

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
tese será disponibilizado
somente a partir de 25/02/2024.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

USO AUTÓLOGO E XENÓLOGO DA FIBRINA RICA EM
PLAQUETAS EM ÚLCERAS DE CÓRNEA EM COELHOS
(*Oryctolagus cuniculus*)

LENISE GARBELOTTI GONÇALVES

Botucatu, São Paulo
maio de 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

USO AUTÓLOGO E XENÓLOGO DA FIBRINA RICA EM
PLAQUETAS EM ÚLCERAS DE CÓRNEA EM COELHOS
(*Oryctolagus cuniculus*)

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-graduação em Biotecnologia
Animal para obtenção do título de
Doutor.

Lenise Garbelotti Gonçalves

Orientador: Profa. Assoc. Cláudia
Valéria Seullner Brandão

Botucatu, São Paulo
maio de 2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Gonçalves, Lenise Garbelotti.

Uso autólogo e xenólogo da fibrina rica em plaquetas em
úlceras de córnea em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) / Lenise
Garbelotti Gonçalves. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia

Orientador: Cláudia Valéria Seullner Brandão

Capes: 50501003

1. Materiais biomédicos. 2. Córnea. 3. Cicatrização.
4. Plasma rico em plaquetas. 5. Fatores de crescimento de
fibroblastos. 6. Fatores de crescimento transformadores.

Palavras-chave: Biomaterial; Cicatrização corneal;
Concentrado de plaqueta; Fatores de crescimento.

Nome do autor: Lenise Garbelotti Gonçalves

USO AUTÓLOGO E XENÓLOGO DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS EM
ÚLCERAS DE CÓRNEA EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)

Data da Defesa 25 de fevereiro de 2022

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Assoc. Cláudia Valéria Seullner Brandão

Presidente e Orientadora

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal
FMVZ, UNESP, Botucatu, SP

Profa. Titular Sheila Canevese Rahal

Membro titular

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal
FMVZ, UNESP, Botucatu, SP

Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves

Membro titular

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal
FMVZ, UNESP, Botucatu, SP

MV. Dra. Cintia Sesso Perches

Membro titular

Médica Veterinária Autônoma
Piracicaba, SP

MV. Dra. Micaella Gordon Gandolfi

Membro titular

Médica Veterinária Autônoma
Itu, SP

DEDICO esse trabalho, com carinho e gratidão, aos meus amados pais Marlete e Laerte Gonçalves.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**. Obrigada por sustentar minha fé.

À minha orientadora **Professora Cláudia Valéria Seullner Brandão**, pela confiança e oportunidade da realização deste trabalho, pela paciência e principalmente pelos ensinamentos transmitidos.

Aos Professores **Cláudia Helena Pellizon** e **Carlos Roberto Padovani** pela contribuição preciosa neste trabalho.

A equipe do serviço de oftalmologia **Inajara Nakamura Hirota, Letícia de Andrade Ramos, Annalu Pinton Ferreira, Mariana de Sessa, Mayara Chagas, Luís Felipe Reiter, Juliana Bardella, Caroline Geraldi e Juliana Marques**. A seu modo, todos vocês me ajudaram e ensinaram muito. Sem o apoio de vocês eu não teria chegado até aqui. Agradeço de coração toda paciência. Torço pelo sucesso de todos.

À **Carolina Hagy Giroto** por ter aceitado participar dessa jornada, obrigada pelo apoio com as anestésias no projeto.

A todos os meus familiares, em especial aos meus pais, **Marlete A. Garbelotti Gonçalves** e **Laerte Gonçalves**, e irmãos **Louise G. Gonçalves** e **Leonardo G. Gonçalves**, que sempre me incentivaram e estiveram ao meu lado em todas minhas escolhas.

Este trabalho, em pleno ano de pandemia, eu não poderia deixar de enaltecer minha querida psicóloga **Letícia F. Mistreta Benine**, por me orientar durante todo esse processo, pelas conversas e ensinamentos.

Ao **CEMPAS**, em especial à **Mariana, Raphael e Luna**, por toda ajuda e ensinamentos com os coelhos.

Ao **Dr. Paulo** do Biotério que prontamente nos ajudou no projeto, com dicas de manejo e contenção, além da marcação dos animais. E também ao **Marcos** da Conicultura, pela ajuda com os coelhos.

Aos funcionários do Hospital Veterinário da UNESP – Campus Botucatu/SP: **Kelly, Clara, Léo, Edi, José e Evandro**, pelo auxílio tanto nos projetos quanto na parte dos atendimentos no setor da Oftalmo.

Este ano apoio de amigos se fez em sua maioria a distância, mas alguns se fizeram presentes. Então também não posso deixar de agradecer a amizade

e companheirismo da **Letícia de Andrade Ramos** e **Daniel Tozadore**. Obrigada pelas conversas, desabafos, pelo apoio e compreensão.

Um agradecimento especial a equipe da seção técnica de pós-graduação, todos sempre prontamente dispostos a sanar dúvidas e ajudar.

Eu não teria chegado até aqui sem passar pelo mestrado, então não poderei deixar de enaltecer pessoas que de alguma forma estiveram presentes nesta jornada acadêmica. As minhas irmãs de república **Micaella G. Gandolfi**, **Anna Clara B. Hussein**, **Mariana F. Borges**, **Amanda Bega**, **Amanda Ilkiu** e **Bárbara Correia**. Agradeço com todo meu amor, pelo lar que me propuseram.

As amigas **Camila Debastiani**, **Viviane Codognoto** e **Isis Pincella** pela amizade que prevaleceu. Ao **Dr. Carlos Alberto Jorge**, obrigada por todo ensinamento e preciosas sugestões fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho e também à **Ana Amábil Heloísa Barros**, por toda paciência e ajuda disponibilizada, acompanhadas do seu carisma.

Ao **Professor José Joaquim Tilton Ranzani**, por todos os ensinamentos e por estar sempre disposto a compartilhar.

Aos animais do meu projeto minha eterna gratidão pelo aprendizado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“As esquinas que eu dobrei, quando deram errado, depois eu agradei ter
dar errado, porque adiante deu tudo certo. E também aprendi isso na vida, às vezes
você se queixa de algo que não foi... calma, daqui a pouco a vida reverte aqui”.*
Fernanda Montenegro

GONÇALVES, L. G. **Uso autólogo e xenólogo da fibrina rica em plaquetas em úlceras de córnea em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)**. 2022. 74p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2022.

RESUMO

A membrana de fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) é um biomaterial com potencial regenerativo proveniente de preparo rápido e simples do sangue. Este trabalho descreveu o uso de membrana autóloga e xenóloga de L-PRF em úlceras corneais profundas induzidas em coelhos; correlacionando achados clínico-oftalmológicos, histomorfométricos e imuno-histoquímico. Foram selecionados 28 coelhos adultos saudáveis, e o olho direito submetido à indução de úlcera de córnea profunda e tratamento com membrana L-PRF xenóloga de cães, fixada na conjuntiva bulbar. Constituíram-se dois grupos experimentais (n=14), designados: grupo um (G1), tratado apenas com a membrana L-PRF xenóloga; e o grupo dois (G2), cujos olhos receberam adicionalmente membrana autóloga de L-PRF previamente no leito da úlcera. Os animais foram avaliados por exame oftalmológico antes da cirurgia e aos quatro (M4), sete (M7), 14 (M14) e 30 (M30) dias de pós-operatório, bem como a análise histomorfométrica da córnea no M30. Cinco animais de cada grupo em M4, foram submetidos apenas à avaliação histomorfométrica e imunohistoquímica para fator de crescimento transformador $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) e fator de crescimento de fibroblastos básico (FGF-2). Os resultados das avaliações clínico-oftalmológicas, histomorfométrico e imunohistoquímico foram similares entre os grupos na maioria das variáveis analisadas. Inflamação discreta e ausência de vascularização corneal foram observadas; a reparação total da lesão verificou-se no M14 com discreta opacidade corneal nos dois grupos. No G2, notou-se absorção mais lenta das membranas na fase inicial, bem como, maior expressão de TGF- $\beta 1$ no epitélio. No M30, na área da lesão, o número de camadas epiteliais e espessura do epitélio foram significativamente maiores, similar à córnea íntegra nos dois grupos. Verificou-se, entretanto, que a redução da área da lesão foi superior no G1 no período inicial (M7). A metodologia do G2 poderá favorecer o uso clínico da membrana autóloga; considerando necessidade de menor volume de sangue autólogo coletado, promovendo sua instituição em animais de pequeno porte. A aplicação cirúrgica da membrana de L-PRF xenóloga e/ou associada à autóloga é exequível e prática, promove a cicatrização de úlceras profundas, e apresenta-se como alternativa viável na clínica oftalmológica.

Palavras-chaves: Biomaterial; cicatrização corneal; concentrado de plaqueta; fator de crescimento de fibroblastos (FGF); fator de crescimento transformador (TGF).

GONÇALVES, L.G. **Autologous and xenogeneic use of platelet-rich fibrin in corneal ulcers in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*)**. 2022. 74p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2022.

ABSTRACT

Platelet and leukocyte-rich fibrin (L-PRF) is a biomaterial made from blood that presents regenerative potential and quick and simple preparation. This study describes the use of autologous and/or xenologous L-PRF membrane in deep induced corneal ulcers in rabbits; correlating clinical-ophthalmological, histomorphometric, and immunohistochemical findings. Twenty-eight healthy adult rabbits were selected. A deep corneal ulcer was induced and the animals were divided into two groups (n = 14): overlay group (G1) was treated with an overlay xenologous L-PRF membrane made from dog blood, fixed in the bulbar conjunctiva; inlay group (G2) received autologous L-PRF inlay and an overlay xenologous L-PRF membrane. The animals were evaluated on M0, before surgery, and on M4, M7, M14, and M30 days postoperatively as well the histomorphometric analysis of the cornea in the M30. In M4, five animals from each group were submitted to the histomorphometric and immunohistochemical evaluation of transforming growth factor- β (TGF- β 1) and fibroblast growth factor (FGF-2). The results of the clinical-ophthalmological, histomorphometric, and immunohistochemical evaluations were similar between the groups in most of the variables analyzed. Mild inflammation and low corneal vascularization were observed; complete repair of the lesion was observed in M14 with a minor corneal opacity in both groups. In G2, slower absorption of membranes was observed in the initial phase, as well as greater expression of TGF- β 1 in the epithelium. In M30, area of the lesion, the number of epithelial layers and the thickness of the epithelium were significantly higher, similar to the intact cornea in both groups. However, the reduction of the lesion area was superior in G1 in the initial period (M7). The G2 methodology may favor the clinical use of the autologous membrane; considering the need for a smaller volume of autologous blood collected, promoting its institution in small animals. The surgical application of xenologous and/or associated with autologous plug L-PRF membrane is feasible and practical, promotes the healing of deep ulcers, and presents itself as a viable alternative in the ophthalmic clinic.

Keywords: Biomaterial; corneal healing; FGF; PRF; platelet concentrate; TGF- β .

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis clínicas analisadas nos diferentes grupos experimentais e, momentos de avaliação, em dias.	42
Tabela 2. Escores observados considerando a reabsorção de membrana de PRF, redução da área da lesão e teste de fluoresceína no G1 e G2, e nos diferentes momentos de avaliação.	43
Tabela 3. Escore do número de vasos na córnea, nos diferentes grupos, momentos e locais de avaliação, representado por mediana dos escores, seguida por valor mínimo e máximo.	44
Tabela 4. Número de camadas de células epiteliais presentes nos diferentes grupos, momentos e locais de avaliação, representada por mediana dos escores, seguida por valor mínimo e máximo.	44
Tabela 5. Espessura epitelial da córnea (μm) nos diferentes grupos, momentos e locais de avaliação, representada por mediana dos escores, seguida por valor mínimo e máximo.	45
Tabela 6. Espessura estromal (μm) nos diferentes grupos, momentos e locais de avaliação, representada por média, seguida por desvio padrão.	45
Tabela 7. Marcação imuno-histoquímica para TGF- β 1 (μm^2) nos diferentes grupos e locais (córnea íntegra, borda, lesão), aos 4 dias pós-operatório.	46
Tabela 8. Marcação imuno-histoquímica para FGF-2 (μm^2) nos diferentes grupos e locais (normal, borda, lesão), aos 4 dias pós-operatório.	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍGLAS

α-SMA	Alfa-actina de músculo liso maduro
μm	Micrômetro
μm^2	Micrometro quadrado
ARVO	Association for Research in Vision and Ophthalmology
ARRIVE	Animal Research: Reporting of in Vivo Experiments
BMP-2	Proteína morfogenética óssea 2
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetro
EGF	Fator de crescimento epidérmico
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
G2	Grupo membrana L-PRF autóloga + xenóloga
G1	Grupo membrana L-PRF xenóloga
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL-1	Interleucina 1
IM	Intramuscular
IV	Intravenoso
Kg	Quilograma
KGF	Fator de crescimento queratinócitos
PRF	Fibrina rica em plaquetas
L-PRF	Fibrina rica em plaquetas e leucócitos
MEC	Matriz extra celular
M0	Momento de avaliação pré-operatório
M4	Momento de avaliação aos quatro dias pós-operatório
M7	Momento de avaliação aos sete dias pós-operatório
M14	Momento de avaliação aos catorze dias pós-operatório
M30	Momento de avaliação aos trinta dias pós-operatório
MMP	Matriz Metaloproteínases
mPRGF	Membrana de fibrina rica em fatores de crescimento
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mm^2	Milímetro quadrado
mm/min	Milímetro por minuto
mmHg	Milímetro de Mercúrio
mg/Kg	Miligramas por quilograma
m/s	Metro por segundo
NGF	Fator de crescimento nervoso
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
PIO	Pressão intraocular

PVPI	Polivinilpuvoidona
RBC	Glóbulos vermelhos
rpm	Rotações por minuto
SRD	Sem Raça Definida
TGF	Fator de crescimento transformador
TLS	Teste lacrimal de Schirmer
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TSP-1	Trombospondina
UNESP	Universidade Estadual Paulista
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

APÊNDICES

- Apêndice 1. Tabela demonstrando avaliação pré-operatória da estesiometria, TLS, paquimetria e PIO dos coelhos utilizados na avaliação clínica oftalmológica pós-operatória (n=18), segundo sexo dos animais, representada pela média, seguida por desvio padrão.....63
- Apêndice 2. Tabela demonstrando avaliação pré-operatória da estesiometria, TLS, paquimetria e PIO, representada pela média, seguida por desvio padrão, onde E1 é composta pelos animais utilizados exclusivamente para avaliação histomorfométricas e imuno-histoquímica de M4 (n=10) e, E2, coelhos utilizados na avaliação clínica oftalmológica pós-operatória (n=18).63

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	2
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1. Coelho como pet e modelo experimental.....	3
2.2. Córnea e aspectos anatomofisiológicos.....	4
2.2.1 Características gerais anátomo-histológicas do olho dos coelhos ..	5
2.3. Lesões de córnea e mecanismos de reparação corneal	7
2.3.1. Fatores de Crescimento	11
2.4. Fibrina Rica em Plaquetas e fatores de crescimento associados.....	14
2.4.1 PRF em coelhos	16
3. Considerações finais.....	17
4. Hipótese(s) e objetivo(s) geral(s) e específico(s)	18
5. REFERÊNCIAS	18
CAPÍTULO 2.....	11
MATERIAL E MÉTODOS.....	35
Conformidades Éticas e Seleção dos Animais.....	35
Grupos experimentais.....	35
Preparo das membranas de L-PRF de coelho e cães	36
Procedimento cirúrgico e pós-operatório	36
Momentos e avaliações oftalmológicas	37
Preparação das amostras e análises microscópicas	39
Análises Morfométricas	39
Imuno-histoquímica	40
Análise Estatística	40
RESULTADOS	41
DISCUSSÃO.....	46
REFERÊNCIAS	52
APÊNDICE	57
ATESTADO ÉTICA.....	59

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A úlcera de córnea é uma afecção frequente na oftalmologia veterinária (WHITLEY; HAMOR, 2021). O processo de cicatrização corneal é dinâmico e complexo; envolve a interação de uma variedade de citocinas, fatores de crescimento e proteases, no qual desequilíbrios podem acarretar perda de transparência (WILSON et al., 2001). A intervenção cirúrgica é indicada quando há o risco de comprometimento da integridade do bulbo ocular e da viabilidade visual (WHITLEY; HAMOR, 2021).

Os biomateriais a base de plaquetas estão sendo progressivamente utilizados na oftalmologia humana e veterinária no tratamento de doenças da superfície ocular (NUGENT; LEE, 2015; YOU et al., 2020). Diversos tipos de preparações desenvolvidas, tais como, suspensões, cola, tampão e membrana, são empregadas isoladas ou associadas a outras técnicas cirúrgicas em úlceras de córnea profundas, descemetoceloses e perfurações (HICK et al., 2005; ALIO et al., 2013; ARNALICH et al., 2016; CAN et al., 2016a; SANCHEZ-AVILA et al., 2018).

Na oftalmologia veterinária, o plasma rico em plaquetas (PRP) como suspensão ou tampão mostrou potencial na cicatrização de úlceras de córneas induzidas em coelhos e ratos (DONATTI, et al., 2013; PERCHES, et al., 2015; GANDOLFI et al., 2021), assim como em úlceras superficiais médias em cães (MERLINI, et al., 2014), profundas em gatos (FARGHALI, et al. 2021) e indolentes de cães (EDELMAAN et al., 2018). O uso de cola de fibrina foi relatado em um caso de úlcera profunda com exposição de membrana de Descemet em cão e possibilitou a reparação ocular (BARBOSA; WOUK, 2014).

Descrita em 2001 por Choukroun, a membrana de fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) destacou-se na medicina regenerativa pela preparação simples, sem manipulação bioquímica de sangue (DOHAN et al., 2006a apud Choukroun et al., 2001; NANDITHA et al., 2017). Apresenta arquitetura 3D com a incorporação intrínseca de citocinas plaquetárias, leucócitos e células-tronco circulantes, fornecendo fatores de crescimento e moléculas bioativas, estimulando a cicatrização, angiogênese e remodelação de tecido (DOHAN et al., 2006d). Adicionalmente, promove suporte mecânico importante para a regeneração da superfície ocular (CAN et al., 2016a; CAN et

al., 2016b; CAKMAK et al., 2017; DERELI CAN et al., 2020; CAMACHO; LEON-ROJAS, 2021).

Considerando que um princípio fundamental na produção do L-PRF é a coleta rápida, trata-se de um desafio considerável em animais de pequeno porte relacionado ao menor calibre das veias e maior volume relativo de sangue necessário quando comparado aos 10 ml coletados em humanos (DOHAN EHRENFEST et al., 2010b).

A aplicação de membrana xenóloga, associada ou não a membrana autóloga, pode ser uma alternativa viável no tratamento oftalmológico, tornando-o acessível também aos animais de espécies ou raças de pequeno porte. Entretanto, na literatura consultada não foram encontrados trabalhos avaliando compatibilidade interespecies para membrana L-PRF xenóloga.

Do conhecimento dos autores, os estudos sobre o uso de membrana de L-PRF são escassos e inovadores tanto na oftalmologia humana como na veterinária. Nosso grupo de pesquisa demonstrou a viabilidade e os benefícios do uso de membrana autóloga em coelhos (HIROTA, 2021), incentivando o desenvolvimento deste trabalho.

Este estudo tem por objetivo avaliar clinicamente, o processo de reparação de úlceras profundas de córnea, induzidas experimentalmente em coelhos, submetidos ao tratamento cirúrgico com membrana de PRF autóloga e xenóloga. Adicionalmente, comparar por histomorfometria e imuno-histoquímica de fatores de crescimento nos tratamentos instituídos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Coelho como *pet* e modelo experimental

O coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculus*, LINNAEUS, 1758) pertence à família Leporidae e ordem Lagomorpha (PESSOA, 2014). Dentre os animais de companhia exóticos, estão comumente envolvidos na prática veterinária, bem como na oftalmologia, com destaque para as afecções da córnea, ductos nasolacrimais e lente (GRAHAM, 2006; GONZÁLEZ-REDONDO; CONTRERAS-CHACÓN, 2012; MÄKITAIPALE et al., 2015). Adicionalmente, representam a espécie de animais de laboratório amplamente utilizada como modelo experimental, incluindo investigações oftálmicas (WERNER et al., 2006; EATON, 2021).

A popularidade da espécie pode ser atribuída em grande parte ao manejo com relativamente baixo dispêndio econômico, facilidade de manuseio, possibilidade de realizar exames sem anestesia e as similaridades notáveis com o olho humano em termos de dimensões e volumes anatômicos oculares (VALINHOS, 2011; WILLIAMS, 2012; EATON, 2021). Entretanto, essas diferenças anatômicas e fisiológicas devem ser levadas em consideração tanto para planejar o estudo, determinando a adequação do modelo, e também durante a interpretação precisa dos resultados obtidos (WERNER et al., 2006; EATON, 2021).

2.2. Córnea e aspectos anatomofisiológicos

A superfície ocular é a interface entre o olho e o meio ambiente, sendo responsável por proporcionar proteção anatômica, fisiológica e imunológica. A córnea representa uma estrutura importante da superfície ocular (HAMRAH; SAHIN, 2015). Após o filme lacrimal, é o primeiro tecido que recebe os raios luminosos e, devido a sua curvatura e transparência, possui grande capacidade de refração e transmissão de luz, representando, em média, 70% do poder óptico do olho (SCHOR et al., 2013; OFRI; EKESTEN, 2021).

A córnea é constituída basicamente por quatro camadas: epitélio e sua membrana basal; estroma; membrana de Descemet; e endotélio (MAGGS, 2018) (Apêndice 1). O filme lacrimal pré-corneal por vezes também é considerado uma camada fisiológica mais externa, por ter uma grande importância tanto na refração quanto na proteção, lubrificação e nutrição da córnea (HAMRAH; SAHIN, 2015; MEEKINS et al., 2021).

O epitélio corneal é escamoso, estratificado, não queratinizado, constituído por duas ou três camadas de células escamosas superficiais, duas ou três camadas de células intermediárias poliédricas; conectada a essas por hemidesmossomos, há uma única camada de células basais, que se encontram em uma fina membrana basal (MAGGS, 2018; MEEKINS et al., 2021).

O estroma constitui 90% da espessura da córnea e sua função principal é oferecer rigidez e manter a curvatura corneal (MÜLLER et al., 2001). É composto principalmente por lamelas organizadas de fibrilas de colágeno; ceratócitos, água, glicosaminoglicanos, fibras nervosas amielínicas, raros linfócitos, macrófagos, neutrófilos e outros componentes da matriz extracelular

(MEEKINS et al., 2021). A disposição ordenada e regular das fibrilas de colágeno é essencial para manter a transparência da córnea (MAGGS, 2018).

A membrana de Descemet é a membrana basal do endotélio, camada delgada, homogênea e acelular (HERRERA, 2008; MAGGS, 2018). Demonstra certa elasticidade clinicamente e é composta por uma série de fibrilas de colágeno (MEEKINS et al., 2021). Em seguida, em contato com o humor aquoso, encontra-se uma única camada de células endoteliais achatadas de formato hexagonal (MEEKINS et al., 2021).

A espessura corneal varia de acordo com espécies, raças, indivíduos e entre as regiões corneais. Na maioria dos animais domésticos encontra-se entre 0,5 e 0,8 mm, não ultrapassando 1,0 mm e tendendo a ser mais fino em aves, répteis e pequenos mamíferos (MAGGS, 2018; MEEKINS et al., 2021).

A córnea é um dos tecidos mais densamente innervados do corpo e é ricamente suprida por fibras nervosas sensoriais. A sensibilidade corneal tem importante função protetora, visto pelo piscar involuntário e lacrimejamento quando estimulada (MÜLLER et al., 2003; MEEKINS et al., 2021). Ademais, a inervação corneal auxilia na transparência, é amielínica e auxilia na cicatrização após lesões; ajudam a manter uma córnea saudável por meio da secreção de fatores tróficos e manutenção das secreções lacrimais basais (MÜLLER et al., 2003; MAGGS, 2018).

2.2.1 Características gerais anátomo-histológicas do olho dos coelhos

Os coelhos são animais com olhos relativamente grandes quando comparados ao seu tamanho, protuberantes e situados lateralmente à cabeça, o que lhes permite amplo campo de visão de aproximadamente 360° (PESSOA, 2014; EATON, 2021).

A córnea do coelho é excepcionalmente grande, ocupando aproximadamente 30% da área da superfície do bulbo; com formato próximo do elíptico e notavelmente fina; apresenta diâmetro corneal horizontal médio de $12,65 \pm 0,55$ mm (DAVIS, 1929; VALINHOS, 2011; ZHANG et al., 2017).

Diferente dos humanos, os coelhos não possuem a camada de Bowman (DAVIS, 1929). O epitélio escamoso estratificado recobre a superfície corneal anterior, composto por aproximadamente seis camadas (DAVIS, 1929). O estroma representa cerca de 90% da espessura corneal e é constituído por

camadas organizadas de fibrilas de colágeno, responsáveis pela transparência corneal (DAVIS, 1929). O endotélio possui maior capacidade regenerativa do que em outras espécies, decorrente da replicação celular em resposta ao ferimento, porém esta capacidade regenerativa é reduzida dos 9 aos 12 meses de idade sendo encontrado maior incidência de polimegatismo endotelial (EATON, 2021 apud VAN HORN et al., 1977).

Nos coelhos, a espessura central é 370 μm e discretamente maiores (450 μm) na periferia próxima ao limbo (DAVIS, 1929). Godoy et al. (2007) relataram espessura corneal de $356,11 \pm 14,34 \mu\text{m}$ em coelhos de 2 a 4 meses, da raça Nova Zelândia, com o uso de paquimetria ultrassônica, similares com os achados de Davis (1929). Gonçalves et al. (2018) utilizaram tomografia computadorizada e observaram uma espessura central de $410.39 \pm 20.46 \mu\text{m}$ em coelhos de 14 meses de idade.

Raça, idade e algumas enfermidades, como diabetes, influenciam variáveis do bulbo ocular de coelhos e devem ser considerados (VALINHOS, 2011; RIAU et al., 2012; BAO et al., 2017; ZHANG et al., 2017). A pressão intra-ocular (PIO) normal nos coelhos é, no geral, considerada de 13 a 20 mmHg (HOLMBERG, 2018; FEATHERSTONE; HEINRICH, 2021).

Os coelhos apresentam um sistema lacrimal diferenciado visto pelo baixo ritmo de piscar, em torno de uma vez a cada seis minutos, mas seu filme lacrimal permanece estável (HOLMBERG, 2018; EATON, 2021). A maior estabilidade do filme lacrimal poderia ser explicada pela presença de quatro glândulas orbitais, com expressão constitutivamente mais ampla de mucina, e também uma camada lacrimal de lipídio mais espessa em comparação com cães e humanos, lhe proporcionando resistência à evaporação e a ruptura do filme lacrimal (EATON, 2021). Os valores para o teste lacrimal de Schirmer (TLS) apresentam uma variabilidade considerável, mas geralmente estão entre $5 \pm 3 \text{ mm/min}$ (HOLMBERG, 2018; EATON, 2021). Hirota (2021) em um estudo com 30 coelhos adultos saudáveis observaram TLS de $9,6 \pm 1,2 \text{ mm/min}$.

Ademais, os coelhos apresentam uma taxa mais lenta de eliminação da lágrima, facilitada pela ausência do ducto nasolacrimal superior (EATON, 2021). Xia et al. (2011) demonstraram uma sensibilidade corneal baixa de coelhos brancos Nova Zelândia de aproximadamente 31,93 mm.

2.3. Lesões de córnea e mecanismos de reparação corneal

A úlcera de córnea é uma afecção, caracterizada por uma solução de continuidade sobre a superfície ocular com exposição do estroma ou membrana basal epitelial (MAGGS, 2018). O contato direto da córnea com o ambiente torna-a susceptível a lesões, sendo úlceras de origem traumática frequentes na oftalmologia veterinária (MAGGS, 2018, MOREIRA et al., 2018). Outras causas descritas são: disfunções palpebrais, corpo estranho, alterações no filme lacrimal, ação de agentes infecciosos e químicos, afecções de origem metabólicas, ou até neoplasias (HERRERA, 2008; WHITLEY; HAMOR, 2021).

Entretanto, as propriedades biomecânicas e geométricas da córnea são essenciais para que suas funções sejam preservadas (LIU; ROBERTS, 2005). A ausência de vasos sanguíneos e pigmentos, seu estado de deturgescência e a manutenção da organização das estruturas celulares são fundamentais para sua transparência (RIORDAN-EVA; WHITCHER, 2008). Adicionalmente, a superfície externa lisa deve ser mantida, considerando processos de reparação contínua do epitélio e filme lacrimal saudável, para a formação adequada da imagem na retina (MEEKINS et al., 2021). Portanto, as células epiteliais possuem grande capacidade regenerativa e a córnea saudável pode reepitelizar em quatro a sete dias (HAMRAH; SAHIN, 2015).

Imediatamente após uma lesão epitelial, ocorre o deslizamento das células ao redor da margem sobre a área afetada, instituição de mitose e maturidade celular e, por fim, sua fixação à membrana basal por meio de hemidesmossomos (MAGGS, 2018). A membrana basal desempenha um papel fundamental no processo, e quando ausente, mais tempo é necessário na reparação, pois a mesma precisa ser restabelecida, impedindo que o epitélio seja facilmente removido do estroma (MEEKINS et al., 2021).

Nas lesões estromais a cicatrização pode ocorrer de modo avascular, vascular ou por ambos. Independentemente do mecanismo, é uma cicatrização relativamente lenta e imperfeita, resultando em uma perda na transparência (MAGGS, 2018). Frequentemente, como o epitélio cicatriza rapidamente, ocorre uma reepitelização sobre a superfície estromal, com o intuito de selar a lesão e posteriormente promover remodelação (MEEKINS et al., 2021).

Segundo Maggs (2018), as feridas estromais descomplicadas tendem à cicatrização avascular, na qual ocorrem recrutamento e infiltração de neutrófilos

na lesão; em seguida, ceratócitos circundantes se transformam em fibroblastos e migram para a área danificada, onde sintetizam proteínas, colágeno e outros componentes junto a sua matriz extracelular para atingir o preenchimento do defeito; cerca de 48 horas após a lesão, há a chegada de macrófagos para remoção de resíduos celulares. A remodelação tecidual ocorre conforme a cicatrização, processo que pode resultar em cicatriz (MAGGS, 2018).

Em lesões estromais infectadas, profundas ou crônicas o processo de remodelação é mais complexo. Geralmente requerem cicatrização vascularizada, na qual a infiltração celular é mais extensa e a área é invadida por vasos sanguíneos originários do limbo adjacente, o que resulta em maior perda na transparência (MAGGS, 2018). A neovascularização corneal ocorre devido à liberação de fatores pró-angiogênicos como fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e várias outras citocinas (CHEN et al., 2020).

A membrana de Descemet é produzida e regenerada pelas células endoteliais, continuamente ao longo da vida (MEEKINS et al., 2021). As lesões de córnea mais profundas e complicadas podem resultar na exposição ou até mesmo no rompimento da membrana de Descemet. Nesses casos, o endotélio também é comprometido, devido à proximidade dessas estruturas (XIMENES et al., 2014; MAGGS, 2018). A capacidade de regeneração endotelial é limitada e varia com espécie e idade (MEEKINS et al., 2021). Em suma, após a perda de células endoteliais, o defeito endotelial é compensado por meio de uma combinação ativa do deslizamento e hiperplasia de células endoteliais vizinhas (VAN DEN BOGERD et al., 2017).

A córnea não possui vasos sanguíneos e, por isso, quando lesionada, uma série de eventos se desenvolvem simultaneamente com o intuito de promover a proliferação celular, migração, diferenciação, apoptose, quimiotaxia, angiogênese e comunicação intercelular (PONTES et al., 2011; WHITLEY; HAMOR, 2021). Esses mecanismos de cicatrização são conduzidos por intermédio de mediadores inflamatórios, juntamente com os fatores de crescimento gerados decorrentes da lesão e também pela ação de proteinases, incluindo as matriz metaloproteinases (PERCHES et al., 2015; WHITLEY; HAMOR, 2021).

Como mencionado anteriormente, o epitélio da córnea é um tecido de auto renovação e, portanto, em casos de lesões leves, como abrasões epiteliais, a cicatrização epitelial depende, em grande parte, da migração e diferenciação das células-tronco límbicas e da remodelação junto à membrana basal (LJUBIMOV; SAGHIZADEH, 2015; WEST et al., 2015).

Após lesão, as células epiteliais feridas ou mortas da córnea liberam interleucina 1 (IL-1) que, ao penetrar no estroma, ligam-se a receptores de IL-1 expresso por ceratócitos adjacentes à lesão induzindo apoptose (WILSON, 2020). Em ceratócitos e fibroblastos mais profundos, onde a concentração de IL-1 é mais baixa do que próximo ao epitélio ferido, no lugar de apoptose, a IL-1 desencadeia a produção e ativação de outros fatores de crescimento, matriz metaloproteínases (MMPs) e quimiocinas, induzindo eventos como a proliferação e quimiotaxia (WEST-MAYS; DWIVEDI, 2006; WILSON, 2020). Neste momento, a produção dos fatores de crescimento de hepatócitos (HGF) e de queratinócitos (KGF) pelos ceratócitos e fibroblastos é aumentada e, dezenas de milhares de células derivadas da medula óssea são atraídas ao estroma, como monócitos, macrófagos, linfócitos e fibrócitos (WILSON, 2020).

O HGF e KGF são moduladores das interações estromais epiteliais que, junto com fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformador α (TGF- α) e outros fatores de crescimento produzidos pelo epitélio e glândulas lacrimais, regulam a proliferação, motilidade, diferenciação e apoptose das células epiteliais defeituosas buscando a cura epitelial (LJUBIMOV; SAGHIZADEH, 2015; WILSON, 2020).

A cicatrização estromal consiste principalmente na transformação dos ceratócitos em fibroblastos e miofibroblastos (LJUBIMOV; SAGHIZADEH, 2015). As células epiteliais, além de IL-1, também influenciam positivamente na secreção e ativação dos fatores de crescimento transformador (TGF) $\beta 1$ e $\beta 2$, e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), considerados citocinas pró-fibróticas, pois adentram o estroma e acionam a transformação dos ceratócitos sobreviventes em fibroblastos que, juntamente com os fibrócitos provenientes por intermédio da IL-1, secretam componentes da matriz extracelular (WILSON et al., 2017; WILSON, 2020).

Conforme a resposta de cicatrização e reconstituição da membrana basal epitelial há uma diminuição do influxo do TGF- β no estroma, sendo que os

fibroblastos e fibrocitos podem reverter para suas respectivas células progenitoras ou sofrer apoptose (WEST-MAYS; DWIVEDI, 2006; WILSON, 2020). Entretanto, lesões mais graves, danos extensos a membrana basal epitelial ou retardo na sua regeneração, levam à penetração contínua TGF- β e PDGF que conduzem a transformação dos fibroblastos e fibrócitos em miofibroblastos (WILSON, 2020). Estes, por sua vez, expressam grande quantidade de alfa-actina de músculo liso maduro (α -SMA) e produzem grandes quantidades matriz extracelular desordenada, o que contribui para fibrose e diminuição da transparência corneal (DE OLIVEIRA; WILSON, 2020).

Assim, na córnea não lesada, a produção e ativação epitelial de TGF- β e PDGF é relativamente baixa e, esses fatores de crescimento, são impedidos de entrar no estroma pela membrana basal epitelial (WILSON, 2020). Quando ocorre lesão ao epitélio que inclui danos a membrana basal epitelial, o TGF- β e PDGF entram no estroma acionando a transformação de ceratócitos sobreviventes em fibroblastos da córnea e, em seguida, ambos os fibroblastos da córnea e os fibrócitos são modulados para iniciar o desenvolvimento em miofibroblastos maduros (WEST-MAYS; DWIVEDI, 2006; WILSON, 2020).

A formação de fibrose corneal vai depender principalmente da quantidade de miofibroblastos transformados. Se o epitélio cicatrizar e, sua membrana basal for restaurada a tempo, miofibroblastos em desenvolvimento sofrem apoptose e há a proliferação de ceratócitos iniciando o processo de remoção de matriz extracelular desordenada diminuindo a opacidade corneal, evento que pode levar meses ou anos (WILSON et al., 2017; DE OLIVEIRA; WILSON, 2020). Entretanto, no caso de secreção acentuada ou contínua de TGF- β e PDGF com grande transformação de miofibroblastos maduros completam seu desenvolvimento e fibrose é gerada (WILSON et al., 2017; DE OLIVEIRA; WILSON, 2020).

As IL-1 α e β liberados pelo epitélio lesado, juntamente com o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), também regulam positivamente a produção de metaloproteinases e collagenases por ceratócitos sobreviventes, fibroblastos, fibrócitos e miofibroblastos (LI et al., 2001; WILSON, 2020). Essas metaloproteinases e collagenases têm um papel crítico na resposta de cicatrização de feridas estromais, uma vez que estão envolvidas na

reorganização e degradação da matriz extracelular estromal (OLLIVIER et al., 2007; WILSON, 2020), tema esse que será abordado mais à frente.

2.3.1. Fatores de Crescimento

Os fatores de crescimento são proteínas solúveis consideradas mediadores biológicos naturais (TAMHANE et al., 2019). Estão presentes no filme lacrimal, humor aquoso e são produzidos constantemente pelas células corneais, pois são essenciais para a manutenção e renovação tecidual e na prevenção de reações imunológicas ou angiogênicas indesejáveis (KLENKLER; SHEARDOWN, 2004; LJUBIMOV; SAGHIZADEH, 2015). No processo de reparação corneal, apresentam ação mediadora na proliferação, migração e diferenciação de células epiteliais e estromais, além de influenciar na remodelação da matriz extracelular (SCALINCI et al., 2011; PONTES et al., 2011; SUZUKI et al., 2013).

Uma infinidade de fatores de crescimento foram detectados no segmento anterior saudável e associados ao processo de cicatrização corneal, dentre os principais encontram-se: TGF α e β , PDGF, EGF, FGF, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), KGF, HGF, VEGF, fator de necrose tumoral (TNF- α) e fator de crescimento nervoso (NGF) (KLENKLER; SHEARDOWN, 2004; YU et al., 2010; LJUBIMOV; SAGHIZADEH, 2015).

A família do TGF- β compreende três isoformas (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3) envolvidas em múltiplos processos biológicos da cicatrização, que incluem produção de matriz extracelular, proliferação celular, angiogênese, resposta imune, apoptose, diferenciação e quimiotaxia celular (ROBERTS, 2002). O TGF- β 1 e o TGF- β 2 foram localizados no epitélio, estroma e filme lacrimal, sendo o TGF- β 1 a principal isoforma capaz de promover a diferenciação de miofibroblastos; enquanto o TGF- β 3 demonstrou receptores em epitélio e endotélio, porém pouco efeito na reepitelização e reparação tecidual (ER; UZMEZ, 1998; CARRINGTON et al., 2006 YU et al., 2010).

Níveis elevados de TGF- β 1 foram associadas ao aumento na expressão α -SMA no citoplasma de células miofibroblásticas, o que contribui para diminuição da transparência corneal (DE OLIVEIRA; WILSON, 2020). O TGF- β 1 também demonstrou ser um potente inibidor do crescimento de células epiteliais, podendo haver retardo na reepitelização (CARRINGTON et al., 2006). Foi

crescente a busca por tratamentos que atenuassem a expressão e sinalização de TGF- β , fornecendo meios para neutralizar as alterações fibróticas que resultam na opacidade estromal; entretanto, a inibição total de TGF- β 1 foi estudada e, apesar de acelerar reepitelização corneal, reduz ou impossibilita a reparação estromal por diminuir a transformação de ceratócitos em fibroblastos e, consecutivamente, a produção de matriz extracelular (SONG et al., 2002; WANG et al., 2011; DE OLIVEIRA; WILSON, 2020).

De acordo com Yu et al., (2010, o TGF- β possui grande interação, ou até mesmo, estimula a produção de outros fatores de crescimento, citocinas, colágeno e outras proteínas associadas à remodelação da matriz extracelular. O fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), por exemplo, é regulado positivamente por TGF- β nos fibroblastos da córnea, desempenhando um papel importante na formação de cicatriz por atuar na diferenciação dos miofibroblastos induzidos pelo TGF- β e na síntese de colágeno por fibroblastos deposição de matriz extracelular (MEC) excessiva no leito da ferida, que pode resultar na formação de cicatrizes.

No epitélio, quando em excesso, o TGF- β 1 demonstrou retardar a cicatrização na fase inicial de reparação, por antagonizar e inibir a proliferação, adesão e migração das células epiteliais promovidas pelos EGF, KGF e HGF. Enquanto nos ceratócitos, aumentou o efeito de promoção do crescimento do EGF (YU et al., 2010). O EGF contribui na aceleração do processo de cicatrização da lesão e intervém na auto-renovação celular, especialmente em úlceras superficiais, pois estimula a proliferação e migração de células epiteliais e mesenquimais, atuando na regeneração de múltiplos tecidos (WANG et al., 2013; SANCHEZ AVILA et al., 2018).

O PDGF demonstrou ser um potente mitógeno durante o processo de transformação de miofibroblastos pelo TGF- β e a combinação desses dois fatores é mais potente que qualquer um dos fatores isolados (WILSON, 2020). Receptores para PDGF são encontrados nos fibroblastos e células endoteliais da córnea (KLENKLER; SHEARDOWN, 2004). A função do PDGF é modular a proliferação, migração e diferenciação das células corneais (SINGH et al., 2014).

Há uma relação íntima entre o TGF- β e o FGF-2, na qual a expressão aumentada de FGF-2 influenciou positivamente no crescimento de fibroblastos pelo TGF- β e estes fibroblastos produziram tanto TGF- β quanto FGF-2 (KAY et

al., 1998). O TGF- β 1 medeia as fases iniciais do reparo de feridas e, além de originar células, pode causar um aumento retardado em FGF-2, atuando primeiro na síntese e a degradação de proteínas específicas. Por outro lado, o FGF-2 inibe a expressão de TGF- β 1 e o seu aumento desempenha importante papel na ação contínua de TGF- β 1 durante as fases posteriores do reparo de feridas corneanas (SONG et al., 2002).

O FGF compreende uma grande família de proteínas com alta afinidade à heparina; sua atividade é mediada pela ligação a proteoglicanos de sulfato de heparano e a tirosina-quinases do receptor da superfície celular de elevada afinidade (NUGENT; IOZZO, 2000; BEENKEN; MOHAMMADI, 2009). Estão envolvidos a vários processos biológicos, incluindo proliferação celular, diferenciação, migração, angiogênese e cicatrização (NUGENT; IOZZO, 2000).

Os membros da família FGF, particularmente FGF-1 (ácido) e FGF-2 (básico), desempenham um papel importante na angiogênese em vários tecidos *in vivo*, mas o FGF-2 é a isoforma mais comum detectada no olho (OLADIPUPO et al., 2014; CHEN et al., 2020). Ambos FGF-1 e FGF-2 se mostraram mitogênicos para células epiteliais, endoteliais e estromais (KLENKLER; SHEARDOWN, 2004).

Wilson et al. (1994a) demonstraram quantidades significativas de FGF-1 nas membranas de Bowman, Descemet e no endotélio corneal, com pouca expressão no epitélio e nenhuma no estroma (KLENKLER; SHEARDOWN, 2004). O FGF-2 e seus receptores foram expressos por células epiteliais, fibroblastos estromais, células endoteliais e também no humor aquoso, podendo apresentar funções diferentes em cada região (OLADIPUPO et al., 2014).

Assim como FGF-2, o VEGF é um potente mediador do processo de vascularização e auxilia na cicatrização promovendo proliferação de células endoteliais e quimiotaxia; entretanto, na córnea a presença de vascularização pode resultar em perda da transparência (SUN et al., 2013).

As plaquetas possuem muitas proteínas bioativas com uma diversidade de isoformas, que promovem a reparação tecidual e influenciam outras células sanguíneas na angiogênese e inflamação local (KLENKLER; SHEARDOWN, 2004). O efeito dos fatores de crescimento depende, em grande parte, da célula em que foi produzido, da sua ativação, presença de receptores e sua interação, em grande parte, com os componentes da matriz extracelular; mas também dos

efeitos de outros fatores de crescimento e dos mecanismos reguladores das células afetadas (KLENKLER; SHEARDOWN, 2004; ETHEREDGE, 2009).

A cicatrização corneal é um processo dinâmico e complexo, como ressaltado anteriormente, seu desequilíbrio pode resultar na perda de transparência (WILSON et al., 2001). Um aumento de um biomarcador em uma determinada região pode ser paralelo por uma diminuição de outro biomarcador em outra região. As diferenças nas atividades dos biomarcadores também estão correlacionadas aos substratos e seus ativadores; portanto, a atividade dos biomarcadores pode variar durante o curso da lesão (OLLIVIER et al., 2007; WANG; KHALIL, 2018; TAMHANE et al., 2019). Compreender como esses biomarcadores se comportam na fisiopatologia da doença e frente a um tratamento proposto é fundamental, já que a terapêutica demonstra influenciar na sua expressão (WANG; KHALIL, 2018; TAMHANE et al., 2019).

2.4. Fibrina Rica em Plaquetas e fatores de crescimento associados

Os biomateriais à base de matriz de fibrina são resultantes da ativação de plaquetas e, basicamente, classificados em dois tipos principais: as auto coaguladas, denominadas fibrina rica em plaquetas (PRF), e as formadas pela adição de ativadores exógenos (DOHAN-EHRENFEST et al., 2009; KAWASE; TANAKA, 2017). A trombina e o cloreto de cálcio são os principais ativadores exógenos utilizados, desencadeiam a ativação plaquetária e polimerização da fibrina (DOHAN-EHRENFEST et al., 2009; KAWASE; TANAKA, 2017).

A fibrina rica em plaquetas (PRF) é um biomaterial proposto pela primeira vez por Choukroun et al., em 2001 e destacou-se não só pelas propriedades cicatrizantes, mas também por resultar de um processamento simples e econômico (CHOUKROUN et al., 2001 apud DOHAN et al., 2006a; CHOUKROUN et al., 2006). Neste o sangue é coletado sem anticoagulante em tubos de vidro secos e imediatamente centrifugado em baixa velocidade, iniciando processo natural de coagulação, com a formação de um coágulo de fibrina rico em plaquetas (DOHAN et al., 2006a; DOHAN et al., 2006b). Com identificação de inúmeros leucócitos em estudos posteriores, sua denominação passou a fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) (DOHAN et al., 2006c; DOHAN-EHRENFEST et al., 2009).

O L-PRF pode ser reproduzido pela centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos ou a 2700 rpm por 12 minutos (DOHAN et al., 2006a NANDITHA et al., 2017). Na ausência de anticoagulantes, a ativação plaquetária e da fibrina são desencadeadas imediatamente, por um processo natural de coagulação, desencadeada pelo contato do sangue total com as paredes do tubo de vidro, durante todo o processo de centrifugação (MADURANTAKAM et al., 2015). Como resultado, três camadas são formadas: a base composta por glóbulos vermelhos (RBC); a superior, um sobrenadante de plasma acelular pobre em plaquetas (PPP); e o coágulo PRF ao meio, rico em leucócitos e plaquetas (DOHAN et al., 2006a; DOHAN EHRENFEST et al., 2009).

A lenta polimerização da fibrina durante o preparo do PRF resulta na formação de um coágulo de fibrina com arquitetura tridimensional complexa (CHOUKROUN et al., 2006). Análises histológicas e por microscopia eletrônica de varredura do PRF descreveram sua capacidade em concentrar 97% das plaquetas e aproximadamente 50% dos leucócitos, com proporções neutrófilas e linfócitos significativamente maiores; na rede tetramolecular de fibrina também se notou a incorporação intrínseca de citocinas, cadeias glicânicas, glicoproteínas e também de células-tronco (CHOUKROUN et al., 2006; DOHAN EHRENFEST et al., 2010). Essa constituição presente no PRF promove capacidade significativa de secretar e liberar local e lentamente vários fatores de crescimento importantes na modulação da inflamação e regeneração de tecidos (DOHAN EHRENFEST et al., 2009; FUJIOKA-KOBAYASHI et al., 2017).

Dentre as citocinas relatadas no PRF encontram-se: TGF- β 1, PDGF, VEGF, trombospondina-1 (TSP-1) e IGF-1 (DOHAN EHRENFEST et al., 2009; FUJIOKA-KOBAYASHI et al., 2017).

Os leucócitos aprisionados na matriz de fibrina, além de proporcionar ao PRF capacidade de regulação imunológica com efeito anti-infeccioso, são capazes de secretar progressivamente grandes quantidades de TGF β 1 e VEGF, importantes para a promoção da angiogênese e regulação inflamatória (DOHAN et al., 2006c; DOHAN EHRENFEST et al., 2009).

O coágulo de PRF pode ser utilizado na forma de gel; entretanto, a aplicação mais comum é na forma de membrana (DOHAN EHRENFEST et al., 2010; DERELI CAN et al., 2018). Quando pressionado entre duas gazes, o coágulo PRF torna-se uma membrana (DOHAN EHRENFEST et al., 2009).

Caixas com instrumentais específicos foram criadas para a manipulação do PRF e também compressão (MADURANTAKAM et al., 2015). A membrana de PRF demonstrou capacidade de resistência e flexibilidade, podendo receber suturas no tecido da lesão (MADURANTAKAM et al., 2015).

Na oftalmologia humana, o PRF já foi utilizado em estudos sobre pterígio (CAKMAK et al., 2017; CAMACHO; LEON-ROJAS, 2021), descemetoceloses (CAN et al., 2016a), plástica conjuntival (CAN et al., 2016b) e reconstruções escleral (DERELI CAN et al., 2020) e demonstrou oferecer suporte mecânico e quimiotático tornando-o adequado para reconstrução e manutenção da superfície ocular, com pouca reação inflamatória no tecido ocular e melhora no tempo de cirurgia (CAN et al., 2016a; CAN et al., 2016b; CAKMAK et al., 2017; DERELI CAN et al., 2020; CAMACHO; LEON-ROJAS, 2021).

Foi documentado que modificações na força, velocidade e tempo de centrifugação proporcionam alterações nas propriedades biomecânicas do biomaterial e também na capacidade de concentração de plaquetas, leucócitos e citocinas, bem como na liberação dos fatores de crescimento, devendo-se ter controle adequado no preparo (GHANAATI et al., 2014; FUJIOKA-KOBAYASHI et al., 2017; CHOUKROUN; GHANAATI, 2018; EL BAGDADI et al., 2019).

2.4.1 PRF em coelhos

A membrana de L-PRF foi descrita em coelhos (DOHAN EHRENFEST et al., 2010b; CAN et al., 2016b; DERELI CAN et al., 2020). Entretanto, Dohan Ehrenfest et al. (2010b) expuseram a dificuldade em reproduzir o verdadeiro biomaterial em coelhos com a técnica de Choukroun. Um dos princípios-chave na produção do L-PRF é a coleta rápida com centrifugação imediata, o que é facilmente realizado em humanos, no entanto, torna-se desafiador em coelhos e outros animais de pequeno porte, pelo calibre das veias (DOHAN EHRENFEST et al., 2010b).

O tempo prolongado de coleta de sangue e sem homogeneidade, pode promover a coagulação parcial inicial no tubo previamente a centrifugação; e resultam na formação de pequena massa de fibrina semelhante ao PRF, porém com arquitetura instável, conteúdo celular e a presença dos fatores de crescimento podem ser alterados (DOHAN EHRENFEST et al., 2010b).

Os locais descritos para a punção venosa em coelhos e suas indicações e limitações são: (1) veias da orelha, podem formar hematomas, trombose e descamação da pele; (2) veia cefálica, preferida para a colocação do cateter intravenoso, mas que promove estresse devido proximidade com a cabeça do coelho; (3) safena lateral, local ideal para a punção venosa, porém também sujeita a hematoma; e (4) veia jugular, que apresenta o melhor fluxo, ideal para coletas de volumes maiores de sangue, como para transfusão de sangue. Entretanto, a veia jugular torna-se adequada apenas em coelhos muito calmos ou sedados, bem como apresenta difícil visualização e localização em coelhos obesos ou fêmeas com grandes barbelas (GRAHAM, 2006).

Can et al. (2016) investigaram o efeito da L-PRF na plástica conjuntival, produziram o biomaterial pela coleta de 5 mL da veia femoral de coelhos adultos, Nova Zelândia. Descreveram expressões significativas do VEGF, TGF- β e PDGF no período pós-operatório, mais especificamente, no 3º e 7º dia. Imunorreatividades significativas de colágeno-1, proteoglicano Agrecano, TGF- β 1, proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) e FGF; e expressões leves de MMP-2 foram observadas em reconstrução escleral tratadas com L-PRF, tendo coelhos como modelo experimental (DERELI CAN et al., 2020). Ambos os estudos concluíram que a membrana de L-PRF disponibiliza substâncias intrínsecas adequadas para estimular cicatrização do tecido e sua macroarquitetura funciona como arcabouço para lesão, estimulando sua aplicação na reconstrução e distúrbios debilitantes da superfície ocular (CAN et al., 2016; DERELI CAN et al., 2020).

3. Considerações finais

A cicatrização corneal é um processo dinâmico e complexo, como ressaltado anteriormente, seu desequilíbrio pode resultar na perda de transparência e, conseqüentemente, comprometer a visão (WILSON et al., 2001). Compreender como um tratamento novo proposto comporta-se frente à lesão corneal é fundamental, já que a terapêutica influencia nos processos biológicos da cicatrização e interferem na produção de matriz extracelular, proliferação celular, angiogênese, resposta imune, apoptose, diferenciação e quimiotaxia celular (LJUBIMOV; SAGHIZADEH, 2015; WANG; KHALIL, 2018; TAMHANE et al., 2019).

Na oftalmologia, os estudos sobre o uso de membrana de L-PRF são escassos e inovadores, demonstrando que a membrana de L-PRF disponibiliza substâncias intrínsecas adequadas para estimular cicatrização do tecido e sua macroarquitetura funciona como arcabouço para lesão de forma que sua aplicação deve ser estimulada na reconstrução e distúrbios da superfície ocular (CAN et al., 2016; DERELI CAN et al., 2020).

As considerações acima estimularam o estudo do L-PRF na reparação da córnea, pois ainda há uma lacuna nesse campo de pesquisa, e poderá ser extrapolado não somente na clínica oftalmológica de coelhos, como também na oftalmologia médica e veterinária.

4. Hipótese(s) e objetivo(s) geral(s) e específico(s)

A hipótese do estudo é que aplicação de membrana L-PRF canina xenóloga ou associada à autóloga deve ser uma alternativa viável no tratamento oftalmológico de úlceras de córnea. Adicionalmente, a associação da membrana xenóloga com autóloga tornará mais acessível à utilização da autóloga em coelhos, reduzindo o volume de sangue coletado.

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o processo de reparação de úlceras profundas de córnea, induzidas em coelhos, submetidos ao tratamento cirúrgico com membrana de L-PRF xenóloga ou sua associação à membrana L-PRF autóloga.

Adicionalmente, avaliação clínica oftalmológica longitudinal até 30 dias da implantação, bem como comparação entre os tratamentos; considerando análise histomorfométrica da córnea e imuno-histoquímica dos fatores de crescimento TGF- β e FGF-2 no M4, importantes no processo de reparação corneal. Presume-se que a associação com membrana L-PRF autóloga diminua possíveis rejeições ao biomaterial, além de oferecer níveis superiores de citocinas, leucócitos e outros bioativos presentes na membrana.

5. REFERÊNCIAS*

ALEIXO, G. A. S.; COELHO, M. C. O. C.; TRAJANO, S. C.; ANDRADE, L. S. S. Plasma rico em plaquetas: mecanismo de ação, produção e indicações de uso -

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro, 2018. 2ª ed. 68 p.

revisão de literatura. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 11, n. 4, p. 239-246, 2017. ISSN: 1809-4678.

ALIO, J. L.; RODRIGUEZ, A. E.; MARTINEZ, L. M.; RIO, A. L. Autologous Fibrin Membrane Combined With Solid Platelet-Rich Plasma in the Management of Perforated Corneal Ulcers. **JAMA Ophthalmology**, v. 131, n. 6, p. 745-751, jun., 2013. DOI:10.1001/jamaophthalmol.2013.2474.

ARNALICH, F.; RODRIGUEZ, A. E.; LUQUE-RIO, A.; ALIO, J. L. Solid Platelet Rich Plasma in Corneal Surgery. **Ophthalmology and Therapy**, v. 5, n. 1, p. 31–45. maio, 2016. doi:10.1007/s40123-016-0051-9.

BARBOSA, C. B.; WOUK, A. F. F. Uso da cola de fibrina autóloga no tratamento de úlcera corneana profunda em cão: Relato de caso. **Medvep**, v. 12, n 40, p. 1-15, 2014.

BAO, F.; DENG, M.; ZHENG, X. et al. Effects of diabetes mellitus on biomechanical properties of the rabbit cornea. **Experimental Eye Research**, v. 161, p. 82-88, 2017.

BEENKEN, A.; MOHAMMADI, M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 3, p. 235–253, 2009. doi:10.1038/nrd2792

CAKMAK, H. B.; DERELI CAN, G.; CAN, M. E.; CAGIL, N. A novel graft option after pterygium excision: platelet-rich fibrin for conjunctivoplasty. **Eye**, v. 31, n. 11, p. 1606–1612. jun., 2017. doi: 10.1038/eye.2017.109.

CAMACHO, C.; LEON-ROJAS, J. E. Platelet-Rich Fibrin Membrane for Pterygium Surgery: A Case Report, Literature Review and feasibility assessment. **Preprints**, p. 1-8, mar., 2021, 2021030473 DOI: 10.20944/preprints202103.0473.v1.

CAN, M. E.; DERELI CAN G.; CAGIL, N.; CAKMAK, H. B.; SUNGU, N. Urgent Therapeutic Grafting of Platelet-Rich Fibrin Membrane in Descemetocoele. **Cornea**, v. 35, n. 9, p. 1245–1249. set., 2016a. DOI: 10.1097/ico.0000000000000917.

CAN, M. E.; CAKMAK, H. B.; DERELI CAN, G.; ÜNVERDI, H.; TOKLU, Y.; HÜCEMENOĞLU, S. A Novel Technique for Conjunctivoplasty in a Rabbit Model: Platelet-Rich Fibrin Membrane Grafting. **Journal of Ophthalmology**, v. 2016, p. 1–11, aug., 2016b. DOI: 10.1155/2016/1965720.

CARRINGTON, L.M., ALBON, J., ANDERSON, I., KAMMA, C., BOULTON, M. Differential regulation of key stages in early corneal wound healing by TGF-beta isoforms and their inhibitors. **Investigative Ophthalmology & Vision Science**, v. 47, n. 5, p. 1886-1894, 2006. doi:<https://doi.org/10.1167/iovs.05-0635>.

CHEN, L.; LIU, Y.; ZHENG, X.; ZHENG, H.; LIU, P.; YANG, X.; LIU, Y. Alarmins from conjunctival fibroblasts up-regulate matrix metalloproteinases in corneal fibroblasts. **International Journal of Ophthalmology**, v. 13, n. 7, Jul., 2020. DOI: 10.18240/ijo.2020.07.03

CHEN, M.; BAO, L.; ZHAO, M.; CAO, J.; ZHENG, H. Progress in Research on the Role of FGF in the Formation and Treatment of Corneal Neovascularization. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, Fev., 2020. DOI:10.3389/fphar.2020.00111

CHOUKROUN, J.; DISS, A.; SIMONPIERI, A.; GIRARD, M.-O.; SCHOEFFLER, C., DOHAN, S. L., ... DOHAN, D. M. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part V: Histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v. 101, n. 3, p. 299–303. mar., 2006. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.012.

CHOUKROUN, J.; GHANAATI, S. Reduction of relative centrifugation force within injectable platelet-rich-fibrin (PRF) concentrates advances patients' own inflammatory cells, platelets and growth factors: the first introduction to the low speed centrifugation concept. **European Journal of Trauma and Emergency Surgery**, v. 44, n. 1, p. 87–95, mar. 2017. DOI:10.1007/s00068-017-0767-9

DAVIS, F. A. The anatomy and histology of the eye and orbit of the rabbit. **Transactions of the American Ophthalmological Society**, v. 27, p. 400-441, 1929.

DE OLIVEIRA, R. C.; WILSON, S. E. Fibrocytes, Wound Healing, and Corneal Fibrosis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 61, n. 2, a. 28, p. 1-14, 2020. doi:10.1167/iovs.61.2.28.

DERELI CAN, G.; AKDERE, O. E.; CAN, M. E.; AYDIN, B.; CAGIL, N.; GÜMÜŞDERELIOĞLU, M. A completely human-derived biomaterial mimicking limbal niche: Platelet-rich fibrin gel. **Experimental Eye Research**, v. 173, p. 1–12. 2018. doi:10.1016/j.exer.2018.04.013

DERELI CAN, G.; AKCAN, G.; CAN, M. E.; AKDERE, Ö.; ÇAYLI, S.; ŞİMŞEK, G.; GÜMÜŞDERELIOĞLU, M. Surgical and Immunohistochemical Outcomes of Scleral Reconstruction with Autogenic, Allogenic and Xenogenic Grafts: An Experimental Rabbit Model, **Current Eye Research**, v. 45, n. 12, p. 1572-1582, 2020. DOI: 10.1080/02713683.2020.1764976.

DOHAN, D. M.; CHOUKROUN, J.; DISS, A.; DOHAN, S. L.; DOHAN, A. J. J.; MOUHYI, J.; GOGLY, B. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 101, n. 3, e37–e44. mar., 2006a. DOI:10.1016/j.tripleo.2005.07.008

DOHAN, D. M.; CHOUKROUN, J.; DISS, A.; DOHAN, S. L.; DOHAN, A. J. J.; MOUHYI, J.; GOGLY, B. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates? **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 101, n. 3, p. e51–55, 2006c. DOI:10.1016/j.tripleo.2005.07.010

DOHAN EHRENFEST, D. M.; DE PEPPO, G. M.; DOGLIOLI, P.; SAMMARTINO, G. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. **Growth Factors**, v. 27, n. 1, p. 63–69, 2009. DOI:10.1080/08977190802636713

DOHAN EHRENFEST, D. M.; DEL CORSO, M.; DISS, A.; MOUHYI, J.; CHARRIER, J.-B. Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. **Journal of**

Periodontology, v. 81, n. 4, p. 546–555. apr., 2010. DOI:10.1902/jop.2009.090531.

DOHAN EHRENFEST, D. M.; LEMO, N.; JIMBO, R.; SAMMARTINO, G. Selecting a relevant animal model for testing the in vivo effects of Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): Rabbit tricks and traps. Letters to the Editor. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 110, n. 4, p. 413-416, 2010b. doi: 10.1016/j.tripleo.2010.05.057.

DONATTII, C.; BRANDÃO, C. V. S.; RANZANI, J. J. T.; PERCHES, C. S.; PADOVANI, C. R.; PELLIZZON, C. H.; SERENOI, M. G. Uso do plasma rico em plaquetas no reparo de úlceras de córnea profundas induzidas em coelhos. Avaliação clínica e histomorfométrica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, v. 65, n. 3, p. 809-818, Jun., 2013. DOI:10.1590/S0102-09352013000300029

EATON, S. Laboratory Animal Ophthalmology. In: GELATT, K. N.; BEN-SHLOMO, G.; GILGER, B. C.; HENDRIX, D. V. H.; KERN, T. J.; PLUMMER, C. E. **Veterinary ophthalmology**. 6. ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2021. vol. 2, cap. 33, p. 2109-2178.

EDELMANN, M. L.; MOHAMMED, H. O.; WAKSHLAG, J. J.; LEDBETTER, E. C. Clinical trial of adjunctive autologous platelet-rich plasma treatment following diamond-burr debridement for spontaneous chronic corneal epithelial defects in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 253, n. 8, p. 1012–1021. Out, 2018. DOI:10.2460/javma.253.8.1012.

EL BAGDADI, K.; KUBESCH, A.; YU, X.; AL-MAAWI, S.; ORLOWSKA, A.; DIAS, A.; ... GHANAATI, S. Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)-based matrices: a proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept). **European Journal of Trauma and Emergency Surgery**, v. 45, p. 467–479, mar. 2019. DOI:10.1007/s00068-017-0785-7

ER, H.; UZMEZ, E. Effects of transforming growth factor-beta 2, interleukin 6 and fibronectin on corneal epithelial wound healing. **European Journal of Ophthalmology**, v. 8, n. 4, p. 224-229, 1998. PMID: 9891893.

ETHEREDGE, L.; KANE, B. P.; HASSELL, J. R. The Effect of Growth Factor Signaling on Keratocytes In Vitro and Its Relationship to the Phases of Stromal Wound Repair. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 50, n. 7, p. 3128-3136. jul., 2009. DOI:10.1167/iov.08-3077

FARGHALI, H.; ABDELKADER, N. A.; ABUBAKR, H. O.; RAMADAN, E. S.; KHATTAB, M. S.; SALEM, N. Y.; EMAM, I. A. Úlcera corneal em cães e gatos: nova aplicação clínica de terapia regenerativa usando injeção subconjuntiva de plasma autólogo rico em plaquetas. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 1-17, Mar., 2021. DOI: 10.3389/fvets.2021.641265

FEATHERSTONE, H. J.; HEINRICH, C. L. Ophthalmic Examination and Diagnostics: The Eye Examination and Diagnostic Procedures. In: GELATT, K. N.; BEN-SHLOMO, G.; GILGER, B. C.; HENDRIX, D. V. H.; KERN, T. J.; PLUMMER, C. E. **Veterinary Ophthalmology**. 6. ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2021. vol. 1, cap. 10, p. 564-661.

FUJIOKA-KOBAYASHI, M.; MIRON, R. J.; HERNANDEZ, M.; KANDALAM, U.; ZHANG, Y.; CHOUKROUN, J. Optimized Platelet-Rich Fibrin With the Low-Speed Concept: Growth Factor Release, Biocompatibility, and Cellular Response. **Journal of Periodontology**, v. 88, n. 1, p. 112–121, 2017. DOI:10.1902/jop.2016.160443

GHANAATI, S.; BOOMS, P.; ORLOWSKA, A.; KUBESCH, A.; LORENZ, J.; RUTKOWSKI, J.; ... CHOUKROUN, J. Advanced Platelet-Rich Fibrin: A New Concept for Cell-Based Tissue Engineering by Means of Inflammatory Cells. **Journal of Oral Implantology**, v. 40, n. 6, p. 679–689, 2014. DOI:10.1563/aaid-joi-d-14-00138

GHARAMI, S.; BHATTACHARJEE, A.; KONAR, A.; HAZRA, S. Antheraea mylitta Silk Films Support Corneal Re-epithelialisation as Inlay Grafts in Large-Sized Corneal Defect. **Regenerative Engineering and Translational Medicine**. mar., 2020. DOI:10.1007/s40883-020-00159-x.

GODOY, C. S. O.; WAHAB, S. A.; MOREIRA, H.; MOREIRA, L. B.; GODOY, G. Análise das alterações na curvatura corneana com implante intra-estromal:

estudo experimental em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 70, n. 2, p. 303-311, 2007.

GONÇALVES, L. G. **Análise das alterações corneanas e do segmento anterior de olhos de coelhos em crescimento pelo sistema duplo Scheimpflug e discos de Plácido**. 2018. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2018.

GONZÁLEZ-REDONDO, P.; CONTRETAS-CHACÓN, G. M. Perceptions among university students in Seville (Spain) of the rabbit as livestock and as a companion animal. **World Rabbit Science**, v. 20, p. 155-162, 2012.

GRAHAM, J. Common Procedures in Rabbits. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 9, n. 2, p. 367–388, 2006. DOI:10.1016/j.cvex.2006.01.002.

HAMRAH, P.; SAHIN, A. Epitélio do limbo e da córnea. In: HOLLAND, E. J.; MANNIS, M. J.; LEE, W. B. **Doenças da superfície ocular: córnea, conjuntiva e filme lacrimal**. Cap 5. 1 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

HERRERA, D. Afecções da córnea. In:_. **Oftalmologia clínica em animais de companhia**. São Paulo: MedVet, 2008. chap. 7, p. 111-140.

HICK, S.; DEMERS, P. E.; BRUNETTE, I.; LA, C.; MABON, M.; DUCHESNE, B. Amniotic Membrane Transplantation and Fibrin Glue in the Management of Corneal Ulcers and Perforations. **Cornea**, v. 24, n. 4, p. 369–377, maio, 2005. DOI: 10.1097/01.ico.0000151547.08113.d1

HIROTA, I. N. **Uso de membrana de fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) em úlceras de córnea profundas induzidas em coelhos**. 2021. Tese (Doutorado em Animais Selvagens) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2021.

HOLMBERG, B. J. Ophthalmology of exotic pets. In: MAGGS, D. J.; MILLER, P. E.; OFRI, R. **Slatter's fundamentals of veterinary ophthalmology**. 6. ed. Missouri: Elsevier, 2018. cap. 20. p. 445-462.

KAY, E. P.; LEE, M. S.; SEONG, G. J.; LEE, Y. G. TGF- β s stimulate cell proliferation via an autocrine production of FGF-2 in corneal stromal fibroblasts. **Current Eye Research**, v. 17, n. 3, p. 286–293, 1998. doi:10.1076/ceyr.17.3.286.5212.

KAWASE, T.; TANAKA, T. An updated proposal for terminology and classification of platelet-rich fibrin. **Regenerative Therapy**, v. 7, p. 80–81, 2017. DOI:10.1016/j.reth.2017.10.002

KLENKLER, B.; SHEARDOWN, H. Growth factors in the anterior segment: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology. **Experimental Eye Research**, v. 79, n. 5, p. 677–688. Nov., 2004. doi:10.1016/j.exer.2004.07.008.

LI, D. Q.; LOKESHWAR, B. L.; SOLOMON, A.; MONROY, D.; JI, Z.; PFLUGFELDER, S. C. Regulation of MMP-9 Production by Human Corneal Epithelial Cells. **Experimental Eye Research**, v. 73, n. 4, p. 449–459, 2001. doi:10.1006/exer.2001.1054.

LIU, J.; ROBERTS, C. J. Influence of corneal biomechanical properties on intraocular pressure measurement. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, v. 31, n. 1, p. 146-155, 2005.

LJUBIMOV, A. V.; SAGHIZADEH, M. Progress in corneal wound healing. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 49, p. 17–45. 2015. doi:10.1016/j.preteyeres.2015.07.002

MADURANTAKAM, P.; YOGANARASIMHA, S.; HASAN, F. K. Characterization of Leukocyte-platelet Rich Fibrin, A Novel Biomaterial. **Journal of Visualized Experiments**, v. 103, e. 53221, p. 1-8, set. 2015. DOI:10.3791/53221

MAGGS, D. J. Cornea and sclera. In: MAGGS, D. J.; MILLER, P. E.; OFRI, R. **Slatter's fundamentals of veterinary ophthalmology**. 6. ed. Missouri: Elsevier, 2018. p. 184-219.

MAKITAIPALE, J.; HARCOURT-BROWN, F. M.; LAITINEN-VAPAAVUORI, O. Health survey of 167 pet rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Finland. **Veterinary Record**, v. 177, n. 16, p. 418, 2015.

MEEKINS, J. M.; RANKIN, A. J.; SAMUELSON, D. A. Ophthalmic Anatomy. In: GELATT, K. N.; BEN-SHLOMO, G.; GILGER, B. C.; HENDRIX, D. V. H.; KERN, T. J.; PLUMMER, C. E. **Veterinary Ophthalmology**. 6. ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2021. cap. 2, p. 41-123.

MERLINI, N.B. et al. Uso de plasma rico em plaquetas em úlceras de córnea em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 6, p. 1742-1750, Jun., 2014. DOI: 10.1590/1678-6906.

MOREIRA, M. V. L.; TEIXEIRA NETO, R. L. A. L.; LANGOHR, I. M.; ECCO, R. Prospective study of ocular and periocular diseases in animals: 188 cases. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 502-510, mar. 2018. DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-5044.

MÜLLER, L. J.; PELS, E.; VRENSSEN, G. F. J. M. The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature. **British Journal of Ophthalmology**, v. 85, p. 437-443, 2001.

NANDITHA, S.; CHANDRASEKARAN, B.; MUTHUSAMY, S.; MUTHU, K.; Apprising the diverse facets of Platelet rich fibrin in surgery through a systematic review. **International Journal of Surgery**, v. 46, p. 186–194, 2017. doi:10.1016/j.ijssu.2017.08.558.

NUGENT, M. A.; IOZZO, R. V. Fibroblast growth factor-2. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 32, n. 2, p. 115–120., 2000. doi:10.1016/s1357-2725(99)00123-5.

NUGENT, R. B.; LEE, G. A. Ophthalmic use of blood-derived products. **Survey of Ophthalmology**, v. 60, n. 5, p. 406–434. mar. 2015. doi:10.1016/j.survophthal.2015.03.003.

OFRI, R.; EKESTEN, B. Optics and Physiology of Vision. In: GELATT, K. N.; BEN-SHLOMO, G.; GILGER, B. C.; HENDRIX, D. V. H.; KERN, T. J.; PLUMMER, C. E. **Veterinary Ophthalmology**. 6. ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2021. vol. 1, cap. 4, p. 168-224.

OLADIPUPO, S. S.; SMITH, C.; SANTEFORD, A.; PARK, C.; SENE, A.; WILEY, L. A.; ORNITZ, D. M. Endothelial cell FGF signaling is required for injury response

but not for vascular homeostasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 37, p. 13379–13384, 2014. doi:10.1073/pnas.1324235111

OLLIVIER, F. J.; GILGER, B. C.; BARRIE, K. P.; KALLBERG, M. E.; PLUMMER, C. E.; O'REILLY, S.; GELATT, K. N.; BROOKS, D. E. Proteinases of the cornea and preocular tear film. **Veterinary Ophthalmology**. v. 10, n. 4, p. 199–206, 2007.

PERCHES, C. S.; PELLIZZON, C. H.; RANZANI, J. J. T.; DONATTI, C.; PADOVANI, C. R.; MERLINI, N. B.; FONZAR, J. F.; BESERRA, H. E. O.; ROCHA, N. S.; BRANDÃO, C. V. S. Expressão de metaloproteinases de matriz e PCNA em úlceras de córnea profundas, induzidas em coelhos, tratadas com plasma rico em plaquetas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 6, p. 1607-1615, 2015. DOI:10.1590/1678-4162-8142.

PESSOA, C. A. Lagomorpha (Coelho, Lebre e Tapiti). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014. v. 1, cap. 56, p. 1209-1237.

PONTES, K. C. S.; BORGES, A. P. B.; ELEOTÉRIO, R. B.; FAVARATO, L. S. C.; DUARTE, T. S. Processo de reparação de lesões da córnea e a membrana amniótica na oftalmologia. **Ciência Rural**, v. 41, n. 12, p. 2120-2127, dez, 2011. DOI: 10.1590/S0103-84782011001200014.

RIAU, A. K.; TAN, N. Y. S.; ANGUNAWELA, R. I.; HTOON, H. M.; CHAURASIA, S. S.; MEHTA, J. S. Reproducibility and age-related changes of ocular parametric measurements in rabbits. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 138, p. 1-9, 2012.

RIORDAN-EVA, P.; WHITCHER, J. P. **Oftalmologia geral de Vaughan e Asbury**. 17. ed. Porto Alegre: AMGH Ltda, 2008.

ROBERTS, A. B. The ever-increasing complexity of TGF- β signaling. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 13, n. 1, p. 3–5, 2002. doi:10.1016/s1359-6101(01)00027-2

SANCHEZ-AVILA, R. M.; MERAYO-LLOVES, J.; Riestra, A. C.; BERISA, S.; LISA, C.; SÁNCHEZ, J. A.; MURUZABAL, F.; ORIVE, G.; ANITUA, E. Plasma rich in growth factors membrane as coadjuvant treatment in the surgery of ocular

surface disorders. **Medicine**, v. 97, n. 17, e. 0242, p.1-10, apr. 2018. doi:10.1097/md.00000000000010242

SCALINCI, S. Z.; SCOROLLI, L.; MEDURI, A.; GRENGA, P. L.; CORRADETTI, G.; SCALINCI, S. Z. Effect of basic fibroblast growth factor and cytochrome c peroxidase combination in transgenic mice corneal epithelial healing process after excimer laser photoablation. **Clinical Ophthalmology**, v. 5, p. 215-221, fev., 2011. doi:10.2147/opth.s16866

SINGH, V.; BARBOSA, F. L.; TORRICELLI, A. A. M.; SANTHIAGO, M. R.; WILSON, S. E. Transforming growth factor β and platelet-derived growth factor modulation of myofibroblast development from corneal fibroblasts in vitro. 31 **Experimental Eye Research**, v. 120, p. 152-160, 2014. Doi: 10.1016/j.exer.2014.01.003

SONG, Q. H.; KLEPEIS, V. E.; NUGENT, M. A.; TRINKAUS-RANDALL, V. TGF-beta1 regulates TGF-beta1 and FGF-2 mRNA expression during fibroblast wound healing. **Molecular Pathology**, v. 55, n. 3, p. 164–176, 2002. doi:10.1136/mp.55.3.164.

SUN, Y.; SU, L.; WANG, Z.; et al. H-RN, a peptide derived from hepatocyte growth factor, inhibits corneal neovascularization by inducing endothelial apoptosis and arresting the cell cycle. **BMC - Molecular and Cell Biology**, v. 14, n. 8, p. 1-10, 2013. Doi: 10.1186/1471-2121-14-8

SUZUKI, S.; MORIMOTO, N.; IKADA, Y. Gelatin gel as a carrier of platelet-derived growth factors. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 28, n. 4, p. 595–606, fev., 2013. DOI:10.1177/0885328212468183

TAMHANE M.; CABRERA-GHAYOURI, S.; ABELIAN, G.; VISWANATH, V. Review of Biomarkers in Ocular Matrices: Challenges and Opportunities. **Pharmaceutical Research**, v. 36, n.3, p. 1-40, 2019. DOI: 10.1007/s11095-019-2569-8

VALINHOS, M. A. R. **Mensuração do bulbo ocular e cálculo do poder dióptrico de lentes intraoculares em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*,**

LINNAEUS, 1758). 2011. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

VAN DEN BOGERD, B.; DHUBHGHAILL, S. N.; KOPPEN, C.; TASSIGNON, M.-J.; ZAKARIA, N. A review of the evidence for in vivo corneal endothelial regeneration. **Survey of Ophthalmology**, v. 63, n. 2, p. 149–165. 2018. doi:10.1016/j.survophthal.2017.07.004

XIMENES, K. F.; SILVA, J. V.; MONTE, F. Q. O papel da membrana de Descemet na patogenia do edema corneano após cirurgia de segmento anterior. **Revista Brasileira de Oftalmologia**. v. 73, n. 5, p. 262-268. DOI: 10.5935/0034-7280.20140057.

WANG, L.; KO, C. Y.; MEYERS, E. E.; PEDROJA, B. S.; PELAEZ, N.; BERNSTEIN, A. M. Concentration-dependent effects of transforming growth factor β 1 on corneal wound healing. **Molecular Vision**, v. 17, p. 2835-2846, 2011. PMID: PMC3224828.

WANG, L.; WU, X.; SHI, T.; LU, L. Epidermal growth factor (EGF)-induced corneal epithelial wound healing through nuclear factor κ B subtype-regulated CCCTC binding factor (CTCF) activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 34, p. 24363-24371, 2013. Doi: 10.1074/jbc.M113.458141

WERNER, L.; CHEW, J.; MAMALIS, N. Experimental evaluation of ophthalmic devices and solutions using rabbit models. **Veterinary Ophthalmology**, v. 9, n. 5, p. 281-291, 2006.

WANG, X.; KHALIL, R. A. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. **Advances in Pharmacology**, v. 81, p. 241-330, 2018. DOI: 10.1016/bs.apha.2017.08.002.

WEST-MAYS, J. A.; DWIVEDI, D. J. The keratocyte: Corneal stromal cell with variable repair phenotypes. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, n. 10, p. 1625–1631, 2006. doi:10.1016/j.biocel.2006.03.010.

WHITLEY, R. D.; HAMOR, R. E. Diseases and surgery of the canine cornea and sclera. In: GELATT, K. N.; BEN-SHLOMO, G.; GILGER, B. C.; HENDRIX, D. V.

H.; KERN, T. J.; PLUMMER, C. E. **Veterinary ophthalmology**. 6. ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2021. vol. 1, cap. 19, p. 1082-1172.

WILLIAMS, D. L. The rabbit eye. In:____. **Ophthalmology of Exotic Pets**. Iowa: Wiley-Blackwell, 2012. chap. 4, p. 15-55.

WILSON, S. E. Corneal wound healing. **Experimental Eye Research**, 197, 108089, 2020. doi:10.1016/j.exer.2020.108089.

WILSON, S. E.; MARINO, G. K.; TORRICELLI, A. A. M.; MEDEIROS, C. S. Injury and defective regeneration of the epithelial basement membrane in corneal fibrosis: A paradigm for fibrosis in other organs? **Matrix Biology**, v. 64, p. 17–26, 2017. doi:10.1016/j.matbio.2017.06.003.

WILSON, S. E.; MOHAN, R. R.; MOHAN, R. R.; AMBRÓSIO JR, R.; HONG, J.; LEE, J. The Corneal Wound Healing Response: Cytokine-mediated Interaction of the Epithelium, Stroma, and Inflammatory Cells. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 20, n. 5, p. 625-637, set., 2001. DOI: 10.1016/s1350-9462(01)00008-8.

YE, H.; AZAR, D.T.; Expression of Gelatinases A and B, and TIMPs 1 and 2 during Corneal Wound Healing. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 39, p. 913-921, May., 1998.

YOU, J.; HODGE, C.; HOQUE, M.; PETSOGLU, C.; SUTTON, G.. Human Platelets and Derived Products in Treating Ocular Surface Diseases – A Systematic Review. **Clinical Ophthalmology**, v. 14, p. 3195–3210. out., 2020. doi:10.2147/opth.s265701.

YU, F. S. X.; YIN, J.; XU, K.; HUANG, J. Growth factors and corneal epithelial wound healing. **Brain Research Bulletin**, v. 81, n. 2–3, p. 229–235, 2010. Doi: 10.1016/j.brainresbull.2009.08.024

ZHANG, H.; QIN, X.; CAO, X.; ZHANG, D.; LI, L. Age-related variations of rabbit corneal geometrical and clinical biomechanical parameters. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1-11, 2017. ID: 3684971

CAPÍTULO 2