

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS ALOGÊNICO EM
ÚLCERAS INDUZIDAS EM CÓRNEA DE RATOS**

MICAELLA GORDON GANDOLFI

BOTUCATU - SP
Julho/2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

PLASMA RICO EM PLAQUETAS ALOGÊNICO EM ÚLCERAS INDUZIDAS EM CÓRNEA DE RATOS

MICAELLA GORDON GANDOLFI

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Botucatu, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Adj. Cláudia Valéria Seullner Brandão.

BOTUCATU - SP
Julho/2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Gandolfi, Micaella Gordon.

Plasma rico em plaquetas alogênico em úlceras induzidas em córnea de ratos / Micaella Gordon Gandolfi. - Botucatu, 2016

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

Orientador: Cláudia Valéria Seullner Brandão

Capes: 50501003

1. Plasma Rico em Plaquetas. 2. Córnea - Úlceras. 3. Biotecnologia animal. 4. Soluções oftálmicas. 5. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Colírio; Fator de crescimento; PDGF; Plasma rico em plaquetas aquecido; Reparação corneal.

MICAELLA GORDON GANDOLFI

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS ALOGÊNICO EM ÚLCERAS INDUZIDAS
EM CÓRNEA DE RATOS**

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª. Adj. Drª. Cláudia Valéria Seullner Brandão

Membro e Orientadora

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária
FMVZ/UNESP - Botucatu - SP.

Profa. Adj. Drª. Regina Kiomi Takahira

Presidente

Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ/UNESP - Botucatu - SP.

Profa. Adj. Drª. Claudia Helena Pellizon

Membro

Departamento de Morfologia
IB-UNESP - Botucatu - SP.

Data da defesa: 22 de julho de 2016.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus.

À minha orientadora Professora Cláudia Valéria, por todos os ensinamentos, pela paciência, por tudo que ela fez e faz por mim e principalmente por ter me aceitado no mestrado e ter depositado tanta confiança em mim, espero ter retribuído.

Ao Professor Quim, por todos os ensinamentos, pelas conversas, por toda a dedicação pelo serviço e por nós.

À Profa. Cláudia Pellizzon por me receber em seu departamento por me ajudar no desenvolvimento deste estudo, sempre me recebendo com muito carinho em seu departamento. Ao Lucas e Fernando Pereira pela ajuda no laboratório.

À Profa. Regina Kiomi Takahira pelas correções e por toda a contribuição tanto na qualificação quanto na defesa.

À grande família oftálmica, que hoje não é tão grande assim: Úrsula, Cintia, Inajara, Natalie, Nátaia, Joice, Vivian, Rodrigo, Cris, Luciana e Anna Clara, queria agradecer de coração a cada um por terem me ajudado, cada um de uma maneira; obrigada por animarem as minhas madrugadas com os animais; sem vocês eu não estaria aqui.

Às meninas com quem morei, seja um mês ou anos, Juliana, Rebeca, Flávia, Janaína, Úrsula, Natalie, Ana Paula, Inajara, Anna Clara e Lenise; obrigada pelas conversas, desabafos e pela ótima convivência.

Aos meus pais, Karen e Alberto, sem vocês eu não estaria aonde estou, obrigada pelo apoio, dedicação, pela educação que recebi; vocês são a minha base, sem vocês nada disso faria sentido. Em especial para o Alberto, pois sempre tive vontade de estudar e aprender me espelhando em você.

Ao Augusto, meu namorado, a pessoa que mais me aguentou nesse tempo todo, obrigada pela paciência e por sempre me fazer ver o outro lado de tudo.

Ao Prof. Carlos Roberto Padovani pela análise estatística.

À CAPES pelo apoio fundamental na realização deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Vascularização corneal nos diferentes grupos e momentos de avaliação, representada por mediana dos escores, seguida por valor mínimo e máximo	43
Tabela 2. Opacidade corneal nos diferentes grupos e momentos de avaliação, representada por mediana dos escores, seguida por valor mínimo e máximo.	44
Tabela 3. Reparação corneal nos diferentes grupos e momentos, representada por mediana dos escores, seguida por valor mínimo e máximo.	45
Tabela 4. Concentração corneal de PDGF-BB (ng/mL), segundo grupos e momento de avaliação, representada por média e desvio padrão.	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto macroscópico dos bulbo ocular e anexos dos ratos. Notar: A. Opacidade leve e ausência de vasos e reparação corneal parcial no M3 do grupo aquecido (GA). B. Opacidade intensa e ausência de vasos e reparação corneal parcial no M3 do grupo controle (GC). C. Opacidade leve, ausência de vasos e reparação corneal parcial no M3 do grupo PRP (GP).45

LISTA DE ABREVIACÕES

µl	microlitro
ARVO	<i>Association for Research in Vision and Ophthalmology</i>
βFGF	fator de crescimento de fibroblastos básico
EGF	fator de crescimento epidermal
FGF	fator de crescimento fibroblástico
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu
GA	grupo tratado com plasma rico em plaquetas aquecido
GC	grupo controle
GP	grupo tratado com plasma rico em plaquetas
IgE	imunoglobulina E
IGF-I	fator de crescimento semelhante à insulina
IM	intramuscular
KGF	fator de crescimento de ceratinócitos
M1	1 dia de tratamento
M3	3 dias de tratamento
M5	5 dias de tratamento
mg	miligramas
mg/kg	miligramas por quilo
mg/mL	miligramas por mililitro
mL	mililitro
MMPs	metaloproteinase da matriz extracelular
ng/mL	nanograma por mililitro
PDGF	fator de crescimento derivado das plaquetas
PPP	plasma pobre em plaquetas
PRP	plasma rico em plaquetas
TGF-β	fator transformador de crescimento beta
UNESP	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

Capítulo 1	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Aspectos anatomofisiológicos da córnea	16
2.2 Reparação corneal.....	18
2.3 Atuação dos fatores de crescimento na reparação corneal	19
2.4 A utilização do plasma rico em plaquetas na oftalmologia	21
3 REFERÊNCIAS	25
PLASMA RICO EM PLAQUETAS ALOGÊNICO EM ÚLCERAS INDUZIDAS EM CÓRNEA DE RATOS	35

GANDOLFI, M.G. **Plasma rico em plaquetas alogênico em úlceras induzidas em córnea de ratos**. Botucatu, 2016. p.49. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Neste estudo, tivemos como objetivo avaliar o efeito clínico do uso do plasma rico em plaquetas (PRP) alogênico, aquecido ou não aquecido, no tratamento de úlcera de córnea, utilizando-se o rato como modelo experimental. Para isso foram induzidas úlceras unilaterais na córnea esquerda de ratos (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*) (n=81), machos e fêmeas, os quais foram distribuídos de forma randomizada em três grupos (n=27): grupo controle (GC), o qual não recebeu nenhum tratamento tópico; grupo PRP aquecido (GA) e o grupo PRP (GP); ambos receberam tratamento tópico a cada oito horas, durante cinco dias. Cada grupo foi subdividido em três momentos, de acordo com o período final de avaliação, 24 horas (M1), três dias (M3) e cinco dias (M5). A avaliação clínica foi realizada considerando-se as variáveis opacidade, vascularização e reparação corneal. Foi dosado na córnea o PDGF-BB, utilizando-se o método de Elisa. Houve diminuição da opacidade corneal nos grupos tratados em relação ao GC, no M1, bem como menor tempo na reparação corneal dos grupos tratados quando comparado com GC. Quanto à vascularização, observou-se maior vascularização no M3 em comparação com o M1, apenas no GP. Entretanto não houve diferença na concentração de PDGF-BB, dentre os grupos e momentos. Conclui-se que a utilização de PRP alogênico, aquecido ou não, acelera a reparação corneal, bem como diminui a opacidade corneal; no entanto, não aumenta a concentração do PDGF-BB na córnea.

Palavras chave: Plasma rico em plaquetas aquecido; Fator de crescimento; reparação corneal; PDGF; Plasma rico em fatores de crescimento; Colírio.

GANDOLFI, M.G. Allogenic Platelet-Rich Plasma In Induced Ulcers In Rats Cornea. Botucatu, 2016. p. 49. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

This study aims to evaluate the clinical effect of the use of an allogeneic platelet-rich plasma (PRP), heated or unheated, in the treatment of corneal ulcers. An experimental model of corneal ulcers were induced in 81 rats (*Rattus norvegicus*, Albinus variety), standardizing the left eye, distributing the rats randomly and blindly into three groups (n = 27): control group (CG), which received no topical treatment; heated PRP Group (GA) and PRP group (PG) which received topical treatment every eight hours for five days. Each group was divided at three different moments, according to the final evaluation moment, 24 hours (M1), three days (M3) and five days (M5). The opacity, vascularization and corneal repair were clinically evaluated. PDGF-BB was measured from the cornea, using ELISA method. There was a reduction of corneal opacity at M1 and M5 in animals treated with PRP (GA and GP) and decrease in corneal repair time, when compared to the control group. Also, a greater vascularization was noted in the GP in M3 compared to M1. The use of allogeneic PRP eyedrops, heated or not, accelerates the corneal repair as well as decreases the corneal opacity. However, the concentration of PDGF in the cornea did not alter in any treatment.

Keywords: Heated Platelet-rich plasma; Growth fator; Platelet-derived growth fator; Corneal repair; Eyedrop.

Capítulo 1

1 INTRODUÇÃO

A ceratite ulcerativa, conhecida também como úlcera de córnea, é a afecção ocular mais frequente nos animais; ocorre quando o epitélio e uma quantidade variável do estroma são perdidos (SLATTER, 2005; HERRERA, 2008; GALERA et al., 2009).

Devido à ausência de vasos na córnea, o mecanismo de cicatrização é conduzido por intermédio de mediadores inflamatórios, juntamente com os fatores de crescimento produzidos decorrentes da lesão (GUM; MacKAY, 2013).

Os fatores de crescimento são produzidos pelo epitélio, estroma e endotélio corneal (ZAGON et al., 2000) e estão presentes no filme lacrimal e humor aquoso, ficando constantemente em contato com a córnea (ROLANDO; ZIERHUT; LONG et al., 2007). Estes são de extrema importância na reparação corneal devido à ação mediadora na proliferação de células epiteliais e estromais, e influenciam na remodelação da matriz extracelular (SCALINCI et al., 2011).

Dentre os principais fatores de crescimento que atuam na cicatrização corneal está o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que tem como função modular a proliferação, migração e diferenciação das células na córnea, assim como em outros tecidos (SINGH et al., 2014).

Estudos avaliaram os derivados à base de sangue e mostraram que os mesmos são eficazes e seguros no tratamento de muitas doenças da superfície ocular (ANITUA, 2015). Dentre os derivados, encontra-se o plasma rico em plaquetas (PRP), que possui alta concentração de plaquetas e fatores de crescimento, que são liberados pelos grânulos- α das plaquetas (ANITUA et al., 2004).

A utilização do PRP em afecções da superfície ocular está sendo cada vez mais estudada e aplicada. Sabe-se que o PRP possui excelentes resultados, acelerando a cicatrização, quando empregados na oftalmologia (ALIÓ et al., 2007a; ALIÓ et al., 2007b; GEREMICCA et al., 2010; PANDA et al., 2012; ALIÓ et al., 2013).

Anitua et al. (2014) avaliaram uma nova opção de PRP, o qual é aquecido à 56°C durante uma hora após o seu preparo. Nesse estudo, verificou-se que a concentração da maioria dos fatores de crescimento não alterou. Entretanto, o

fator de crescimento epidermal (EGF), proteínas do sistema complemento e Imunoglobulina E (IgE) apresentaram diminuição significativa do componente inflamatório. Concluíram que o uso do PRP aquecido é uma opção para o tratamento de doenças da superfície ocular em pacientes que possuem como etiologia de base, o sistema autoimune, uma vez que o aquecimento diminuiu os níveis de IgE e do sistema complementar; contudo, manteve a maior parte das proteínas e componentes envolvidos na cicatrização. Além disso, sugeriram estudos *in vivo* para avaliar a eficácia e o potencial do PRP aquecido.

Hipotetiza-se que a utilização de fatores de crescimento em forma de colírio aumenta a presença do mesmo na córnea. Além de que, a utilização de PRP, seja ele aquecido ou não, oriundo de outros animais da mesma espécie, sob forma de colírio é capaz de acelerar a cicatrização, bem como diminuir a opacidade corneal, posto que os fatores de crescimento presentes no PRP modulam a reparação corneal.

Na literatura consultada, não foram encontrados estudos sobre a administração do PRP aquecido no tratamento de úlcera de córnea, tampouco a utilização de PRP alogênico, o que estimulou o desenvolvimento desta pesquisa.

Diante deste contexto, objetivou-se, com este estudo, avaliar o efeito clínico do uso do PRP e PRP aquecido, ambos alogênicos, no tratamento de úlcera de córnea, utilizando-se o rato como modelo experimental. Além disso, comparar a resposta do tratamento com PRP e PRP aquecido, por meio de avaliação clínica e quantificação do fator de crescimento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB) na córnea, desta forma, estabelecendo-se uma nova opção terapêutica adjuvante na cicatrização de úlcera de córnea.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos anatomofisiológicos da córnea

A córnea é a principal superfície de refração óptica do olho, em razão de sua curvatura (SLATTER, 2005; SLATTER; DIETRICH, 2007). Além disto, atua como barreira física, dá suporte ao conteúdo intraocular e permite a passagem da luz, em virtude de sua transparência (LEDBETTER; GILGER, 2013).

A transparência da córnea se baseia: na disposição e organização das fibras de colágeno; epitélio não queratinizado; superfície óptica lisa conferida pelo filme lacrimal; deturgescência parcial; ausência de pigmentos, vasos e células sanguíneas; e fibras nervosas periféricas amielínicas (SLATTER, 2005; SLATTER; DIETRICH, 2007; PIPPI; GONÇALVES, 2009; LEDBETTER; GILGER, 2013).

Histologicamente, a córnea é constituída por cinco ou seis camadas: epitélio; lâmina basal ou, em algumas espécies, cápsula de Bowman's; estroma; membrana de Descemet; e endotélio (HERRERA, 2008; LEDBETTER; GILGER, 2013). Porém, alguns autores consideram o epitélio e a lâmina basal como uma única camada e o filme lacrimal pré-corneal uma camada fisiológica mais externa (SLATTER, 2005; PIPPI; GONÇALVES, 2009).

O epitélio corneal tem a espessura de seis a dez células, é classificado como pavimentoso estratificado não queratinizado, apresentando padrão básico de membrana basal, células epiteliais basais, aladas e superficiais escamosas. O seu tempo de renovação são de cinco a sete dias (SLATTER, 2005; NJAA; WILCOCK, 2013).

As células basais, ao se dividirem, deslocam as células-filhas em direção à superfície, tornando-as achatadas como células aladas, e aos poucos vão perdendo suas organelas (SLATTER, 2005).

O estroma constitui 90% da córnea e é composto por fibrócitos, ceratócitos, lamelas de fibra de colágeno do tipo I e V e por matriz de proteoglicanos e glicosaminoglicanos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; SLATTER, 2005; LEDBETTER; GILGER, 2013).

Os ceratócitos são capazes de sintetizar colágeno, mucoproteínas, glicosaminoglicanos e de se transformar em fibrócitos, os quais produzem colágeno não transparente após uma lesão. O período de substituição do colágeno estromal varia de acordo com a espécie, mas pode se estender por anos (SLATTER, 2005).

A membrana de descemet é uma camada delgada, homogênea e acelular, estabelecida durante toda a vida, podendo aumentar a espessura com o passar da idade (SLATTER, 2005; HERRERA, 2008). A mesma pode ser chamada de membrana basal do endotélio, que a produz (LEDBETTER; GILGER, 2013).

A camada mais interna da córnea, o endotélio, é formado por uma simples e única camada de células de forma hexagonal, a qual exerce um papel fisiológico importante na manutenção da transparência corneal, por meio da ação de bombas metabólicas que controlam a passagem da água (HERERRA, 2008). Essas células apresentam mínima capacidade de replicação, o que varia de acordo com a idade e a espécie (SLATTER, 2005).

A inervação da córnea se dá pelos nervos ciliares longos, provenientes do ramo do nervo trigêmeo, que se ramificam por meio do estroma anterior e epitélio, onde as terminações nervosas são amielínicas; essa densa inervação gera intensa dor em lesões superficiais, bem como deflagra o reflexo do axônio quando estimulado, ocasionando miose, hiperemia, epífora e blefarospasmo (SLATTER; DIETRICH, 2007; GUM; MacKAY; 2013).

A sensibilidade corneal é o fator de maior importância de proteção do olho, visto que os reflexos de piscar rápido, retração do bulbo ocular e protrusão da terceira pálpebra são fundamentais quando a córnea é tocada ou estimulada (GUM; MacKAY; 2013).

Por ser a estrutura mais externa, a córnea é susceptível a sofrer lesões com maior frequência (HERRERA, 2008), acarretando a entrada de microrganismos, que por sua vez podem desencadear ceratites (STADES et al, 1999).

Há outros fatores que podem ocasionar as ceratites como: distúrbio de produção lacrimal; uveíte; glaucoma; irite; corpo estranho; trauma; dentre outros (STADES et al., 1999; SLATTER, 2005; PIPPI; GONÇALVES, 2009).

A ceratite ulcerativa é a afecção ocular mais frequente, caracterizada pela solução de continuidade corneal em decorrência de perda do epitélio e de uma quantidade variável de estroma (SLATTER, 2005; HERRERA, 2008; GALERA et al., 2009). Nos animais, a grande maioria é de origem traumática (van der WOERDT, 2004; BERCHT, 2009; WILLIAMS; KIM, 2009), porém, também pode ser de origem autoimune (ANDREW, 2008) e espontânea (MURPHY et al., 2001; LEDBETTER et al., 2006).

2.2 Reparação corneal

A reparação cicatricial da córnea provém do equilíbrio entre a migração, proliferação, diferenciação, apoptose e adesão celular (ZAGON, et al., 1998; ZAGON et al., 2000; ROLANDO; ZIERHUT, 2001). Esse processo é modulado por mediadores presentes na matriz extracelular do estroma, pela força mecânica exercida pelos movimentos palpebrais (BENTLEY; MURPHY, 2004), pela viabilidade da membrana basal do epitélio, como fonte de diferentes fatores de crescimento (MURPHY et al., 2001; YU et al., 2010) e pelas condições do filme lacrimal pré-corneal (BROOKS; OLLIVIER, 2004).

Uma variedade de fatores de crescimento é produzida pelo epitélio, estroma e endotélio corneal, os quais são fundamentais para a manutenção e a reparação da córnea (ZAGON et al., 2000). Esses se encontram tanto no filme lacrimal como no humor aquoso e ficam constantemente em contato com a córnea, promovendo a homeostase do segmento anterior do olho (ROLANDO; ZIERHUT, 2001; LONG et al., 2007).

Os fatores de crescimento são importantes no processo de reparação tecidual, pois estimulam a angiogênese, atuam na inflamação, tal como na deposição de matriz extracelular (ANITUA et al., 2004; KAUR et al., 2009).

As metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) têm um papel importante na manutenção e reparação do epitélio e do estroma corneal; dessa maneira, as mesmas têm sido amplamente estudadas na oftalmologia veterinária (STRUBBE et al., 2000; OLLIVIER et al., 2003; OLLIVIER et al., 2004; COUTURE et al., 2006; BARROS et al., 2007; PERCHES et al., 2015). Ademais, essas estão envolvidas na remodelação e reparação tecidual, bem como na destruição de tecidos (BROOKS; OLLIVIER, 2004).

2.3 Atuação dos fatores de crescimento na reparação corneal

Como na córnea integra não existem vasos sanguíneos, o mecanismo de cicatrização é conduzido por intermédio dos mediadores inflamatórios juntamente com os fatores de crescimento gerados decorrentes da lesão (GUM; MacKAY, 2013).

Os fatores de crescimento são mediadores biológicos naturais e são responsáveis por diversos eventos celulares, tais como: síntese de DNA, quimiotaxia e citodiferenciação (ANITUA, 1999).

Estes estão presentes no filme lacrimal e no humor aquoso e são produzidos constantemente pelo epitélio corneal (ROLANDO; ZIERHUT, 2001). Além disso, são importantes na reparação tecidual, sendo de extrema importância no processo de cicatrização corneal, devido à ação mediadora na proliferação de células epiteliais e estromais, além de influenciar na remodelação da matriz extracelular (SCALINCI et al., 2011).

O PDGF pertence à família de homo e heterodímeros catiônicos e possui três isoformas PDGF-AA, PDGF-AB e PDGF-BB, os quais são produzidos e liberados por células inflamatórias e pelas plaquetas (ACKERMANN, 2013); e estão presentes na lágrima, bem como no epitélio corneal (KIM et al., 1999; ZHOU et al., 2007).

Adicionalmente, foram descritos mais dois novos membros da família do PDGF, o PDGF-C e o PDGF-D; estes possuem estruturas proteicas semelhantes às do PDGF-A e PDGF-B (BETSHOLTZ et al., 2001)

Sabe-se que o PDGF é resistente ao calor (100°C) e ao tratamento com várias substâncias de dissociação, mas suscetível a agentes redutores (ANITUA, 1999).

As isoformas do PDGF exercem efeitos sobre células alvo por meio da ativação de dois receptores, α e β , após glicosilação de suas cadeias polipeptídicas (TERRACIO et al., 1988; CLAESSEONWELSH et al., 1989).

Por ser um dímero, o PDGF se liga à duas moléculas de receptores. Essa ligação possui alta afinidade, os receptores α ligam-se tanto à cadeia A quanto B, enquanto o receptor β possui afinidade apenas à cadeia B (ANITUA, 1999; BERGSTEN et al., 2001; GILBERTSON et al., 2001).

A função do PDGF é modular a proliferação, migração e diferenciação das células na córnea, assim como de outros tecidos (SINGH et al., 2014). Kaur et al. (2009) estudaram o bloqueio do PDGF e avaliaram a opacidade corneal pós ceratectomia em coelhos, e não observaram diferença estatística em relação ao grupo controle. Concluíram que foi devido a uma possível interação do PDGF sobre o fator transformador de crescimento β (TGF- β), ambos agindo na formação de opacidade corneal.

Existem três isoformas do TGF- β , o TGF- β^1 , TGF- β^2 e o TGF- β^3 , que podem ser encontrados no estroma, no epitélio e no filme lacrimal, sendo o TGF- β^1 a principal isoforma na cicatrização da córnea (CARRINGTON et al., 2006). O TGF- β pode se ligar à três diferentes tipos de receptores de membrana, os quais estão nas células do epitélio, estroma e endotélio (JOYCE; ZIESKE, 1997; CARRINGTON et al., 2006).

A família do TGF- β tem funções importantes no processo de cicatrização como na inflamação, angiogênese, reepitelização, formação de tecido de granulação e conjuntivo, síntese de matriz extracelular, resposta imune, apoptose e diferenciação celular, além de quimiotaxia (CARRINGTON et al., 2006; LONG et al., 2007; YU et al., 2010).

Carrington et al. (2006) investigaram a atuação do TGF- β^1 na cicatrização da córnea, bloqueando-o, e observaram que o tratamento com o anti-TGF- β^1 acelera reepitelização corneal, entretanto reduz a reparação estromal.

Long et al. (2007) pesquisaram a correlação da presença de TGF- β^1 na lágrima de pacientes pós cirurgia refrativa à laser, e relataram uma correlação positiva entre os níveis de TGF- β^1 no filme lacrimal no primeiro dia de pós-operatório e o grau de opacidade na córnea após um mês. Concluíram que a opacidade foi devido ao aumento significativo de TGF- β^1 na lágrima no primeiro dia do pós-operatório.

O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é o principal mediador do processo de vascularização corneal; auxilia na cicatrização da córnea, entretanto a vascularização pode promover secundariamente a perda da transparência (SUN et al., 2013). O VEGF-A estimula as células endoteliais dos vasos a degradarem a sua membrana basal e a migrarem; além disso, elas liberam matriz metaloproteinases que degradam a matriz extracelular facilitando o deslocamento das células (WITMER et al., 2003).

As plaquetas possuem mais de 30 proteínas bioativas dentre elas as principais citocinas e fatores de crescimento que promovem a reparação tecidual e influenciam outras células sanguíneas na angiogênese e inflamação local, tais como: PDGF; TGF- β ; VEGF; EGF; fator de crescimento fibroblástico (FGF); fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I); fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF); e fator de crescimento de ceratinócitos (KGF) (MARX, 2004; VENDRAMIN et al., 2006; WROTONIAK et al., 2007; LEE et al., 2013; KABIRI et al., 2014).

2.4 A utilização do plasma rico em plaquetas na oftalmologia

O PRP é um hemocomponente rico em fatores de crescimento oriundos dos grânulos- α plaquetários. As estratégias terapêuticas usadas têm como objetivo aumentar os efeitos dos fatores de crescimento, os quais são os principais iniciadores no processo de regeneração tecidual (LYNCH et al., 1989; MARX et al., 1998).

O plasma rico em plaquetas é indicado para promover a reepitelização e reparação tecidual de feridas, atuar no processo de hemostasia; seus fatores de crescimento estimulam células mesenquimais e epiteliais locais a migrar, dividir e aumentar a formação de matriz extracelular e de colágeno (ANITUA et al., 2004; ALIÓ et al., 2012).

Segundo Anitua et al. (2004), a concentração de plaquetas no PRP deve ser superior a 300.000 por μ L. Entretanto, Marx (2004) considera que a concentração de plaquetas deve ser quatro vezes maior que a do sangue total ou apresentar concentração mínima de 500.000 a 1.000.000 de plaquetas por μ L, para que seja capaz de acelerar reparação tecidual.

Sabe-se que a concentração dos fatores de crescimento no PRP é significativamente maior quando comparado com o sangue total, sucedendo um único produto com alta concentração de diferentes fatores, capaz de promover uma cicatrização mais rápida e eficaz (ALIÓ et al., 2007a).

Kim et al. (2012) compararam a concentração dos fatores de crescimento do PRP com o soro autólogo e observaram que TGF- β 1 apresentou concentração cerca de 138% superior, e o EGF foi aproximadamente 2,5 vezes maior no PRP.

Um dos primeiros relatos do uso de PRP foi feito por Whitrrman et al. (1997) em cirurgia oral e maxilo-facial na medicina. Estes descreveram a sua atuação em acelerar a cicatrização e regeneração tanto em tecidos duros, quanto moles. Desde então, uso terapêutico tem sido continuamente explorado em vários campos da cirurgia (KIM et al., 2012; ALIÓ et al., 2012; LEE et al., 2013).

Na oftalmologia, um dos primeiros relatos do uso de PRP foi por Rezende et al. 2007, em um caso de perfuração ocular secundária à úlcera neurotrófica, que após 23 dias de transplante de córnea, tratamento tópico à base de antibióticos, lágrimas artificiais e anti-inflamatório não tinha resultado em sucesso; o PRP foi iniciado, por via tópica; verificou-se a reepitelização corneal no oitavo dia.

A utilização de PRP autólogo em afecções da superfície ocular vem sendo cada vez mais estudada e aplicada. Sabe-se que o PRP possui excelentes resultados quando empregados na oftalmologia (ALIÓ et al., 2007a; ALIÓ et al., 2007b; GEREMICCA et al., 2010; PANDA et al., 2012; ALIÓ et al., 2013; MERLINI et al., 2014).

O tratamento com PRP tópico também foi estudado em olhos secos em humanos, em que foram observadas melhoras significativas em 89% dos casos. Além do mais, o tratamento apresentou redução na inflamação, melhora da qualidade do filme lacrimal e da acuidade visual, assim como nos quadros de ceratites (ALIÓ et al., 2007b).

Alió et al. (2007a) compararam o uso de PRP sob a forma de colírio e tampão associado à membrana amniótica no tratamento de úlceras dormentes, não responsivas ao tratamento convencional, sendo 12 úlceras neurotróficas, nove úlceras herpéticas e cinco úlceras de origem imunológica, em humanos. Observaram melhora na inflamação, fotofobia e dor, favorecendo a reepitelização e promovendo a cicatrização, tanto de olhos próximos à perfuração quanto dos perfurados.

O PRP também mostrou ser eficaz no tratamento tópico de úlceras refratárias, entre elas as neurotróficas e pós trauma físico ou químico, promovendo a diminuição do tempo de cicatrização em todos os casos (GEREMICCA et al., 2010)

Panda et al. (2012) compararam, em úlcera de córnea química em humanos, o tratamento convencional associado ou não ao uso do PRP tópico. Observaram que o PRP é uma terapia segura e eficaz, bem como promove cicatrização mais rápida quando comparado com o tratamento convencional isolado.

Alió et al. (2013) estudaram o uso do PRP em forma de tampão associado à membrana de fibrina, ambos autólogos, no tratamento de perfuração corneal em humanos. A membrana foi observada por três a cinco dias e posteriormente absorvida. Todas as córneas cicatrizaram e foram acompanhadas durante três meses, sem recidiva. O uso combinado mostrou ser uma alternativa cirúrgica segura e eficaz para o tratamento de perfurações oculares, entretanto essa técnica deve ser indicada como uma medida temporária, devido ao tempo que o tampão permanece sobre a córnea.

A utilização do PRP na medicina veterinária também obteve bons resultados, tanto sob forma de colírio ou de tampão, no tratamento de úlceras de córnea em coelhos. Entretanto, o colírio promoveu menor hiperemia e opacidade no período inicial de avaliação em relação ao tampão de PRP, além do mais, o colírio à base de PRP promoveu maior epitelização corneal na fase inicial da lesão, quando comparado aos demais grupos (DONATTI et al., 2013).

Freire et al. (2014) compararam três tipos de derivados do sangue: soro autólogo, PRP e PRP ativo, tanto *in vitro*, com cultura do epitélio corneal de humanos, quanto *in vivo*, em úlceras induzidas em coelhos. O estudo denotou que os três derivados do sangue são promotores da reepitelização da córnea. Entretanto, a cicatrização corneal comportou de maneira distinta, uma vez que *in vitro* o soro autólogo e PRP ativo obtiveram uma cicatrização mais rápida e, *in vivo*, apenas o PRP ativo obteve a cicatrização mais rápida.

Merlini et al. (2014) compararam o uso de PRP tópico e em forma de tampão em úlceras de córnea em cães e concluíram que o PRP nas duas formas é uma excelente terapia adjuvante, visto que diminui os sinais da dor ocular e auxiliam na cicatrização epitelial.

Perches et al. (2015) avaliaram a ação das MMPs em úlcera de córnea induzida em coelhos e tratada com PRP, e observaram que o tratamento estimulou a proliferação celular na fase inicial e que o uso de PRP influencia a expressão de MMPs, na maioria das vezes aumentando a sua expressão.

A aplicação subconjuntival de PRP foi descrita por Marquez et al. (2007), em humanos, no tratamento de ceratites ulcerativas causadas por queimaduras e relataram cicatrização mais rápida quando comparada ao grupo controle.

Tandir et al. (2010) descreveram o uso subconjuntival em coelhos e observaram que o PRP acelera a reepitelização corneal após lesão, no entanto, o uso de antibiótico associado ao PRP subconjuntival retardou a cicatrização, quando comparado com o PRP sozinho.

Anitua et al. (2014) relataram uma nova opção terapêutica de PRP, o qual após o preparo é aquecido à 56°C. Nesse estudo, verificaram que a concentração da maioria dos fatores de crescimento não apresentou alterações, sendo esses o PDGF-AB, TGF- β^1 , IGF-I e VEGF; entretanto, observaram diminuição significativa do EGF e proteínas do sistema complemento.

Após o aquecimento, a maior parte das proteínas e componentes envolvidos na cicatrização mantiveram-se, entretanto, houve diminuição nos níveis de Imunoglobulina E (IgE) e do sistema complementar (Anitua et al. (2014).

Anitua et al. (2014) concluíram que o uso do PRP aquecido é uma opção para o tratamento de doenças da superfície ocular em pacientes que possuem, como etiologia de base, o sistema autoimune. Os autores sugeriram o desenvolvimento de estudos *in vivo* para avaliar a eficácia e o potencial do PRP aquecido.

3 REFERÊNCIAS

ACKERMANN, M. R. Inflamação e cicatrização. In: ZACHARY, J. F.; McGAVIN, M. D. **Bases da patologia em veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013. cap. 3, p. 86-146.

ALIÓ, J. L.; ABAD, M.; ARTOLA, A.; RODRIGUEZ-PRATS, J. L.; PASTOR, S.; COLECHA, J. R. Use of autologous platelet-rich plasma in treatment of dormant corneal ulcers. **American Academy of Ophthalmology**, v. 114, n. 7, p. 1286-1293, 2007a.

ALIÓ, J. L.; ARNALICH-MONTIEL, F.; RODRIGUEZ, A. E. The role of "eye platelet rich plasma" (E-PRP) for wound healing in ophthalmology. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, p. 1257-1265, 2012.

ALIÓ, J. L.; COLECHA, J. R.; PASTOR, S.; RODRIGUEZ, A.; ARTOLA, A. Symptomatic dry eye treatment with autologous platelet-rich plasma. **Ophthalmic Research**, v. 39, n. 3, p. 124-129, 2007b.

ALIÓ, 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. **Journal of the American Medical Association. Formerly Archives of Ophthalmology**, v. 131, n. 6, p. 745-751, 2013.

ANDREW, S. E. Immune-mediated canine and feline keratitis. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 38, n. 2, p. 269-290, 2008.

ANITUA, E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 14, p. 529-535, 1999.

ANITUA, E.; ANDIA, I.; ARDANZA, B.; NURDEN, P.; NURDEN, A. T. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 91, n. 1, p. 4-15, 2004.

ANITUA, E.; MURUZABAL, F.; TAYEBBA, A.; Riestra, A.; PEREZ, V. L.;

MERAYO-LLOVES, J.; ORIVE, G. Autologous serum and plasma rich in growth factors in ophthalmology: preclinical and clinical studies. **Acta Ophthalmologica**, v. 93, p. 605-614, 2015.

ANITUA, E.; MURUZABAL, F.; DE LA FUENTE, M.; MERAYO-LLOVES, J.; ORIVE, G. Effects of heat-treatment on plasma rich in growth factors-derived autologous eye drop. **Experimental Eye Research**, v. 119, p. 27-34, 2014.

BARROS, L. F.; BARROS, P. S.; RÖPKE, C. D.; SILVA, V. V.; SAWADA, T. C.; BARROS, S. B.; BELFORT JR., R. Dose-dependent in vitro inhibition of rabbit corneal matrix metalloproteinases by an extract of *Pothomorphe umbellata* after alkali injury. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 8, p. 1129-1132, 2007.

BENTLEY, E.; MURPHY, C. J. Topical therapeutic agents that modulate corneal wound healing. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 34, n. 3, p. 623-638, 2004.

BERCHT, B. S. **Úlcera de córnea profunda em cães**. 2009. 35 f. Monografia (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Departamento de Comissão de Estágio, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

BERGSTEN, E.; UUTELA, M.; LI, X.; PIETRAS, K.; OSTMAN, A.; HELDIN, C.-H.; ALITALO, K.; ERIKSSON, U. PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor. **Nature Cell Biology**, v. 3, p. 512-516, 2001.

BETSHOLTZ, C.; KARISSON, L.; LINDAHL, P. Developmental roles of platelet-derived growth factors. **Bio e Essays**, v. 23, p. 494-507, 2001.

BROOKS, D. E.; OLLIVIER, F. J. Matrix metalloproteinase inhibition in corneal ulceration. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 34, n. 3, p. 611-622, 2004.

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.

CLAESSON-WELSH, L. Mechanism of action of platelet-derived growth factor. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 28, p. 373-374, 1996.

COUTURE, S.; DOUCET, M.; MOREAU, M.; CARRIER, M. Topical effect of various agents on gelatinase activity in the tear film of normal dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v. 9, n. 3, p. 157-164, 2006.

DONATTI, C.; BRANDÃO, C. V. S.; RANZANI, J. J. T.; PERCHES, C. S.; PADOVANI, C. R.; PELLIZZON, C. H.; SERENO, M. G. Uso do plasma rico em plaquetas sob a forma de colírio ou tampão no reparo de úlceras de córnea profundas induzidas em coelhos: avaliação clínica e histomorfométrica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 3, p. 809-818, 2013.

FREIRE, V.; ANDOLLO, N.; ETXEBARRIA, J.; HERNÁEZ-MOYA, R.; DURÁN, J.A.; MORALES, M. C. Corneal wound healing promoted by 3 blood derivatives: an in vitro and in vivo comparative study. **Cornea**, v. 33, n. 6, p. 614-620, 2014.

GALERA, P. D.; LAUS, J. L.; ORIÁ, A. P. Afecções da túnica fibrosa. In: LAUS, J. L. **Oftalmologia clínica e cirúrgica em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2009. cap. 4, p. 69-96-110.

GEREMICCA, W.; FONTE, C.; VECCHIO, S. Blood components for topical use in tissue regeneration: evaluation of corneal lesions treated with platelet lysate and considerations on repair mechanisms. **Blood Transfusion**, v. 8, p. 107-112, 2010.

GILBERTSON, D. G.; DUFF, M. E.; WEST, J. W.; KELLY, J. D.; SHEPPARD, P. O.; HOFSTRAND, P. D.; GAO, Z.; SHOEMAKER, K.; BUKOWSKI, T. R.; MOORE, M.; FELDHAUS, A. L.; HUMES, J. M.; PALMER, T. E.; HART, C. E. Platelet-derived growth factor C (PDGF-C), a novel growth factor that binds

to PDGF α and β receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 27406-27414, 2001.

GUM, G. G.; MacKAY, E. O. Physiology of the eye. In: GELLAT, K. N.; GILGER, B. C.; KERN, T. J. **Veterinary ophthalmology**. 5. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2013. chap. 3, p. 171-207.

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

JOYCE, N.; ZIESKE, J. Transforming growth factor-beta receptor expression in human cornea. **Investigative Ophthalmology & Vision Science**, v. 38, p. 1922-1928, 1997.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 488.

KABIRI, A.; ESFANDIARI, E.; ESMAEILI, A.; HASHEMIBENI, B.; POURAZAR, A.; MARDANI, M. Platelet-rich plasma application in chondrogenesis. **Advanced Biomedical Research**, v. 3, p. 135-156, 2014.

KAUR, H.; CHAURASIA, S. S.; MEDEIROS, F. W.; AGRAWAL, V.; SALOMAO, M. Q.; SINGH, N.; AMBATI, B. K.; WILSON, S. E. Corneal stroma PDGF blockade and myofibroblast development. **Experimental Eye Research**, v. 88, n. 5, p. 960-965, 2009.

KIM, K. M.; SHIN, Y. T.; KIM, H. K. Effect of autologous platelet rich plasma on persistent corneal epithelial defect after infectious keratitis. **The Official International Journal of the Japanese Ophthalmology Society**, v. 56, p. 544-550, 2012.

KIM, W. J.; MOHAN, R. R.; WILSON, S. E. Effect of PDGF, IL-1 alpha, and BMP2/4 on corneal fibroblast chemotaxis: expression of the platelet-derived growth factor system in the cornea. **Investigative Ophthalmology & Vision Science**, v. 40, p. 1364-1372, 1999.

LEDBETTER, E. C.; GILGER, B. C. Diseases and surgery of the canine cornea and sclera. In: GELLAT, K. N.; GILGER, B. C.; KERN, T. J. **Veterinary ophthalmology**. 5. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2013. chap. 18, p. 976-1049.

LEDBETTER, E. C.; MUNGER, R. J.; RING, R. D.; SCARLETT, J. M. Efficacy of two chondroitin sulfate ophthalmic solutions in the therapy of spontaneous chronic corneal epithelial defects and ulcerative keratitis associated with bullous keratopathy in dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v. 9, n. 2, p. 77-78, 2006.

LEE, J. W.; KWON, O. H.; KIM, T. K.; CHO, Y. K.; CHOI, K. Y.; CHUNG, H. Y.; CHO, B. C.; YANG, J. D.; SHI, J. H. Platelet-rich plasma: quantitative assessment of growth factor levels and comparative analysis of activated and inactivated groups. **Archives of Plastic Surgery**, v. 40, n. 5, p. 530-535, 2013.

LONG, Q.; CHU, R.; ZHOU, X.; DAI, J.; CHEN, C.; RAO, S. K.; LAM, D. S. C. Correlation between TGF- β 1 in tears and corneal haze following LASEK and Epi-LASIK. **American Journal of Ophthalmology**, v. 143, n. 1, p. 195-199, 2007.

LYNCH, S. E.; WILLIAMS, R. C.; POLSON, A. M.; HOWELL, T. H.; REDDY, M. S.; ZAPPA, U. E.; ANTONIADES, H. N. A combination of platelet-derived and insuline-like growth factors enhances periodontal regeneration. **Journal of Periodontology**, v. 16, p. 545-548, 1989.

MARQUEZ, R. A.; ESPINOSA, I. M.; MUNOZ, M.; PEREIRA, G. Aplicación subconjuntival de concentrado de plaquetas plasmáticas en el tratamiento de quemaduras oculares. Resultados preliminares. **Archivos Sociedad Española de Oftalmología**, v. 82, p. 475-482, 2007.

MARX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 62, n. 4, p. 489-496, 2004.

MARX, R. E.; CARLSON, E. R.; EICHSTAEDT, R. M.; SCHIMMELE, S. R.; STRAUSS, J. E.; GEORGEFF, K. R. Platelet-rich plasma: growth factor

enhancement for bone grafts. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology**, v. 85, p. 638-646, 1998..

MERLINI, N. B.; FONZAR, J. F.; PERCHES, C. S.; SERENO, M. G.; SOUZA, V. L.; ESTANISLAU, C. A.; RODAS, N. R.; RANZANI, J. J. T.; MAIA, L.; PADOVANI, C. R.; BRANDÃO, C. V. S. 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, 2014.

MURPHY, C. J.; MARFURT, C. F.; McDERMOTT, A.; BENTLEY, E.; ABRAMS, G. A.; REID, T. W.; CAMPBELL, S. Spontaneous chronic epithelial defects (SCCED) in dogs: clinical features, innervation, and effect of topical SP, with or without IGF-1. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 42, n. 10, p. 2252-2261, 2001.

NJAA, B. L.; WILCOCK, B. P. Orelha e olhos. In: ZACHARY, J. F.; McGAVIN, M. D. **Bases da patologia em veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. cap. 20, p. 1156-1247.

OLLIVIER, F. J.; BROOKS, D. E.; KALLBERG, M. E.; KOMAROMY, A. M.; LASSALINE, M. E.; ANDREW, S. E.; GELATT, K. N.; STEVENS, G. R.; BLALOCK, T. D.; VAN SETTEN, G. B.; SCHULTZ, G. S. Evaluation of various compounds to inhibit activity of matrix metalloproteinases in the tear film of horses with ulcerative keratitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. 9, p. 1081-1087, 2003.

OLLIVIER, F. J.; BROOKS, D. E.; VAN SETTEN, G. B.; SCHULTZ, G. S.; GELATT, K. N.; STEVENS, G. R.; BLALOCK, T. D.; ANDREW, S. E.; KOMAROMY, A. M.; LASSALINE, M. E.; KALLBERG, M. E.; CUTLER, T. J. Profiles of matrix metalloproteinase activity in equine tear fluid during corneal healing in 10 horses with ulcerative keratitis. **Veterinary Ophthalmology**, v. 7, n. 6, p. 397-405, 2004.

PANDA, A.; JAIN M.; VANATHI M.; VELPANDIAN T.; KHOKHAR S.; DADA T. Topical autologous platelet-rich plasma eyedrops for acute corneal chemical injury. **Cornea**, v. 31, n. 9, p. 989-993, 2012.

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.

PIPPI, N. L.; GONÇALVES, G. F.; ORIÁ, A. P. Anatomofisiologia ocular. In: LAUS, J. L. **Oftalmologia clínica e cirúrgica em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2009. cap. 1, p. 1-10.

REZENDE, M. S. V. M.; SILV, C.; ANTUNES, V. C.; RIBEIRO, L. E. F.; TATSUI, N.; CVINTAL, T. Uso do concentrado de plaquetas em doença da superfície ocular. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 66, n. 4, p. 257-261, 2007.

ROLANDO, M.; ZIERHUT, M. The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease. **Survey of Ophthalmology**, v. 45, n. 2, p. 203-212, 2001.

SCALINCI, S. Z.; SCOROLLI, L.; MEDURI, A.; GRENGA, P. L.; CORRADETTI, G.; METRANGOLO, C. 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, 2011.

SINGH, V.; JAINI, R.; TORRICELLI, A. A. M.; SANTHIAGO, M. R.; SINGH, N.; AMBATI, B. K.; WILSON, S. E. TGF β and PDGF-B signaling blockade inhibits myofibroblast development from both bone marrow-derived and keratocyte-derived precursor cells in vivo. **Experimental Eye Research**, v. 21, p. 35-40, 2014.

SLATTER, D. Córnea e esclera. In: SLATTER, D. **Fundamentos de oftalmologia veterinária**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2005. cap. 11, p. 283-338.

SLATTER, D.; DIETRICH, U. Córnea e esclera. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3. ed. Barueri: Manole, 2007. cap. 11, p. 1368-1396.

STADES, F. C.; BOEVÉ, M. W.; NEUMANN, W.; WYMAN, M. **Fundamentos de oftalmologia veterinária**. São Paulo: Roca, 1999.

STRUBBE, D. T.; BROOKS, D. E.; SCHULTZ, G. S.; WILLIS-GOULET, H.; GELATT, K. N.; ANDREW, S. E.; KALLBERG, M. E.; MACKAY, E. O.; COLLANTE, W. R. Evaluation of tear film proteinases in horses with ulcerative keratitis. **Veterinary Ophthalmology**, v. 3, n. 2-3, p. 111-119, 2000.

SUN, Y.; SU, L.; WANG, YANG, Z.; XU, Y.; XU, X. H-RN, a peptide derived from hepatocyte growth factor, inhibits corneal neovascularization by inducing endothelial apoptosis and arresting the cell cycle. **BMC Cell Biology**, v. 14, n. 8, p. 1-10, 2013.

TANDIR, S. T.; YUKSEL, N.; ALTINTAS, O.; YILDIZ, D. K.; SENER, E.; CAGLAR, Y. The effect of subconjunctival platelet-rich plasma on corneal epithelial wound healing. **Basic Investigation**, v. 29, n. 6, p. 664-669, 2010.

TERRACIO, L.; RÖNNSTRAND, L.; TINGSTRÖM, A.; RUBIN, K.; CLAEISSON-WELSH, L.; FUNA, K.; HELDIN, C.-H. Induction of platelet-derived growth factor receptor expression in smooth muscle cells and fibroblasts upon tissue culturing. **Journal of Cell Biology**, v. 107, p. 1947, 1988.

VAN DER WOERDT, A. Adnexal surgery in dogs and cats. **Veterinary Ophthalmology**, v. 7, n. 5, p. 284-290, 2004.

VENDRAMIN, F. S.; FRANCO, D.; NOGUEIRA, C. M.; PEREIRA, M. S.; FRANCO, T. R. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**, v. 33, n. 1, p. 24-28, 2006.

WHITMAN, D. H.; BERRY, R. L.; GREEN, D. M. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery.

Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, v. 55, p. 1294-1299, 1997.

WILLIAMS, D. L.; KIM, J. Y. Feline entropion: a case series of 50 affected animals (2003-2008). **Veterinary Ophthalmology**, v. 12, n. 4, p. 221-226, 2009.

WITMER, A. N.; VRENSSEN, G. F. J. M.; VAN NOORDEN, C. J. F.; SCHLINGEMANN, R. O. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 22, p. 1-29, 2003.

WROTNIAK, M.; BIELECKI, T.; GAZDZIK, T. S. Current opinion about using the platelet-rich gel in orthopaedics and trauma surgery. **Ortopedia Traumatologia Rehabilitação**, v. 9, n. 3, p. 227-238, 2007.

YU, F. S. X.; YIN, J.; XU, K.; HUANG, J. Growth factors and corneal epithelial wound healing. **Brain Research Bulletin**, v. 81, p. 229-235, 2010.

ZAGON, I. S.; SASSANI, J. W.; MCLAUGHLIN, P. J. Re-epithelialization of the rabbit cornea is regulated by opioid growth factor. **Brain Research**, v. 803, p. 61-68, 1998.

ZAGON, I. S.; SASSANI, J. W.; McLAUGHLIN, P. J. Reepithelization of the human cornea is regulated by endogenous opioids. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 41, n. 1, p. 73-81, 2000.

ZHOU, L.; BEUERMAN, R. W.; HUANG, L.; BARATHI, A.; FOO, Y. H.; LI, S. F.; CHEW, F. T.; TAN, D. Proteomic analysis of rabbit tear fluid: defensin levels after an experimental corneal wound are correlated to wound closure. **Proteomics**, v. 7, n. 17, p. 3194-3206, 2007.

Capítulo 2

PLASMA RICO EM PLAQUETAS ALOGÊNICO EM ÚLCERAS INDUZIDAS EM CÓRNEA DE RATOS

Trabalho a ser enviado para a revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

PLASMA RICO EM PLAQUETAS ALOGÊNICO EM ÚLCERAS INDUZIDAS EM CÓRNEA DE RATOS

[Allogenic Platelet-rich Plasma in induced ulcers in rats cornea]

RESUMO

Objetivou-se no estudo avaliar o efeito clínico do uso do plasma rico em plaquetas (PRP) alogênico, aquecido ou não aquecido, no tratamento de úlcera de córnea, bem como a dosagem do PDGF-BB em córnea, utilizando-se o rato como modelo experimental. Foram induzidas úlceras em córnea, padronizando o olho esquerdo, de 81 ratos (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*) distribuídos de forma randomizada e cega em três grupos (n=27): grupo controle (GC), o qual não recebeu nenhum tratamento tópico; grupo PRP aquecido (GA) e o grupo PRP (GP), os quais receberam tratamento tópico a cada oito horas durante cinco dias. Cada grupo foi subdividido em três momentos, de acordo com o período final de avaliação: 24 horas (M1); três dias (M3); e cinco dias (M5). Na avaliação clínica avaliou-se a opacidade, vascularização e reparação corneal. O PDGF-BB da córnea foi dosado, utilizando-se o método de Elisa. Houve diminuição da opacidade corneal nos animais tratados com PRP (GA e GP) e diminuição no tempo de reparação corneal, quando comparados ao GC, tanto no M1 quanto no M5. Além disso, observou-se maior vascularização no GP no M3 em comparação ao M1. O uso de colírio de PRP alogênico, aquecido ou não, acelera a reparação corneal, bem como diminui a opacidade corneal. No entanto, concentração do PDGF na córnea não se alterou em nenhum dos tratamentos.

Palavras chave: Plasma rico em plaquetas aquecido; fator de crescimento; reparação corneal; PDGF; plasma rico em fatores de crescimento; colírio.

ABSTRACT

The objective in this study was to evaluate the clinic effect applying allogenic platelet-rich plasma (PRP) heated or not, treating cornea ulcers, as the dosage of PDGF-BB in the cornea,, using the rat as experimental model. The ulcers were induced, standardizing the left eye from 81 rats (Ratus norvegicus, albinus variety) randomly and blindly in the three groups (N=27): control group (GC) which has not received any topic treatment; heated PRP group (GA) and PRP group (GP), which received topic treatment each eight hours during five days. Each group was subdivided in 24 hours (M1), three days (M3) and five days (M5). The clinical exam evaluated the opacity, the vascularization and corneal repair. The corneal PDGF-BB was dosed through the Elisa method. There was a decrease of corneal opacity in treated animals with PRP (GA and GP) and decrease of the corneal repair time while compared to GC, M1 as well as M5. Besides that, it was observed more vascularization in the GP in M3 moment comparing to M1. Applied allogenic PRP eye drops, heated or not, speeds up the corneal healing, as well as reduces the time to repair the corneal. However, the concentration of PDGF in the cornea has not altered in any of the treatments.

Keywords: heated platelet-rich plasma, growth factor, corneal repair, PDGF, plasma rich in growth factors, eye drops..

INTRODUÇÃO

A ceratite ulcerativa é a afecção ocular mais frequente nos animais e ocorre quando o epitélio e uma quantidade variável do estroma são perdidos (SLATTER, 2005; HERRERA, 2008; GALERA et al., 2009).

Devido à ausência de vasos na córnea, o mecanismo de cicatrização é conduzido por intermédio de mediadores inflamatórios juntamente com os fatores de crescimento produzidos decorrente à lesão (GUM; MacKAY, 2013).

Os fatores de crescimento são produzidos pelo epitélio, estroma e endotélio corneal (ZAGON et al., 2000) e estão presentes no filme lacrimal e no humor aquoso, ficando constantemente em contato com a córnea (ROLANDO; ZIERHUT, 2001; LONG et al., 2007). Estes são de extrema importância na reparação corneal devido à ação mediadora na proliferação de células epiteliais e estromais e influenciam na remodelação da matriz extracelular (SCALINCI et al., 2011).

Dentre os principais fatores de crescimento que atuam na cicatrização corneal está o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que tem como função modular a proliferação, migração e diferenciação das células na córnea, assim como em outras células (SINGH et al., 2014).

Estudos vêm avaliando os tratamentos com derivados do sangue e mostraram que os mesmos são eficazes e seguros no tratamento de muitas doenças da superfície ocular (ANITUA, 2015). Dentre esses, encontra-se o plasma rico em plaquetas (PRP), caracterizado por alta concentração de plaquetas e fatores de crescimento, os quais são liberados pelos grânulos-alpha das plaquetas (ANITUA et al., 2004).

A utilização do PRP em afecções da superfície ocular está sendo cada vez mais estudada e aplicada. Sabe-se que o PRP possui excelentes resultados, acelerando a cicatrização, quando empregados na oftalmologia (ALIÓ et al., 2007a; ALIÓ et al., 2007b; GEREMICCA et al., 2010; PANDA et al., 2012; ALIÓ et al., 2013).

Anitua et al. (2014) avaliaram uma nova opção de PRP, o qual é aquecido à 56°C durante uma hora após o seu preparo. Nesse estudo verificou-se que a concentração da maioria dos fatores de crescimento não se alterou. Entretanto, o fator de crescimento epidermal (EGF), proteínas do sistema complemento e Imunoglobulina E (IgE) apresentaram diminuição significativa. Concluíram que o uso do PRP aquecido é uma opção para o tratamento de doenças da superfície ocular em pacientes que possuem, como etiologia de base, o sistema autoimune, pois o aquecimento diminuiu os níveis de IgE e do sistema complementar, contudo manteve a maior parte das proteínas e componentes envolvidos na cicatrização. Os autores sugeriram estudos *in vivo* para avaliar a eficácia e o potencial do PRP aquecido.

Hipotetiza-se que a utilização de fatores de crescimento oriundos do PRP em forma de colírio aumenta a presença do mesmo na córnea. Além de que, a utilização de PRP alogênico, seja ele aquecido ou não, oriundo de outros animais da mesma espécie, sob forma de colírio é capaz de acelerar a cicatrização, bem como diminuir a opacidade corneal.

Na literatura consultada não foram encontrados estudos sobre a administração do PRP aquecido no tratamento de úlcera de córnea, tampouco a utilização de PRP alogênico, o que estimulou o desenvolvimento desta pesquisa.

Diante deste contexto, objetivou-se, com este estudo, avaliar o efeito clínico do uso do PRP e PRP aquecido, ambos alogênicos, no tratamento de úlcera de córnea, utilizando-se o rato como modelo experimental. Além disso, objetivou-se, comparar a

resposta do tratamento com PRP e PRP aquecido, por meio de avaliação clínica e quantificação do PDGF na córnea. Desta forma, estabelecendo uma nova opção terapêutica adjuvante na cicatrização de úlcera de córnea.

MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais desenvolvidos seguiram as normas da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO); ademais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – UNESP – Campus de Botucatu, processo nº 92/2015-CEUA.

Foram utilizados 81 ratos (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*), machos e fêmeas, adultos, sadios ao exame clínico, pesando entre 200 e 300g, com aproximadamente três meses de idade. Estes foram fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Botucatu, UNESP. Os mesmos foram submetidos ao exame oftalmológico por meio de biomicroscopia em lâmpada de fenda, para exclusão de doenças oculares.

Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas plásticas individuais, identificadas no biotério do Departamento de Cirurgia da FMVZ/UNESP-Botucatu, com temperatura, luminosidade e umidade controladas, recebendo dieta alimentar composta por ração comercial e água à vontade.

Todos os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para a indução da úlcera de córnea. Esses foram anestesiados com cetamina (Ketamin, Cloridrato de cetamina à 50mg/ml, Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda, Brasil) na dose de 100 mg/Kg, associada à xilazina (Xilazim, Cloridrato de Xilazina 2%, Syntec, Brasil) à 10 mg/kg, por via intramuscular (IM). Após 15 minutos da aplicação, foi realizada tricotomia da região torácica esquerda para monitoração cardíaca com doppler e os animais foram mantidos em máscara de isoflurano durante todo o procedimento cirúrgico.

Posteriormente, foi instilado colírio anestésico (Anestalcon, Cloridrato de proximetacaína 0,5%, Alcon, Brasil), para total dessensibilização corneal, seguida pela demarcação da úlcera por um *punch* de três mm de diâmetro e delaminação corneal com um bisturi crescente angulado.

Para o procedimento unilateral realizado foi padronizado o bulbo ocular esquerdo, onde, após a indução da úlcera, foi instilada fluoresceína (Fluoresceína Strips, Ophthalmos Indústria e Comércio de Produtos Farmacêuticos LTDA., Brasil) diluída e

em seguida foi realizada a fotodocumentação. A analgesia foi feita com dose única de Morfina (2mg/kg).

Então, os animais foram distribuídos de forma randomizada e cega em três grupos (n=27), sendo que ratos sem tratamento tópico constituíram o grupo controle (GC); animais tratados com colírio de PRP, a cada oito horas, o grupo plasma (GP); e os ratos tratados com colírio de PRP aquecido, a cada oito horas, o grupo aquecido (GA).

Os grupos GC, GP e GA foram subdivididos em outros três grupos (n=9), divididos de acordo com o tempo após a realização da úlcera de córnea, tratada ou não, compreendendo: momento um (M1), 24 horas, após o procedimento cirúrgico; momento três (M3), três dias; e momento cinco (M5), cinco dias. Em cada momento, todos os animais foram submetidos ao exame oftalmológico e em seguida eutanasiados.

Os animais do GA e GP receberam seus respectivos tratamentos a cada oito horas, durante o período máximo de cinco dias. A eutanásia foi feita no mesmo horário do procedimento cirúrgico, de forma que, as córneas foram coletadas após oito horas da última instilação do PRP, aquecido ou não.

Para a coleta e preparo do PRP foram utilizados nove ratos saudáveis. Esses foram anestesiados utilizando-se cetamina (100 mg/Kg), associada à xilazina (10 mg/kg), todos por via IM. Após 15 minutos, os mesmos foram submetidos a anestesia inalatória por máscara de Isoflurano (Isoforine, Isoflurano 100%, Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda, Brasil), até perda total dos reflexos palpebral e de dor profunda.

Logo após, o sangue foi coletado por punção intracardíaca e em seguida os animais foram eutanasiados por injeção intracardíaca de cloreto de potássio (Cloreto de potássio 10%, Equiplex indústria farmacêutica Ltda, Brasil). O sangue foi distribuído em frascos estéreis contendo citrato de sódio 3,2% (Tubo estéril com Citrato de Sódio 3,2%, Greiner Bio-one, Brasil), resultando em 4,5 ml de sangue total, por frasco.

Os tubos foram armazenados ao abrigo de luz em temperatura ambiente durante 30 minutos, e logo após, foram centrifugados à 220 gravidade (g), durante dez minutos. Em seguida 1/3 do plasma sobrenadante foi descartado e o restante transferido para tubos plásticos de cinco mL estéreis e centrifugados novamente à 660 g por dez minutos. Logo após foi descartado 2/3 do sobrenadante, sendo este o plasma pobre em plaquetas (PPP), sobrando apenas o PRP, o qual foi homogeneizado cuidadosamente (MERLINI, 2014).

Para o preparo do PRP aquecido, logo após a homogeneização, o mesmo foi mantido em banho maria à 56°C durante 60 minutos (ANITUA, 2014). Os dois PRP

foram armazenados em frascos de um mL e mantidos à temperatura de 2 a 4°C, durante os cinco dias de tratamento.

O incremento plaquetário foi quantificado, tanto no PRP simples quanto no aquecido, utilizando o método de contagem de plaquetas em câmara de Neubauer, resultando no número de plaquetas por μL . Para verificação de alteração no incremento plaquetário, o PRP aquecido foi quantificado antes e após o aquecimento.

Os níveis de fatores de crescimentos foram testados nas córneas utilizando-se kits imunoençaios ELISA.

A dosagem foi realizada em 81 córneas de ratos tratadas ou não, distribuídas nos diferentes grupos e subgrupos anteriormente citados. Para a coleta das córneas foi empregado o mesmo protocolo anestésico para o preparo do PRP padronizado anteriormente descrito. Após a eutanásia, foi realizada enucleação do bulbo ocular esquerdo e, imediatamente, a ressecção total da córnea adjacente ao limbo.

As córneas coletadas foram armazenadas individualmente em tubo estéril de um mL e logo em seguida congeladas à -20°C, seguindo orientação do fabricante, até o momento da dosagem.

Para a quantificação do PDGF-BB, as córneas foram descongeladas lentamente e pesadas para o cálculo da adição de PBS (pH entre 7,2 a 7,4), na proporção de 1:10. As amostras foram então homogenizadas e centrifugadas à 30.000 rpm, durante cinco minutos, à 4°C.

Após a centrifugação, as alíquotas de células sobrenadantes de cada amostra foram utilizadas para dosagem em duplicata do fator de crescimento PDGF-BB (Mouse/Rat PDGF-BB Quantikine, ELISA Kit, INK, USA), em ng/mL, seguindo a orientação do fabricante.

No exame clínico oftalmológico, foram avaliadas a presença de opacidade e vascularização e reparação corneal, sinais esses avaliados por um único observador oculto nos diferentes momentos de avaliação.

O grau de opacidade corneal foi classificado em escore com escala de 0 a 4, sendo: 0- ausente, córnea totalmente transparente; 1- discreta, com leves traços opacos, visto com iluminação oblíqua; 2- moderada, opacidade proeminente, porém sem afetar a visualização de câmara anterior; 3- intenso, dificultando visualização de câmara anterior; 4- muito intenso, opacidade total do estroma, impossibilitando visualização de câmara anterior.

Atribuiu-se um escore com escala de 0 a 3 para a vascularização, sendo 0- ausente, 1- discreta, 2- moderada, 3- intensa. Além disso, a reparação corneal foi avaliada por meio de fotodocumentação e posteriormente foi classificada em: 0-ausente, sem sinais de cicatrização corneal; 1- parcial; 2- total, reparação corneal completa.

A análise estatística da quantificação do PDGF-BB foi realizada pela técnica da análise de variância para o modelo com dois fatores, complementada com as comparações múltiplas entre as médias pelo Método de Tukey. Em relação à opacidade, vascularização e reparação corneal, variáveis que não apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste não paramétrico para o modelo com dois fatores, complementado com as comparações múltiplas de Dunn (Zar, 2009), considerando o nível de 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a obtenção do PRP nos ratos, no presente estudo utilizou-se o protocolo baseado para cães, descrito por Merlini et al. (2014), com duas centrifugações. Este resultou num incremento plaquetário médio de 2.525.000 plaquetas por μl e concentração 4,9 vezes maior em relação ao sangue total.

Portanto, com o protocolo instituído verificou-se bom desempenho, quando empregado em ratos, capaz de atingir uma concentração eficaz de plaquetas. Segundo Marx et al. (2004), a concentração necessária para melhor eficiência do uso de PRP é quatro vezes a concentração basal ou no mínimo 500.000 a 1.000.000 de plaquetas por μl . Entretanto, Alió et al. (2012) sugerem um aumento de 1,6 à 2,5 vezes.

Após o aquecimento do PRP à 56°C durante uma hora, a concentração média de plaquetas caiu de 2.525.000 para 249.975 por μl e observou-se diversas regiões na câmara de Neubauer com agregados plaquetários, o que consequentemente resultou em diminuição da concentração, uma vez que esta é feita a partir da contagem apenas das plaquetas isoladas. Portanto, um dos principais fatores possíveis que sucederam para essa queda foi a agregação plaquetária.

Entretanto, Alió et al. (2014) comprovaram que o PRP aquecido mantém a concentração de diversos fatores de crescimento, posto que os fatores de crescimento são resistentes ao calor. Porém, eles não relataram a presença da agregação de plaquetas.

Nenhum animal apresentou qualquer tipo de reação adversa após a instilação do PRP alogênico, sendo aquecido ou não, sugerindo que, mesmo sendo de origem de outros indivíduos, porém da mesma espécie, não houve rejeição.

O uso de PRP alogênico já foi descrito na literatura por Lamplot et al. (2013), em que avaliaram a utilização do PRP no tendão do manguito rotador em ratos. Não foi encontrada, na literatura consultada, a sua utilização do PRP alogênico no tratamento para a superfície ocular.

Um dos principais desafios relacionados ao uso de PRP, tanto em humanos como em outras espécies, está na quantidade necessária de sangue coletado, a qual é relativamente grande, considerando-se a obtenção de pequeno volume de PRP (DONATTI et al., 2014; ESPINOSA et al., 2015). Dessa maneira, o PRP alogênico poderia ser utilizado de maneira mais ampla. Adicionalmente, bancos de PRP poderiam ser criados e os PRPs estocados durante três meses, segundo Anitua et al. (2013), sem que houvessem perdas na qualidade do mesmo.

Espinosa et al. (2015) demonstraram a viabilidade do uso de soro alogênico em pacientes humanos que necessitam de maior quantidade de soro. No entanto, sugeriram mais estudos para avaliar a segurança, eficácia e benefício do seu uso. Porém, na medicina veterinária, a utilização do soro autógeno, alogênico e xenógeno já foi bem estabelecida (JORGE et al., 2003).

Entretanto, principalmente na medicina humana, a transmissão de doenças é um fator importante a ser considerado no uso de PRP alogênico. Todavia, o aquecimento vem sendo estudado com o intuito de reduzir também a carga viral e de microrganismos (ANITUA et al., 2013).

Não foi observada nenhum tipo de secreção ocular no estudo, o que sugere que o uso de antibiótico profilático não é necessário em úlceras de córnea em animais laboratoriais, uma vez que essa foi induzida cirurgicamente, considerando-se limpa. Esse resultado corroborou Donatti et al. (2013), os quais relataram que não houve necessidade da utilização de colírio antibiótico no tratamento com PRP colírio em úlceras induzidas cirurgicamente em coelhos.

Além disso, Tandır et al. (2010) observaram atraso na reepitelização corneal quando o PRP foi utilizado em associação com antibiótico, ambos por via subconjuntival, quando comparados com o PRP subconjuntival sozinho, em estudo experimental em coelhos. Considerando os aspectos acima, no presente estudo não foi utilizado antibiótico e não houve contaminação, sendo assim, pôde-se observar apenas a ação do PRP sem interferência de outras medicações.

Na avaliação da vascularização (Tab. 1), observou-se aumento significativo no GP entre o M1 e M3 ($p < 0,05$), o qual pode ser decorrente dos fatores de crescimento

presentes no PRP, dentre eles, destaca-se o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), principal mediador no processo de vascularização corneal.

Esse resultado encontrado foi similar ao descrito por Perches et al. (2015), os quais observaram maior vascularização na avaliação final de 30 dias, nos animais tratados com PRP tópico, e sugeriram também ser devido à concentração de VEGF no PRP.

Tabela 1. Vascularização corneal nos diferentes grupos e momentos de avaliação, representada por mediana dos escores, seguida por valor mínimo e máximo

GRUPO	MOMENTO DE AVALIAÇÃO			Valor p
	M1	M3	M5	
GC	0,0(0,0;0,0)	0,0(0,0;3,0)	0,0(0,0;2,0)	p>0,05
GA	0,0(0,0;2,0)	0,0(0,0;2,0)	0,0(0,0;2,0)	p>0,05
GP	0,0(0,0;0,0) A*	1,0(0,0;1,0) B	0,0(0,0;1,0) AB	p<0,05
	p>0,05	p>0,05	p>0,05	

Escores: 0- ausente; 1- discreto; 2- moderado; 3- intenso. *Letras maiúsculas: comparação de momentos (p<0,05) dentre os grupos. GC-grupo controle; GA-grupo aquecido; GP-grupo PRP.

No M1, observou-se maior opacidade corneal no GC quando comparado ao GA e GP (p<0,01). Acredita-se que ela seja devido aos fatores de crescimento presentes no PRP, os quais modulam o processo de reparação, diminuindo a formação cicatricial (Tab. 2).

Além disso, Donatti et al. (2013) também observaram menor opacidade nos grupos tratados com PRP após 30 dias, correlacionando-se com a presença dos fatores de crescimento disponíveis do PRP.

Tabela 2. Opacidade corneal nos diferentes grupos e momentos de avaliação, representada por mediana dos escores, seguida por valor mínimo e máximo.

GRUPO	MOMENTO DE AVALIAÇÃO			Valor p
	M1	M3	M5	
GC	2,0(1,0;2,0) b B*	1,0(0,0;3,0) AB	1,0(0,0;2,0) b A	p<0,05
GA	0,0(0,0;1,0) a**	1,0(0,0;1,0)	0,0(0,0;1,0) a	p>0,05
GP	0,0 (0,0;1,0) a	0,0(0,0;1,0)	0,0(0,0;1,0) ab	p>0,05
Valor p	p<0,01	p>0,05	p<0,05	

Escores: 0- ausente; 1- discreto; 2- moderado; 3- intenso; 4- muito intenso. *Letras maiúsculas: comparação de momentos ($p<0,05$) dentre os grupos. **Letras minúsculas: comparação de grupos ($p<0,05$) fixado em momentos. GC-grupo controle; GA-grupo aquecido; GP-grupo PRP.

Sabe-se que a ativação das plaquetas ocorre quando o PRP, sob forma de colírio, entra em contato com a superfície ocular e imediatamente libera uma grande quantidade de fatores de crescimentos (ALIÓ et al., 2012).

No GA verificou-se também diferença significativa quando comparado com o GC no M5 ($p<0,05$), porém, não houve entre o GP e GC, pôde-se observar menor opacidade no aquecido quando comparado ao controle. Tal fato pode ser atribuído ao aquecimento, uma vez que sob este processo resulta na diminuição de imunoglobulinas E (IgE), bem como sistema complementos, entretanto, a maioria dos fatores de crescimento permanecem (ANITUA, 2014).

No GC, em decorrência da maior opacidade inicial, houve redução significativa entre os momentos de avaliação inicial e final, entretanto, as médias do GC foram maiores que dos demais grupos nos dois momentos.

Considerando-se a reparação corneal (Tab. 3), representada pela menor profundidade do estroma corneal na região da úlcera, pode-se observar no M3 melhor padrão cicatricial no GA e GP quando comparado com GC. Dessa maneira, sugere-se que o uso do PRP acelera à reparação corneal. Além do mais, no M3, apenas nos grupos tratados verificou-se uma tendência a reparação, comparado ao momento inicial (M1). Nenhum animal do estudo apresentou perfuração ocular.

Tabela 3. Reparação corneal nos diferentes grupos e momentos, representada por mediana dos escores, seguida por valor mínimo e máximo.

GRUPO	MOMENTO DE AVALIAÇÃO			Valor p
	M1	M3	M5	
GC	0,0(0,0;1,0) A*	0,0(0,0;0,0) a** A	1,0(1,0;2,0) B	p<0,01
GA	0,0(0,0;1,0) A	1,0(0,0;2,0) b AB	1,0(1,0;2,0) B	p<0,05
GP	0,0(0,0;1,0) A	1,0(0,0;1,0) b AB	1,0(1,0;2,0) B	p<0,05
	p>0,05	p<0,05	p>0,05	

Escores: 0-ausência; 1- reparação parcial; 2- reparação completa. *Letras maiúsculas: comparação de momentos (p<0,05) dentre os grupos. **Letras minúsculas: comparação os grupos (p<0,05) fixados em momentos. GC-grupo controle; GA-grupo aquecido; GP-grupo PRP.

Essa reparação mais rápida corrobora o encontrado na literatura, onde Freire et al. (2014) relataram que o uso do PRP ativo *in vivo* acelera o tempo de cicatrização em úlceras induzidas em coelhos, comparando com o soro autólogo, assim como Donatti et al. (2013) observaram no tratamento com PRP tópico em relação ao PRP sob forma de tampão ou membrana amniótica.

Além disso, Geremicca et al. (2010) observaram também uma diminuição do tempo de cicatrização no tratamento com PRP em úlceras refratárias, do mesmo modo que Panda et al. (2012) em úlceras químicas, ambos em humanos.

O aspecto macroscópico da superfície ocular e anexos dos ratos, nos diferentes grupos de avaliação, está apresentado nas figuras 1 a 3.

Figura 1. Aspecto macroscópico dos bulbo ocular e anexos dos ratos. Notar: A. Discreta opacidade e ausência de vasos e reparação corneal parcial no M3 do grupo aquecido (GA). B. Intensa opacidade e ausência de vasos e reparação corneal parcial no M3 do grupo controle (GC). C. Discreta opacidade, ausência de vasos e reparação corneal parcial no M3 do grupo PRP (GP).

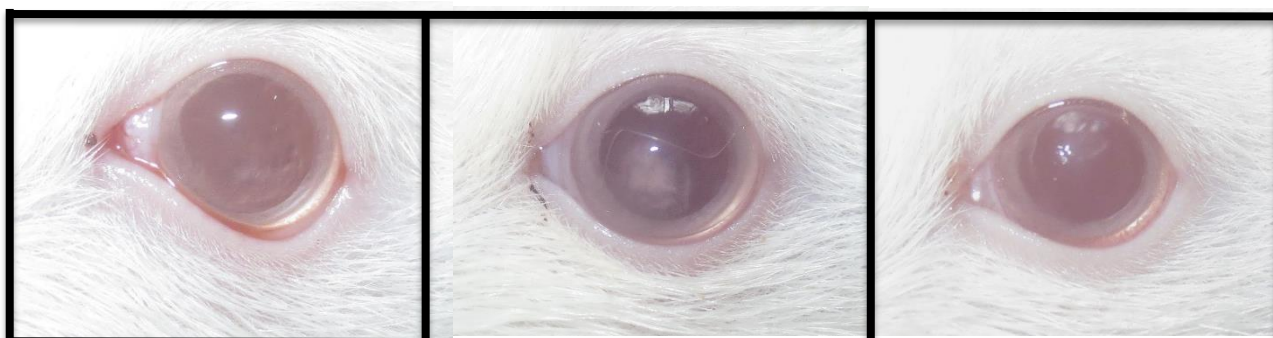


Tabela 4. Concentração corneal de PDGF-BB (ng/mL), segundo grupos e momento de avaliação, representada por média e desvio padrão.

GRUPO	Momento de avaliação			Valor p
	M1	M3	M5	
GC	296,19(26,84)	200,23(79,77)	279,31(62,43)	p>0,05
GA	272,31(141,78)	233,10(39,31)	251,99(103,33)	p>0,05
GP	274,20(79,43)	148,58(21,92)	251,76(69,98)	p>0,05
Valor p	p>0,05	p>0,05	p>0,05	

GC-grupo controle; GA-grupo aquecido; GP-grupo PRP.

Kaur et al. (2009b) relataram a presença de receptores alpha no estroma anterior, o que pode ter ocasionado a queda do PDGF-BB livre, uma vez que estes encontravam-se ligados, devido à exposição do estroma decorrente da úlcera de córnea. No presente estudo foi utilizado o método de Elisa, o qual quantifica apenas o PDGF-BB não ligado. Possivelmente, se a expressão de RNA pelo método de PCR tivesse sido conduzida, maior detecção da influência do uso de PRP poderia ter sido observada nos grupos tratados.

Além disso, sabe-se que PDGF é comumente encontrado na lágrima, bem como em córnea (KIM et al., 1999; ZHOU et al., 2007). Uma das possíveis causas da baixa concentração numérica de PDGF-BB observada, pode ser devido ao fato que grande parte estivesse presente na lágrima, a qual não foi dosada, por dificuldades técnicas. Além de que as córneas foram coletadas após oito horas da última instilação de PRP, o que possivelmente resulta em queda na concentração, visto que os fatores agem na córnea e logo após são drenados junto com a lágrima.

Outra possibilidade seria que o PDGF-BB não é o principal isótopo presente na córnea de ratos, ou mesmo o principal fator de crescimento que atua na reparação, dado que existem diferentes isoformas pertencentes à família de PDGF, sendo elas o PDGF-AA, PDGF-AB e PDGF-BB (PENN et al., 2008), e sabe-se que existe mais dois novos membros, o PDGF-C e o PDGF-D, os quais possuem estruturas proteicas semelhantes às outras isoformas (BETSHOLTZ et al., 2001). Apesar da ausência de alterações detectadas no PDGF dosado, pode-se verificar resultados clínicos positivos no processo de reparação com o tratamento de PRP aquecido ou não.

CONCLUSÕES

Conclui-se que o uso de PRP, aquecido ou não, minimiza a formação de opacidade corneal e acelera a reparação corneal, quando administrado por via tópica, no tratamento de úlcera de córnea, porém o uso do PRP não altera os níveis de concentração do PDGF-BB em ratos. Também, pode-se concluir que o PRP aquecido obteve menor opacidade quando comparado ao controle, no momento final de avaliação, indicando que a utilização do PRP alogênico aquecido diminui a formação da opacidade.

Considerando-se a ausência de efeitos adversos, o tratamento à base de PRP alogênico, aquecido e não aquecido, sob forma de colírio, pode ser indicado como opção de tratamento adjuvante para úlceras de córnea.

REFERÊNCIAS

ALIÓ, J.L.; ABAD, M.; ARTOLA, A. et al. Use of autologous platelet-rich plasma in treatment of dormant corneal ulcers. *Am. Acad. Ophthalmol.*, v.114, n.7, p.1286-1293, 2007a.

ALIÓ, J.L.; ARNALICH-MONTIEL, F.; RODRIGUEZ, A.E. The role of "eye platelet rich plasma" (E-PRP) for wound healing in ophthalmology. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, v.13, p.1257-1265, 2012.

ALIÓ, J.L.; COLECHA, J.R.; PASTOR, S. et al. Symptomatic dry eye treatment with autologous platelet-rich plasma. *Ophthalmic Res.*, v.39, n.3, p.124-129, 2007b.

ALIÓ, J.L.; RODRIGUEZ, A.E.; MARTINEZ, L.M. et al. Autologous fibrin membrane combined with solid platelet-rich plasma in the management of perforated corneal ulcers. *JAMA Ophthalmol.*, v.131, n.6, p.745-751, 2013.

ANITUA, E.; ANDIA, I.; ARDANZA, B. et al. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb. Haemost.*, v.91, n.1, p.4-15, 2004.

ANITUA, E.; MURUZABAL, F.; PINO, A. et al. Biological stability of plasma rich in growth factors eye drops after storage of 3 months. *Basic Invest.*, v.32, n.10, p.1380-1386, 2013.

ANITUA, E.; MURUZABAL, F.; TAYEBBA, A. et al. Autologous serum and plasma

rich in growth factors in ophthalmology: preclinical and clinical studies. *Acta Ophthalmol.*, v.93, p.605-614, 2015.

ANITUA, E.; MURUZABAL, F; DE LA FUENTE, M. et al. Effects of heat-treatment on plasma rich in growth factors-derived autologous eye drop. *Exp. Eye Res.*, v.119, p.27-34, 2014.

BETSHOLTZ, C.; KARISSEN, L.; LINDAHL, P. Developmental roles of platelet-derived growth factors. *Bioessays*, v.23, p.494-507, 2001.

DONATTI, C.; BRANDÃO, C.V.S.; RANZANI, J.J.T. et al. Uso do plasma rico em plaquetas sob a forma de colírio ou tampão 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, 2013.

ESPINOSA, A.; HJORTH-HANSEN, H.; AASLY, K. et al. Implementation of a standardised method for the production of allogeneic serum eye drops from regular blood donors in a Norwegian University Hospital: some methodological aspects and clinical consideration. *Transfus. Apher. Sci.*, v.53, p.88-91, 2015.

FREIRE, V.; ANDOLLO, N.; ETXEBARRIA, J. et al. Corneal wound healing promoted by 3 blood derivatives: an in vitro and in vivo comparative study. *Cornea*, v.33, n.6, p.614-620, 2014.

GALERA, P.D.; LAUS, J.L.; ORIÁ, A.P. Afecções da túnica fibrosa. In: LAUS, J.L. Oftalmologia clínica e cirúrgica em cães e gatos. São Paulo: Roca, 2009. cap.4, p.69-96-110.

GEREMICCA, W.; FONTE, C.; VECCHIO, S. Blood components for topical use in tissue regeneration: evaluation of corneal lesions treated with platelet lysate and considerations on repair mechanisms. *Blood Transfus.*, v.8, p.107-112, 2010.

GUM, G.G.; MacKAY, E.O. Physiology of the eye. In: GELLAT, K.N.; GILGER, B.C.; KERN, T.J. *Veterinary ophthalmology*. 5.ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2013. chap.3, p.171-207.

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

JORGE, A.T.; CAMPOS, C.F.; TALIERI, I.C. et al. Topical effects of autogenous, allogeneous and xenogeneous blood serum on the healing of alkali burns in the cornea of dogs. *Rev. Bras. Ciênc. Vet.*, v.10, n.1, p.49-54, 2003.

KAUR, H.; CHAURASIA, S.S.; WILSON, S.E. Expression of PDGF receptor-alpha in corneal myofibroblasts in situ. *Exp. Eye Res.*, v.39, n.3, p.432-436, 2009.

KIM, W.J.; MOHAN, R.R.; WILSON, S.E. Effect of PDGF, IL-1 alpha, and BMP2/4 on corneal fibroblast chemotaxis: expression of the platelet-derived growth factor system in the cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v.40, p.1364-1372, 1999.

LAMPLOT, J.D.; ANGELINE, M.; ANGELES, J. et al. Distinct effects of platelet-rich plasma and BMP13 on rotator cuff tendo injury healing in a rat model. *Am. J. Sports Med.*, v.42, n.12, p.2877-2887, 2014.

LONG, Q.; CHU, R.; ZHOU, X. et al. Correlation between TGF- β 1 in tears and corneal haze following LASEK and Epi-LASIK. *Am. J. Ophthalmol.*, v.143, n.1, p.195-199, 2007.

MARX, R.E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.62, n.4, p.489-496, 2004.

MERLINI, N.B.; FONZAR, J.F.; PERCHES, C.S. et al. Uso de plasma rico em plaquetas em úlceras de córnea em cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, n.6, p.1742-1750, 2014.

PANDA, A.; JAIN M.; VANATHI M. et al. Topical autologous platelet-rich plasma eyedrops for acute corneal chemical injury. *Cornea*, v.31, n.9, p.989-993, 2012.

PENN, J.S.; MADAN, A.; CALDWELL, R.B. et al. Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Prog. Retin. Eye Res.*, v.27, p.331-371, 2008.

PERCHES, C.S.; PELLIZZON, C.H.; RANZANI, J.J.T. et al. Expressão de metaloproteinases de matriz e PCNA em úlceras de córnea profundas, induzidas em coelhos, tratadas com plasma rico em plaquetas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.67, n.6, p.1607-1615, 2015.

ROLANDO, M.; ZIERHUT, M. The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease. *Surv. Ophthalmol.*, v.45, n.2, p.203-212, 2001.

SCALINCI, S.Z.; SCOROLLI, L.; MEDURI, A. et al. Effect of basic fibroblast growth factor and cytochrome c peroxidase combination in transgenic mice corneal epithelial healing process after excimer laser photoablation. *Clin. Ophthalmol.*, v.5, p.215-221, 2011.

SINGH, V.; JAINI, R.; TORRICELLI, A.A.M. et al. TGFb and PDGF-B signaling blockade inhibits myofibroblast development from both bone marrow-derived and keratocyte-derived precursor cells in vivo. *Exp. Eye Res.*, v.21, p.35-40, 2014.

SLATTER, D. Córnea e esclera. In: SLATTER, D. Fundamentos de oftalmologia veterinária. 3. ed. São Paulo: Roca, 2005. cap.11, p.283-338.

TANDIR, S.T.; YUKSEL, N.; ALTINTAS, O. et al. The effect of subconjunctival platelet-rich plasma on corneal epithelial wound healing. *Basic Invest.*, v.29, n.6, p.664-669, 2010.

ZAGON, I.S.; SASSANI, J.W.; McLAUGHLIN, P.J. Reepithelization of the human cornea is regulated by endogenous opioids. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v.41, n.1, p.73-81, 2000.

ZAR, J.H. Biostatistical analysis. 5.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2009. 994p.

ZHOU, L.; BEUERMAN, R.W.; HUANG, L. et al. Proteomic analysis of rabbit tear fluid: defensin levels after an experimental corneal wound are correlated to wound closure. *Proteomics*, v.7, n.17, p.3194-3206, 2007.

Artigo submetido à The Journal Cornea and External Diseases

Normas no site:

<http://www.editorialmanager.com/cornea/default.aspx>