cicatrização (Souza *et al.*, 2000; Buckwalter, 2002; Ribeiro *et al.*, 2004; Bhosale & Richardson, 2008).

Desta forma, quando temos uma lesão na cartilagem, o tecido de cicatrização que se forma não suporta carga da mesma forma que o tecido normal. A consequência é a evolução, a longo prazo, para a osteoartrose (Souza *et al.*, 2000). Esta é uma doença incapacitante e sem cura, com prevalência nos Estados Unidos da América (EUA) de 50 milhões de casos (Bittencourt, 2008) e cujos gastos estimados para tratamento ficam na faixa de 65 bilhões de dólares ao ano (D’Lima & Colwell, 2001).

Aroen *et al.* (2004) encontraram 66% de lesões condrais em 993 artroscopias consecutivas de joelho, comprovando a grande importância deste problema.

Para tratar as lesões condrais e tentar evitar ou desacelerar a instalação de uma osteoartrose, há algumas opções cirúrgicas. Entre os procedimentos, a condroplastia por abrasão, isolada ou associada à microfraturas do osso subcondral, tenta estimular a formação de um coágulo e a migração de células mesenquimais para formar um tecido cicatricial (Alford & Cole, 2005; Bittencourt, 2008). Esse tecido de reparo é, porém, uma fibrocartilagem, com maior concentração de colágeno tipo I, portanto diferente bioquímica e biomecanicamente da cartilagem hialina normal, com piora das suas características com o tempo, mesmo em modelos animais (Wei & Messner, 1999; Souza *et al.*, 2000; Sgaglione, 2005). Indica-se, também, o transplante autólogo de cilindros osteocondrais, conhecido como mosaicoplastia, de técnica difícil, alto custo, indicação limitada e com possível morbidade no sítio doador (Sgaglione, 2005; Haleem *et al.*, 2010). Mais recentemente, observa-se a utilização do transplante autólogo de condrócitos, no qual uma amostra de cartilagem é colhida do paciente e suas células cultivadas para, posteriormente, serem reimplantadas na lesão, contudo possui alto custo e os resultados ainda são muito discutidos na literatura (Costa *et al.*, 2001; Buckwalter, 2002; Alford & Cole, 2005; Sgaglione, 2005; Wasiak *et al.*, 2009; Haleem *et al.*, 2010). Por último, como procedimento de salvação, em pacientes mais

idosos e com grande perda de qualidade de vida, indica-se a prótese total de substituição.

Paralelo a isso, nos últimos anos, houve o aumento do uso do plasma rico em plaquetas (PRP) para o tratamento de diversos tipos de doenças na ortopedia, inclusive as lesões condrais (Foster *et al.*, 2009). Usa-se o PRP desde 1970, quando também se iniciaram os estudos acerca de sua eficácia. Primeiro fora utilizado na cirurgia bucomaxilofacial e agora ganha espaço na ortopedia e medicina esportiva.

O PRP é uma fração do plasma com alta concentração de plaquetas, rico em vários fatores de crescimento. Sua obtenção é minimamente invasiva, relativamente fácil do próprio paciente e de baixo custo (Bittencourt, 2008; Foster *et al.*, 2009).

Clinicamente é sugerido que o PRP deva conter aproximadamente um milhão de plaquetas por microlitro, ou até mais. No entanto encontram-se na literatura bons resultados mesmo com concentrações menores, sugerindo que esse valor pode variar dependendo do tecido onde vá ser aplicado (Kon *et al.*, 2011).

Diversos componentes presentes no PRP como fibrina, fibronectina, fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e fator de crescimento transformador-beta (TGF- β) fazem parte do processo natural da homeostase e da cicatrização dos tecidos, por terem a capacidade de estimular a proliferação celular, quimiotaxia de células tronco mesenquimais, diferenciação celular, remoção de debris,

angiogênese e depósito de matriz extracelular (Mehta & Watson, 2008).

Mishra *et al.* (2009) demonstraram *in vitro* que 10% de PRP não ativado têm alta capacidade de aumentar a proliferação de células tronco mesenquimais. Desta forma, a maior concentração destas proteínas bioativas, presentes no PRP, pode ter o efeito de melhorar e acelerar o processo de reparo (Sgaglione, 2005; Beca *et al.*, 2007; Mehta & Watson, 2008).

O uso de fatores de crescimento é útil na prática clínica porque promove uma rápida cicatrização com tecido de alta qualidade e permite retorno precoce, seguro e sem restrições às atividades desenvolvidas antes da lesão (Kon *et al.*, 2011).

O PRP pode ser manipulado na forma líquida ou gel por meio da adição de trombina ou, mais comumente, de cálcio. Dessa forma pode ser aplicado em lesões mais profundas (Bittencourt, 2008). A aplicação na forma de gel ainda tem a vantagem de prover um suporte adesivo que confina a secreção dos fatores de crescimento no local escolhido (Kon *et al.*, 2011).

Ao ser aplicado em lesões condrais de atletas, o PRP demonstrou bons resultados pelo suposto efeito de estimular a regeneração celular, bem como a síntese de proteínas e de fatores de crescimento (Foster *et al.*, 2009). Também já foi demonstrada sua capacidade de estimular a condrogênese de células tronco mesenquimais, a proliferação, diferenciação e adesão de condrócitos, além de aumentar a concentração de glicosaminoglicanas e a síntese

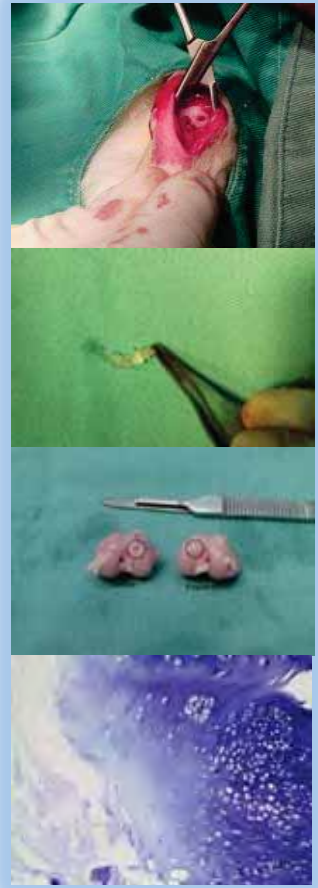
de colágeno tipo II, como diminuir a degradação da cartilagem (Foster *et al.*, 2009; Lopez-Vidriero *et al.*, 2010). Kon *et al.* (2011) em uma revisão de literatura, citam também o potencial do PRP de diminuir a fibrilação da cartilagem, a hipertrofia da membrana sinovial e a hemorragia.

Alguns trabalhos ainda mostram que o PRP tem capacidade de estimular a síntese óssea e diminuir a dor (Sanchez *et al.*, 2009; Lopez-Vidriero *et al.*, 2010), e que pode estimular a produção de ácido hialurônico intraarticular (Foster *et al.*, 2009; Sanchez *et al.*, 2009; Lopez-Vidriero *et al.*, 2010).

A literatura, no entanto, permanece muito pobre em trabalhos de qualidade com o uso do PRP em lesões condrais, pois há poucos artigos bem delineados, com resultados pré-clínicos e clínicos ainda controversos (Kon *et al.*, 2011)

Desta forma, o objetivo deste trabalho é tratar lesões ostecondrais da cartilagem articular do joelho com gel de PRP, utilizando como modelo experimental coelhos. A hipótese é de que as lesões tratadas terão uma qualidade superior de tecido cicatricial do que as lesões não tratadas.

Material e Métodos



2. Material e Métodos

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, segundo o protocolo número 717 (anexos).

Foram utilizados 30 coelhos albinos machos da raça Botucatu provenientes do laboratório experimental de cirurgia e ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, com idade mínima de três meses, pesando acima de 2Kg. Os animais foram alojados em sala apropriada e confinados em gaiolas metálicas individuais antes e depois do procedimento cirúrgico, alimentados com ração padrão e água *ad libitum*.

Primeiro foi coletado sangue de vários coelhos para preparo do plasma rico em plaquetas. Adicionou-se ao sangue 3,8% de citrato de sódio, para evitar sua coagulação. A mistura foi centrifugada (centrífuga FANEM[®]) a 1000 RPM por 10 minutos. Essa centrifugação resulta na separação de três camadas no tubo de ensaio: a camada inferior, composta por concentrado de hemácias; uma camada intermediária, composta de glóbulos brancos; e outra, superior, composta de plasma. A camada superior é separada e, então, novamente centrifugada por dez minutos a 3000 RPM para obtenção de duas frações: o plasma pobre em plaquetas (parte superior) e o plasma rico em plaquetas (parte inferior). O plasma rico em plaquetas é posteriormente ativado, um dia antes da cirurgia, pela adição de gluconato de cálcio e trombina humana.

2.1. Técnica cirúrgica:

Os animais são anestesiados pela via intramuscular com Virbac (Zoletil®) na dose de 15,0-30,0 mg/Kg de peso associado ao cloridrato de Xilazina (Anasedan®) a 2% na dose de 4 mg/Kg de peso. Após anestesia, os animais são submetidos à tricotomia da área cirúrgica, assepsia e antissepsia e colocação de campos cirúrgicos estéreis. Aplica-se anestésico local (xilocaína 2% sem vasoconstritor) no local da incisão. Procede-se, então, uma incisão para-patelar medial na pele e no tecido subcutâneo e depois no aparelho extensor. A patela é, daí, luxada para lateral. Com o joelho fletido, expõe-se o côndilo femoral medial que é perfurado com uma trefina, fazendo uma lesão de 3,5mm de diâmetro e 4,0mm de profundidade na área de carga de ambos os joelhos. O defeito é a seguir lavado com solução fisiológica estéril a 0,9% e no joelho esquerdo a lesão é preenchida com o gel de PRP (figuras 1 e 2). A lesão do joelho direito é deixada sem tratamento para servir como controle. Após isso, realiza-se a sutura da lesão, por planos, com fio de nylon 4.0.

Durante cinco dias, os animais recebem antibiótico Enrofloxacino (Baytril® 5%) por via subcutânea na dose de 0,1ml/Kg e 0,2mg/Kg de anti-inflamatório (meloxicam 0,2%) por via subcutânea, por dois dias.

Os animais foram submetidos à eutanásia com 180 dias de pós-operatório, com uma dose excessiva de pentobarbital sódico. Os

côndilos femorais foram, então, removidos e submetidos à análise macroscópica.

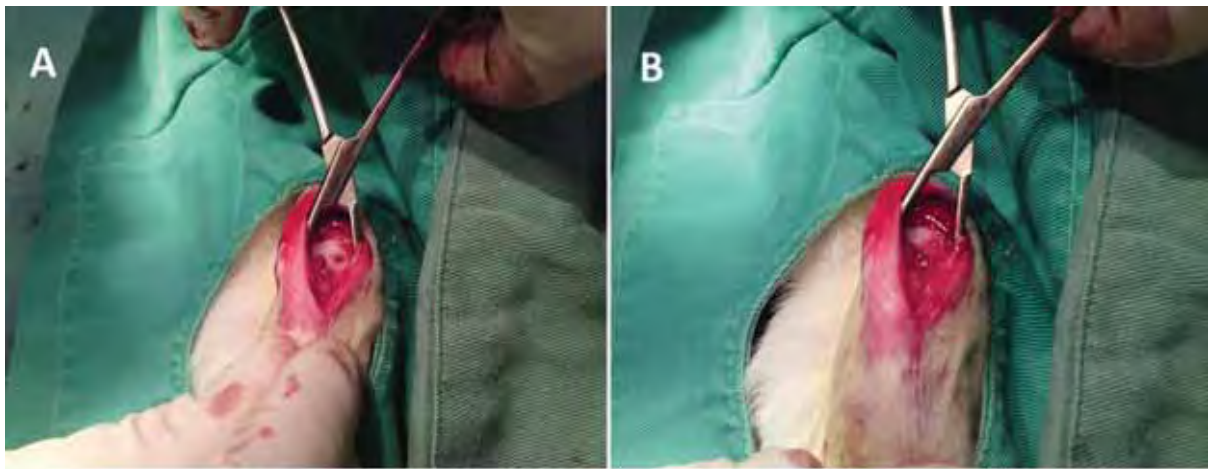


Figura 1- Aspecto da lesão condral antes (A) e depois (B) da aplicação do gel de plaquetas (fonte: arquivo pessoal)



Figura 2- Aspecto do gel de plaquetas antes de sua aplicação na lesão condral (fonte: arquivo pessoal)

A observação macroscópica foi classificada da seguinte forma:

Tipo I. Preenchimento total plano com cor semelhante ao normal;

Tipo II. Preenchimento total plano com cor diferente do normal;

Tipo III. Preenchimento parcial (depressão);

Tipo IV. Preenchimento parcial de aspecto avermelhado; e,

Tipo V. Erosão (exposição do osso subcondral).

Depois, as peças foram conservadas em solução tampão de formalina a 10% e enviadas para o Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, para análise histológica. Neste, após sua descalcificação, as peças foram cortadas e coradas com hematoxilina-eosina e com azul de toluidina. Cada peça foi avaliada por um morfolologista e classificada de acordo com a escala de graduação histológica descrita por Wakitani *et al.* (1994) (tabela 1). Para registrar as avaliações microscópicas, utilizou-se o analisador de imagens Leica Qwin Colour® (RGB) acoplado ao microscópio Leica® DM 2500.

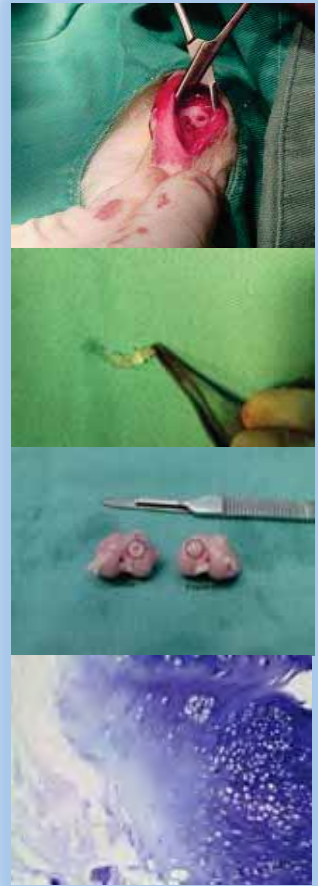
Para análise estatística foram utilizados os testes não paramétricos de Mann-Whitney e Wilcoxon, pelo software *SPSS Inc, version 15 (Chicago, IL)*, considerando estatisticamente significante quando $p < 0,05$.

Tabela 1: Escala de Graduação Histológica

Categoria	Pontos
Morfologia celular	
Cartilagem hialina	0
Maioria cartilagem hialina	1
Maioria fibrocartilagem	2
Maioria não cartilagem	3
Somente não cartilagem	4
Metacromasia	
Normal	0
Ligeiramente reduzida	1
Marcadamente reduzida	2
Sem metacromasia	3
Regularidade da superfície	
Lisa	0
Moderada	1
Irregular	2
Severamente irregular	3
Espessura da cartilagem*	
>2/3	0
1/3-2/3	1
<1/3	2
Integração com cartilagem adjacente	
Ambos os lados integrados	0
Um lado integrado	1
Nenhum lado integrado	2

*Espessura média do tecido de reparo comparado com a cartilagem normal ao redor

Resultados



3. Resultados

Foram operados 30 coelhos desde 15/05/2009 a 29/01/2010, com 15 óbitos, sendo 13 por infecção respiratória adquirida durante uma epidemia que acometeu o biotério e dois durante o procedimento cirúrgico. Dos 15 coelhos restantes, somente na peça do joelho direito do coelho 10 não foi possível realizar a avaliação microscópica por deficiência em sua descalcificação.

Os resultados da análise macroscópica evidenciaram clara tendência à melhor cicatrização no lado tratado (Gráfico 1 e Figura 3), quando comparado ao não tratado. Em uma peça do lado não tratado tivemos formação de cicatriz hipertrófica, e no lado tratado tivemos três. Já a presença de erosão, ou péssima cicatrização, foi mais evidente no lado não tratado.

Na análise histológica, quando consideramos os escores de cada critério em separado, tivemos diferença estatística para morfologia celular ($p=0,002$), regularidade da superfície ($p<0,001$), espessura condral ($p<0,02$) e integração lateral ($p<0,02$), com melhor resultado para o grupo tratado. Não houve diferença quanto à metacromasia ($p=0,063$). A diferença no escore total final apresentou significância estatística ($p<0,001$), também com melhor resultado no grupo tratado (Tabelas 2 e 3; Gráficos 2, 3, 4, 5, 6 e 7).

Amostras das lâminas avaliadas estão representadas nas figuras 4, 5, 6, 7, 8 e 9.

O coelho 21 respondeu, especialmente, com grande formação de tecido cicatricial no local da lesão, em ambos os lados. Porém, no lado tratado, esta cicatriz estava muito melhor organizada (figura 7).

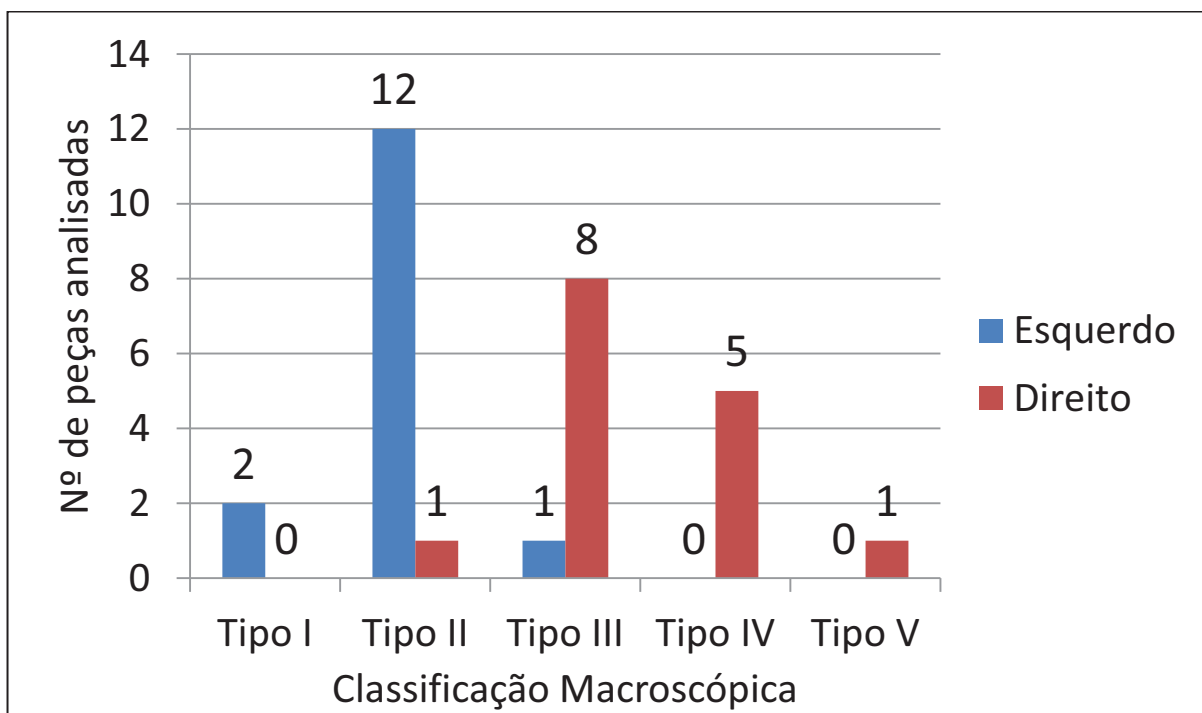


Gráfico 1: Classificação macroscópica do tipo de reparo de acordo com o lado



Figura 3- Aspecto macroscópico do tecido de cicatrização dos joelhos do coelho 2. Notar a deficiência de cicatrização no lado direito e a melhor aparência no esquerdo (fonte: arquivo pessoal)

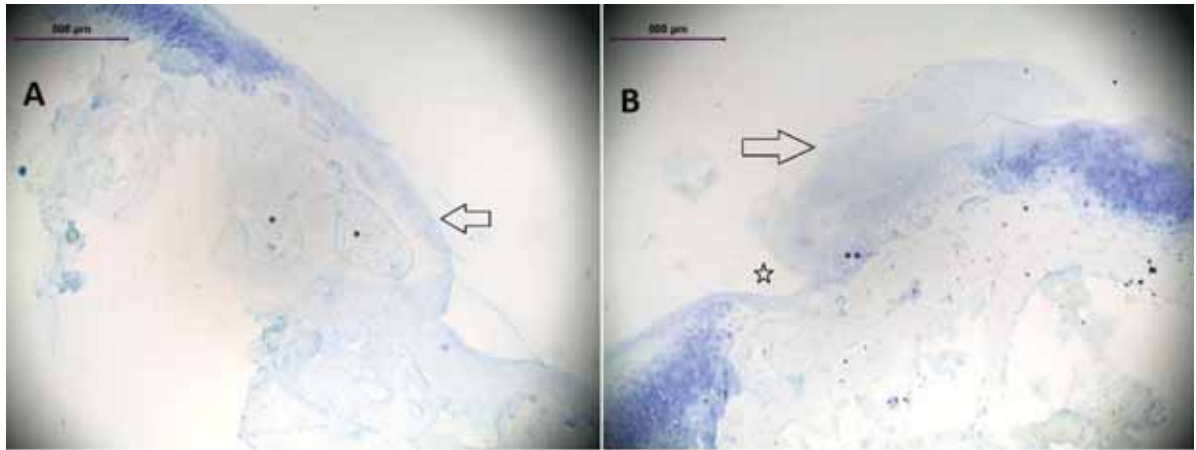


Figura 4- Aspecto histológico das lâminas do coelho número 2 coradas com azul de toluidina (aumento 4 vezes). A) Lado direito: notar degeneração gordurosa no tecido cicatricial (*) e presença de tecido predominantemente fibroso (seta menor); B) Lado esquerdo: maior presença de condrócitos (**), tecido cicatricial hipertrófico (seta maior) e deficiência de integração lateral (estrela) (fonte: arquivo pessoal)

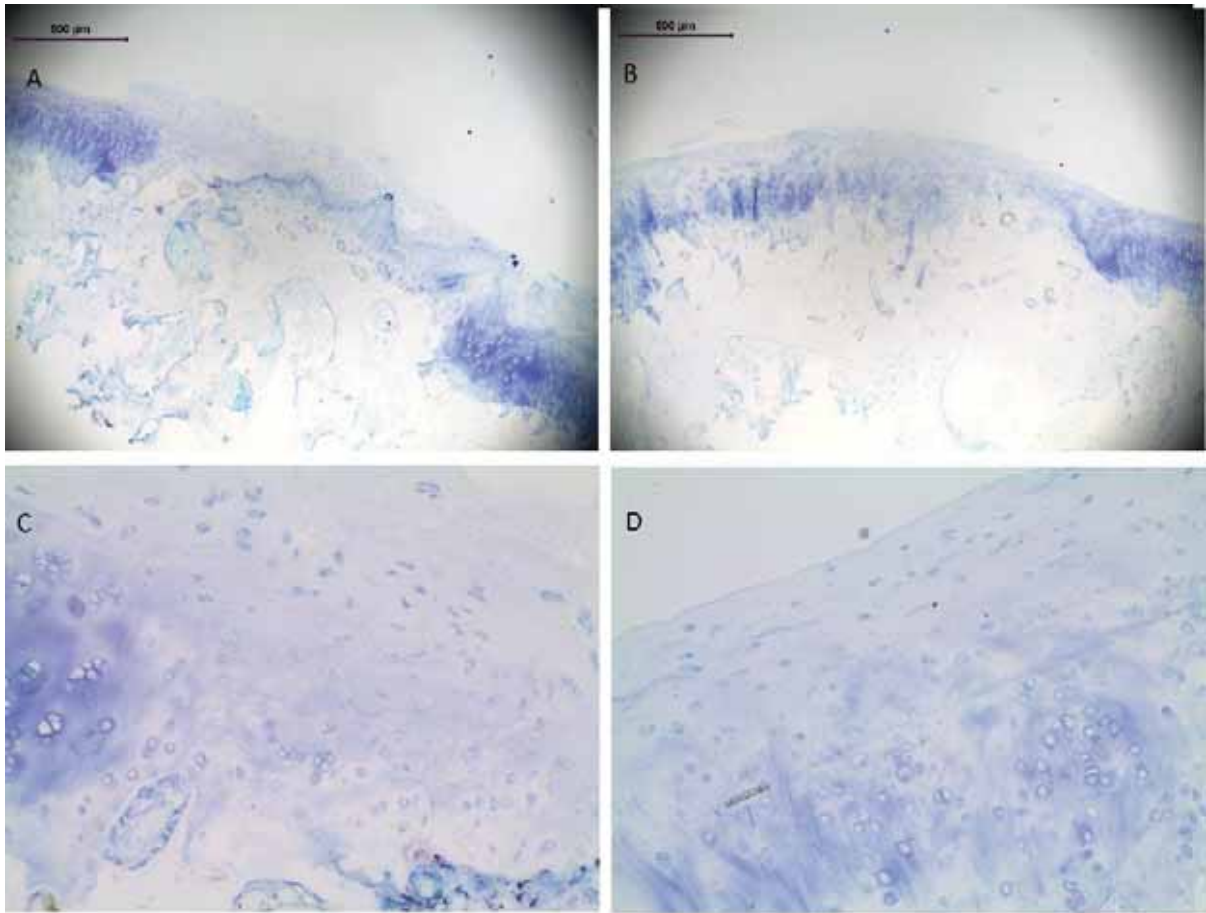


Figura 5- Aspecto histológico das peças do coelho 8, coradas com azul de toluidina. A) Joelho direito (aumento 4 vezes): notar tecido fibrocartilagenoso com superfície irregular; B) Joelho esquerdo (aumento 4 vezes): tecido mais cartilagenoso, melhor organizado e superfície mais lisa; C) Joelho direito (aumento 20 vezes): presença de maior quantidade de células alongadas (fibroblastos); D) Joelho esquerdo (aumento 20 vezes): presença de condrócitos em organização e superfície lisa (fonte: arquivo pessoal)

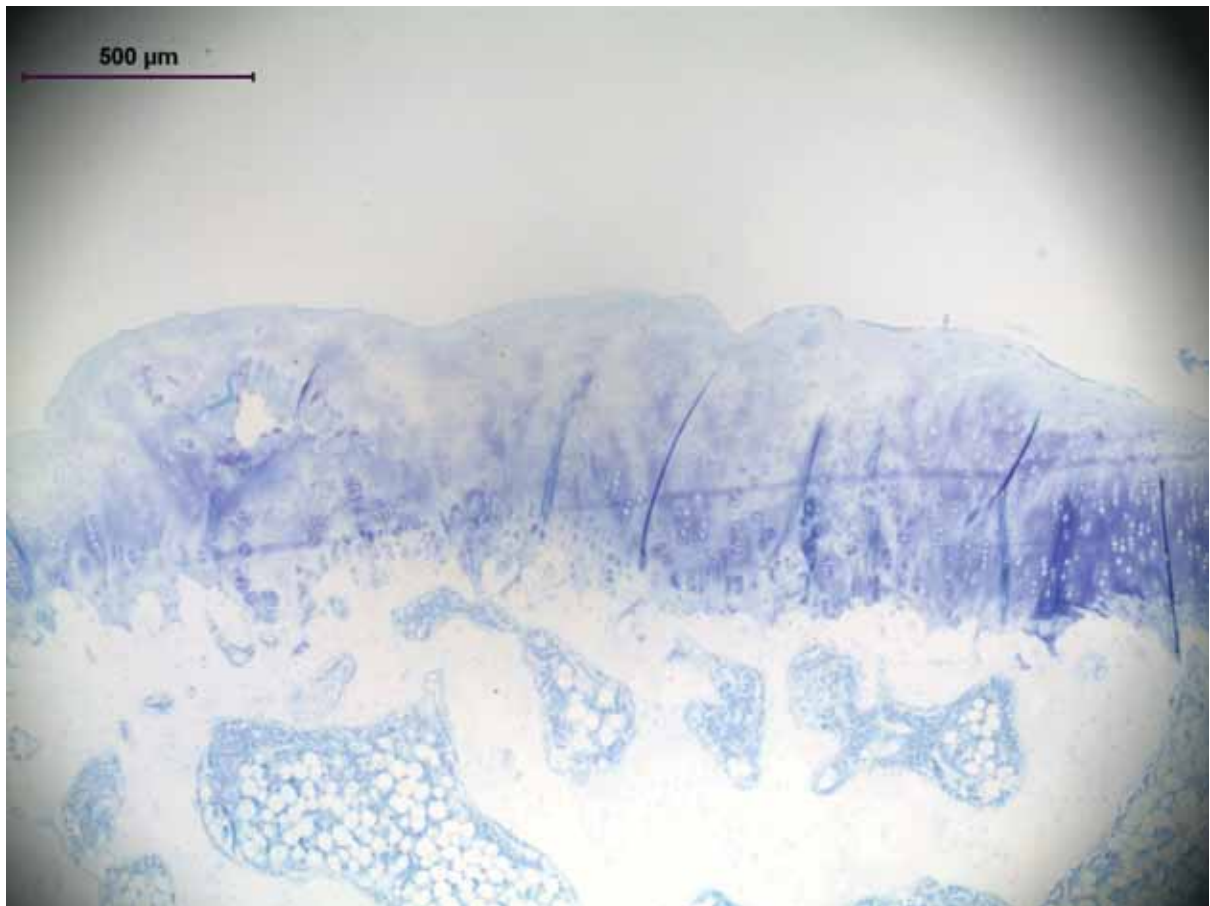


Figura 6- Aspecto histológico da lâmina do joelho esquerdo do coelho 7, corado com azul de toluidina (aumento 4 vezes). Observar o tecido cicatricial bem organizado (fonte: arquivo pessoal)

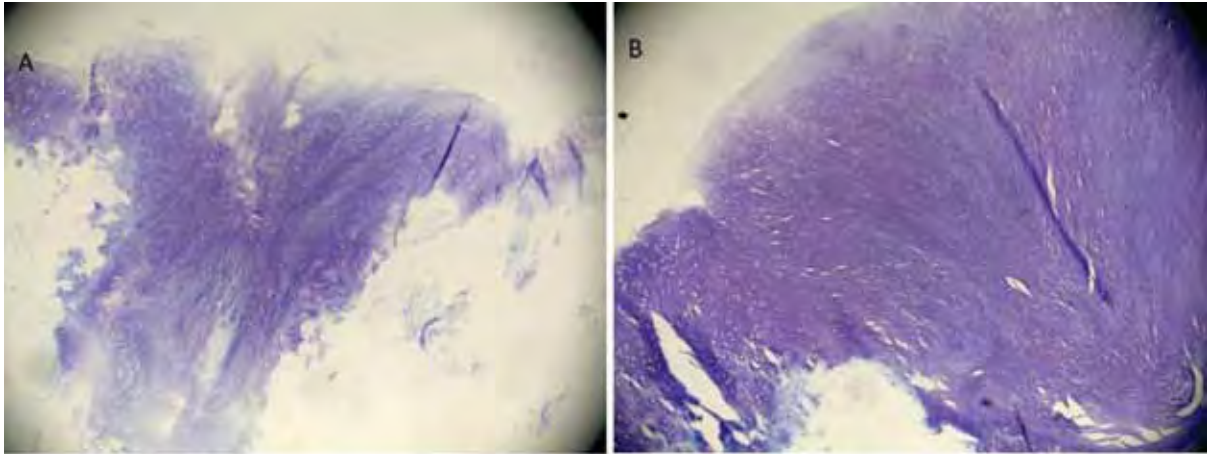


Figura 7- Aspecto histológico da lâmina do coelho 21, corado com azul de toluidina (aumento 4 vezes). A) Lado direito; B) Lado esquerdo. Observar a cicatriz profunda, com matriz exuberante e muitos condrócitos em ambos os lados, mas melhor organizada no lado esquerdo(B) (fonte: arquivo pessoal)



Figura 8- Aspecto histológico da lâmina do joelho direito do coelho 24 corada com azul de toluidina (aumento 4 vezes). Notar o tecido de cicatrização bem organizado, mas com superfície irregular e deficiência de integração nas laterais (fonte: arquivo pessoal)

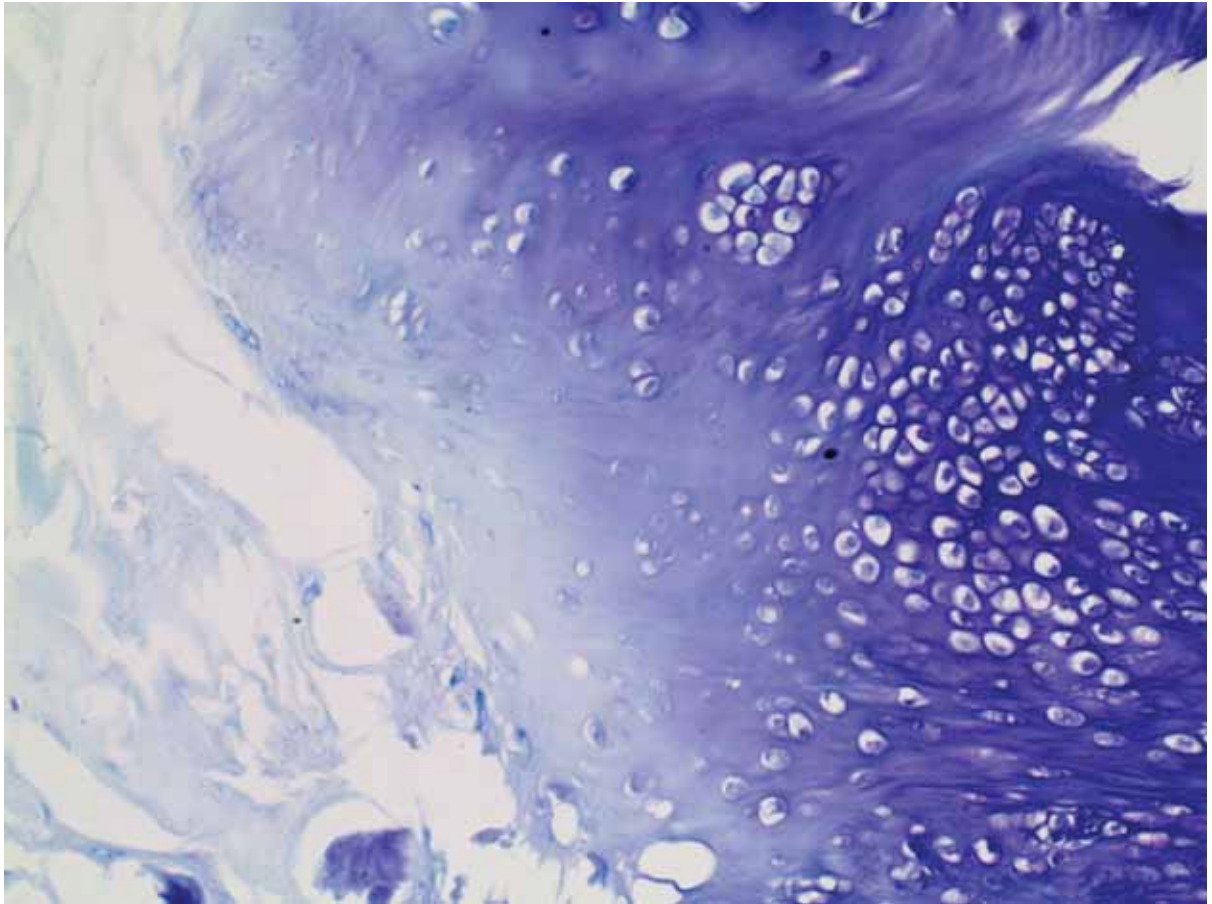


Figura 9- Aspecto histológico da lâmina do joelho esquerdo do coelho 20 corado com azul de toluidina (aumento 20 vezes). Observar a grande quantidade de condrócitos desorganizados no tecido de cicatrização (fonte: arquivo pessoal)

Tabela 2: Média e Desvio Padrão dos Escores histológicos do tecido de reparo do lado esquerdo (tratado)

	Escore					
	MC	M	RS	EC	IL	Total
Média	1,27	1,07	0,6	0,2	0,07	3,2
SD	0,7	0,6	0,63	0,41	0,26	1,78

MC= Morfologia celular, M= Metacromasia, RS= Regularidade da superfície, EC= Espessura da cartilagem, IL= Integração lateral e SD= Desvio Padrão.

Tabela 3: Média e Desvio Padrão dos Escores histológicos do tecido de reparo do lado direito (não tratado)

	Escore					
	MC	M	RS	EC	IL	Total
Média	2,43	1,71	1,86	1	0,64	7,64
SD	0,94	0,82	0,66	0,88	0,63	2,87

MC = Morfologia celular, M = Metacromasia, RS = Regularidade da superfície, EC = Espessura da cartilagem, IL= Integração lateral e SD= Desvio Padrão.

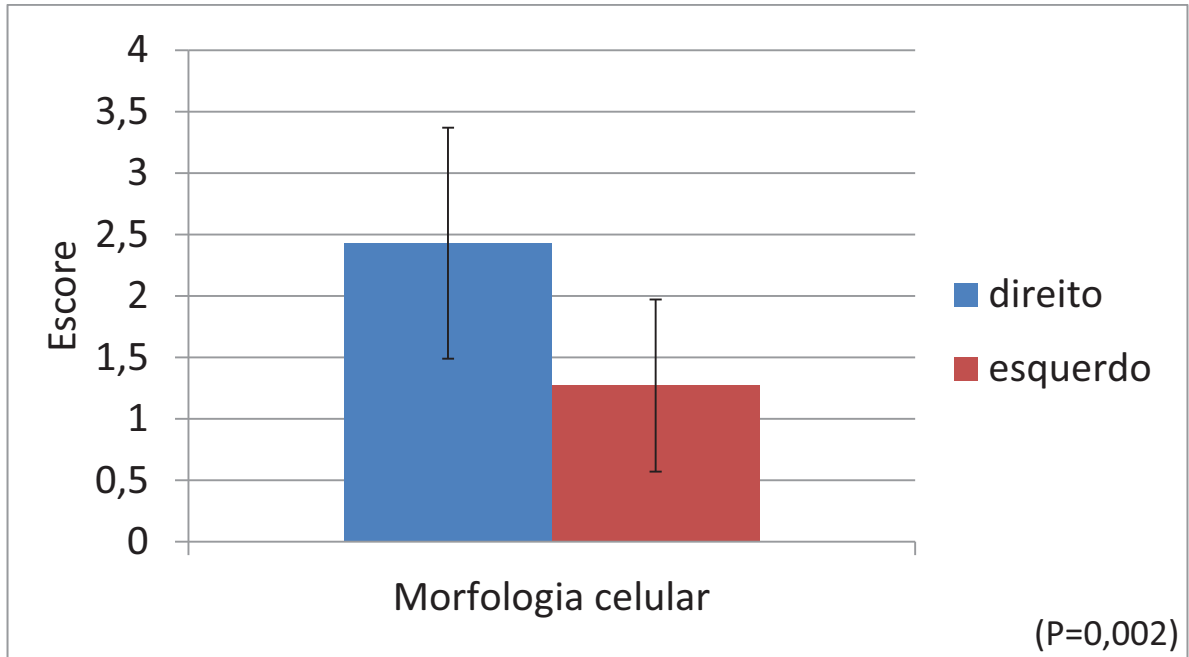


Gráfico 2: Média e desvio padrão do escore histológico da morfologia celular

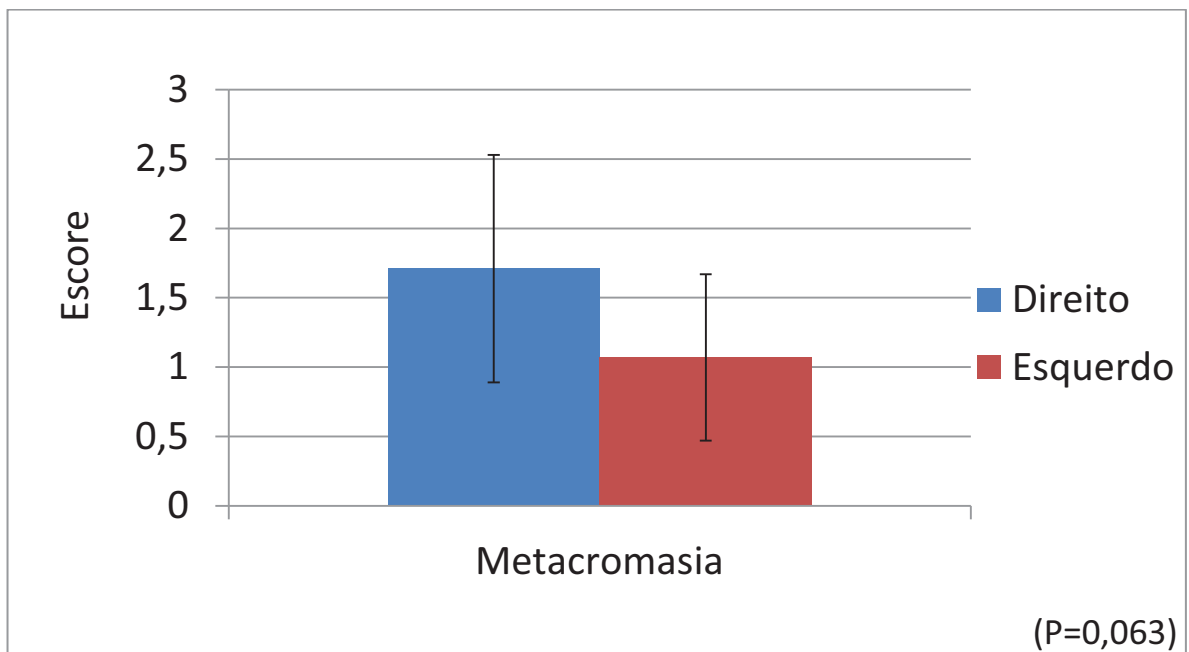


Gráfico 3: Média e desvio padrão do escore histológico da metacromasia

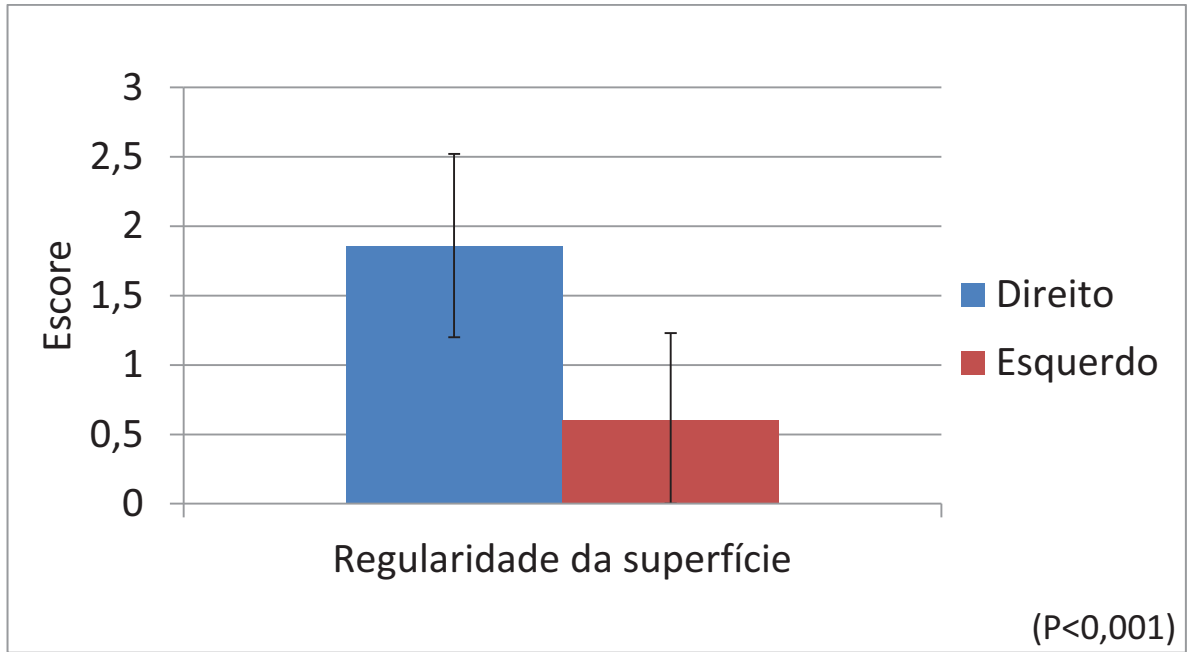


Gráfico 4: Média e desvio padrão do escore histológico da regularidade da superfície

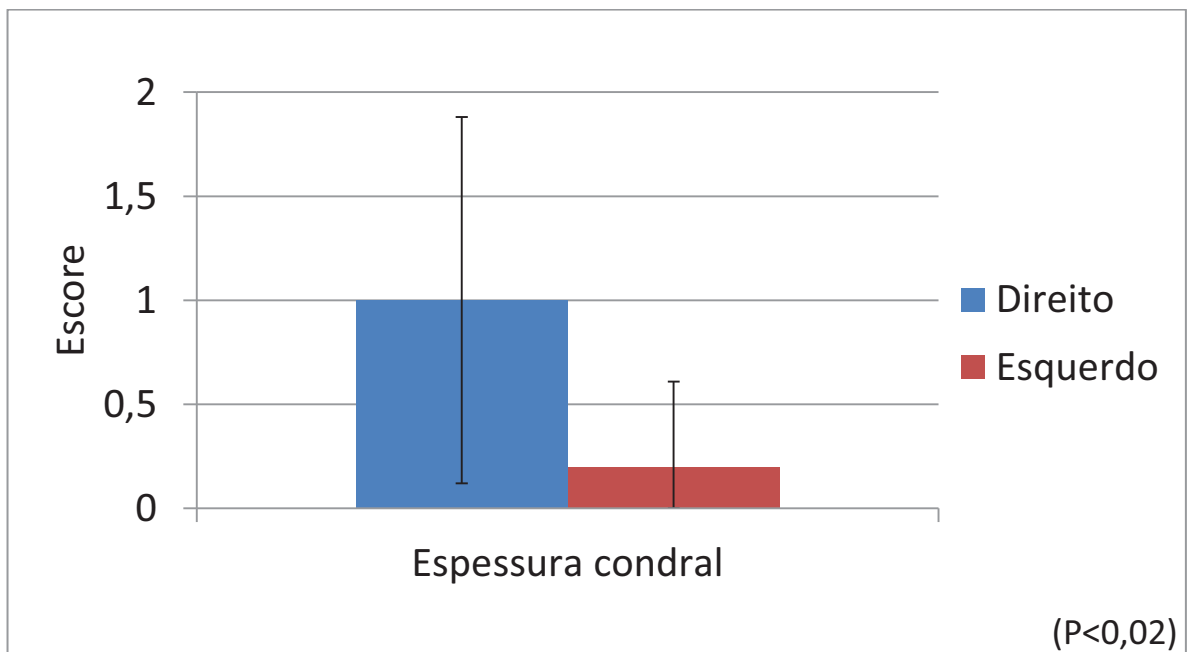


Gráfico 5: Média e desvio padrão do escore histológico da espessura condral

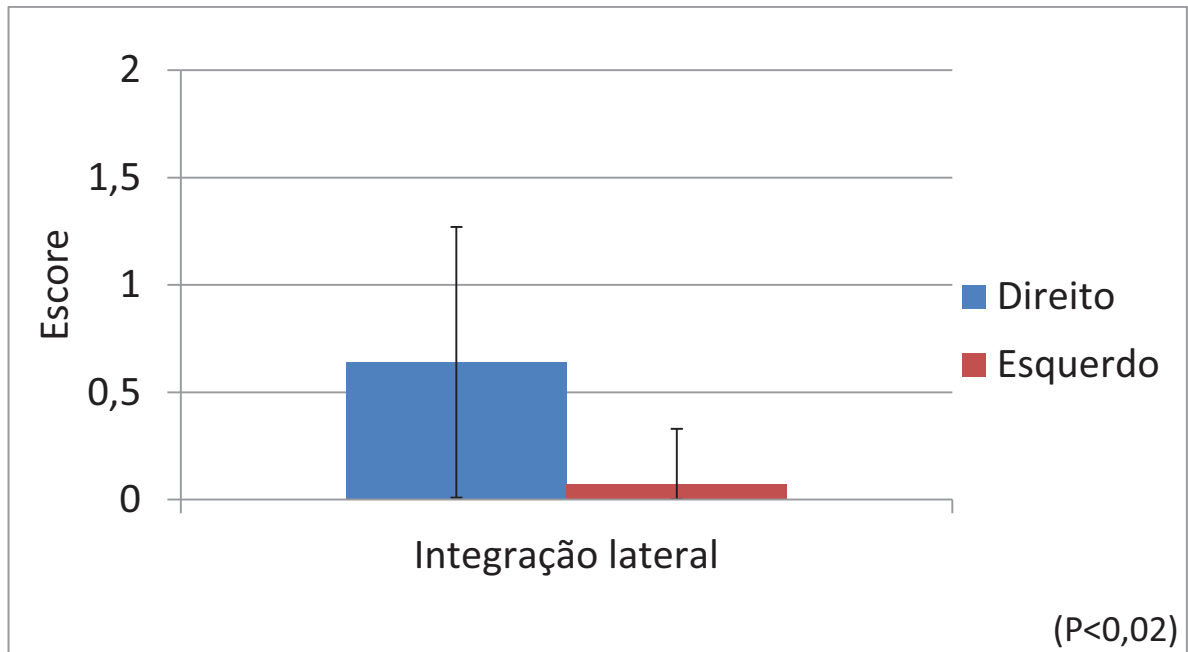


Gráfico 6: Média e desvio padrão do escore histológico da integração lateral

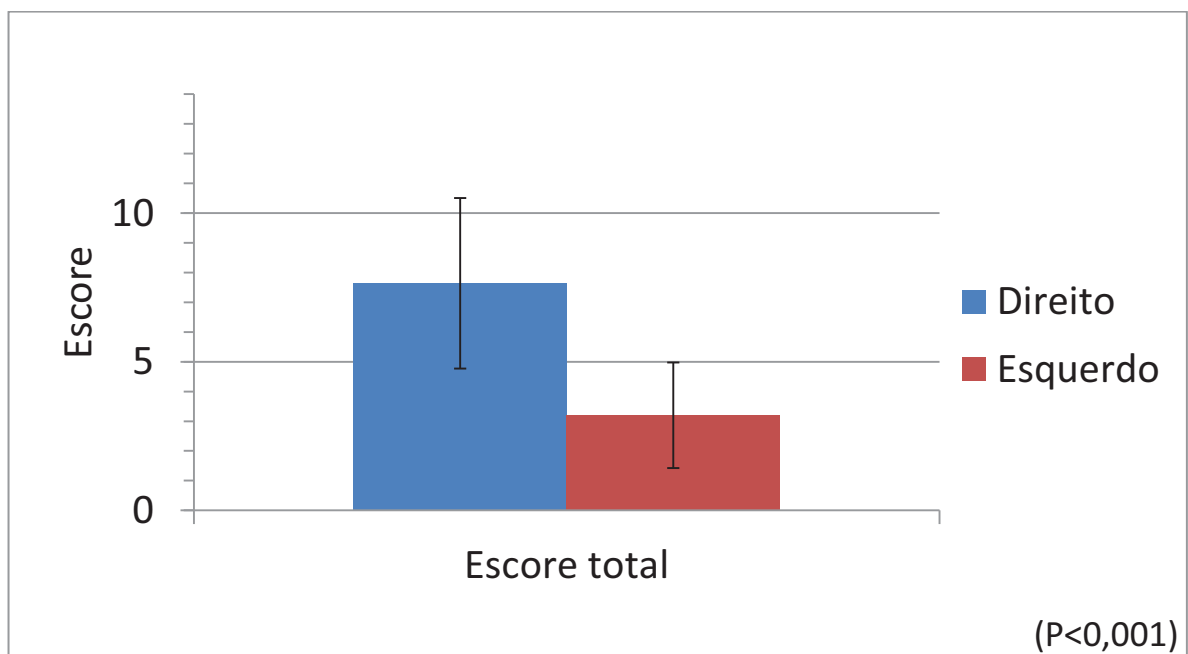
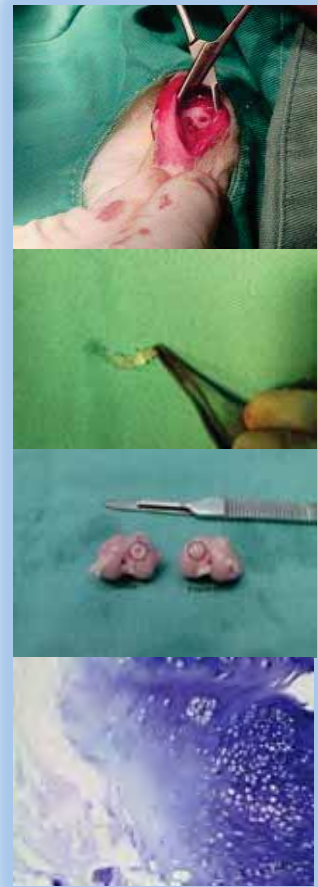


Gráfico 7: Média e desvio padrão do escore histológico total

Discussão



4. Discussão

Escolheu-se o coelho por ser um animal amplamente utilizado como modelo para estudo de reparos de lesão condral. Foram escolhidos coelhos adultos jovens e evitaram-se coelhos muito novos que poderiam ter um maior potencial de cicatrização (Fuller & Ghadially, 1972; Wei & Messner, 1999; Bhosale & Richardson, 2008). Optou-se por esperar seis meses para realizar a eutanásia a fim de se poder avaliar o reparo da lesão com um tempo mais longo. Buckwalter (2002) relata que o reparo condral e osteocondral está completo em seis semanas, mas a remodelação continua por meses e até anos. Desta forma, o tempo mínimo para análise deste reparo é de quatro a seis semanas, e os métodos que se mostram promissores no início precisam de uma avaliação após seis meses. Como Bittencourt (2008) mostrou uma boa evolução do reparo condral tratado com gel de plaquetas com 30, 60 e 90 dias, optou-se por aplicar o mesmo método de tratamento, mas com uma lesão maior e avaliação única com 180 dias, para checar a durabilidade desse tecido.

No trabalho de Bittencourt (2008) ora citado, foram realizadas lesões pouco menores às usadas neste experimento (2,0mm de diâmetro por 4,0mm de profundidade) e, em dois grupos, as lesões foram tratadas com gel de plaquetas com e sem condrócitos, comparando com dois grupos nos quais foi usado hidrogel de alginato com e sem condrócitos. Observou-se que o grupo só tratado com gel de plaquetas, sem condrócitos, já apresentou resultado melhor que o

hidrogel de alginato associado à condrócitos, com formação de tecido semelhante à cartilagem hialina com 90 dias de evolução. Este resultado estimulou a testar, em uma lesão maior, somente o gel de PRP, por ter menor custo, ser mais simples de se obter do que uma cultura de células condrais e já demonstrar resultados animadores.

O tamanho da lesão de 3,5mm de diâmetro foi escolhido por ser proporcionalmente grande para esse animal, que dificulta ainda mais a cicatrização, para poder mostrar o potencial de reparo do gel de PRP. Sabe-se que defeitos maiores que 3,0mm de diâmetro raramente cicatrizam, sem tratamento, em coelhos (Qi *et al.*, 2009). Quanto à profundidade, optou-se por 4,0mm, já que configura o tamanho adequado no intuito de atingir o osso subcondral, sem provocar destruição medular óssea (Ribeiro *et al.*, 2004; Martin-Hernandes *et al.*, 2010).

A graduação macroscópica e microscópica por pontuação permite uma melhor avaliação estatística dos resultados, porém pode estar sujeita a viés por ser examinador dependente. Tentou-se, todavia, diminuir este viés, pedindo a um morfolologista experiente, e sem vínculo com a pesquisa, que fizesse a análise das lâminas. Entretanto o desvio padrão apresentado pode ser considerado alto, mesmo tendo diferença estatística entre os grupos. Talvez uma amostra maior de casos pudesse compensar este viés.

O grupo tratado apresentou três casos de cicatrização hipertrófica, sendo que só um caso foi registrado no lado não tratado. Park *et al.* (2011) em um estudo de expressão gênica de condrócitos,

em cultura, associados a PRP, sugerem que esta cicatrização hipertrófica pode estar associada ao aumento da expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). Este problema poderia ser resolvido com o desenvolvimento de um PRP com menor expressão deste fator.

Sabemos que reparos biologicamente aceitáveis podem se formar em defeitos tratados ou não, e podem, até, ser indistinguíveis pela aparência macroscópica. Desta forma, a avaliação histológica permite a diferenciação destes tipos de reparos. No nosso caso, tanto a análise macroscópica quanto microscópica apresentaram diferenças estatisticamente significativas para melhor no grupo tratado.

Vários outros artigos utilizando modelos de lesão semelhantes em coelhos, mas tratando de forma e com materiais diferentes, obtiveram melhor resultado nos espécimes tratados (Costa *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.* 2004; Ozsoy *et al.*, 2009; Yan & Yu, 2007). Como exemplos temos Costa *et al.* (2001) com matriz óssea desmineralizada, Ribeiro *et al.* (2004) com transplante autólogo de cilindro osteocondral e Ozsoy *et al.* (2009) com bloco ósseo com cobertura de perióstio. Porém, assim como os nossos resultados, em nenhum caso houve a formação de cartilagem hialina em sua forma clássica nos tecidos de reparo. Wei & Messner (1999) demonstraram que mesmo tecidos de reparo com 80% de cartilagem semelhante à hialina apresentando um comportamento biomecânico inferior à cartilagem normal, tendem a deteriorar menos com o tempo.

Os mesmos Ozsoy *et al.* (2009) fazem uma observação interessante de que mesmo as lesões controle, deixadas sem tratamento, apresentam uma cicatrização macroscopicamente adequada, no entanto com uma alta atividade catabólica, quando comparadas com o grupo tratado. Supõe-se, desta forma, que o tratamento da lesão condral tem um potencial de aumentar a duração e função do tecido de reparo, mesmo se esse for um tecido fibrocartilaginoso. O PRP já teve comprovada a função de reduzir o catabolismo condral (Kon *et al.*, 2010) e inibir a apoptose de condrócitos submetidos a trauma (Rezende *et al.*, 2011), desempenhando, assim, papel importante também na duração do tecido de reparo.

Milano *et al.* (2010) realizaram o tratamento de lesões condrais em ovelhas com PRP gel ou liquido, associado ou não a microfraturas. O grupo tratado com PRP gel associado à microfraturas obteve os melhores resultados macroscópicos, histológicos e biomecânicos. Sem, entretanto, formação de cartilagem hialina em qualquer reparo.

Apesar da falta de formação de uma cartilagem hialina, ao observar os resultados dos escores, tivemos no grupo tratado uma maior presença de condrócitos, melhor regularidade da superfície, da espessura condral e melhor integração lateral nas bordas da lesão. Isso sugere que esse tecido de reparo, provavelmente, terá uma função mais semelhante à cartilagem hialina e com maior duração. Já quanto aos maus resultados da metacromasia, isto talvez demonstre uma

matriz mais deficiente, com menor quantidade de glicosaminoglicanas, mas que pode melhorar com o tempo com a produção de matriz pelos condrócitos.

Drengk *et al.* (2009) mostraram que condrócitos e células tronco mesenquimais de ovelhas cultivadas *in vitro*, com adição de PRP, apresentam uma proliferação celular até 67% maior que sem a adição desse. Porém, com redução da expressão do ácido ribonucléico (RNA) mensageiro para colágeno tipo II. A explicação sugerida é que o aumento da proliferação influencia negativamente a diferenciação celular, mas que isso poderia ser alterado pelo ambiente *in vivo*, após a proliferação celular chegar ao seu limite.

Yan & Yu (2007) realizaram o tratamento de lesões condrais em coelhos, semelhantes ao nosso modelo, mas tratando com células tronco mesenquimais, condrócitos, fibroblastos ou sangue de cordão umbilical de humanos em uma matriz de ácido poli-láctico (PLA). As análises macroscópica e histológica foram feitas com seis e 12 semanas. Os resultados do grupo tratado com células tronco mesenquimais foram os melhores, seguidos pelos resultados do grupo tratado com condrócitos. Estes últimos tiveram escore histológico médio semelhante ao nosso grupo tratado, e o grupo controle também obteve média semelhante. A avaliação macroscópica demonstrou também resultados semelhantes aos nossos. Isso pesa a favor da nossa técnica, por usarmos coelhos mais velhos e com análise com mais tempo (180 dias), pois os escores destes autores demonstraram ainda piora com o tempo. Talvez um modelo de tratamento com células

tronco mesenquimais, aplicadas com PRP, possa obter melhores resultados, o que já foi sugerido também por Qi *et al.* (2009).

Nesse trabalho de Qi *et al.* (2009), foi realizada uma lesão de 4,0mm de diâmetro e 3,00mm de profundidade na tróclea de cada um dos 38 coelhos do experimento. Esses animais foram divididos em três grupos, com 11 espécimes cada. Separaram-se, então, cinco coelhos para avaliação biomecânica. No grupo I, as lesões não foram tratadas. No grupo II, tratadas com matriz de colágeno e no grupo III, tratadas com PRP em uma matriz de colágeno. Os grupos foram subdivididos para avaliação das peças com seis e 12 semanas. Com seis semanas (42 dias), observou-se que o reparo do grupo I apresentava predomínio de tecido fibroso. Quanto aos grupos II e III, tecido fibroso associado a pouco tecido semelhante à cartilagem. Posteriormente, com 12 semanas (84 dias), o reparo do grupo I ainda apresentava predomínio de tecido fibroso. O do grupo II, maior quantidade de cartilagem semelhante à hialina que o grupo I e, finalmente, do grupo III, esta característica era ainda mais marcante. Concluiu-se dessa forma que o PRP tem papel positivo no processo de reparo da cartilagem.

Observamos, no entanto, que o uso da matriz de colágeno pode ter influência positiva nos resultados, como já foi citado antes. Qualquer tratamento em cartilagem tem resultado sobremaneira melhor do que o não tratar. Apesar dos defeitos terem diâmetro maior que o utilizado no nosso modelo experimental, as lesões foram realizadas na tróclea e não na área de carga do côndilo femoral medial

que, por suportar maior estresse mecânico, pode evoluir com uma cicatrização pior e apresentar degeneração com o tempo.

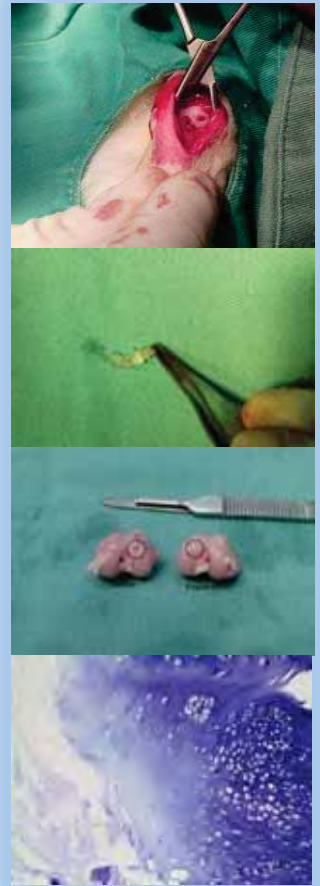
Sun *et al.* (2010) realizaram, por sua vez, um estudo com 16 coelhos adultos jovens, realizando uma lesão de 5,0mm de diâmetro e 4,0mm de profundidade na tróclea dos joelhos. Em um lado, tratou-se a lesão com uma matriz de ácido poli-láctico-glicólico (PLGA) e no outro joelho com PRP associado à matriz de PLGA. Foram feitas lesões em ambos os joelhos de oito coelhos para servir de controle sem tratamento. Subdividiram-se estes animais em dois grupos: o primeiro, avaliado com quatro semanas (28 dias) e o segundo, com 12 semanas (84 dias). Na avaliação macroscópica com quatro semanas os grupos tratados foram semelhantes e, por vezes, melhores que o grupo controle. Já com 12 semanas, o grupo controle desenvolveu um tecido de reparo irregular e avermelhado, o grupo tratado com PLGA tinha um tecido com aparência fibrocartilaginosa e o grupo PRP/PLGA mostrou o melhor tecido, com coloração branca e integrado ao tecido normal. Nossos resultados assemelham-se, a propósito, a este resultado macroscópico.

Já quanto à histologia, com quatro semanas, o grupo controle apresentou um tecido de reparo mais fibroso, o grupo PLGA, tecido fibroso associado a tecido imaturo e o grupo PRP/PLGA, tecido com maior presença de condrogênese e maior celularidade. Com 12 semanas, o grupo controle ainda apresentava maior presença de tecido fibroso, o grupo PLGA, fibrocartilagem com pouca matriz e o grupo PRP/PLGA, tecido semelhante à cartilagem hialina. Apesar de terem

feito uma lesão maior neste estudo, usou-se também uma matriz, neste caso de PLGA, que pode ter efeito positivo na cicatrização, e tal fato pode ser comprovado pelos resultados melhores no grupo PLGA, quando comparado ao grupo controle. O tempo de avaliação também foi menor que no nosso estudo, bem como a lesão fora realizada na tróclea; problemas já discutidos. Mas na avaliação histológica, separando por critérios, nossos resultados são semelhantes aos exibidos por esse trabalho, sugerindo que o uso de matriz pode não ser necessário, principalmente se trabalharmos com o plasma rico em plaquetas na forma de gel. Por este motivo pode-se afirmar, já que os resultados seguem um padrão semelhante em outros artigos, com certeza, que o PRP que tem um papel ativo essencial na melhor cicatrização do tecido condral.

Como falhas, em nossa pesquisa, podemos citar o grande número de óbitos de animais que poderia alterar a estatística, mas optamos por não incluir mais animais, porque nossos resultados apresentaram diferença com significância. Como já citado, o risco de viés na análise das lâminas foi compensado por avaliação das mesmas por uma pessoa experiente sem vínculo com o projeto. Poderíamos ter feito a imunohistoquímica para pesquisa de colágeno tipo II, mas, como os resultados já demonstraram diferença, descartou-se essa opção.

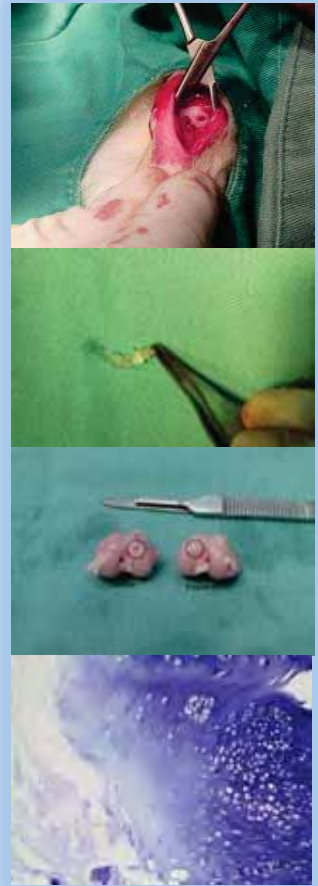
Conclusão



5. Conclusão

Com estes resultados podemos concluir que o reparo de lesões condrais em joelhos de coelhos, tratadas com gel de plaquetas, foram macroscópica e histologicamente melhores, com 180 dias de evolução, quando comparados com o mesmo tipo de reparo de lesão não tratada.

Bibliografía



6. Bibliografia

Alford JW, Cole BJ. Cartilage restoration, part 2. Techniques, outcomes, and future directions. *Am J Sports Med.* 2005; 33:443-460.

Aroen A, Loken S, Heir S, Alvik E, Ekeland A, Granlund OG, Engebretsen L. Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies. *Am J Sports Med.* 2004; 32:211-215.

Beca T, Hernández G, Morante S, Bascones A. Plasma rico en plaquetas. Una revisión bibliográfica. *Av Periodon Implantol.* 2007; 19:39-52.

Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull.* 2008; 87:77-95.

Bittencourt RAC. Cultura de condrocitos para uso terapêutico: reconstituição de cartilagem [Tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2008.129f.

Buckwalter JA. Articular cartilage injuries. *Clin Orthop Relat R.* 2002; 402:21-37.

Costa AJF, Oliveira CRGCM, Leopizzi N, Amatuzzi MM. O uso da matriz óssea desmineralizada na reparação de lesões osteocondrais. Estudo experimental em coelhos. *Acta Ortop Bras.* 2001; 9:27-38.

D’Lima DC, Colwell Jr CW. Clinical objectives for cartilage repair. *Clin Orthop Relat R.* 2001; 391S:S402-S405.

Drengk A, Zapf A, Sturmer EK, Sturmer KM, Frosch KH. Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs.* 2009; 189:317-326.

Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo AS. Platelet-rich plasma – from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med.* 2009; 37:2259-2272.

Fuller JA, Ghadially FN. Ultrastructural observations on surgically produced partial-thickness defects in articular cartilage. *Clin Orthop Relat R.* 1972; 86:193-205.

Haleem AM, El Singergy AA, Sabry D, Atta HM, Rashed LA, Chu CR, El Shewy MT, Azzam A, Aziz MTA. The Clinical Use of human culture-expanded autologous bone marrow mesenchymal stem cells transplanted on platelet-rich fibrin glue in the treatment of articular

cartilage defects: a pilot study and preliminary results. *Cartilage*. 2010; 1:253-261.

Kon E, Buda R, Filardo G, Di Martino A, Timoncini A, Cenacchi A, Fornasari PM, Giannini S, Marcacci M. Platelet-rich plasma: intra-articular knee injections produced favorable results on degenerative cartilage lesions. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2010; 18:472-479.

Kon E, Filardo G, Di Martino A, Marcacci M. Platelet-rich plasma (PRP) to treat sports injuries: evidence to support its use. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2011; 19:516-527.

Lopez-Vidriero E, Goulding KA, Simon DA, Sanchez M, Johnson DH. The use of platelet-rich plasma in arthroscopy and sports medicine: optimizing the healing environment. *Arthroscopy*. 2010; 26:269-278.

Martin-Hernandes C, Cebamanos-Celma J, Molina-Ros A, Ballester-Jimenez J, Ballester-Soleda J. Regenerated cartilage produced by autogenous periosteal grafts: a histologic and mechanical study in rabbits under the influence of continuous passive motion. *Arthroscopy*. 2010; 26:76-83.

Mehta S, Watson JT. Platelet rich concentrate: Basic science and current clinical applications. *J Orthop Trauma*. 2008; 22:433-438.

Milano G, Passino ES, Deriu L, Careddu G, Manunta L, Manunta A, Saccomanno MF, Fabbriciani C. The effect of platelet rich plasma combined with microfractures on the treatment of chondral defects: an experimental study in a sheep model. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010; 18:971-980.

Mishra A, Tummala P, King A, Lee B, Kraus M, Tse V, Jacobs CR. Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009; 15:431-435.

Ozsoy MH, Aydogdu S, Taskiran D, Sezak M, Hayran M, Oztop F, Ozsoy A. The effects of early or late treatment of osteochondral defects on joint homoeostasis: an experimental study in rabbits. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2009; 17:578-589.

Park SI, Lee HR, Kim S, Ahn MW, Do SH. Time-sequential modulation in expression of growth factors from platelet-rich plasma (PRP) on the chondrocyte cultures. *Mol Cell Biochem*. Publicado online em 29 de setembro de 2011. DOI 10.1007/s11010-011-1081-1.

Qi YY, Chen X, Jiang YZ, Cai HX, Wang LL, Song XH, Zou XH, Ouyang HW. Local delivery of autologous platelet in collagen matrix simulated in situ articular repair. *Cell Transplant*. 2009; 18:1161-1169.

Rezende MU, Silva RBB, Bassit ACF, Tatsui NH, Sadigursky, Neto RB. Efeito do plasma rico em plaquetas na apoptose pós-traumática de condrócitos. *Acta Ortop Bras*. 2011; 19:102-105.

Ribeiro JL, Camanho GL, Takita LC. Estudo macroscópico e histológico de reparos osteocondrais biologicamente aceitáveis. *Acta Ortop Bras*. 2004; 12:16-21.

Sanchez M, Anitua E, Orive G, Mujika I, Andia I. Platelet-rich therapies in the treatment of orthopaedic sport injuries. *Sports Med*. 2009; 39:345-354.

Sgaglione NA. Biologic approaches to articular cartilage surgery: future trends. *Orthop Clin North Am*. 2005; 36:485-495.

Souza TD, Del Carlo RJ, Vitoria MIV. Avaliação histológica do processo de reparação da superfície articular de coelhos. *Cienc Rural*. 2000; 30:439-444.

Sun Y, Feng Y, Zhang CQ, Chen SB, Cheng XG. The regenerative effect of platelet-rich plasma on healing in large osteochondral defects. *Int Orthop*. 2010; 34:589-597.

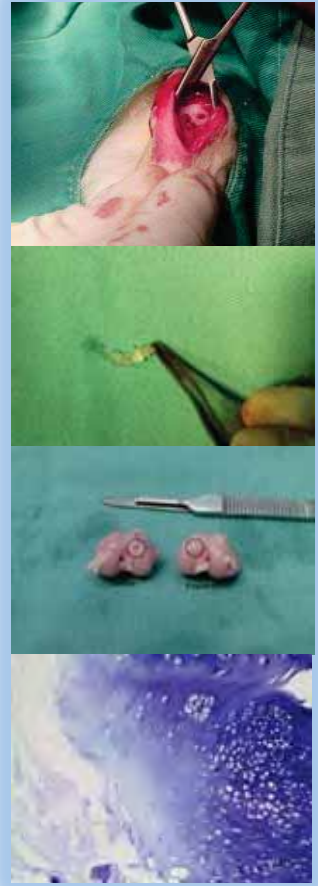
Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone joint Surg Am*. 1994; 76:579-592.

Wasiak J, Clar C, Villanueva E. Autologous cartilage implantation for full thickness articular cartilage defects of the knee. Cochrane Database of Systematic Reviews, In *The Cochrane Library*, Issue 3, 2009. Art N° CD003323.DOI:10.1002/14651858.CD003323.pub4.

Wei X, Messner K. Maturation-dependent durability of spontaneous cartilage repair in rabbit knee joint. *J Biomed Mater Res*. 1999; 46:539-548.

Yan H, Yu C. Repair of full-thickness cartilage defects with cells of different origin in a rabbit model. *Arthroscopy*. 2007; 23:178-187.

Anexos





Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Dálmato Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.

CEP: 16.018-970

Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143

e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99



Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 717 sobre o Projeto de Pesquisa "Tratamento das lesões osteocondrais do joelho com gel de plaquetas", a ser conduzido pelo Dr. Marcus Vinicius Danieli, orientado pelo Prof. Doutor Hamilton da Rosa Pereira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva que os "coelhos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de certificar a sanidade dos mesmos.

Projeto de Pesquisa Aprovado em 12 de fevereiro de 2.009


Prof. Drª Regina Helena G. Martins
Presidente da CEEA


Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99



Comissão de Ética em Experimentação Animal

Botucatu, 15 de dezembro.

Of. 32/11-CEEA

Ilustríssima Senhora
Prof.ª. Dr.ª. Elenice Deffune
Divisão de Hemocentro da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Dr.ª. Elenice,

Informo que o Projeto de Pesquisa "Tratamento de lesões osteocondrais do joelho com gel de plaqueta", conduzido por Marcus Vinicius Danieli, teve sua orientação alterada do Prof. Dr. Hamilton da Rosa Pereira para Vossa Senhoria. O título do projeto também foi alterado para "Tratamento das lesões osteocondrais do joelho pela aplicação do gel de plaquetas", para melhor adequação na língua portuguesa.

Atenciosamente,

Prof.ª. Dr.ª. Maria Rosa Bet Moraes Silva
Presidente da CEEA