

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

**USO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS AUTÓLOGO E  
ALOGÊNICO AQUECIDO NO TRATAMENTO DE CERATITE  
ULCERATIVA EM CÃES**

ANNALÚ PINTON FERREIRA

Botucatu – SP

Julho/ 2019

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

**USO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS AUTÓLOGO E  
ALOGÊNICO AQUECIDO NO TRATAMENTO DE CERATITE  
ULCERATIVA EM CÃES**

**ANNALÚ PINTON FERREIRA**

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Assoc. Cláudia Valéria  
Seullner Brandão

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina Veterinária e Zootecnia da  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para  
obtenção do título de mestre no Programa  
de Pós-graduação em Biotecnologia  
Animal.

Botucatu - SP  
2019

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

Ferreira, Annalú Pinton.

Uso do plasma rico em plaquetas autólogo e alogênico aquecido no tratamento de ceratite ulcerativa em cães / Annalú Pinton Ferreira. - Botucatu, 2019

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

Orientador: Cláudia Valéria Seullner Brandão  
Capes: 50501003

1. Imunologia. 2. Plasma rico em plaquetas. 3. Córnea. 4. Ceratite. 5. Substâncias de crescimento. 6. Cães - Doenças.

Palavras-chave: PRP; fatores de crescimento; imunologia; lesões de córnea.

ANNALÚ PINTON FERREIRA

**USO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS AUTÓLOGO E  
ALOGÊNICO AQUECIDO NO TRATAMENTO DE CERATITE  
ULCERATIVA EM CÃES**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Prof.<sup>a</sup> Assoc. Cláudia Valéria Seullner Brandão**

Membro e Orientadora

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ - UNESP Botucatu /SP

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elenice Deffune**

Membro

Departamento de Urologia

FMB - UNESP Botucatu /SP

---

**Dr.<sup>a</sup> Cíntia Sesso Perches**

Membro

Médica Veterinária Autônoma

Piracicaba - SP

Data da Defesa: 08 de maio de 2019

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por me ajudar a superar todas as dificuldades enfrentadas durante este período.

Aos meus familiares: **José Ferreira Filho, Sueli Aparecida Pinton Ferreira, Neide Maria Ferreira Trevizan, Wagner Pinton Ferreira** por todo suporte psicológico, incentivo, amor, companheirismo e apoio incondicional durante toda a minha vida, sem vocês nada disso seria possível.

Ao meu namorado **João Victor Ribeiro da Silva de Souza** que esteve ao meu lado em todos os momentos, apoiando e me fazendo crescer juntamente aos meus sogros: **Claudia Andreia da Silva Paniguel e Valdir Ângelo Paniguel** que me adotaram como filha a quem eu sou eternamente grata.

À minha orientadora **Professora Cláudia Valéria Seullner Brandão** pela confiança depositada em meu trabalho desde o período de iniciação científica e que pôde acompanhar minha evolução profissional. Sou grata pelos ensinamentos transmitidos, pela paciência e por tudo o que faz por todas nós.

Ao **Professor José Joaquim Tilton Ranzani** pelos momentos de descontração, pelas conversas e por estar sempre disposto a nos ajudar.

A toda “Família Oftalmo” composta por **Micaella Gandonfi, Rodrigo Barros, Inajara Hirota, Anna Clara Hussein, Lenise Garbelotti, Letícia Ramos e Mariana de Sessa** e aos mais recentes **Luis Reiter e Mayara Chagas Ferreira** pela amizade, aprendizados e por toda a ajuda neste período.

Às **Professoras Ana Liz Garcia Alves e Regina Kiomi Takahira** pela disponibilidade ao uso do laboratório para a realização deste projeto.

Ao **Professor Carlos Roberto Padovani** pelos ensinamentos e por ter desenvolvido a análise estatística.

Às minhas grandes amigas irmãs **Alana Lucena Oliveira e Mayara Travalini de Lima** pelas risadas, companheirismo, paciência e desabafos. Agradeço por sempre estarem ao meu lado.

Agradecer à **Bruna dos Santos** pela amizade de tanto tempo e por todo o auxílio laboratorial no desenvolvimento deste projeto.

À **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), processo nº 2017/ 13836-0, pelo apoio fundamental na realização deste trabalho.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Sinais clínicos oftalmológicos analisados segundo tratamento com PRP alogênico aquecido (GA) ou PRP autólogo (GP) nos momentos de avaliação representados por mediana, seguida por valor mínimo e máximo .....43
- Tabela 2.** Área da ceratite ulcerativa (mm<sup>2</sup>) analisadas segundo tratamento com PRP alogênico aquecido (GA) ou PRP autólogo (GP) até o momento de reparação corneal completa (M5), representada por mediana, seguida por valores mínimos e máximo.....46
- Tabela 3.** Espessura central e periférica da córnea, segundo tratamento com PRP alogênico aquecido (GA) ou PRP autólogo (GP) nos momentos de avaliação, representada por média e desvio padrão.....47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>PRP</b>	Plasma rico em plaquetas
<b>FCs</b>	Fatores de crescimento
<b>EGF</b>	Fator de crescimento epidermal
<b>IgE</b>	Imunoglobulinas E
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>MMPs</b>	Metaloproteinases
<b>PDGF</b>	Fator de crescimento derivado de plaquetas
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Fator de crescimento transformador- $\beta$
<b>IGF-I</b>	Fator de crescimento semelhante à insulina
<b>FGF</b>	Fator de crescimento de fibroblastos
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento do endotélio vascular
<b>PF-4</b>	Fator plaquetário IV
<b>LASIK</b>	Cirurgia refrativa
<b>PPP</b>	Plasma pobre em plaquetas
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitro
<b>GP</b>	Grupo tratado com PRP autólogo
<b>GA</b>	Grupo tratado com PRP alogênico aquecido
<b>M0</b>	Antes de iniciar o tratamento
<b>M3</b>	3 dias de tratamento
<b>M5</b>	5 dias de tratamento
<b>M10</b>	10 dias de tratamento
<b>M15</b>	15 dias de tratamento
<b>M30</b>	30 dias de tratamento
<b>mL</b>	Mililitro
<b>G</b>	Gravidade
<b>ARVO</b>	Association for Research in Vision and Ophthalmology
<b>AP</b>	Autologous PRP eye drops
<b>HP</b>	Heated allogeneic PRP eye drops

## SUMÁRIO

Capítulo 1.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1 Anatomia e Fisiologia da Córnea .....	13
2.2 Ceratite ulcerativa e mecanismos de reparação da córnea .....	14
2.3 Os fatores de crescimento e sua atuação na reparação corneal .....	16
2.4 O uso do plasma rico em plaquetas (PRP) na oftalmologia.....	20
3. REFERÊNCIAS.....	25
Capítulo 2.....	33
USO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS AUTÓLOGO E ALOGÊNICO AQUECIDO NO TRATAMENTO DE CERATITE ULCERATIVA EM CÃES .....	34
Resumo.....	34
Abstract.....	35
Introdução .....	35
Material e Métodos.....	37
Resultados e discussão .....	40
Conclusão .....	48
Referências Bibliográficas.....	48

FERREIRA, A.P. **Uso do Plasma Rico em Plaquetas Autólogo e Alogênico Aquecido no Tratamento de Ceratite Ulcerativa em Cães**. Botucatu, 2019. p.52. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## RESUMO

O plasma rico em plaquetas (PRP) atua na reparação corneal e quando aquecido, apresenta menor potencial à reação imunológica local sem prejudicar os níveis dos fatores de crescimento (FCs). O objetivo deste estudo clínico foi comparar o PRP autólogo com o alogênico aquecido no tratamento de ceratite ulcerativa em cães, bem como os seus efeitos clínicos. Para esse experimento, foram utilizados 24 cães com ceratite ulcerativa e estes foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais, um tratado por meio de colírio de PRP autólogo (n=11) outro com colírio de PRP alogênico aquecido (n=13). Todos os animais foram avaliados no momento inicial e após 3, 5, 10, 15 e 30 dias do tratamento. Foram analisadas as variáveis oftalmológicas: blefaroespasmos, secreção ocular, opacidade corneal, vascularização, fotofobia, hiperemia conjuntival, quemose, espessura corneal, bem como o percentual de redução da úlcera de córnea. Em ambos os grupos, foi verificada redução do tempo de cicatrização da lesão com adequada reepitelização corneal, bem como diminuição dos sinais de inflamação. Concluiu-se que o PRP autólogo e alogênico aquecido apresentaram resultados equivalentes e podem ser uma excelente opção no tratamento adjuvante na reparação de ceratite ulcerativa em cães e que sua utilização potencializa a cicatrização, promove diminuição da inflamação e opacidade corneal.

**Palavras chave:** Fatores de crescimento; imunologia; lesões de córnea; PRP.

FERREIRA, A.P. **Use of Heated Alogenic and Autologous Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Ulcerative Keratitis in Dogs.** Botucatu, 2019. p.52. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

### **ABSTRACT**

Platelet rich plasma (PRP) acts on corneal repair and, when heated, presents reduced local immune response without interfering in growth factor (GF) levels. This clinical trial aimed to compare the use of autologous PRP and heated allogeneic PRP in the treatment of ulcerative keratitis in dogs, as well as their clinical effects. For this purpose, 24 dogs were utilized from the routine with diagnosis of ulcerative keratitis, and randomly distributed into two experimental groups, one treated with autologous PRP eye drops (n=11) and the other with heated allogeneic PRP eye drops (n=13). All the animals were evaluated before and at 3, 5, 10, 15 and 30 days after treatment. The ophthalmologic variables analyzed were: blepharospasm, ocular discharge, corneal opacity, vascularization, photophobia, conjunctival hyperemia, chemosis, corneal thickness, as well as the percentage of corneal ulcer reduction. In both groups, reduction of wound healing time with adequate corneal reepithelialization was observed, as well as reduction of inflammation signs. It was concluded that heated autologous and allogeneic PRP presented equivalent results and may be an excellent option in the adjuvant treatment in the repair of ulcerative keratitis in dogs and that its use promotes a decrease in inflammation and clinical signs of pain, enhancing corneal healing.

**Key-words:** Growth factors; immunology; corneal ulcers; PRP.

# Capítulo 1

## 1. INTRODUÇÃO

A oftalmologia veterinária é uma especialidade que vem evoluindo muito nos últimos anos, contribuindo para a manutenção da visão dos animais (GALERA et al., 2017). Dentre as principais afecções oculares que os acometem encontra-se a ceratite ulcerativa, também denominada úlcera de córnea, que ocorre quando há perda do epitélio e parte do estroma corneal (HERRERA et al., 2008; LAUS et al., 2009; SLATTER et al., 2013; MOREIRA et al., 2018).

As principais funções da córnea estão correlacionadas com a proteção e refração da luz (LAUS et al., 2009). Por estar diretamente em contato com o ambiente externo está propensa à ocorrência de traumas físicos, químicos e biológicos resultando na perda da função de sua barreira protetora, e desta forma, o seu mecanismo de reparação é regulado por mediadores inflamatórios e fatores de crescimento (FCs) produzidos imediatamente após a ocorrência da lesão (GUM; MACKAY, 2013).

Os FCs são mediadores biológicos naturais sintetizados pelas células do epitélio, estroma e endotélio corneal logo após a ocorrência de uma lesão (YU et al., 2010). Podem estar localizados no filme lacrimal e humor aquoso em contato íntimo com a córnea, participando dos processos reparativos da mesma (YU et al., 2010). Estes são responsáveis por estimularem a proliferação de ceratinócitos que irão sintetizar colágeno e proteoglicano, produzindo a matriz extracelular a fim de promover cicatrização da úlcera (ALIO et al., 2015).

Estes fatores também podem ser encontrados nos grânulos- $\alpha$  plaquetários, sendo possível concentrá-los por meio de centrifugações, e, após essa etapa, passa a ser denominado como plasma rico em plaquetas (PRP) (ALIO et al., 2013). Desta forma, o seu uso proporciona uma maior concentração de FCs tornando a reparação corneal mais rápida e eficaz, sendo frequentemente estudado em oftalmologia devido aos seus benefícios terapêuticos e pelo baixo custo de processamento (ANITUA et al., 2004; MERLINI et al., 2014; ANITUA et al., 2018).

Anitua et al. (2014) desenvolveram uma nova modalidade de PRP, na qual, após o sangue coletado ser submetido às centrifugações este é aquecido

à 56°C durante uma hora. Pôde-se observar neste estudo que o aquecimento diminuiu os índices de fator de crescimento epidermal (EGF), proteínas do sistema complemento e Imunoglobulinas E (IgE), sem interferir na concentração dos demais FCs, podendo ser indicado no tratamento de afecções de caráter autoimune.

A hipótese para esse trabalho é que o PRP alogênico aquecido seja uma opção viável de tratamento adjuvante na reparação das ceratites ulcerativas em cães. Ressalta-se, portanto, que o uso de PRP alogênico aquecido e autólogo vem sendo estudado no tratamento de úlceras de córnea, apresentando resultados bastante satisfatórios especialmente no que diz respeito à aceleração inicial da cicatrização, diminuição de opacidades e na possibilidade de redução do seu potencial imunogênico ao aquecê-lo (DONATTI et al., 2013; MERLINI et al., 2014; PERCHES et al., 2015; GANDOLFI, 2016).

A motivação para o desenvolvimento desse projeto esta na carência de estudos relatando a eficácia clínica do PRP alogênico aquecido no processo de reparação corneal em cães. Devido à diminuição da atividade imunológica local, sem comprometer a concentração dos FCs, tornaria viável a implantação de um banco de PRP com animais saudáveis.

O estoque de PRP alogênico aquecido permitiria ampliar a sua aplicação em outros cães, inclusive os de pequeno porte e peso reduzido ou aqueles acometidos por alguma afecção sistêmica, sem comprometer suas funções hemodinâmicas, em vista da grande quantidade de sangue necessária para a síntese de PRP autólogo.

Objetiva-se com esse estudo comparar os efeitos clínicos do PRP autólogo com o PRP alogênico aquecido no tratamento de ceratite ulcerativa em cães. Podendo-se desta forma indicá-los como uma opção de terapia adjuvante na cicatrização de úlceras de córnea.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Anatomia e Fisiologia da Córnea

A córnea compõe a túnica fibrosa, juntamente com a esclera, fornecendo sustentação ao bulbo ocular (GELATT et al., 2014). Trata-se de uma estrutura avascular e transparente devido à disposição organizada das fibras de colágeno e inervação por fibras amielínicas o que possibilita a refração da luz, essencial para a visão (GANDHI; JAIN, 2015).

A análise do corte histológico da córnea evidencia a organização de cinco camadas: epitélio, lâmina basal, estroma, membrana de Descemet e o endotélio (GANDHI; JAIN, 2015). Mais externamente é composta pelo filme lacrimal atuando na proteção, lubrificação, transporte de substâncias e nutrição corneal (GALERA et al., 2017).

O epitélio é a camada mais externa e é classificado como pavimentoso, estratificado e não queratinizado (LAUS et al., 2009; NAUTSCHER et al., 2016). Tem a espessura de aproximadamente 10nm, sendo composto por seis a dez camadas de células (SLATTER et al., 2013). A lâmina basal tem 30 a 55nm de espessura e une o epitélio ao estroma pelos hemidesmossomos (GELATT et al., 2014).

O estroma representa 90% da espessura corneal é composto por fibrócitos e ceratinócitos que são capazes de sintetizar fibras de colágeno tipo IV, VI e VII além de glicosaminoglicanos e de proteoglicanos (LAUS et al., 2009; GILGER et al., 2013; SLATTER et al., 2013).

As fibras colágenas presentes no estroma estão organizadas de forma ordenada em camadas alternadas, paralelas à superfície corneal, sendo intercaladas pelas proteoglicanas (GILGER et al., 2013).

As terminações nervosas amielínicas originam-se de ramificações do nervo trigêmeo e permeiam o estroma anterior e epitélio da córnea (SLATTER et al., 2013; GANDHI; JAIN, 2015). Por esta razão, as úlceras superficiais tendem a serem mais dolorosas quando comparadas às profundas ocasionando sinais de dor como blefaroespasmos e fotofobia (GILGER et al., 2013; GELATT et al., 2014).

A membrana de Descemet é uma camada delgada, homogênea e acelular produzida pelo endotélio, podendo aumentar sua espessura com o passar dos anos (GILGER et al., 2013; XIMENES et al. 2014).

O endotélio situa-se mais internamente e permanece em contato com a câmara anterior (SLATTER et al., 2013). É constituído por uma única camada de células de formato hexagonal e possui baixa capacidade de replicação, variando de acordo com a idade (CARDIGOS; NERI, 2018). O endotélio juntamente com o epitélio corneal são responsáveis pelo controle da passagem de água mediante a um sistema de bombas (SLATTER et al., 2013). A quebra da barreira endotelial causa um desequilíbrio hídrico e desorganiza as fibras de colágeno que resulta em edema alterando a transparência corneal (CARDIGOS; NERI, 2018).

## **2.2 Ceratite ulcerativa e mecanismos de reparação da córnea**

A córnea é a estrutura mais exposta do bulbo e por esse motivo a ceratite ulcerativa é uma afecção ocular bastante frequente (MOREIRA et al., 2018). Pode ser de causa traumática e levar à uma perfuração ocular com extravasamento do humor aquoso e colabamento da câmara anterior, desta forma é considerada como uma emergência oftálmica (LAUS et al., 2009).

A úlcera corneal também pode ocorrer devido à presença de corpo estranho, neoplasias, agentes químicos, alteração da conformação palpebral, distiquíases, cílios ectópicos, ceratoconjuntivite seca, entre outros fatores, ativando os mecanismos de reparação corneal (PISO et al., 2017).

O processo de reparação corneal é constituído por uma série de eventos que se desenvolvem simultaneamente com o intuito de promover a proliferação celular, migração, diferenciação, apoptose, quimiotaxia e angiogênese (PONTES et al., 2011).

Imediatamente após a ocorrência de uma lesão superficial ocorre a migração celular do epitélio íntegro com secreção de fibrina, fibrinogênio e fibronectina recobrando a área lesionada (ZACHARY et al., 2016). O desbridamento das células remanescentes é realizado pelos leucócitos polimorfonucleares por meio de fagocitose dos debris celulares (HERRERA et al., 2008). As células epiteliais da borda se achatam e deslizam sobre o defeito

sofrendo mitoses sucessivas restaurando sua espessura original (GILGER et al., 2013). O tempo médio de reepitelização da córnea é de sete a dez dias (ZACHARY et al., 2016).

A membrana basal desempenha importante função na aderência do epitélio ao estroma e em casos de ruptura, o tempo de reparação será prolongado, pois é necessário primeiro refazê-la para posteriormente as células epiteliais utilizá-las para sua adesão ao estroma (PONTES et al., 2011).

Nas úlceras estromais superficiais, o reparo é feito pelo deslizamento e mitoses das células epiteliais, conforme já mencionado (GILGER et al., 2013). Já nas lesões profundas, também ocorre a reepitelização sobre a superfície, entretanto o preenchimento estromal requer proliferação de ceratinócitos que irão sintetizar colágeno e proteoglicano, produzindo a matriz extracelular (GILGER et al., 2013; SLATTER et al., 2013). O colágeno formado será depositado no leito da lesão e remodelado pelas colagenases e metaloproteinases (MMPs), deslocando o epitélio já formado anteriormente (PERCHES et al., 2015).

Em casos mais graves, pode haver perda de todo o estroma levando a uma exposição ou rompimento da membrana de Descemet, podendo comprometer o endotélio devido à proximidade dessas estruturas (XIMENES et al., 2014). O endotélio é constituído por uma fina camada de células justapostas, com capacidade regenerativa limitada, e durante sua reparação as células remanescentes aumentam de tamanho e vão se alongando até entrar em contato com a outra célula vizinha, ocorrendo o pleomorfismo celular (CARDIGOS; NERI, 2018).

A presença dos FCs auxilia na migração e proliferação das células para o defeito corneal, sendo importantes no processo de reparação como descrito a seguir (ALEIXO et al. 2017).

### 2.3 Os fatores de crescimento e sua atuação na reparação corneal

A córnea não possui vasos sanguíneos e, por isso, sua reparação é realizada por intermédio de mediadores inflamatórios, citocinas, proteinases, inibidores de proteinases e FCs peptídicos presentes na lágrima, humor aquoso e vasos límbicos (GUM; MACKAY, 2013).

Os FCs são mediadores biológicos naturais, produzidos pelo epitélio, estroma e endotélio corneal que após uma lesão são liberados e se ligam aos receptores de superfície celular da própria célula secretora ou de outras células. Estes promovem a proliferação, migração, diferenciação de células epiteliais e estromais, comunicação intercelular, apoptose e angiogênese (PONTES et al., 2011; SUZUKI et al., 2013; ALEIXO et al., 2017).

Sabe-se que o PRP possui uma grande concentração desses fatores e com isso potencializaria a cicatrização corneal ANITUA et al. (2018). Os principais FCs, presentes no PRP e relacionados com a cicatrização da córnea são: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF $\beta$ ), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e fator plaquetário IV (PF-4) (SINGH et al., 2014; KABIRI et al., 2014; ALEIXO et al., 2017; ANITUA et al. 2018).

Na literatura consultada, há um estudo comparativo entre a utilização de membrana amniótica e a membrana de fibrina rica em FCs e esta última apresentou menor tempo de cicatrização em relação à membrana amniótica. O uso da membrana rica em FCs, portanto, promoveu resultados mais satisfatórios na regeneração corneal, podendo ser utilizado em casos de úlceras resistentes aos tratamentos convencionais ou em procedimento cirúrgicos que causam desordens na superfície ocular, minimizando a inflamação e fibrose (SANCHEZ-AVILA et al., 2018b).

O PDGF é uma proteína catiônica, resistente ao calor (100°C), armazenada nos grânulos- $\alpha$  plaquetários que possui as seguintes isoformas PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC e o PDGF-DD (JAVED et al., 2011; ZACHARY, 2016). Por se tratar de um dímero, exerce seus efeitos sobre a célula alvo por meio da ativação de dois receptores  $\alpha$  e  $\beta$ , e após isso essa

célula passa a expressar sinais mitogênicos (CURY; GUIMARÃES, 2012; MUÑOZ et al., 2018).

Em um estudo realizado por Javed et al. (2011), os autores demonstraram que a isoforma PDGF-BB se sobressaiu em relação às demais quanto sua atividade mitótica e quimiotática atuando nos processos de regeneração tecidual de forma mais eficaz. De acordo com Muñoz et al. (2018), o PDGF-BB induziu um aumento na secreção do fator de crescimento transformador-  $\beta^1$  ( $TGF\beta^1$ ) produzindo um aumento na proliferação celular e promoção da cicatrização mais efetiva.

O  $TGF\beta$  é constituído de três isoformas  $TGF\beta^1$ ,  $TGF\beta^2$  e  $TGF\beta^3$  as quais são responsáveis pela quimiotaxia, diferenciação celular e angiogênese (ALEIXO et al., 2017). O  $TGF\beta$  interfere na ação de outros FCs, podendo antagonizar os efeitos do EGF com redução da sua capacidade de proliferação, adesão e migração de células epiteliais (YU et al., 2010). Entretanto nos ceratinócitos o  $TGF\beta^1$  potencializa os efeitos do EGF (YU et al., (2010).

O  $TGF\beta^1$  é a principal isoforma envolvida na reparação corneal e única capaz de diferenciar ceratinócitos em miofibroblastos promovendo uma cicatrização fibrótica densa (CARRINGTON et al., 2006; COSTA FILHO et al., 2017). Sua inibição acarretaria na redução da migração celular no estroma, minimizando a opacidade e a fibrose corneal (CARRINGTON et al., 2006), todavia se o  $TGF\beta^1$  for totalmente inibido a úlcera não irá cicatrizar (WANG et al., 2011).

Desta forma, em casos de úlceras refratárias ao tratamento, é indicado o uso de baixas doses de  $TGF\beta^1$ , e estas irão estimular a proliferação de fibroblastos no estroma sem formação de fibrose densa (WANG et al., 2011).

O  $TGF\beta^2$  tem baixa eficácia na reparação da córnea enquanto que o  $TGF\beta^3$  possui ação antagônica ao  $TGF\beta^1$  e conseqüentemente previne a formação de fibrose por retardar a migração celular estromal (CARRINGTON et al., 2006).

Em outro estudo realizado por Brown et al. (2017), o  $TGF\beta$  é responsável pela produção excessiva de componentes da matriz extracelular como o colágeno e fibronectina por meio dos fibroblastos e a supressão da sua sinalização preveniria a opacidade exagerada da córnea.

Uma das complicações relacionada com o aumento da atividade do TGF $\beta$  é a formação de glaucoma devido à deposição de matriz extracelular no tecido trabecular levando a uma maior resistência do fluxo do humor aquoso, elevando a pressão intraocular. Fármacos contendo anti-TGF $\beta$  estão sendo desenvolvidos como possível opção de tratamento para o glaucoma (SANCHEZ-AVILA et al., 2018a).

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., 2018a).

Em pacientes portadores de diabetes nos quais o tempo de cicatrização de uma úlcera, mesmo que superficial, é prolongado o uso de EGF tópico torna-se uma opção viável para aumentar a reepitelização (REINACH; POKORNY, 2008). Nos defeitos estromais, o EGF aumenta a mitose dos fibroblastos estimulando a produção de matriz extracelular (REINACH; POKORNY, 2008; OHTA et al., 2018)

O IGF-I em associação com o PDGF estão envolvidos na migração e proliferação de ceratinócitos que promove a síntese de colágeno da matriz extracelular (ZACHARY et al., 2016). Desta forma, ele induz a migração celular, aumenta a proliferação e inibe a apoptose de células epiteliais (YU et al., 2010).

Ghiasi et al. (2018) demonstraram que a instilação tópica de IGF-I associado à substância P (neuropeptídeo sensorial) em casos de ceratectomia fotorrefrativa, atuam em sinergismo, reduzindo o tempo de cicatrização do defeito epitelial, pois estimula a migração de células epiteliais e adicionalmente possui efeitos benéficos na adesão celular.

O FGF pode ser dividido em alcalino (aFGF) e básico (bFGF), estes possuem alta afinidade pela heparina e exercem efeitos na proliferação, migração celular e reparação tecidual (ANITUA et al., 2018). Em um experimento realizado por Wu et al. (2016), após a incorporação de aFGF e bFGF em hidrogéis à base de heparina (HP-GF) observou-se aceleração da cicatrização com aumento de tecido de granulação, nos estágios iniciais e estimulação da angiogênese e reepitelização.

O bFGF é a forma mais potente sendo capaz de promover a proliferação de células endoteliais *in vitro* de felinos domésticos (LUO et al., 2011). De acordo com Hu et al. (2009), a utilização de bFGF tópico em úlceras superficiais diminuiu o tempo de cicatrização, minimizou a inflamação e proporcionou um rearranjo mais regular das camadas da córnea.

O principal mediador do processo de vascularização corneal a partir de vasos preexistentes é o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), cuja forma original é VEGF-A sendo capaz de se ligar nos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 promovendo proliferação de células endoteliais e quimiotaxia, que pode levar a perda de sua transparência (SUN et al., 2013; KRIZOVA et al., 2014; SANCHEZ-AVILA, 2018b). Desta forma, o aumento excessivo desses FCs se torna algo indesejável e compromete a visão do paciente (SUN et al., 2013).

Para minimizar a formação de vasos em abundância, diversos estudos buscam maneiras de inibir o VEGF e conseqüentemente a angiogênese, mantendo a córnea transparente e funcional. Isso pode ser realizado por intermédio de fármacos como o bevacizumab, ranibizumab, aflibercept e ziv-aflibercept (MALIK et al., 2014). Em um estudo realizado por Gore et al. (2018), com o intuito de comparar a eficácia do ziv-aflibercept com o bevacizumab em córneas de coelhos, demonstraram que a aplicação subconjuntival de ziv-aflibercept apresentou benefícios terapêuticos em longo prazo, com redução da neovascularização, sendo o tratamento mais eficaz.

A ativação do VEGF-A se dá por hipóxia e inflamação e isso faz com que ocorra a estimulação das células endoteliais dos vasos, dessa maneira ocasiona a degradação da membrana basal e propicia migração celular (MALIK et al., 2014). Também pode atuar em sinergismo com o bFGF, induzindo a formação de novos capilares (WITMERA et al., 2003).

E por fim, o fator plaquetário IV (PF-4) produzido no megacariócito e armazenado no grânulo  $\alpha$  das plaquetas, são proteínas que possuem alta afinidade com a heparina e estão envolvidas na hemostasia e reparação vascular pela cascata de coagulação (PIMENTA et al., 2016).

Portanto o PRP é composto por uma alta concentração de diversos FCs, conforme mencionados acima, e tem sido um grande aliado no tratamento de

ceratite ulcerativa em diversas espécies animais (DONATTI et al., 2013; MERLINI et al., 2014; PERCHES et al. 2015; GANDOLFI, 2016).

## **2.4 O uso do plasma rico em plaquetas (PRP) na oftalmologia**

O PRP é definido como o componente obtido do sangue total, após centrifugação, contendo alta concentração plaquetária em relação à amostra inicial (MARX, 2001). As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados, oriundos dos megacariócitos e provenientes de trombopoiese, processo que ocorre na medula óssea, pulmões, fígado e baço (STOCKHAM; SCOTT, 2008).

Os trombócitos são constituídos de grânulos onde armazenam substâncias que atuam na reparação tecidual, as quais são liberadas somente após a ativação plaquetária (STEINERT, 2012). Essa ativação pode ocorrer farmacologicamente por meio de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) a 10%, trombina bovina pura ou pelo próprio contato do PRP com o tecido lesado (STEINERT, 2012).

Neste processo de ativação ocorrem alterações morfológicas das plaquetas com formação de pseudópodos e rompimento dos grânulos- $\alpha$  plaquetários (STEINERT, 2012) liberando mediadores biológicos como a trombina, tromboxano A<sub>2</sub>, adenosina difosfato, tromboplastina, fatores de coagulação, cálcio, serotonina, histamina, fator de Von Willebrand, fibrinogênio, catecolaminas e os FCs, sendo estes os mais importantes reparadores teciduais (WHITLOW et al., 2008; ZACHARY, 2016).

Após o processo acima descrito ocorre liberação imediata e prolongada desses FCs na lesão, promovendo efeito duradouro de sua ação e com isso, sua reparação pode ser acelerada de duas a três vezes comparativamente ao processo fisiológico natural (ALIO et al., 2012).

No início o PRP foi desenvolvido com o intuito de promover hemostasia objetivando redução de hemorragias durante procedimentos cirúrgicos (MAN et al., 2001). De tal maneira que um dos primeiros relatos do uso de PRP foi feito por Ralph et al. (1975) no qual foram utilizados produtos derivados do sangue pela primeira vez em pacientes com úlceras de córnea por queimaduras químicas.

O PRP vem sendo cada vez mais estudado e empregado em diversas áreas da medicina como odontologia, ortopedia, medicina esportiva, cirurgia reconstrutiva, cardiologia, dermatologia, oftalmologia, neurocirurgia, ginecologia, entre outras (RUBIO; LÓPEZ, 2018).

A aplicação do PRP em oftalmologia apresenta resultados favoráveis no tratamento de diversas afecções, como em úlceras de córnea, ceratoconjuntivite seca, em casos de necrose após realização de flaps, no pós-operatório de cirurgia refrativa (LASIK), entretanto na medicina veterinária seu uso ainda é pouco difundido (ALEIXO et al., 2017; RIBEIRO et al., 2017; RUBIO; LÓPEZ, 2018).

É indicado para promover a hemostasia, auxiliar na reparação tecidual, propiciar regeneração celular, age na formação de novos vasos, atua na aceleração da cicatrização por meio da migração, diferenciação e divisão de células mesenquimais e epiteliais e adicionalmente a isso, pelo aumento da formação de matriz extracelular com deposição de colágeno (ANITUA et al., 2004). Também são responsáveis pelos processos de apoptose, quimiotaxia e atuam na regulação da inflamação (ANITUA et al., 2004; REINACH; POKORNY, 2008; PONTES et al., 2011).

No passado, a produção de PRP era laboriosa e necessitava de equipamentos caros e específicos (KEVY; JACOBSON, 2004). Atualmente se trata de um produto de fácil obtenção e custo relativamente baixo, pois podem ser utilizadas centrífugas comuns no seu processamento (KEVY; JACOBSON, 2004).

Há diversos tipos de protocolos descritos na literatura, com um ou dois momentos de centrifugações (ALEIXO et al., 2011; MERLINI et al., 2014). Sendo que, a primeira etapa de centrifugação consiste na separação das hemácias, leucócitos e plaquetas, por variação de densidade, as células vermelhas, que tem maior peso, tendem a se depositarem no fundo do tubo, ao passo que os leucócitos situam-se em uma área intermediária e o plasma permanece acima (PAGLIOSA; ALVES, 2007).

Este plasma sobrenadante é separado e submetido à uma segunda etapa de centrifugação na qual é separado em PRP e plasma pobre em plaquetas (PPP), sendo que este, não possui as mesmas vantagens terapêuticas do PRP (MERLINI et al., 2014; RIBEIRO et al., 2017).

A junção de plaquetas e alguns leucócitos, na área intermediária, formam uma camada esbranquiçada denominada névoa (ALEIXO et al., 2017). Os leucócitos possuem propriedades antimicrobianas, mas também sintetizam citocinas pró-inflamatórias com efeitos catabólicos, podendo prejudicar a cicatrização, sendo contra indicado em pacientes com alterações ou doenças imunológicas (LÓPEZ-GARCÍA et al., 2007; ANITUA et al., 2013a). Segundo Anitua et al. (2013a), a presença de leucócitos não interferiu na concentração de FCs, entretanto aumentou drasticamente a secreção de citocinas pró-inflamatórias sendo indesejável para o processo cicatricial da córnea.

Em um estudo feito por Hauagge et al. (2010), no qual se comparou dois tipos de protocolos e foi observado que a utilização de menor força de centrifugação promove maior concentração plaquetária e quando o plasma é submetido à uma segunda etapa de centrifugação o PRP se torna mais eficiente.

Embora exista uma série de anticoagulantes disponíveis, o de eleição para o preparo do PRP é o citrato de sódio, este se liga aos íons de cálcio, impede a coagulação e desta forma, mantém a integridade da membrana das plaquetas (MARX, 2001); entretanto esse efeito pode ser revertido por meio da adição de cloreto de cálcio sendo útil este procedimento para a produção de gel de plaquetas para o tratamento de úlceras de córnea (MARX, 2001; MERLINI et al., 2014; ALEIXO et al., 2017).

Na bibliografia consultada há divergência dos valores de concentrações de plaquetas do PRP a serem adotados, segundo Marx, (2004), o ideal é que essa concentração atinja de quatro a cinco vezes mais que o sangue total ou que apresente valores de 500.000 a 1.000.000 de plaquetas por  $\mu\text{L}$  para proporcionar uma resposta adequada. No entanto, Anitua et al. (2004) preconizaram que concentrações superiores a 300.000 por  $\mu\text{L}$  já são suficiente para realizarem suas funções.

Mais recentemente, Alio et al., (2012) recomendam um aumento de 1,6 à 2,5 vezes do valor do sangue total. Kim et al., (2012) ao empregar em concentração de 1,5 vezes mais plaquetas obtiveram resultados satisfatórios com altas dosagens de EGF e TGF-  $\beta$ . Desta forma, são necessários mais estudos correlacionando a concentração de plaquetas e seus efeitos clínicos nas diversas afecções oftalmológicas.

Na oftalmologia, o PRP pode ser empregado na forma de colírio para instilação na superfície ocular, por via subconjuntival ou por meio de tampão sólido associado ao recobrimento com a terceira pálpebra para melhor fixação (KEVY; JACOBSON, 2004; MERLINI et al., 2014). Este produto pode ser mantido refrigerado a 4°C durante sete dias, na temperatura ambiente por 24 horas ou armazenado congelado a 20°C negativos durante três meses sem comprometer sua composição e atividade biológica (Anitua et al., 2013b).

O PRP autólogo mostrou-se eficaz no tratamento de úlceras neurotróficas e em defeitos epiteliais persistentes com 80% dos pacientes com cicatrização completa e 16% apresentaram melhora significativa em relação ao tamanho, profundidade e inflamação do defeito tornando-se um tratamento econômico, sem conservantes e rico em FCs, diferente da terapia convencional no qual se utiliza produtos sintéticos recombinantes com apenas um fator de crescimento e preços inacessíveis (SANCHEZ-AVILA et al., 2018b; WRÓBEL-DUDZIŃSKA et al., 2018).

O PRP não desempenha apenas papel importante em afecções de superfície ocular, em um estudo realizado por Parra et al. (2017), foram avaliados o efeito terapêutico do PRP intradérmico após cirurgia de blefaroplastia e o grupo tratado se sobressaiu em relação ao grupo controle promovendo melhoria na cicatrização, elasticidade e regeneração tecidual.

Em um trabalho realizado por Merlini et al. (2014) foram avaliados clinicamente cães diagnosticados com ceratite ulcerativa, os quais foram tratados com PRP autólogo na forma de colírio e tampão sólido e ambos se mostraram efetivos como tratamento adjuvante de úlceras de córnea, minimizando os sinais da inflamação e dor, auxiliando na cicatrização epitelial.

Perches et al. (2015) estudaram a influência do PRP na proliferação celular e na expressão de MMPs durante a reparação corneal em coelhos e foi concluído que o PRP estimula a proliferação celular principalmente na fase inicial do tratamento (período correspondente a quatro dias) e que sua ação também aumenta a expressão das MMPs responsáveis pela manutenção e remodelamento da matriz extracelular.

O PRP autólogo minimiza as chances de reações imunológicas, rejeição, transmissão de doenças infectocontagiosas por ser um produto oriundo do próprio animal (MARX, 2004; ALIO et al., 2007). Por isso, Anitua et al. (2014)

desenvolveram uma nova modalidade terapêutica de PRP aquecido à 56°C durante uma hora. Pôde-se observar no estudo em seres humanos que o aquecimento, apesar de reduzir os níveis de EGF, manteve as concentrações dos principais FCs que atuam na reparação corneal (PDGF-AB, TGF $\beta$ <sup>1</sup>, IGF-I e VEGF). Também ocorreu a diminuição de Imunoglobulinas E (IgE) e de proteínas do sistema complemento.

Gandolfi (2016) realizaram um experimento com o objetivo de avaliar o efeito clínico na utilização de PRP alogênico aquecido ou não no tratamento de úlceras de córnea induzidas em ratos e verificaram como resultados que ambos apresentaram diminuição da opacidade corneal bem como aceleração da reparação, tornando-o uma opção de tratamento adjuvante para ceratite ulcerativa.

A literatura ainda carece de estudos sobre os efeitos clínicos *in vivo* do PRP alogênico aquecido como modalidade terapêutica adjuvante da ceratite ulcerativa em cães. Sua aplicação poderia beneficiar no tratamento de animais de pequeno porte, portadores de afecções sistêmicas e/ou imunomediadas, além de viabilizar a instituição de um banco de PRP na rotina clínica.

### 3. REFERÊNCIAS

ALEIXO, G. A. S.; COELHO, M. C. O. C.; TRAJANO, S. C.; ANDRADE, L. S. S. Platelet-rich plasma : mechanisms of action, production and indications for use - a review. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 11, n. 4, p. 239-246, 2017.

ALEIXO, G. A. S.; COELHO, M. C. O. C.; TEIXEIRA, M. N. Comparação entre dois protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas, em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 3, p. 567-573, 2011.

ALIO, J. L. et al. Eye platelet-rich plasma in the treatment of ocular surface disorders. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 26, n. 4, p. 325-332, 2015.

ALIO, J. L. et al. Autologous fibrin membrane combined with solid platelet-rich plasma in the management of perforated corneal ulcers: A pilot study. **JAMA Ophthalmology**, v. 131, n. 6, p. 745-751, 2013.

ALIO, J. L. et al. The role of “eye platelet rich plasma”(E-PRP) for wound healing in ophthalmology. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, n. 7, p. 1257-1265, 2012.

ALIO, J. L. et al. Use of Autologous Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Dormant Corneal Ulcers. **Ophthalmology**, v. 114, n. 7, p. 1286-1294, 2007.

ANITUA, E.; PRADO, R.; NURDEN, A. T.; NURDEN, P. Characterization of Plasma Rich in Growth Factors (PRGF): Components and Formulations. **Platelet Rich Plasma in Orthopaedics and Sports Medicine**. p.29-45, 2018.

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.

ANITUA, E.; MURUZABAL, F.; PINO, A.; MERAYO-LLOVES, J.; ORIVE, G. Biological stability of plasma rich in growth factors eye drops after storage of 3 months. **Cornea**, v. 32, n. 10, p. 1380-1386, 2013a.

ANITUA, E.; ZALDUENDO, M. M.; ALKHRAISAT, M. H.; ORIVE, G. Release kinetics of platelet-derived and plasma-derived growth factors from autologous plasma rich in growth factors. **Annals of Anatomy**, v. 195, n. 5, p. 461-466, 2013b.

ANITUA, E. et al. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 91, n. 1, p. 4-15, 2004.

BROWN, K. D.; SHAH, M. H.; LIU, G. S.; et al. Transforming growth factor  $\beta$ 1-induced NADPH oxidase-4 expression and fibrotic response in conjunctival fibroblasts. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 58, n. 7, p. 3011-3017, 2017.

CARDIGOS, J.; NERI, G. A Morfologia Endotelial e a Espessura Central da Córnea em Idade Pediátrica. **Oftalmologia**, v. 41, 2018.

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 and Visual Science**, v. 47, n. 5, p. 1886-1894, 2006.

COSTA FILHO, O. A. A.; RIBAS FILHO, J. M.; ARIEDE, B. L.; et al. Avaliação da eficácia de três marcadores imunoistoquímicos envolvidos nos diferentes tempos da cicatrização da ferida cirúrgica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 44, n. 4, p. 367-373, 2017.

CURY, V. F.; GUIMARÃES, M. M. Fator de crescimento derivado de plaquetas na implantodontia. Novas perspectivas de tratamento para reconstrução óssea. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**, v. 53, n. 1, p. 60-66, 2012.

DONATTI, C.; BRANDÃO, C., et al. Use of platelet-rich plasma in the treatment of deep corneal ulcers induced in rabbits. Clinical and histomorphometric evaluation. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, v. 65, n. 3, p. 809-818, 2013.

GALERA, P. D.; ARAÚJO, R. L. S.; SANT'ANA, F. J. F.; CASTRO, M. B. Caracterização clínica e histopatológica de bulbos oculares de cães e gatos (2005-2015). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 10, p. 1125-1132, 2017.

GANDHI, S.; JAIN, S. The anatomy and physiology of cornea. **Keratoprotheses and Artificial Corneas: Fundamentals and Surgical Applications**, v. 37, n. 3, p. 19-25, 2015.

GANDOLFI, M. G. Plasma rico em plaquetas alogênico em úlceras induzidas em córneas de ratos. **Dissertação de Mestrado em Oftalmologia**, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu-SP, 2016.

GELATT, K. N. **Essentials of Veterinary Ophthalmology**: Physiology of the eye. 3. ed, p. 40-55, University of Florida, EUA: Wiley Blackwell, 2014.

GHIASI, Z.; GRAY, T.; TRAN, P.; et al. The Effect of Topical Substance-P Plus Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) on Epithelial Healing After Photorefractive Keratectomy in Rabbits. **Tranlational Vision Science & Technology**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2018.

GILGER, B. C.; LEDBETTER, E. C.; GELLAT, K. N. Diseases and surgery of the canine cornea and sclera. **Veterinary Ophthalmology**. 5. ed, p. 976-1049, University of Florida, EUA: Wiley Blackwell, 2013.

GORE, A.; HORWITZ, V.; COHEN, M.; et al. Successful single treatment with ziv-aflibercept for existing corneal neovascularization following ocular chemical insult in the rabbit model. **Experimental Eye Research**, v. 171, p. 183-191, 2018.

GUM, G.; MACKAY, E. O. **Veterinary Ophthalmology**: Physiology of the eye. 5. ed, p. 171-173, University of Florida, EUA: John Wiley & Sons Inc, 2013.

HAUAGGE, G.S.; GAMA, R. Plasma rico em plaquetas: diferentes protocolos de obtenção. **Programa de pós-graduação em Medicina Estética (IPEMCE)**. v. 3, n. 1, 2010.

HERRERA, D.; et al. **Oftalmologia Clínica em Animais de Companhia**: Afecções da córnea. 1.ed, p.111-140, Universidade de Buenos Aires, Argentina: MedVet, 2008.

HU, C.; DING, Y.; CHEN, J.; et al. Treatment of corneal epithelial wounds in dogs using basic fibroblast growth factor. **Veterinarni Medicina**, v. 54, n. 6, p. 280-286, 2009.

JAVED, F.; AL-ASKAR, M.; AL-RASHEED, A.; AL-HEZAIMI, K. Significance of the platelet-derived growth factor in periodontal tissue regeneration. **Archives of Oral Biology**, v. 56, n. 12, p. 1476-1484, 2011.

- KABIRI, A.; ESFANDIARI, E.; ESMAEILI, A.; HASHEMIBENI, B. Platelet-rich plasma application in chondrogenesis. **Advanced Biomedical Research**, v. 3, n. 138, 2014.
- KEVY, S. V.; JACOBSON, M. S. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. **The Journal of Extra-Corporeal Technology**, v. 36, n. 1, p. 28-35, 2004.
- KIM, K. M.; SHIN, Y. T.; KIM, H. K. Effect of autologous platelet-rich plasma on persistent corneal epithelial defect after infectious keratitis. **Japanese Journal of Ophthalmology**, v. 56, n. 6, p. 544-550, 2012.
- KRIZOVA, D.; VOKROJOVA, M.; LIEHNEOVA, K.; STUDENY, P. Treatment of corneal neovascularization using anti-VEGF bevacizumab. **Journal of Ophthalmology**, v. 2014, p. 1-8, 2014.
- LAUS, J. L.; TEIXEIRA, A. L.; BARROS, L.F.M. **Oftalmologia Clínica e Cirúrgica em Cães e em Gatos: Afecções da Túnica Fibrosa**. 1ed. p.69-96, São Paulo, 2009.
- LÓPEZ-GARCÍA, J. S.; GARCÍA-LOZANO, I.; RIVAS, L.; MARTÍNEZ-GARCHITORENA, J. Use of autologous serum in ophthalmic practice. **Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología**, v. 82, n. 1, p. 9-20, 2007.
- LUO, W.J.; ZHOU, Y.; LIU, M.G.; WANG, C.F. Effect of basic fibroblast growth factor on cat corneal endothelial cell proliferation. **International Journal of Ophthalmology**, v. 4, n. 4, p. 384-387, 2011.
- MALIK, D.; TAREK, M.; DEL CARPIO, J. C.; et al. Safety profiles of anti-VEGF drugs: Bevacizumab, ranibizumab, aflibercept and ziv-aflibercept on human retinal pigment epithelium cells in culture. **British Journal of Ophthalmology**, v. 98, n. 1, p. 11-17, 2014.
- MAN, D.; PLOSKER, H.; WINLAND-BROWN, J. E. The Use of Autologous Platelet-Rich Plasma (Platelet Gel) and Autologous Platelet-Poor Plasma (Fibrin Glue) in Cosmetic Surgery. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 107, n. 1, p. 229-237, 2001.
- MARX, R. E. Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP?

**Journal of Implant Dentistry**, v. 10, n. 4, p. 225-228, 2001.

MARX, R. E. Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support Its Use. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, 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. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 6, p. 1742-1750, 2014.

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, 2018.

MUÑOZ, G. P.; FRÍAS, I. L.; GARROTE, J. A.; et al. Human corneal fibroblast migration and ECM synthesis during stromal repair: Role played by PDGF-BB, bFGF, and TGF $\beta$ 1. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 1, 2018.

NAUTSCHER, N.; BAUER, A.; STEFFL, M.; AMSELGRUBER, W. M. Comparative morphological evaluation of domestic animal cornea. **Veterinary Ophthalmology**, v. 19, n. 4, p. 1-8, 2016.

OHTA, M.; MORITA, Y.; YAMADA, N.; NISHIDA, T.; MORISHIGE, N. Remodeling of the Corneal Epithelial Scaffold for Treatment of Persistent Epithelial Defects in Diabetic Keratopathy. **Case Reports in Ophthalmology**, v. 9, p. 333-340, 2018.

PAGLIOSA, G. M.; ALVES, G. E. S. Considerações sobre a obtenção e o uso do plasma rico em plaquetas e das células mesenquimais indiferenciadas em enxertos ósseos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1202-1205, 2007.

PARRA, F.; MORALES-ROME, D. E.; CAMPOS-RODRÍGUEZ, R.; CRUZ-HERNÁNDEZ, T. R.; DRAGO-SERRANO, M. E. Effect of platelet-rich plasma on patients after blepharoplasty surgery. **Orbit**, v. 37, n. 2, p. 81-86, 2017.

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. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 6, p. 1607-1615, 2015.

- PISO, T.; GUIMARÃES, P.; ANDRADE, A. Manejo de úlceras corneales en animales domésticos: revisión de literatura. **Revista Eletrônica de Veterinaria**, v. 18, n. 12, p. 1-22, 2017.
- PIMENTA, E. F. R.; BONETTI, Y. W.; ALMEIDA, R. H.; et al. Heparin induced thrombocytopenia in a patient with acute arterial occlusion. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 15, n. 2, p. 138-141, 2016.
- PONTES, K. C. D. 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, 2011.
- RALPH, R. A.; DOANE, M. G.; DOHLMAN, C. H. Clinical experience with a mobile ocular perfusion pump. **Archives of Ophthalmology**, v. 93, 1975.
- REINACH, P.; POKORNY, K. The corneal epithelium: clinical relevance of cytokine-mediated responses to maintenance of corneal health. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 71, n. 6, p. 80-88, 2008.
- RIBEIRO, M. V. M. R.; DE MELO, V. F.; BARBOSA, M. E. F. C.; et al. O uso do concentrado de plaquetas na oftalmologia: uma revisão de literatura. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 76, n. 6, p. 319–324, 2017.
- RUBIO, J. A.; LÓPEZ, J. M. S. Clinical applications of plasma growth factors. **Plasma Medicine - Concepts and Clinical Applications**, p.83-98, 2018.
- SANCHEZ-AVILA, R. M.; MERAYO-LLOVES, J.; FERNANDEZ, M. L.; et al. Plasma rich in growth factors eye drops to treat secondary ocular surface disorders in patients with glaucoma. **International Medical Case Reports Journal**, v. Volume 11, p. 97-103, 2018a.
- SANCHEZ-AVILA, R. M.; MERAYO-LLOVES, J.; RIESTRA, A. C.; et al. Plasma rich in growth factors membrane as coadjuvant treatment in the surgery of ocular surface disorders. **Medicine (United States)**, v. 97, n. 17, p. 1-10, 2018b.
- SINGH, V.; BARBOSA, F. L.; TORRICELLI, A. A. M.; SANTHIAGO, M. R.; WILSON, S. E. Transforming growth factor  $\beta$  and platelet-derived growth factor modulation of myofibroblast development from corneal fibroblasts *in vitro*.

**Experimental Eye Research**, v. 120, p. 152-160, 2014.

SLATTER, D.; MAGGS, D. J.; et al. **Fundamentals of Veterinary Ophthalmology: Cornea and Sclera**. 3. ed, p. 184-216, St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders, 2013.

STEINERT, A. F. et al. Platelet-Rich Plasma in Orthopaedic Surgery and Sports Medicine: Pearls, Pitfalls, and New Trends in Research. **Operative Techniques In Orthopaedics**, v. 22, n. 2, p.91-103, 2012.

STOCKHAM, L.; SCOTT, M. **Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology: Platelets**. 2. ed, p. 223-259, College of Veterinary Medicine, Kansas State University: Wiley-Blackwell, 2008.

SUN, Y.; SU, L.; WANG, Z.; et al. 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.

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, 2013.

WANG, L.; KO, C. Y.; MEYERS, E. E.; et al. Concentration-dependent effects of transforming growth factor  $\beta$ 1 on corneal wound healing. **Molecular Vision**, v. 17, p. 2835-2846, 2011.

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

WHITLOW, J.; SHACKELFORD, A.; SIEVERT, A.; SISTINO, J. Barriers to the acceptance and use of autologous platelet gel. **Perfusion**, v. 23, n. 5, p. 283-289, 2008.

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

WRÓBEL-DUDZIŃSKA, D.; ALIO, J.; RODRIGUEZ, A.; et al. Clinical Efficacy of Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Neurotrophic Corneal Ulcer. **Journal of Ophthalmology**, v. 2018, p. 1–7, 2018.

WU, J.; ZHU, J.; HE, C.; et al. Comparative study of heparin-poloxamer hydrogel modified bFGF and aFGF for *in vivo* wound healing efficiency. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 8, n. 29, p. 18710–18721, 2016.

XIMENES, K. F.; SILVA, J. V.; VASCONCELOS, K. F. X.; MONTE, F. Q. The role of Descemet's membrane in the pathogeny of corneal edema following anterior segment surgery. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 73, n. 5, p. 262–268, 2014.

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.

ZACHARY, J. F.; et al. **Pathologic Basis of Veterinary Disease Expert Consult: The eye**. 6. ed, University of Illinois: Elsevier Saunders, 2017.

## **Capítulo 2**

**USO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS AUTÓLOGO E ALOGÊNICO  
AQUECIDO NO TRATAMENTO DE CERATITE ULCERATIVA EM CÃES**

Trabalho a ser enviado à revista *Research in Veterinary Science*

Link para o site que indica as normas de publicação da revista:

<https://www.elsevier.com/journals/research-in-veterinary-science/0034-5288/guide-for-authors#3700>

## USO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS AUTÓLOGO E ALOGÊNICO AQUECIDO NO TRATAMENTO DE CERATITE ULCERATIVA EM CÃES

[Use of heated alogenic and autologous platelet-rich plasma in the treatment of ulcerative keratitis in dogs]

### RESUMO

O plasma rico em plaquetas (PRP) atua na reparação corneal e, quando aquecido, minimiza a reação imunológica local sem interferir nos níveis dos fatores de crescimento. O objetivo deste estudo clínico foi comparar o PRP autólogo (GP) com o alogênico aquecido (GA) no tratamento de ceratite ulcerativa em cães, bem como os seus efeitos clínicos. Para isso, foram utilizados 24 cães diagnosticados na rotina oftalmológica com ceratite ulcerativa, distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais, um tratado utilizando-se colírio de PRP autólogo (n=11) e outro com colírio de PRP alogênico aquecido (n=13). Todos os animais foram avaliados no momento inicial do atendimento e após 3, 5, 10, 15 e 30 dias do tratamento. Foram analisadas as seguintes variáveis oftalmológicas: blefaroespasmos, secreção ocular, opacidade corneal, vascularização, fotofobia, hiperemia conjuntival, quemose, espessura corneal e o percentual de redução da úlcera de córnea. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos considerando o tratamento utilizado e verificou-se redução no tempo de cicatrização da lesão com adequada reepitelização corneal, bem como diminuição da opacidade e dos sinais de inflamação. Concluiu-se que o PRP autólogo e alogênico aquecido em cães apresentam-se de forma equiparável, sendo uma excelente opção no tratamento adjuvante da ceratite ulcerativa.

**Palavras chave:** Fatores de crescimento; imunologia; lesões de córnea; PRP.

## ABSTRACT

34  
35 Platelet rich plasma (PRP) acts on corneal repair and, when heated, presents reduced local  
36 immune response without interfering in growth factor levels. This clinical trial aimed to  
37 compare the use of autologous PRP (AP) and heated allogeneic PRP (HP) in the treatment of  
38 ulcerative keratitis in dogs, as well as their clinical effects. For this purpose, 24 dogs were  
39 utilized from the routine with diagnosis of ulcerative keratitis, and randomly distributed into  
40 two experimental groups, one treated with autologous PRP eye drops (n=11) and the other  
41 with heated allogeneic PRP eye drops (n=13). All the animals were evaluated before and at 3,  
42 5, 10, 15 and 30 days after treatment. The ophthalmologic variables analyzed were:  
43 blepharospasm, ocular discharge, corneal opacity, vascularization, photophobia, conjunctival  
44 hyperemia, chemosis, corneal thickness, as well as the percentage of corneal ulcer reduction.  
45 There was no statistical difference between the groups considering the treatment used and  
46 there was a reduction in the healing time of the lesion with adequate corneal  
47 reepithelialization, as well as a decrease in opacity and signs of inflammation. It was  
48 concluded that autologous and allogeneic PRP in dogs are similar, being an excellent option  
49 in the adjuvant treatment of ulcerative keratitis.

50

51 **Key-words:** Growth factors; immunology; corneal lesions; PRP.

52

## 53 INTRODUÇÃO

54 A ceratite ulcerativa, também denominada úlcera de córnea, é uma afecção muito  
55 frequente na rotina clínica oftalmológica (Moreira et al., 2018). Em virtude da ausência de  
56 vasos, a reparação corneal inicial ocorre por intermédio de mediadores inflamatórios,  
57 citocinas, proteinases, inibidores de proteinases e fatores de crescimento (FCs) (Gum and  
58 Mackay, 2013).

59 Os FCs são mediadores biológicos naturais, produzidos pelo epitélio, estroma e  
60 endotélio da córnea e estão presentes na lágrima e humor aquoso participando dos processos  
61 de reparação da lesão (Yu et al., 2010). Este mecanismo é realizado por meio da produção de  
62 matriz extracelular de forma organizada, o que leva a estimulação na proliferação de  
63 ceratinócitos, síntese de colágenos e proteoglicanos (Alio et al., 2007).

64 Esses fatores estão presentes nos grânulos- $\alpha$  plaquetários sanguíneos do sangue total,  
65 de modo que após sua coleta, centrifugação e descarte do sobrenadante obtém-se um aumento  
66 na concentração dos FCs e, após esse processo, este sangue passa a ser denominado como  
67 plasma rico em plaquetas (PRP) (Alio et al., 2013).

68 A aplicação do PRP vem sendo muito estudada, pois promove aceleração na  
69 cicatrização da lesão e diminui a formação de opacidade corneal devido a uma grande  
70 concentração de FCs que estimulam a migração e divisão de células mesenquimais e  
71 epiteliais contribuindo com a formação da matriz extracelular (Merlini et al., 2014; Gandolfi,  
72 2016; Sanchez-Avila et al., 2018).

73 Os principais FCs, presentes no PRP, e relacionados com a cicatrização da córnea são:  
74 fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador- $\beta$   
75 (TGF $\beta$ ), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento semelhante à insulina  
76 (IGF-I), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento do endotélio  
77 vascular (VEGF) e fator plaquetário IV (PF-4) (Singh et al., 2014; Kabiri et al., 2014; Aleixo  
78 et al., 2017; Anitua et al., 2018).

79 Anitua et al. (2014) observaram que o PRP quando é submetido ao aquecimento à  
80 56°C durante uma hora promove redução nos índices de EGF, proteínas do sistema  
81 complemento e Imunoglobulinas E (IgE), sem interferir na concentração da maioria dos  
82 fatores de crescimento (PDGF, TGF-  $\beta^1$ , IGF-I, VEGF) ou seja, essa técnica possibilita o uso  
83 de PRP alogênico aquecido no tratamento adjuvante de ceratites ulcerativas, com custo  
84 acessível, mínima reação inflamatória local podendo ser utilizados em diferentes animais  
85 (Gandolfi, 2016).

86 De acordo com Anitua et al. (2014) todas as concentrações das imunoglobulinas  
87 foram reduzidas no grupo de PRP inativado pelo calor, entretanto, diferenças significativas  
88 foram observadas somente para IgE e não para IgG e IgM, sendo este produto indicado para

89 pacientes portadores de afecções de caráter autoimune (síndrome de Sjögren, lúpus  
90 eritematoso, vasculite, alergopatias).

91 Ressalta-se que na literatura consultada, a utilização de PRP alogênico e aquecido  
92 ainda não foi avaliado em úlceras corneais de cães, bem como a sua comparação com PRP  
93 autólogo. Adicionalmente, a obtenção de volume de colírio autólogo suficiente para o  
94 tratamento clínico é um desafio, especialmente em cães de pequeno porte, que mais  
95 frequentemente são acometidos por úlceras corneais. Desta maneira, o PRP alogênico  
96 aquecido poderia se tornar uma opção terapêutica viável para estes animais.

97 Portanto, objetivou-se com esse estudo comparar o PRP autólogo com o alogênico  
98 aquecido no tratamento de ceratite ulcerativa em cães, bem como os seus efeitos clínicos.  
99 Podendo-se desta forma, indicá-lo como uma opção de terapia adjuvante na cicatrização de  
100 úlceras de córnea.

101

## 102 **Material e Métodos**

103 Foram utilizados 24 cães, sem predileção de sexo, raça, peso e idade distribuídos  
104 aleatoriamente em dois grupos experimentais. Todos os animais foram atendidos pelo setor  
105 de Oftalmologia Veterinária do Hospital Veterinário da UNESP, Campus Botucatu e foram  
106 selecionados cães com o diagnóstico de ceratite ulcerativa, incluindo as úlceras estromais  
107 profundas atingindo no máximo dois terços da espessura corneal total; excluindo, portanto, as  
108 descemetoceloses e indolentes.

109 Todos os procedimentos experimentais desenvolvidos foram aprovados pela Comissão  
110 de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da  
111 Universidade Estadual Paulista, campus de Botucatu, sob o protocolo nº 0046/2017-CEUA.  
112 Assim como, foi realizado de acordo com as normas da “Association for Research in Vision  
113 and Ophthalmology” (ARVO).

114 Os cães selecionados foram submetidos ao exame físico geral e laboratorial para  
115 descartar afecções sistêmicas bem como a presença de trombocitopenia, sendo estes, fatores  
116 de exclusão. Foi realizada avaliação oftalmológica de rotina com auxílio da lâmpada de fenda  
117 portátil (SL 15 Kowa Japan) para identificação de alterações em estruturas e anexos oculares  
118 que poderiam comprometer o tratamento.

119 Adicionalmente, foi realizado teste de Schirmer tipo 1 (Ophthalmos®) para averiguar  
120 a produção lacrimal. A tonometria de aplanção (TonoPen® MedTronic) para mensurar a  
121 pressão intraocular; o teste de flurosceína, com o intuito de identificar qual o tipo de úlcera e  
122 sua extensão; e por fim, a fotodocumentação para acompanhamento do tratamento  
123 preconizado.

124 As alterações palpebrais, quando presentes, foram corrigidas antes do início do  
125 tratamento. Outras afecções concomitantes que poderiam predispor a formação de úlceras e  
126 interferir na sua cicatrização como o glaucoma, uveíte intensa, ceratoconjuntivite seca  
127 também foram incluídas nos critérios de exclusão deste experimento.

128 Os animais selecionados foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos  
129 experimentais (GP e GA). No grupo GP (n=11), foi utilizado colírio tópico contendo PRP  
130 autólogo não aquecido e no grupo GA (n=13) colírio de PRP alogênico aquecido. Os PRPs na  
131 forma de colírio foram instilados quatro vezes ao dia até a total resolução da úlcera. Em todos  
132 os casos foi associado colírio à base de tobramicina (Tobrex® - Alcon), quatro vezes ao dia.

133 As preparações dos colírios de PRP autólogo e alogênico aquecido foram feitos de  
134 acordo com o protocolo utilizado por Merlini et al. (2014). Para o protocolo foi coletado 45  
135 mililitros (mL) de sangue total, por meio da punção da veia jugular utilizando Vacutainer e  
136 esse volume foi distribuído em dez frascos contendo citrato de sódio 3,2%, obtendo 4,5 mL  
137 em cada frasco. O processamento do PRP foi realizado na capela de fluxo laminar  
138 unidirecional para manter o produto estéril.

139           Posteriormente, a amostra coletada passou por dois processos de centrifugações,  
140 sendo que a primeira centrifugação foi de 220 gravidades (G), durante dez minutos, após isso,  
141 foi pipetado e desprezado 30% do plasma da superfície e o restante foi acondicionado em  
142 tubos tipo Falcon de 15 mL até completar seis mililitros. Em seguida, este plasma  
143 remanescente foi submetido a uma segunda etapa de centrifugação a 600 G durante dez  
144 minutos.

145           Dois terços do sobrenadante obtido da segunda centrifugação foi descartado e  
146 denominado plasma pobre em plaquetas (PPP) e o restante, como PRP o qual foi utilizado na  
147 forma de colírio do GP. A diluição para a contagem plaquetária foi feita na proporção de  
148 1:100, utilizando a câmara de Neubauer.

149           No GA, foram selecionados três cães de porte médio, hípidos como doadores para  
150 obtenção do sangue total. Como já foi dito, o PRP alogênico aquecido foi obtido da mesma  
151 forma descrita anteriormente; no entanto, após seu processamento, foi mantido em banho  
152 maria à 56°C durante 60 minutos (Anitua et al., 2014).

153           O PRP de ambos os grupos foi acondicionado em uma seringa estéril de um mililitro e  
154 foi mantido congelado à 20°C negativos para a conservação dos fatores de crescimento  
155 (Anitua et al., 2013a). Durante o tratamento, os tutores foram orientados a manter o PRP na  
156 geladeira por no máximo sete dias (Anitua et al., 2013a).

157           A espessura corneal foi realizada com o auxílio de paquímetro (Tomey<sup>®</sup> – Japan) após  
158 sua dessensibilização com colírio anestésico à base de cloridrato de proximetacaína 0,5%  
159 (Anestalcon<sup>®</sup>), mensurando a região central e periférica temporal.

160           A evolução do tratamento foi monitorada com a instilação de fluoresceína em todos os  
161 retornos, bem como, a realização de fotografias para documentação com câmera fotográfica  
162 digital a uma distância de 10 cm. Em seguida, a área da úlcera foi analisada por meio do  
163 software ImageJ<sup>®</sup>.

164 As avaliações foram feitas nos seguintes momentos: antes do tratamento (M0), três  
165 (M3), cinco (M5), dez (M10), quinze (M15) e trinta dias (M30) após início da terapêutica. As  
166 variáveis oftalmológicas como: blefaroespasma, secreção ocular, opacidade corneal,  
167 vascularização, fotofobia, hiperemia conjuntival e quemose foram classificadas em escores,  
168 sendo: (0) ausente; (1) discreto; (2) moderado; (3) intenso.

169 Para análise dessas variáveis, bem como, para o cálculo da área da úlcera, foram  
170 utilizadas a análise de variância não paramétrica para o modelo de medidas repetidas em  
171 grupos independentes, complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn (Zar,  
172 2009). A espessura corneal foi aplicada a técnica da análise de variância paramétrica para o  
173 modelo de medidas repetidas em grupos independentes complementada com o teste de  
174 comparações múltiplas de Bonferroni. Foi considerado nível de 5% de significância em todas  
175 as variáveis (Johnson and Wichern, 2007).

176

## 177 **Resultados e discussão**

178 A obtenção de PRP com protocolo de duas centrifugações foi eficaz, corroborando ao  
179 descrito por Merlini et al. (2014). Protocolos de dupla centrifugação apresentam melhor  
180 resposta na concentração plaquetária quando comparado com uma única (Aleixo et al., 2011).  
181 Com a metodologia adotada, observou-se incremento plaquetário médio de 1.475.773  
182 plaquetas/ $\mu$ L no GP, portanto quatro vezes o valor do sangue total. O GA concentrou em  
183 média 1.406.882 plaquetas/ $\mu$ L antes de aquecê-lo, não houve diferença estatística entre os  
184 valores das concentrações de ambos os grupos ( $p>0,05$ ).

185 Após o aquecimento à 56°C do PRP do GA, não foi possível realizar a contagem na  
186 câmara de Neubauer devido à presença de diversos agregados plaquetários, o mesmo foi  
187 observado por Gandolfi, (2016), verificou-se diminuição da concentração total de plaquetas,  
188 entretanto, sem significado clínico. Todavia, Anitua et al. (2014) relataram por meio de

189 mensurações dos fatores de crescimento, que o aquecimento não interfere na quantidade dos  
190 mesmos, e que estes são resistentes nessa faixa de temperatura, tornando-se viável no  
191 processo de reparação corneal.

192 Da mesma maneira, Akbache et al. (2009) observaram diminuição na concentração de  
193 FC no soro, em especial o TGF $\beta$ , em temperaturas acima de 60°C, sendo que, neste caso, o  
194 processo de desnaturação ocorre no intervalo de 66 a 76°C. Adicionalmente, Miller et al.  
195 (1991) descreveram que as quantidades de IGF-I não alteraram após o aquecimento à 79°C,  
196 entretanto, em temperaturas a partir de 121°C este fator já não foi mais detectado no soro. No  
197 que se refere as imunoglobulinas, Garbett et al. (2008) demonstraram que a desnaturação de  
198 IgG ocorre na temperatura de 69,8°C.

199 Em relação a contagem total de plaquetas, segundo Marx, (2004), o ideal é que o PRP  
200 supere de quatro a cinco vezes mais que o sangue total ou que apresente valores de 500.000 a  
201 1.000.000 de plaquetas por  $\mu$ L. Anitua et al. (2004) recomendam que 300.000 plaquetas/ $\mu$ L  
202 por aplicação já seria eficaz para o tratamento. Alio and Arnalich-Montiel, (2012)  
203 preconizaram um aumento de 1,6 a 2,5 vezes do valor do sangue total.

204 Já Kim et al. (2012) ao empregarem concentração de 1,5 vezes mais plaquetas  
205 obtiveram resultados satisfatórios com altas dosagens de EGF e TGF-  $\beta$ . Desta forma são  
206 necessários mais estudos correlacionando a concentração de plaquetas e seus efeitos clínicos  
207 nas diversas afecções oftalmológicas. O protocolo instituído, portanto, apresentou um  
208 desempenho satisfatório e as concentrações plaquetárias estavam de acordo com a literatura  
209 consultada.

210 A estocagem do PRP à 20°C negativos permite conservar todas as propriedades dos  
211 fatores derivados de plaquetas por até três meses (Anitua et al., 2013a), com isso se tornaria  
212 possível à instalação de um banco de PRP para os casos de ceratite ulcerativa na rotina  
213 ambulatorial.

214 Durante todo o tratamento ressalta-se que nenhum cão dos grupos experimentais  
215 apresentou qualquer tipo de reação adversa após a instilação do colírio. Nos animais do  
216 presente estudo também adicionamos o uso de colírio tópico à base de tobramicina (Tobrex®  
217 - Alcon) quatro vezes ao dia, por não se tratar de uma úlcera induzida e esta poderia  
218 apresentar riscos de contaminação (Merlini et al., 2014). Embora haja descrição de atividade  
219 antibacteriana com o uso do PRP (Anitua et al., 2013b), por se tratar de uma pesquisa clínica,  
220 optou-se pela inclusão do mesmo.

221 De acordo com Tanidir et al. (2010), a associação de antibiótico e PRP subconjuntival  
222 poderia retardar a cicatrização corneal, entretanto, não há relatos em sua utilização tópica. A  
223 escolha deste aminoglicosídeo de amplo espectro foi baseada no trabalho de Merlini et al.  
224 (2014) que realizaram cultura e antibiograma nos animais utilizados e preconizaram-se o uso  
225 da tobramicina para o controle de bactérias Gram positivas e Gram negativas no tratamento  
226 de ceratite ulcerativa em cães.

227 Ainda que os animais selecionados como doadores no GA estivessem bem  
228 sistemicamente, o aquecimento também pôde promover redução da carga viral e bacteriana  
229 do PRP, minimizando os riscos em sua aplicação (Anitua et al., 2013a). A utilização do  
230 aquecimento como forma de eliminação de agentes patogênicos foi inicialmente descrito por  
231 Louis Pasteur em 1864 por meio do processo de pasteurização. Do mesmo modo que esse  
232 processo também reduz o potencial imunogênico com a diminuição das proteínas do sistema  
233 complemento e IgE (Anitua et al., 2014).

234 Considerando as variáveis clínicas oftalmológicas não foram observadas diferenças  
235 significativas entre os grupos ( $p>0,05$ ) avaliados. Entretanto, diferenças estatísticas foram  
236 identificadas entre os momentos de cada tratamento, conforme demonstrado na **Tabela1**.

237

238

239 **Tabela 1.** Sinais clínicos oftalmológicos analisados segundo tratamento com PRP alogênico  
 240 aquecido (GA) ou PRP autólogo (GP) nos momentos de avaliação representados por  
 241 mediana, seguida por valor mínimo e máximo.

Variáveis	Grupo	M0	M3	M5	M10	M15	M30	
<b>Blefar.</b>	<b>GP</b>	2(2;3)B	1(0;2)B	0(0;1)A	0(0;0)A	0(0;0)A	0(0;0)A	<b>p&lt;0,01</b>
	<b>GA</b>	2(2;3)B	1(0;2)AB	0(0;1)A	0(0;0)A	0(0;0)A	0(0;0)A	<b>p&lt;0,01</b>
<b>Secreção</b>	<b>GP</b>	1(1;3)B	1(0;1)AB	0(0;1)A	0(0;0)A	0(0;0)A	0(0;0)A	<b>p&lt;0,01</b>
	<b>GA</b>	1(1;3)B	1(0;2)AB	0(0;1)A	0(0;1)A	0(0;0)A	0(0;0)A	<b>p&lt;0,01</b>
<b>Opacidade</b>	<b>GP</b>	0(0;2)A	1(1;2)AB	1(1;2)AB	1(1;2)AB	1(1;3)B	1(1;1)AB	<b>p&lt;0,05</b>
	<b>GA</b>	0(0;1)A	1(1;2)B	1(1;2)B	1(1;2)B	2(1;2)B	1(1;2)B	<b>p&lt;0,05</b>
<b>Vascular.</b>	<b>GP</b>	0(0;3)	0(0;3)	0(0;2)	0(0;2)	0(0;2)	0(0;1)	<b>p&gt;0,05</b>
	<b>GA</b>	0(0;1)	1(0;2)	1(0;3)	1(0;3)	1(0;2)	0(0;1)	<b>p&gt;0,05</b>
<b>Fotofobia</b>	<b>GP</b>	2(1;2)B	0(0;1)A	0(0;0)A	0(0;0)A	0(0;0)A	0(0;0)A	<b>p&lt;0,01</b>
	<b>GA</b>	1(1;2)B	1(0;1)AB	0(0;1)A	0(0;0)A	0(0;0)A	0(0;0)A	<b>p&lt;0,01</b>
<b>Hiperemia</b>	<b>GP</b>	3(2;3)C	2(1;3)BC	1(0;3)B	1(0;2)AB	0(0;2)AB	0(0;1)A	<b>p&lt;0,01</b>
	<b>GA</b>	3(2;3)B	2(1;3)B	1(0;2)AB	1(0;2)A	0(0;1)A	0(0;1)A	<b>p&lt;0,01</b>
<b>Quemose</b>	<b>GP</b>	0(0;1)	0(0;1)	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)	<b>p&gt;0,05</b>
	<b>GA</b>	0(0;1)	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)	<b>p&gt;0,05</b>
		<b>p&gt;0,05</b>	<b>p&gt;0,05</b>	<b>p&gt;0,05</b>	<b>p&gt;0,05</b>	<b>p&gt;0,05</b>	<b>p&gt;0,05</b>	

242 Blefar.- Blefaroespasm; Vascular.- Vascularização; M0-Momento 0; M3-3 dias; M5-5 dias; M10-10 dias;  
 243 M15-15 dias; M30-30 dias após o início do tratamento. Valores não seguidos de letras não foram significativos  
 244 no teste de Dunn. Letras maiúsculas iguais indicam ausência diferença significativa entre os momentos dentro  
 245 do mesmo grupo.  
 246  
 247

248 Em relação ao blefaroespasm e a secreção de aspecto seroso à mucoide no início do  
 249 tratamento, em ambos os grupos, os animais apresentaram melhora significativa a partir de

250 M5, com manutenção desta até o final das avaliações. Tal observação esta relacionada ao fato  
251 de que a partir do quinto dia com colírio, a maioria dos animais avaliados já possuíam  
252 cicatrização completa da úlcera, com redução significativa dos sinais clínicos relacionados  
253 com a dor como blefaroespasma e fotofobia, conforme descrito na literatura (Maggs, 2013).

254 Considerando a redução da secreção, relaciona-se também ao uso de antibioticoterapia  
255 tópica, minimizando a contaminação bacteriana local e seu potencial invasivo (Ranzani et al.,  
256 2009; Merlini et al., 2014). É importante salientar que nenhum dos animais apresentaram  
257 secreção purulenta com a evolução do tratamento.

258 Quanto à opacidade corneal, verificou-se uma tendência a apresentar-se discretamente  
259 mais favorável em relação aos momentos avaliados no GP (**tabela 1**), apesar da ausência de  
260 diferença estatística entre os grupos, conforme já relatado. Salienta-se discreta nos grupos já  
261 que o uso de PRP tende a minimizar a formação de cicatriz densa na córnea devido à  
262 presença dos fatores de crescimento que modulam o processo de reparação corneal (Alio and  
263 Arnalich-Montiel, 2012).

264 Panda et al. (2012) após o uso de PRP autólogo em úlceras químicas, também  
265 relataram opacidade no início do tratamento, entretanto, em um período de três meses, a  
266 córnea tende a reestabelecer sua transparência devido ao tempo necessário para o  
267 remodelamento estromal. Donatti et al., (2013) realizaram um experimento em coelhos e  
268 encontraram menor intensidade de opacidade corneal no período inicial no grupo em que foi  
269 utilizado PRP autólogo, além de promover uma maior epitelização corneana.

270 Gandolfi, (2016) comparou a utilização do PRP aquecido e não aquecido no  
271 tratamento de úlceras induzidas em ratos e demonstrou que ambos apresentaram menor  
272 opacidade em relação ao grupo controle, nos quais os olhos não foram submetidos a nenhum  
273 tipo de tratamento.

274 A variável fotofobia foi observada em todos os animais analisados em ambos os  
275 grupos e teve uma tendência à redução a partir do momento M3.

276 A presença de hiperemia conjuntival foi observada em todos os animais. Para o grupo  
277 GP a melhora foi progressiva até o momento M30. No grupo GA a redução da hiperemia foi  
278 significativa a partir do momento M10 e essa se manteve até o M30, apresentando remissão  
279 completa de forma mais rápida, entretanto não houve diferença entre os tratamentos.

280 Sugere-se que o aquecimento do PRP pode ter promovido a diminuição de proteínas  
281 do sistema complemento e IgE, contribuindo para minimizar a resposta inflamatória local  
282 (Anitua et al., 2014). Este comportamento vem ao encontro de que a instilação de PRP  
283 aquecido não causou qualquer irritabilidade à superfície ocular, mesmo sendo oriundo de  
284 outro animal, corroborando a Gandolfi, (2016). Na literatura há descrição de melhora da  
285 hiperemia devido à liberação dos fatores de crescimento que regulam a inflamação local por  
286 meio de quimiotaxia (Anitua et al., 2004; Alio et al., 2007; Pontes et al., 2011).

287 Não houve diferença significativa da quemose e vascularização corneal nos momentos  
288 avaliados e entre os tratamentos. A quemose também é modulada pelos mecanismos  
289 quimiotáticos dos fatores de crescimento, que ameniza a reação inflamatória (Young et al.,  
290 2011). Por mais que a córnea seja uma estrutura avascular, o PRP possui o VEGF e acaba por  
291 estimular a angiogênese aumentando a vascularização corneal (Anitua et al., 2018). Nos  
292 olhos avaliados essa vascularização, quando presente, foi superficial com presença de vasos  
293 ramificados de coloração vermelho vivo localizando-se do limbo para o terço anterior do  
294 estroma (Maggs, 2013). Pode-se notar, no entanto, que a vascularização foi pouco  
295 representativa, neste estudo, provavelmente pela rápida cicatrização das lesões corneais.

296 Na redução da lesão ( $\text{mm}^2$ ) foi verificado comportamento similar entre os dois grupos  
297 ( $p>0,05$ ) e redução significativa da lesão corneal entre o M0, M3 e M5 ( $p>0,01$ ), conforme  
298 demonstrado na **tabela 2**.

299 **Tabela 2.** Área da ceratite ulcerativa (mm<sup>2</sup>) analisadas segundo tratamento com PRP  
 300 alogênico aquecido (GA) ou PRP autólogo (GP) até o momento de reparação corneal  
 301 completa (M5), representada por mediana, seguida por valores mínimos e máximos.

Variáveis	Grupo	M0	M3	M5	
Área	GP	3,21(1,00;4,62)B	0,35(0,00;1,05)A	0,00(0,00;0,18)A	p<0,01
	GA	3,31(1,26;4,96)B	0,68(0,00;1,73)A	0,00(0,00;0,78)A	p<0,01
		p>0,05	p>0,05	p>0,05	

302 M0-Momento 0; M3-3 dias; M5-5 dias

303

304 A redução percentual média da área da lesão em M3 foi de 81,25% no GA e 90,76%  
 305 no GP. Por sua vez, em M5 a média foi de 98,14% em GA e 99,24% em GP, ao passo que em  
 306 M10 os animais avaliados não apresentavam mais úlcera, sendo esta confirmada pelo teste da  
 307 fluoresceína negativo. De acordo com Ackermann, (2017), o tempo de reepitelização da  
 308 úlcera é de aproximadamente sete a dez dias, já a reparação estromal pode chegar a até 30  
 309 dias. Desta forma, verificou-se que o uso de PRP autólogo ou alogênico aquecido promoveu  
 310 redução no tempo de reepitelização corneal.

311 Esse resultado corrobora aos achados de Anitua et al. (2014), que relataram que  
 312 embora o PRP aquecido tenha promovido diminuição na concentração de EGF, esse fato não  
 313 foi suficiente para minimizar a proliferação de células epiteliais da córnea. Isso pode ser  
 314 justificado pela presença de outros fatores de crescimento que também estimulam a atividade  
 315 mitogênica como o IGF-I, mantido após o aquecimento à 56°C, compensando a falta de  
 316 atuação do EGF (Rocha et al., 2002; Anitua et al., 2014).

317 A espessura corneal central apresentou aumento significativo a partir do momento M5  
 318 em ambos os grupos, com relação ao M0, no GP verificou-se estabilização até o M30. No  
 319 entanto no GA, houve aumento progressivamente até o M30 (**Tabela 3**).

320 **Tabela 3.** Espessura central e periférica da córnea, segundo tratamento com PRP alogênico  
 321 aquecido (GA) ou PRP autólogo (GP) nos momentos de avaliação, representada por média e  
 322 desvio padrão.

Variáveis	Grupo	M0	M5	M15	M30	
<b>Espessura</b>	<b>GP</b>	399,3(94,0)A	555,7(88,4)B	534,2(75,0)B	536,4(62,4)B	<b>p&lt;0,01</b>
<b>Central</b>	<b>GA</b>	368,8(58,2)A	475,3(71,2)B	509,3(66,0)BC	535,2(58,0)C	<b>p&lt;0,01</b>
<b>Espessura</b>	<b>GP</b>	633,5(102,1)	646,7(81,2)	621,9(82,8)	599,3(76,0)	<b>p&lt;0,01</b>
<b>Periférica</b>	<b>GA</b>	588,3(59,4)	619(55,8)	613,6(68,0)	604,3(78,1)	<b>p&lt;0,01</b>
		<b>p&gt;0,05</b>	<b>p&gt;0,05</b>	<b>p&gt;0,05</b>	<b>p&gt;0,05</b>	

323 M0-Momento 0; M5-5 dias; M15-15 dias; M30-30 dias

324

325       Esse aumento da espessura central, observado para ambos os grupos, está relacionado  
 326 com o processo de reconstituição das camadas que compõe a córnea que por sua vez aumenta  
 327 sua espessura, podendo sofrer remodelamento pela ação das colagenases e metaloproteinases  
 328 (Perches et al., 2015). De acordo com Samuelson (2013), a remoção do epitélio pode produzir  
 329 um aumento de 200% da espessura corneal em 24 horas devido à entrada de água no estroma.  
 330 Entretanto, em relação aos valores da espessura periférica não houve diferença significativa  
 331 entre os momentos e grupos.

332       Portanto, neste estudo foi possível observar que entre os grupos não houve diferenças  
 333 estatísticas e que as variáveis oftalmológicas variaram discretamente em relação aos  
 334 momentos analisados. Desta forma, os dois tratamentos foram clinicamente favoráveis e a  
 335 escolha do método fica a critério do oftalmologista.

336       Para animais de pequeno porte ou que apresentam trombocitopenia o mais viável seria  
 337 utilizar o PRP alogênico aquecido, pois seu processamento não comprometeria a sua função  
 338 hemodinâmica e concentraria um maior número de plaquetas.

339 Para a validação inequívoca de protocolos clínicos há a necessidade de se produzir  
340 mais pesquisas utilizando-se o PRP alogênico em sua forma aquecida ou não, bem como, do  
341 uso de concentrado de plaquetas xenólogo no tratamento de ceratite ulcerativa em cães,  
342 tornando-se um campo aberto para pesquisas futuras.

343

#### 344 **Conclusão**

345 Conclui-se que o PRP autólogo e alogênico aquecido em cães apresentam-se de forma  
346 equiparável quanto a sua capacidade de acelerar a reepitelização, redução da inflamação e  
347 opacidade corneal, sendo uma excelente opção no tratamento adjuvante da ceratite ulcerativa  
348 em cães. O uso do PRP alogênico aquecido promove ampla disponibilidade de aplicação  
349 clínica especialmente em cães de pequeno porte e portadores de afecções de caráter  
350 autoimune, tornando válida a instituição de um banco de PRP alogênico aquecido e  
351 criopreservado.

352

#### 353 **Agradecimentos**

354 A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo  
355 nº2017/ 13836-0, pelo apoio financeiro.

356

#### 357 **Referências Bibliográficas**

358 Ackermann, M.R., 2017. Inflammation and healing. In: Zachary, J.F. (Ed.), Pathologic Basis  
359 of Veterinary Disease. Elsevier, Illinois-USA, pp. 73-131.

360 Akbache, A., Lamiot, É., Moroni, O., Turgeon, S., Gauthier, S.F., Pouliot, Y., 2009. Use of  
361 membrane processing to concentrate TGF-  $\beta$ 2 and IGF-I from bovine milk and whey.

362 Journal of Membrane Science, 326, 435-440.

363 Aleixo, G.A. de S., Coelho, M.C. de O.C., Trajano, S.C., Andrade, L.S.S., 2017. Platelet-rich

- 364 plasma: mechanisms of action, production and indications for use - a review. *Medicina*  
365 *Veterinária (UFRPE)*, 11, 239-246.
- 366 Aleixo, G.A.S., Coelho, M.C.O.C., Teixeira, M.N., Mesquita, E.P., Oliveira, F.F., Zubieta,  
367 L.M. V, Almeida, T.L.C., Guimarães, A.L.N., Maia, F.C., Zacarias, T.F.L., Santos,  
368 S.M.L.G., Lima, C.P.S., 2011. Comparison between two protocols to obtain platelet-rich  
369 plasma in dogs. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 63, 567-573.
- 370 Alio, J.L., Rodriguez, A.E., Martinez, L.M., Rio, A.L., 2013. Autologous fibrin membrane  
371 combined with solid platelet-rich plasma in the management of perforated corneal  
372 ulcers: A pilot study. *JAMA Ophthalmology*, 131, 745-751.
- 373 Alio, J.L., Arnalich-Montiel, F., Rodriguez, A.E., 2012. The role of “eye platelet rich  
374 plasma”(E-PRP) for wound healing in ophthalmology. *Current Pharmaceutical*  
375 *Biotechnology*, 13, 1257-1265.
- 376 Alio, J.L., Abad, M., Artola, A., Rodriguez-Prats, J.L., Pastor, S., Ruiz-Colecha, J., 2007. Use  
377 of autologous platelet-rich plasma in the treatment of dormant corneal ulcers.  
378 *Ophthalmology*, 114, 1286-1293.
- 379 Anitua, E., Andia, I., Ardanza, B., Nurden, P., Nurden, A.T., 2004. Autologous platelets as a  
380 source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thrombosis and Haemostasis*, 91,  
381 4-15.
- 382 Anitua, E., Muruzabal, F., Pino, A., Merayo-Llodes, J., Orive, G., 2013a. Biological stability  
383 of plasma rich in growth factors eye drops after storage of 3 months. *Cornea*, 32, 1380-  
384 1386.
- 385 Anitua, E., Zalduendo, M.M., Alkhraisat, M.H., Orive, G., 2013b. Release kinetics of  
386 platelet-derived and plasma-derived growth factors from autologous plasma rich in  
387 growth factors. *Annals of Anatomy*, 195, 461-466.
- 388 Anitua, E., Muruzabal, F., De la Fuente, M., Merayo-Llodes, J., Orive, G., 2014. Effects of

- 389 heat-treatment on plasma rich in growth factors-derived autologous eye drop.  
390 Experimental Eye Research, 119, 27-34.
- 391 Anitua, E., Prado, R., Nurden, A.T., Nurden, P., 2018. Characterization of plasma rich in  
392 growth factors (PRGF): components and formulations. In: Anitua, E., Cugat, R.,  
393 Sánchez, M. (Eds.), Platelet Rich Plasma in Orthopaedics and Sports Medicine. Springer  
394 International Publishing, Vitoria Gasteiz-Spain, pp. 29-45.
- 395 Donatti, C., Brandão, C.V.S., Ranzani, J.J.T., Perches, C.S., Padovani, C.H., Pellizzon, C.H.,  
396 Sereno, M.G., 2013. Use of platelet-rich plasma in the treatment of deep corneal ulcers  
397 induced in rabbits. Clinical and histomorphometric evaluation. Arquivo Brasileiro de  
398 Medicina Veterinária e Zootecnia, 65, 809-818.
- 399 Gandolfi, M.G., 2016. Allogenic Platelet-Rich Plasma In Induced Ulcers In Rats Cornea.  
400 Master Thesis (Veterinary Ophthalmology), Universidade Estadual Paulista Júlio de  
401 Mesquita Filho, Botucatu-SP.
- 402 Garbett, N.C., Miller, J.J., Jenson, A.B., Chaires, J.B., 2008. Calorimetry outside the box : a  
403 new window into the plasma proteome. Biophysical Journal, 94, 1377-1383.
- 404 Gum, G.G., Mackay, E.O., 2013. Physiology of the eye. In: Gelatt, K.N. (Ed.), Veterinary  
405 Ophthalmology. Wiley-Blackwell, University of Florida, USA, pp. 171-207.
- 406 Johnson, R.A., Wichern, D.W, 2007. The Bonferroni Method of Multiple Comparisons. In:  
407 Johnson, R.A., Wichern, D.W (Eds.), Applied Multivariate Statistical Analysis. Pearson  
408 Prentice Hall, New Jersey, pp. 232-233.
- 409 Kabiri, A., Esfandiari, E., Esmaeili, A., Hashemibeni, B., Pourazar, A., Mardani, M., 2014.  
410 Platelet-rich plasma application in chondrogenesis. Advanced Biomededical Research.  
411 3, 138.
- 412 Kim, K.M., Shin, Y.T., Kim, H.K., 2012. Effect of autologous platelet-rich plasma on  
413 persistent corneal epithelial defect after infectious keratitis. Japanese Journal

- 414 of Ophthalmology, 56, 544-550.
- 415 Maggs, D.J., 2013. Cornea and sclera. In: Maggs, D.J., Miller, P.E., Ofri, R. (Eds.), Slatter's  
416 Fundamentals of Veterinary Ophthalmology. Elsevier, pp. 184-219.
- 417 Marx, R.E., 2004. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. Journal of Oral and  
418 Maxillofacial Surgery, 62, 489-496.
- 419 Merlini, N.B., Fonzar, J.F., Perches, C.S., Sereno, M.G., Souza, V.L., Estanislau, C.A.,  
420 Rodas, N.R., Ranzani, J.J.T., Maia, L., Padovani, C.R., Brandão, C.V.S., 2014. Use of  
421 platelet rich plasma on corneal ulcers in dogs. Arquivo Brasileiro de Medicina  
422 Veterinária e Zootecnia, 66, 1742-1750.
- 423 Miller, M.A., Collier, R.J., Torkelson, A.R., White, T.C., Madsen, K.S., Eppard, P.J., Vicini,  
424 J.L., Lanza, G.M, 1991. Factors Affecting Insulin-Like Growth Factor-I Concentration  
425 in Bovine Milk. Journal of Dairy Science, 74, 2905-2911.
- 426 Moreira, M.V.L., Teixeira Neto, R.L.A.L., Langohr, I.M., Ecco, R., 2018. Prospective study  
427 of ocular and periocular diseases in animals: 188 cases. Pesquisa Veterinária Brasileira,  
428 38, 502-510.
- 429 Panda, A., Jain, M., Vanathi, M., Velpandian, T., Khokhar, S., Dada, T., 2012. Topical  
430 autologous platelet-rich plasma eyedrops for acute corneal chemical injury. Cornea 31,  
431 989-993.
- 432 Perches, C.S., Pellizzon, C.H., Ranzani, J.J.T., Donatti, C., Padovani, C.R., Merlini, N.B.,  
433 Fonzar, J.F., Beserra, H.E.O., Rocha, N.S., Brandão, C.V.S., 2015. Expression of matrix  
434 metalloproteinases and PCNA in deep corneal ulcers induced in rabbits, treated with  
435 platelet-rich plasma. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 67, 1607-  
436 1615.
- 437 Pontes, K.C.S., Borges, A.P.B., Eleotério, R.B., Favarato, L.S.C., Duarte, T.S., 2011. Repair  
438 process of corneal damage and the amniotic membrane in ophthalmology. Ciência Rural

- 439 41, 2120-2127.
- 440 Ranzani, J.J.T., Brandão, C.V.S., Cremonini, D.N., Mobicci, L.A.L., Rodrigues, G.N., 2009.
- 441 Terapia em Oftalmologia. In: Laus, J.L (Ed.), *Oftalmologia Clínica e Cirúrgica em Cães*
- 442 *e Gatos*. Rocca, pp. 12–32.
- 443 Rocha, E.M., Cunha, D.A., Carneiro, E.M., Boschero, A.C., Saad, M.J.A., Velloso, L.A.,
- 444 2002. Identification of insulin in the tear film and insulin receptor and IGF-I receptor on
- 445 the human ocular surface. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43, 963-967.
- 446 Samuelson, D. A., 2013. *Ophthalmic Anatomy*. In: Gelatt, K.N. (Ed.), *Veterinary*
- 447 *Ophthalmology*. Wiley-Blackwell, University of Florida, USA, pp. 39-170
- 448 Sanchez-Avila, R.M., Merayo-Lloves, J., Riestra, A.C., Berisa, S., Lisa, C., Sánchez, J.A.,
- 449 Muruzabal, F., Orive, G., Anitua, E., 2018. Plasma rich in growth factors membrane as
- 450 coadjuvant treatment in the surgery of ocular surface disorders. *Medicine*, 97, 1–10.
- 451 Singh, V., Barbosa, F.L., Torricelli, A.A.M., Santhiago, M.R., Wilson, S.E., 2014.
- 452 Transforming growth factor  $\beta$  and platelet-derived growth factor modulation of
- 453 myofibroblast development from corneal fibroblasts *in vitro*. *Experimental Eye*
- 454 *Research*, 120, 152–160.
- 455 Tanidir, S.T., Yuksel, N., Altintas, O., Yildiz, D.K., Sener, E., Caglar, Y., 2010. The effect of
- 456 subconjunctival platelet-rich plasma on corneal epithelial wound healing. *Cornea* 29,
- 457 664–669.
- 458 Yu, F.S.X., Yin, J., Xu, K., Huang, J., 2010. Growth factors and corneal epithelial wound
- 459 healing. *Brain Research Bulletin*, 81, 229–235.
- 460 Young, A., Mcnaught, C.E., 2011. The physiology of wound healing. *Surgery Oxford*, 29,
- 461 475-479.
- 462 Zar, J.H., 2009. *Biostatistical analysis*. Pearson Prentice Hall, New Jersey, pp. 232-233.
- 463