

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**Uso de membrana de fibrina rica em plaquetas e
leucócitos (L-PRF) em úlceras de córnea
profundas induzidas em coelhos**

Inajara Nakamura Hirota

Botucatu – SP

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**Uso de membrana de fibrina rica em plaquetas e
leucócitos (L-PRF) em úlceras de córnea
profundas induzidas em coelhos**

Inajara Nakamura Hirota

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Animais Selvagens para obtenção do título de doutor.

Orientadora: Profa. Assoc. Cláudia Valéria Seullner Brandão

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

Hirota, Inajara Nakamura.

Uso de membrana de fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) em úlceras de córnea profundas induzidas em coelhos / Inajara Nakamura Hirota. - Botucatu, 2021

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

Orientador: Cláudia Valéria Seullner Brandão
Capes: 50501003

1. Coelhos - Doenças. 2. Fibrina rica em plaquetas. 3. Córnea - Cirurgia. 4. Leucócitos. 5. úlceras.

Palavras-chave: Cicatrização corneal; Histomorfometria; PRF.

Nome do autor: Inajara Nakamura Hirota

TÍTULO: Uso de membrana de fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) em úlceras de córnea profundas induzidas em coelhos

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Valéria Seullner Brandão

Presidente e Orientadora

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

FMVZ – UNESP – BOTUCATU

Prof^ª.Dr^ª. Sheila Canevese Rahal

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

FMVZ – UNESP – BOTUCATU

Prof. Ass. Cláudia Helena Pellizon

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional

IBB – UNESP – BOTUCATU

MV. Dra. Cintia Sesso Perches

MÉDICA VETERINÁRIA AUTÔNOMA

MV. Dr. Eduardo Perlmann

MÉDICO VETERINÁRIO AUTÔNOMO

Data da Defesa:25-02-2021

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por nunca me abandonar, mesmo nos momentos mais difíceis que por muitas vezes vencida pelo cansaço e por problemas do dia a dia, não me deixou desistir dos meus objetivos.

A minha orientadora do Mestrado e do Doutorado, Prof. Dra. Cláudia Valéria Seullner Brandão, que não me conhecia antes do mestrado, mas mesmo assim me deu a oportunidade de estar nessa equipe e sempre me incentivou, me apoiou nas minhas loucuras e ainda por ser uma mãezona e ser super compreensiva nos meus momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. José Joaquim Tilton Ranzani e a Prof. Dra. Sheila Canevese Rahal pela oportunidade de conhecê-los e trabalhar em alguns projetos com vocês, minha gratidão por todos os ensinamentos e experiências compartilhadas.

A Carolina Hagy Giroto e Santiago Garcia Vallarino pela amizade e pelo apoio no projeto na parte das anestésias e contenções dos animais.

A equipe de oftalmovet de Botucatu que prontamente me ajudaram nos projetos e pela parceria de todos esses anos: Lenise Gonçalves Garbelotti, Annalú Pinton Ferreira, Letícia de Andrade Ramos, Natalie Bertelis Merlini, Micaella Gordon Gandolfi, Luís Felipe Reiter, Mayara Chagas, Caroline Geraldí, Juliana Bardella e em especial a Mariana de Sessa, que além de fazer parte desta equipe é uma das primeiras pessoas em que fiz amizade em Botucatu e que me incentiva e me ajuda com toda disposição.

À minha família que sempre esteve ao meu lado, me dando suporte financeiro e emocional para continuar essa caminhada de conquistas, em especial aos meus pais (Roberto Hajime Hirota e Márcia Nakamura Hirota) que me deram a vida, e sempre me ensinaram que o nosso estudo ninguém tira, é uma conquista por mérito. Além disso, foram compreensíveis nos momentos de ausência, enquanto realizava minhas atividades. As minhas melhores amigas, que Deus me deu como irmãs, Nayara Nakamura Hirota e Liara Nakamura Hirota, que sempre me incentivaram na parte profissional e sempre estiveram ao

meu lado na parte pessoal, e em especial ao meu pacotinho de amor Pedro Akira Santos Hirota, meu sobrinho e meu amor incondicional.

Ao meu noivo Victor Siniciato Katayama, pela paciência, amor, dedicação e incentivo para que eu sempre continuasse estudando, e ainda literalmente me ajudando na parte dos projetos, indo a Botucatu comigo em meio a crise e pandemia do corona vírus, por carregar cada coelho do projeto mesmo não gostando do cheiro deles, e na minha ausência cuidou com muito amor e carinhos dos nossos filhotes de pelo (Amora, Pitanga, Yuri, Gohan e Didi que hoje já não esta conosco).

Vó Vera, uma vó que ganhei, e que sempre me mimou, e me deu amor de vó!

Ao tio Celso Nakamura, que sempre me apoiou nas minhas escolhas e decisões, me ajudou na época mais difícil da minha vida, me deu suporte emocional, e foi meu mentor de vida, meu segundo pai, obrigada por tudo!

À Tia Yassuko Hosoume, minha referência e inspiração de pesquisadora e no meio acadêmico, e mesmo de longe sempre vibrou e me apoiou nas minhas conquistas. Além de ser um exemplo de mulher independente e batalhadora.

As minhas primas queridas, Camila Leiko Nakamura e Nathaly Hirota Castanho por sempre me socorrerem, obrigada por tudo meninas!

A minha querida psicóloga Liane Leonel por me salvar e me orientar durante todo esse processo, sempre torcendo por mim.

Aos meus amigos que fazem parte de minha família e que eu amo tanto, que me dão suporte emocional e que estão sempre presentes: Lais Lucas Fernandes (minha Frien querida, que me ajudou e deu suporte principal para o desenvolvimento desse trabalho, além de me socorrer em todos os momentos da minha vida, sem ela esse trabalho não existiria), Josiane Batista, Rodrigo Chihara, Gabriel Chihara (por serem minha família de Botucatu e por me fazer gostar dessa cidade). Aos meus pais postiços Tia Marli e Tio Pedro. Tatiana Rosa Fernandes minha companheira de residência e de vida. Thainan Lima Teixeira por continuar sendo minha mentora e amiga desde o final da residência. A Úrsula Chaves Guberman que foi um dos melhores presentes que a oftalmovet

me deu, e que continua mesmo a distância sendo minha amiga e sempre me motiva a ser uma pessoa melhor.

Ao Dr Paulo do Biotério que prontamente nos ajudou no projeto, nos deu dica de manejo e contenção, além da marcação dos animais.

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

Aos locais de onde trabalho e aos meus pacientes, pela compreensão dos meus horários ausentes e pela correria.

À empresa Vision Line, representada pelo Sr Gilberto que prontamente nos ajudou com a doação dos trépanos a vácuo.

Aos meus pacientes da unesp, aos animais do meu projeto minha eterna gratidão pelo aprendizado.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível superior do Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Sumário

LISTA DE TABELAS.....	II
Resumo.....	IV
Abstract.....	V
1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	2
2 TRABALHO CIENTÍFICO.....	5
3 REFERÊNCIAS.....	25
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	38
5 REFERÊNCIAS	43
6 APÊNDICE.....	50

Lista de Tabelas

Tabela 1. Avaliação clínica oftalmológica nos coelhos dos grupos membrana (GM) e grupo controle (GC), nos diferentes momentos (M0, M1, M4, M7, M30 dias) de avaliação.	16
Tabela 2 Avaliações histomorfométricas da espessura do estroma, média e desvio padrão, de córneas de coelhos, nos grupos tratados com membrana de L-PRF e sem membrana (controle).....	18
Tabela 3 Avaliações histomorfométricas da espessura do epitélio, média e desvio padrão, de córneas de coelhos, nos grupos tratados com membrana de L-PRF e sem membrana (controle).....	18
Tabela 4 - Comparação da relação entre fibrina e células (leucócitos e hemácias) nas membranas de L-PRF nas regiões inferior e superior.....	20

HIROTA, I. N. Uso de membrana de fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) em úlceras de córneas profundas induzidas em coelhos. Botucatu, 2020. 52p. Tese (Doutorado em Animais Selvagens – Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A Fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) é um subproduto sanguíneo que se caracteriza por possuir fatores de crescimento, atuar na cicatrização tecidual, e ser de fácil obtenção. Objetivou-se verificar a composição da L-PRF e sua atuação na cicatrização da córnea de coelhos, e a histomorfometria da membrana de L-PRF e da córnea. Foram utilizados 30 coelhos, adultos, sadios, todos submetidos à indução de úlcera profunda de córnea, distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais, Grupo controle (n=14) e Grupo membrana de PRF (n=15), neste foi instituído tratamento com membrana de L-PRF suturada à córnea. Os animais foram avaliados em diferentes dias do pós-cirúrgico (M1, M4, M7 e M30), e avaliados clinicamente quanto a hiperemia conjuntival, opacidade, vascularização, blefaroespasma, teste de fluoresceína, e tempo de absorção da membrana. Os resultados clínicos apresentaram-se favoráveis, com presença de vascularização e opacidade leve no grupo L-PRF; na histomorfometria no M30, verificou-se alteração significativa com menor espessura significativa do epitélio e estroma no grupo membrana, comparado ao controle, na borda da úlcera e centro; entretanto, considerando os vasos da córnea, os resultados foram similares nos dois grupos experimentais. A membrana de L-PRF do coelho é constituída basicamente por fibrina e apresenta significativa presença da camada leucocitária em sua extremidade inferior. A utilização da membrana de L-PRF promove a cicatrização e é viável, promove cicatrização da córnea e vascularização leve em úlceras de córnea profunda em coelhos. Adicionalmente, pode ser suturada no leito da úlcera, como uma alternativa para tratamento de afecções na superfície ocular, e caracteriza-se por ser de rápida obtenção, devido ser possível ser preparada no ato cirúrgico e baixo custo.

Palavras-chave: cicatrização corneal, PRF, histomorfometria

HIROTA, I. N. Use of fibrin membrane rich in platelets and leukocytes (L-PRF) in induced deep corneal ulcers in rabbits. Botucatu, 2020. 52p. Thesis (Doctorate in Wild Animals - Surgery) - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu Campus, Universidade Estadual Paulista.

SUMMARY

Platelet and leukocyte-rich fibrin (L-PRF) is a blood by-product that is characterized by having growth factors, acting on tissue healing, and being easily obtained. The objective was to verify the composition of L-PRF and its performance in the healing of cornea, as well as in the transparency, vascularization and histomorphometry of the L-PRF membrane and the cornea. Thirty healthy adult rabbits were subjected to induction of deep corneal ulcer, randomly distributed in two experimental groups, Control Group (n = 14) and PRF Membrane Group (n = 15), in which treatment with L membrane was instituted. - PRF fixed to the cornea. The animals were evaluated on different days after surgery (M1, M4, M7 and M30), and the clinical evaluation criteria were: conjunctival hyperemia, opacity, vascularization, blepharospasm, fluorescein test, intraocular pressure and absorption time of the membrane. The clinical results were favorable, with the presence of vascularization and slight opacity: histomorphometry showed statistical difference when comparing the measurements of stroma thickness between the groups GM and CG of the border ($p < 0.0001$) and the injury of the two groups ($p = 0.0006$), regarding the evaluation of the corneal vessels, there was no statistical difference in the comparison of the two groups and a low variation. It is concluded that the use of the PRF membrane is feasible and promotes corneal transparency and mild vascularization in deep corneal ulcers in rabbits. In addition, it can be sutured in the wound bed, making it an alternative for treating disorders on the ocular surface, being quick to obtain and low cost.

Keywords: corneal healing, PRF, histomorphometry

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Ao considerar os variados tipos de desafios oftálmicos em animais de companhia, ou os selvagens que vem crescendo substancialmente na rotina da medicina veterinária, deve-se levar em considerações alternativas de fácil obtenção e com custo acessível. As úlceras de córnea são comumente diagnosticadas na rotina da clínica oftalmológica veterinária e ocorrem devido ao trauma no epitélio corneal e consequente exposição estromal ¹. Quando acometem mais de 50% da espessura total, são necessários procedimentos de emergência que visam à manutenção da integridade e funcionalidade da córnea, estrutura avascular e transparente ². Geralmente, este tipo de tratamento tem custo elevado, seja pela obtenção ou disponibilidade de materiais no mercado ³⁻⁶. Dessa forma, novas alternativas são estudadas para tornar o procedimento mais viável e amplamente disponível, objetivando manter a integridade ocular e transparência da córnea. A seleção da técnica cirúrgica e da anatomia do animal a ser estudado são desafiadores, tanto pela questão financeira quanto funcional ⁷.

O coelho (*Oryctolagus cuniculus*) é um importante modelo experimental utilizado, pois apresenta um processo cicatricial corneal consideravelmente rápido e permite a avaliação da neovascularização, mecanismo geralmente associado a úlceras de córnea profundas cicatrizadas ^{2,8}. A utilização do modelo experimental é muito importante, pois promove um melhor entendimento dos mecanismos ⁷.

A medicina regenerativa e os diversos materiais que podem ser obtidos por meio dos componentes sanguíneos, providos de grande concentração de fibrinogênio e/ou fatores de crescimento e que auxiliam na cicatrização tecidual têm se destacado ⁹.

A fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) é considerada um importante material biológico, pois possui características que auxiliam na cicatrização e controle da inflamação, cujo processo de preparo é simples e sem necessidade de aditivos, utilizada tanto na forma de coágulo como de membrana

¹⁰. Essa membrana é absorvível, flexível e elástica, e apresenta resistência para ser suturada no leito da ferida ^{11,12}.

Existem várias opções de tratamentos que auxiliam na cicatrização corneal, porém o custo elevado, o difícil acesso para uso veterinário e a opacidade intensa no local da lesão tornam-se limitantes. Na medicina humana, há um estudo piloto que utilizou a membrana de PRF associado ao coágulo de plasma rico em plaquetas em casos de perfuração ocular, com resultados favoráveis ¹³. Do conhecimento dos autores, em animais não há estudos com esse material biológico para auxiliar no tratamento de úlceras de córnea.

Sendo assim, de maneira geral, o estudo visou verificar se a membrana de fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) auxilia na cicatrização corneal, por meio da avaliação clínica oftalmológica e seus efeitos na transparência, vascularização, e análise histomorfométrica da reparação das úlceras profundas induzidas em coelhos.

TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista (*Cornea*).

Normas disponíveis em:
(<https://journals.lww.com/corneajrnl/layouts/15/1033/oaks.journals/information/orauthors.aspx>)

Uso de membrana de fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) em úlceras de córneas profundas induzidas em coelhos

RESUMO

A Fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) é um subproduto sanguíneo que se caracteriza por possuir fatores de crescimento, atuar na cicatrização tecidual, e ser de fácil obtenção. Objetivou-se verificar a composição da L-PRF e sua atuação na cicatrização da córnea de coelhos, e a histomorfometria da membrana de L-PRF e da córnea. Foram utilizados 30 coelhos, adultos, sadios, todos submetidos à indução de úlcera profunda de córnea, distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais, Grupo controle (n=14) e Grupo membrana de PRF (n=15), neste foi instituído tratamento com membrana de L-PRF suturada à córnea. Os animais foram avaliados em diferentes dias do pós-cirúrgico (M1, M4, M7 e M30), e avaliados clinicamente quanto a hiperemia conjuntival, opacidade, vascularização, blefaroespasma, teste de fluoresceína, e tempo de absorção da membrana. Os resultados clínicos apresentaram-se favoráveis, com presença de vascularização e opacidade leve no grupo L-PRF; na histomorfometria no M30, verificou-se alteração significativa com menor espessura significativa do epitélio e estroma no grupo membrana, comparado ao controle, na borda da úlcera e centro; entretanto, considerando os vasos da córnea, os resultados foram similares nos dois grupos experimentais. A membrana de L-PRF do coelho é constituída basicamente por fibrina e apresenta significativa presença da camada leucocitária em sua extremidade inferior. A utilização da membrana de L-PRF promove a cicatrização e é viável, promove cicatrização da córnea e vascularização leve em úlceras de córnea profunda em coelhos. Adicionalmente, pode ser suturada no leito da úlcera, como uma alternativa para tratamento de afecções na superfície ocular, e caracteriza-se por ser de rápida obtenção, devido ser possível ser preparada no ato cirúrgico e baixo custo.

Palavras-chave: cicatrização corneal, PRF, histomorfometria

HIROTA, I. N. Use of fibrin membrane rich in platelets and leukocytes (L-PRF) in induced deep corneal ulcers in rabbits

SUMMARY

Platelet and leukocyte-rich fibrin (L-PRF) is a blood by-product that is characterized by having growth factors, acting on tissue healing, and being easily obtained. The objective was to verify the composition of L-PRF and its performance in the healing of cornea, as well as in the transparency, vascularization and histomorphometry of the L-PRF membrane and the cornea. Thirty healthy adult rabbits were used, all subjected to the induction of deep corneal ulcer, randomly distributed in two experimental groups, Control Group (n = 14) and PRF Membrane Group (n = 15), in which membrane treatment was instituted L-PRF attached to the cornea. The animals were evaluated on different days after surgery (M1, M4, M7 and M30), and the criteria for ophthalmic clinical evaluation were: conjunctival hyperemia, opacity, vascularization, blepharospasm, fluorescein test, intraocular pressure and time of absorption of membrane. The clinical results were favorable, with the presence of vascularity and mild opacity in the L-PRF group; on M30 histomorphometry, there was a significant change in stroma thickness between the membrane and control group at the ulcer border ($P < 0.0001$) and center ($P = 0.0006$). However, considering the corneal vessels, the results were similar in both experimental groups. It is concluded that the use of the L-PRF membrane is feasible and promotes corneal transparency and mild vascularization in deep corneal ulcers in rabbits. In addition, it can be sutured in the ulcer bed, as an alternative for the treatment of conditions on the ocular surface, and it is characterized by being quick to obtain and low cost.

Keywords: corneal healing, PRF, histomorphometry

Introdução

As úlceras de córnea são comumente diagnosticadas na rotina da clínica oftalmológica veterinária e ocorrem devido ao trauma no epitélio corneal e consequente exposição estromal ¹. Quando acometem mais de 50% da espessura total, são necessários procedimentos de emergência que visam à manutenção da integridade e funcionalidade da córnea, estrutura avascular e transparente ². Geralmente, este tipo de tratamento tem custo elevado, seja pela obtenção ou disponibilidade de materiais no mercado ³⁻⁶. Dessa forma, novas alternativas são estudadas para tornar mais viável e amplamente disponível, objetivando manter a integridade ocular e transparência da córnea. A seleção da técnica cirúrgica e da anatomia do animal a ser estudado são desafios, tanto pela questão financeira quanto funcional ⁷.

Novas pesquisas relacionadas com medicina regenerativa e os diversos materiais que podem ser obtidos por meio dos componentes sanguíneos, providos de grande concentração de fibrinogênio e/ou fatores de crescimento e que auxiliam na cicatrização tecidual têm se destacado ^{9,14}. A fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) é considerada um importante material biológico, pois auxilia na cicatrização e controle da inflamação, cujo preparo é simples e sem necessidade de aditivos, utilizada tanto na forma de coágulo como de membrana ¹⁰. Essa membrana é absorvível, flexível e elástica, e apresenta resistência para ser suturada no leito da ferida ^{11,12}.

É um biomaterial obtido por meio da coleta de sangue sem a adição de anticoagulantes e centrifugação imediata ¹⁵. O processo de coagulação inicia durante a centrifugação, e resulta em três partes no tubo, uma a base de glóbulos vermelhos na parte inferior, plasma acelular como um sobrenadante (plasma pobre em plaquetas), e o coágulo de PRF no meio. Este último, rico em fibrina, plaquetas e leucócitos ¹⁶.

O PRF pode ou não conter leucócitos, sendo denominados respectivamente, L-PRF e fibrina rica em plaquetas pura (P-PRF). Independente do PRF, a ativação das plaquetas sem a adição de substâncias ativadoras, tem por finalidade a obtenção de fibrina forte ¹⁵.

Trata-se de uma nova geração de concentrados de plaquetas, rico em fatores de crescimento, e, diferentemente de outras técnicas, não necessita de

manipulação bioquímica do sangue, e é formado pelo processo de coagulação natural ¹⁷. Atua intensificando a resposta regenerativa das células do próprio paciente ^{10,18}.

O PRF possui várias citocinas: fator de crescimento transformador β (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento insulina (IGF-1), fator de crescimento de fibroblastos (EGF) e fator de crescimento epidermal (EGE), que resultam na modulação da inflamação e aceleração do processo cicatricial ¹⁹. Atua como uma membrana absorvível, com característica flexível e, elástica, resistente e com capacidade de ser suturada no leito da ferida ^{11,12}.

Sua aplicabilidade clínica é extensa, e iniciou-se na odontologia na França ^{13,20-22}. Choukroun et al. (2006a) descreveram atuação na cicatrização: angiogênese, controle imunológico, aproveitamento de células-tronco circulantes e recobrimento da ferida por epitélio, auxiliando o processo cicatricial, assim como relatado por Khiste; Naik Tari (2013).

Apresenta vantagens como: suporte mecânico de proteção à lesão, estímulo da migração celular necessário para neovascularização e sobrevivência do enxerto, além da presença de leucócitos e citocinas capazes de promover a autorregulação do processo infeccioso e inflamatório ¹¹. O método oferece uma opção terapêutica interessante, considerando a eficiência, o baixo custo e a segurança do uso de tal “coágulo sanguíneo otimizado” autólogo ¹⁶. Inúmeros trabalhos descrevem sua aplicação com resultados favoráveis como nas áreas de cirurgia plástica, ortopedia, oftalmologia, dentre outros ^{13,21,22}.

Ressalta-se que apesar das várias opções de tratamentos que auxiliam na cicatrização corneal, de modo geral apresentam custo elevado, difícil acesso para uso médico veterinário e a algumas técnicas resultam em opacidade intensa no local da lesão. Na medicina humana, há um estudo piloto que utiliza a membrana de PRF associado ao coágulo de plasma rico em plaquetas em casos de perfuração ocular, com resultados favoráveis ¹³. Do conhecimento dos autores, em animais, não há publicações na literatura com esse material biológico para auxiliar no tratamento de úlceras de córnea.

O objetivo do trabalho foi descrever a histologia da membrana de fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) e sua atuação na cicatrização corneal, por meio da avaliação clínica oftalmológica e seus efeitos na transparência,

vascularização, e análise histomorfometria em úlceras profundas induzidas em coelhos.

Materiais e Métodos

Animais e ambiente de experimentação

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Botucatu, segundo o protocolo nº 158/2018-CEEA. O trabalho seguiu as normativas de procedimentos da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO).

Os animais foram provenientes do Biotério central da UNESP – Campus Botucatu/SP, com idade média de 60 dias. Foram mantidos em gaiolas individuais, em um espaço específico para seu manejo, com ventilação adequada, com água potável e ração comercial *ad libitum*.

Animais e Grupos experimentais

Foram utilizados 30 animais da espécie leporina (*Oryctolagus cuniculus*), da raça Norfolk, machos e fêmeas, com idade média de 2 anos e peso médio de 4.4Kg. Após ao exame físico, hemograma completo e exame oftalmológico, foram selecionados coelhos saudáveis e sem alterações oftalmológicas.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais, constituídos de 15 animais em cada, denominados Grupo controle (GC) e Grupo membrana de L-PRF (GM), de acordo com o tratamento realizado após a indução da úlcera cirúrgica.

Coleta de sangue e Preparo da membrana de PRF

Todos os animais foram sedados com cetamina (20 mg/kg/IM, Dopalen®), midazolam (1 mg/kg/IM, Dormonid®), e morfina (1 mg/kg/IM, Dimorf®). Após 15 minutos, os mesmos foram preparados para o procedimento, realizado a tricotomia e canulação da veia auricular com cateter 24G. Em seguida, foi coletado 2 ml de sangue da veia jugular, utilizando-se agulha 20X5,5 e seringa de 3ml, de cada animal do GM para preparação da membrana de fibrina rica em plaquetas e leucócitos.

Com a equipe devidamente paramentada, considerando aspectos de assepsia e antisepsia, o sangue foi transferido para tubo de vidro seco estéril, e centrifugado imediatamente após a coleta a 3000 rpm por 10 minutos. Ao retirar-se o tubo da centrífuga, observou-se a formação de um gel no interior do tubo, que foi recuperado delicadamente com o auxílio de uma pinça. Em seguida o coágulo foi colocado sobre uma gaze estéril, e com uma espátula pertencente ao kit com caixa metálica para confecção de L-PRF, a parte vermelha foi gentilmente removida. Este foi pressionado levemente com tripla camada de gaze úmida com solução fisiológica 0,9% estéril. Foi transferido para caixa metálica específica e novamente submetido a leve compressão com o auxílio do tambor metálico durante poucos segundos, resultando no desenvolvimento de membrana fina, opaca e de tamanho necessário para o recobrimento de toda da úlcera, no GM.

Para a avaliação histológica da membrana, foram sorteados aleatoriamente dez coelhos considerando o sexo, sendo 5 machos e 5 fêmeas, estes foram submetidos a coleta de mais uma amostra de sangue contendo 2ml, pela veia safena, e confeccionadas segundo o protocolo acima descrito.

Procedimento cirúrgico e pós-operatório

Todos os coelhos foram anestesiados e mantidos com isoflurano (Cristália®), via máscara, com concentração alveolar mínima de 1,4 vol%, associado a anestesia tópica a base de colírio de cloridrato de proximetacaína 0,5% (Anestalcon®). Foi feita a tricotomia das pálpebras do olho esquerdo e, após a antisepsia, utilizando-se solução de polivinilpirrrolidona (PVPI 1:50), os panos cirúrgicos adesivados estéreis foram posicionados e as pálpebras fixadas mecanicamente com o blefarostato Barraquer infantil. Para a realização da úlcera de córnea cirúrgica, o olho esquerdo foi posicionado sob o microscópio cirúrgico, e feito o bloqueio da cápsula de tenon para centralização da córnea, com lidocaína (0.3ml), após isso, com um trépano a vácuo (Surgistar vacuum trephine – SurgistarTM) foram padronizadas as úlceras de córnea centrais com 7,25mm de diâmetro e 313µm de profundidade. Utilizando-se um bisturi crescente, a córnea foi delaminada cuidadosamente. No GC, o procedimento foi realizado até essa etapa, sendo que no GM, ato contínuo, a membrana de L-PRF foi fixada sobre a lesão na córnea em pontos simples separados, com náilon

10-0. A membrana foi posicionada de forma em que a parte celular, que vamos nominar parte inferior da membrana onde encontramos a camada leucocitária, ficasse posicionada sempre para a região temporal do olho do animal. E a parte sem células, designada parte superior da membrana posicionada no canto medial do olho do coelho.

Após o procedimento cirúrgico, os coelhos foram identificados e mantidos em gaiolas individuais com água potável e ração comercial *ad libitum*. No pós-cirúrgico imediato e após 24 horas, foi administrado em todos os animais, o antiinflamatório à base de meloxicam (0,5mg/kg/IM) (Maxicam® injetável 2% - Ourofino), além de morfina (2 mg/Kg/IM), quando necessário, visando maximizar o conforto pós-operatório. Adicionalmente, os coelhos foram tratados topicamente com colírio a base de tobramicina 0,3% (Tobracin® – Latinofarma), quatro vezes ao dia, durante 10 dias. No décimo dia foi realizada a retirada dos pontos (GM), para isso, os animais foram contidos de forma física e submetidos a anestesia tópica a base de colírio de cloridrato de proximetacaína 0,5% (Anestalcon®). Na região ocular foram feitas limpezas sempre que necessárias com solução fisiológica a 0,9%.

Momentos e Avaliação oftalmológica

Os coelhos foram avaliados em cinco momentos, designados M0, antes do procedimento cirúrgico; M1- um dia após o procedimento cirúrgico, M4 – após quatro dias do procedimento, M7- após sete dias do procedimento e M30- trinta dias, após a cirurgia.

Os exames oftalmológicos foram realizados apenas com contenção física. Foi realizada a biomicroscopia com lâmpada de fenda (Kowa SL-15®, Kowa Optimed, Inc., Torrance, Califórnia) para avaliação minuciosa das estruturas e dos reflexos pupilares. A avaliação da porção aquosa do filme lacrimal foi feita com o teste de Schirmer (Teste de Schirmer Ophthalmos®), no qual a tira milimetrada foi inserida e posicionada na parte média da pálpebra inferior, permanecendo por um minuto no saco conjuntival. Em seguida, foi realizado o teste de fluoresceína 1% (Ophthalmos®) para avaliação da integridade do epitélio corneal. A tonometria (Tonovet Plus® - Icare) foi realizada para avaliação da pressão intraocular. Foram feitas cinco mensurações consecutivas do mesmo

olho e depois realizado a média dos valores para obtenção do valor final. No M1 foi excluído o teste de fluoresceína, bem como no M4 e M7 o teste de Schirmer, este foi realizado novamente no M30.

Os critérios de avaliação clínica foram qualificados considerando os escores para hiperemia, opacidade e vascularização como: ausente (0), leve (1), moderada (2) e intensa (3), blefaroespasma ausente (1) ou presente (2) e teste de fluoresceína negativo (1) ou positivo (2). No GM, foi avaliada a absorção da membrana nos momentos descritos e foram classificados como: leve (1), quando na avaliação com a lâmpada de fenda foi possível observar que formava um relevo, moderada (2) no momento em que já formava um degrau nas bordas das úlceras, mas ainda havia a presença de membranas na superfície da mesma e total (3), ausência total de membrana na superfície da lesão. Todas as análises foram realizadas por um único avaliador.

Histomorfometria da Córnea

No período final de avaliação (M30), todos os animais foram sedados utilizando-se o mesmo protocolo descrito para a coleta de sangue; ato contínuo foram eutanasiados utilizando-se tiopental (20mg/kg/IV) associado a cloreto de potássio 19,1% (2ml/kg/IV). A seguir, os coelhos foram submetidos à enucleação do olho esquerdo operado. Os olhos foram fixados em formaldeído tamponado a 10%. Após 72 horas, as córneas foram isoladas e transferidas para álcool 70% e submetidas ao processamento histológico de rotina, incluídos na parafina e realizado cortes de 4 micrômetros. As lâminas foram coradas pelos métodos de hematoxilina/eosina (HE) e tricrômico de Masson.

Análise morfométrica

A análise morfométrica da córnea foi feita utilizando-se microscópio Olympus BX 57® associado a Camera Olympus DP73® e associado ao Software cellSens Standard 1.12 copyright 2009-2014- Olympus Corporation, e foi avaliada por histopatologista sem o conhecimento do tratamento. A espessura das células epiteliais da região de córnea central normal, borda e região central da úlcera no quadrante temporal foram mensuradas, bem como a espessura estromal nessas regiões foram mensuradas, foram obtidos três pontos em cada região, e sua média considerada o resultado final.

Adicionalmente, foi avaliada a quantidade de vasos na córnea na região da úlcera epitelizada dos coelhos, por meio de análise semi-quantitativa, considerando 10 campos/animal. A classificação adotada foi de 0 – ausente, 1- presença de um até três vasos por campo, 2- de quatro a seis vasos por campo e score 3- sete ou mais vasos por campo.

Análise histológica da Membrana de L-PRF

As 10 membranas confeccionadas foram fixadas em solução de formalina a 10% durante o período de 72 horas, em seguida foram mantidas em álcool 70%. A seguir, foram seccionadas de forma longitudinal em sua porção média e submetidas a rotina histológica padrão com inclusão em parafina. Foram realizados cortes de 4µm, envolvendo todo seu comprimento, ou seja, parte inferior e superior. Todas as lâminas foram coradas pelo método de Hematoxilina/eosina (HE), e analisadas por microscópio óptico.

A descrição histomorfométrica da membrana de L-PRF foi realizada por modelo semi-quantitativo, incluindo 10 campos de cada extremidade superior e inferior, e o resultado final considerado a média/mediana destes. Para a avaliação celular, foi realizada a contagem totalizando 100 células por campo envolvendo leucócitos e hemácias, e a avaliada a relação entre essas células. Ato contínuo foi analisada por escores a proporção de fibrina, e sua relação com leucócitos e hemácias, bem como entre essas células tanto na parte superior quanto inferior da membrana. Utilizou-se os escores para a relação fibrina/células: 1- discreto, quando havia presença de células em até 25% da matriz de fibrina, 2- moderado, quando predominava até 50% a presença de células na fibrina, e 3- intenso, quando observava-se celularidade acima de 75% na matriz de fibrina.

Para a relação dos leucócitos e hemácia na matriz de fibrina, adotou-se: 0- Ausência de leucócitos e hemácias, 1- Discreta presença de leucócitos (25%) em relação a hemácias, 2- Moderada presença de leucócitos (26 a 75 %) em relação as hemácias e 3 -intensa presença de leucócitos (mais de 75 a 100%) em relação a hemácias.

Análise estatística

As variáveis tiveram sua distribuição avaliada por análises gráficas (histograma e QQ Plot) e testes de normalidade (Shapiro-Wilk). Para as paramétricas, foi utilizado o teste T para verificar a diferença entre machos e fêmeas, e olhos direitos e esquerdos, e a análise de variância (ANOVA) seguida de Tukey para verificar diferenças entre os resultados ao longo dos dias de avaliação e das duas técnicas cirúrgicas utilizadas. Para a espessura da córnea foi realizado o t-test seguido por Welch correction. Nas variáveis não paramétricas foi utilizado o teste de Mann-Whitney considerando machos e fêmeas, olhos direitos e esquerdos, as técnicas cirúrgicas empregadas, e as membranas. O teste não paramétrico Wilcoxon "*matched-pairs signed rank test*" foi utilizado na morfometria das membranas. O teste de paramétrica nos diferentes dias. Foram consideradas diferenças estatísticas quando $p < 0,05$. As análises foram feitas com auxílio do Statistical Analysis Software – SAS versão 9.3²³ e do Graphpad Prism 6.0²⁴.

Resultados

Animais

O GM foi constituído por sete fêmeas e oito machos e, GC, cinco fêmeas e dez machos, houve o óbito de uma fêmea no transcirúrgico. As variáveis pré-operatórias foram avaliadas considerando o sexo e o olho (direito e esquerdo) dentro de cada grupo experimental, não sendo verificadas diferenças, exceto para a Variável PIO, cujos os machos (16,7mmHg) apresentaram valores menores que as fêmeas (18,3mmHg) ($P=0,0309$), no entanto todos dentro da normalidade. Com a distribuição homogênea entre os grupos essa diferença não interferiu nos resultados (Apêndice 1 e 2).

Avaliação Clínica Oftalmológica e análise histomorfométrica

Durante os procedimentos cirúrgicos para a obtenção da membrana, a coleta do sangue da jugular foi laboriosa, exigindo habilidade técnica; as duas membranas não puderam ser coletadas e produzidas no mesmo momento devido ao processo de coagulação ser rápido, dessa forma optou-se em um segundo momento a coleta do sangue pela veia safena, aproveitando o

posicionamento cirúrgico, essa foi uma opção mais tranquila de acesso. Todos os procedimentos envolvendo a cirurgia foram realizados de forma simultânea, para maximizar a eficiência dos processos e reduzir o tempo da anestesia de cada animal.

Considerando as variáveis clínicas oftalmológicas não houve diferença estatísticas na produção lacrimal pelo teste de Schirmer (tabela 1) na comparação entre as técnicas e momentos ($P>0,05$). Entretanto na vascularização da córnea (tabela 1), apesar de ausência de diferença entre os momentos, verificou-se maior vascularização no GM, no período final de avaliação. Nos primeiros dias foi possível observar secreção mucosa com o aspecto opaco da membrana de intensidade leve, apenas no grupo GM.

Tabela 1 - Avaliação clínica oftalmológica nos coelhos dos grupos membrana (GM) e grupo controle (GC), nos diferentes momentos (M0, M1, M4, M7, M30 dias) de avaliação.

Variável	Grupo	M0	M1	M4	M7	M30	valor P
Schirmer	GM	9,6 (1,2)	-	-	-	8,5 (1,1)	0,8716
	GC	13 (1,2)	-	-	-	11,6 (1,3)	0,0677
	Valor P	0,0069	-	-	-	0,426	
Vascularização	GM	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-3)	1 (0-3)	0,0001
	GC	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-0)	0,406
	Valor P	1	0,3773	1	0,0505	0,0045	
PIO	GM	16,5 (0,5)A	11,5 (0,6)B	12,5 (0,6)A	13,7 (0,6)AB	14,4 (0,6)AB	<0,0001
	GC	18 (0,9)A	12,2 (0,5)B	14,2 (0,5)AB	12,3 (0,8)B	16 (0,6)AB	<0,0001
	Valor P	0,9989	1	0,9961	1	0,9536	
Fluoresceína	GM	1 (1-1)A	-	2 (1-2)B	2 (1-2)B	1 (1-2)AB	<0,0001
	GC	1 (1-1)A	-	2 (2-2)B	2 (1-2)B	1 (1-2)AB	<0,0001
	Valor P	1	-	0,334	0,2609	0,8216	
Hiperemia	GM	0 (0-0)A	2 (1-3)BD	1 (1-2)BC	1 (0-2)CA	0 (0-2)DA	<0,0001
	GC	0 (0-0)A	1 (1-3)BD	1 (0-2)BD	0 (0-3)AC	0 (0-1)AD	<0,0001
	Valor P	1	0,0115	0,4832	0,142	1	
Opacidade	GM	0 (0-0)A	2 (1-3)B	2 (1-3)B	1 (1-3)B	1 (1-3)B	<0,0001
	GC	0 (0-0)A	2 (1-3)B	1 (0-2)ABC	1 (1-2)BC	2 (1-3)C	<0,0001
	Valor P	1	0,1293	0,012	0,3706	0,0076	
Blefaroespasma	GM	1 (1-1)A	2 (2-2)B	2 (1-2)BC	1 (1-2)AC	1 (1-1)A	<0,0001
	GC	1 (1-1)	1 (1-2)	1 (1-2)	1 (1-2)	1 (1-1)	0,7306
	Valor P	1	0,0023	0,118	0,9332	1	

Valores $P < 0,05$ indicam diferença estatística. Letras diferentes (A, B, C) indicam diferença estatística ($P < 0,05$) para os dias dentro da mesma técnica.

Considerando a maioria das variáveis clínicas, foi possível observar diferenças entre os momentos avaliados, porém sem alteração significativa entre os tratamentos. Na tonometria (Tabela 1) e o teste de fluoresceína (Tabela 1),

observou-se redução da PIO e coloração por fluresceína, seguida pela normalização do processo de evolução.

Quanto à hiperemia conjuntival (Tabela 1) também não houve diferença entre os grupos, a hiperemia evoluiu com aumento nos momentos iniciais e redução no momento final de avaliação, sendo esse comportamento numericamente superior no GM; entretanto, entre todos os animais do GM um animal manifestou hiperemia em todos os momentos. Em relação ao blefaroespasma, verificou-se aumento da presença desta variável no M1 em relação ao GM ($P=0.023$), bem como evolução com ausência desta variável no GC. A absorção da membrana no GM, no M4 já foi possível observar em todos os animais.

Houve diferença entre os tratamentos considerando a opacidade corneal (Tabela 1), com característica moderada no GM e leve no GC no M4 ($P=0,012$) e inversão desse comportamento no momento final de avaliação ($P=0.0076$). Na comparação entre os momentos, em ambos os grupos, verificou-se aumento da opacidade em relação ao M0, devido à lesão da córnea induzida.

Na avaliação histopatológica foi possível verificar a córnea composta pelas principais camadas: epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio (Figura 8). O epitélio corneal apresentou-se estratificado escamoso não queratinizado, com células poliédricas e colunares e a membrana basal. O estroma manteve a característica de camada mais espessa da córnea constituindo a maior parte da espessura total, inclusive na região da úlcera cicatrizada, apresentando ceratócitos, e raras células inflamatórias. As lamelas de colágeno apresentaram-se organizadas e paralelas entre si em ambos os grupos, especialmente na coloração de tricromico de Masson. A membrana de Descemet, foi facilmente localizada entre o estroma posterior e o endotélio, bem como o endotélio corneal composto por camada única de células basofílicas. Destaca-se a preservação desta camada em ambos os grupos experimentais.

Observou-se ausência de diferença morfológica na região do estroma de córnea normal entre os grupos ($P=0.307$); edemaciamento, no grupo sem membrana tanto na região da úlcera quanto na borda; bem como um espessamento do epitélio na borda da úlcera e menor espessura do epitélio na região da úlcera em ambos os grupos ($P<0.0001$), porém continuidade uniforme maior do epitélio na região da úlcera no grupo tratado com L-PRF (Tabela 3). Na

avaliação do colágeno total, não foram observadas diferenças entre os grupos, considerando as análises microscópicas nas colorações HE e tricrômico de Masson.

A histomorfometria da espessura do estroma nas três regiões diferentes, estão apresentadas na Tabela 2. Verificou-se menor espessura na região da borda ($P<0.0001$) e na região da úlcera ($P=0.0006$) do grupo tratado com PRF em relação ao não tratado no M30. No epitélio mesmo comportamento foi observado, ou seja, o epitélio mostrou-se mais fino na borda ($P<0.0001$) e na lesão ($P<0.0022$) (Tabela 3).

Tabela 2 Avaliações histomorfométricas da espessura do estroma, média e desvio padrão, de córneas de coelhos, nos grupos tratados com membrana de L-PRF e sem membrana (controle).

Localização da mensuração	Membrana	Sem membrana	Valor P
Córnea sem indução de lesão	307.52±4.95	345.85±4.51	P=0.307
Córnea íntegra	259.14±3.61	315.38±7.57	P<0.0001***
Área de lesão	301.63±6.15	343.53±8.35	P=0.0006***

* Diferença significativa $P<0,05$

Tabela 3 Avaliações histomorfométricas da espessura do epitélio, média e desvio padrão, de córneas de coelhos, nos grupos tratados com membrana de L-PRF e sem membrana (controle).

Localização da mensuração	Membrana	Sem membrana	Valor p
Córnea sem indução de lesão	24.44±0.36	24.77±0.35	P=0.5222
Córnea íntegra	40.23±1.17	41.33±2.23	P<0.0001***
Área de lesão	13.82±0.405	13.97±0.306	P<0.0022***

Em relação aos vasos da córnea, a presença foi discreta (1 a 3/campo) e não houve diferença quando comparado os 2 grupos (GM e GC) no M30 ($P=0.4632$) (Apendice 3).

Na histologia da membrana de L-PRF, verificou-se predomínio de matriz de fibrina nas lâminas, sendo esse notório também na extremidade superior, com escassa presença de leucócitos e hemácias. Entretanto, na extremidade inferior observou-se concentração de células, denominada camada leucocitária, apresentando leucócitos e raras hemácias entremeadas na matriz de fibrina. Não foi possível distinguir morfologicamente as plaquetas na histologia, mas pela densidade da célula é provável que esteja entremeada com os leucócitos. Em coelhos, ressalta-se que esses animais não apresentam neutrófilos, e sim heterófilos.

Nas análises semi-quantitativas das células e fibrina nas membranas de L-PRF, não houve diferença entre membranas confeccionadas de coelhos machos e fêmeas ($P>0,05$) (Apêndice 4).

Adicionalmente, não houve diferença ($P>0,05$) na comparação entre a relação fibrina/ leucócitos e a fibrina/ hemácias na região inferior, bem como nestas variáveis na região superior, como demonstrado na (Apêndice 5). Já considerando a comparação entre a região inferior e superior da membrana, na relação a fibrina e os leucócitos (Tabela 4) verificou-se maior ($P=0.0060$) quantidade de fibrina na região superior em relação ao número de leucócitos. Entretanto, nas relações fibrina e hemácias, nas regiões superior e inferior, não houve diferença ($P=0.1686$). Porém, na comparação entre os leucócitos e hemácias nas regiões inferior e superior, observou-se diferença significativa ($P<0.001^{***}$), por apresentar maior número de células na inferior (Tabela 4).

Na comparação da relação entre leucócitos e hemácias, evidenciou-se, com maior número de leucócitos em relação a fibrina na parte inferior da membrana, quando comparado a parte superior, confirmando o o visibilizado na Figura 11. (Tabela 4).

O número de leucócitos e hemácias, nas regiões inferior da membrana, foram de $77,90\pm5,8$ e $22,10\pm5,8$ células, respectivamente ($P=0.0060^{**}$) (Apêndice 7).

Tabela 4 - Comparação da relação entre fibrina e células (leucócitos e hemácias) nas membranas de L-PRF nas regiões inferior e superior.

Região L-PRF	Inferior	Superior	P value	Teste
	Fibrina X Leucócitos	Fibrina X Leucócitos		
Mediana	2	3	P=0.0060**	Wilcoxon matched- pairs test
Min-Máx	(1-3)	(3-3)		
	Fibrina X Hemácias	Fibrina X Hemácias		
Mediana	3	3	P=0.1686	Mann- Whitney test
Min-Máx	(2-3)	(3-3)		
	Leucócito X Hemácias	Leucócitos X Hemácias		
Mediana	3	0	p<0.001***	Mann- Whitney test
Min- Máx	(2-3)	(0-0)		

Discussão

O estudo da membrana rica em fibrina foi realizado em úlceras profundas em coelhos, e indicou a viabilidade de sua utilização e disponibilidade para a aplicação em úlceras de córnea profundas na oftalmologia veterinária, com resultados favoráveis, além de sua produção ser um processo simples e de rápida obtenção.

Na maioria dos estudos analisados, a utilização do tubo de vidro seco foi prevalente, similar a este trabalho, e em um estudo específico comparando a utilização do tubo seco de vidro e de plástico, os autores concluíram que não há interferência na formação do coágulo do PRF e nem na compressão da membrana, mas deve-se ter cautela pois pode haver interferência nos fatores de crescimento ²⁵

Para a confecção da membrana de fibrina rica em plaqueta, apesar de diversos relatos na literatura ²⁵⁻²⁸, o protocolo instituído apresentou desempenho

satisfatório utilizando a centrifugação de 3000 rpm em 10 minutos, corroborando ao descrito na literatura ²⁹.

Além disso, centrífuga utilizada em nosso estudo é a centrífuga simples que é utilizada em laboratórios comuns, pelo fato de ser mais acessível na rotina do cirurgião, e não houve interferência na produção da membrana, quando comparada com alguns estudos que referem que a produção do L-PRF deve ser realizada com centrífuga específica, relatando que afeta a produção final do PRF em vários aspectos ³⁰

Destaca-se, entretanto o menor volume que utilizado (2ml) devido ao tamanho do coelho. Fernandes et al. (2019) confeccionaram a membrana em aves utilizando 0,5 ml, e ressaltaram seu potencial para utilização em casos com pouca disponibilidade de sangue.

Os principais estudos relacionados com a confecção da membrana de PRF são em seres humanos ou em cães, nestes a confecção da membrana é realizada com um volume maior de sangue (9 a 10 ml) ³¹⁻³³, sendo assim, torna-se viável a utilização da chapa metálica da caixa metálica do Kit de PRF ^{11,34}, pois nos cantos da chapa, ela apresenta um limitador para fazer a pressão necessária no coágulo, sendo assim a chapa metálica não fez pressão suficiente para a confecção completa da membrana, em nossa metodologia devido apresentar um volume consideravelmente reduzido de sangue, sendo necessário a compressão complementar do coágulo do PRF com auxílio de gaze umedecida com solução fisiológica a 0,9%, similar ao relatado na odontologia humana ^{29,31}.

Foi instituído o colírio tópico à base de tobramicina, devido a possíveis riscos de contaminação, seguindo protocolos já utilizados com PRP ³⁵. Apesar de ser referido ao PRF capacidade de promover a auto regulação do processo infeccioso e inflamatório ¹¹ por se tratar de pesquisa com viés para a aplicação clínica, optou-se pela inclusão do mesmo.

Considerando as variáveis clínicas oftalmológicas, em sua maioria não foram observadas diferenças significativas entre tratamento, sugerindo que a presença da membrana de PRF não promoveu qualquer tipo de reação adversa e indica potencial para aplicação em úlceras mais complicadas.

O comportamento da cicatrização da úlcera pelo teste de fluoresceína foi similar nos momentos avaliados. Reforçando que o PRF é uma alternativa de

tratamento para úlceras córneas profundas em animais, assim como descrito por Alió et. al. (2013) em seu trabalho em perfuração de córnea nos seres humanos, associado com coágulo de plasma rico em plaquetas.¹³ Porém, diferentemente, notou-se que os coelhos do GM apresentaram blefaroespasma, mesmo com o teste de fluoresceína negativo, variável não relatada por Alió et al. (2013). Acredita-se que a presença deste sinal clínico, e hiperemia numericamente maior no GM, esteja provavelmente associado a presença de fios de sutura na córnea não sepultados, bem como Alió et al. (2013) realizaram os pontos na conjuntiva, minimizando este efeito. A remoção precoce destes pontos e/ou o sepultamento dos pontos deve ser indicada em estudos futuros e na clínica oftalmológica. Esta foi uma limitação na condução da parte clínica experimental.

A presença da membrana foi possível observar no período de aproximadamente 4 dias, similar ao apresentado por Alió et al., (2013). Além disso, a membrana apresentava resistência suficiente para sutura em leito cirúrgico, como demonstrado também em vários outros estudos^{12,22,34}. Madurantakam et al. (2015), em um estudo específico de resistência da membrana em relação as suturas, apresentaram bons resultados.

A vascularização corneal foi presente no GM no período final de avaliação em comparação ao controle, e também foi descrita no trabalho de Alio et al.(2013), embora esta comparação apresente outros fatores intercorrentes tais como a aplicação em casos clínicos associados a perfuração, bem como a utilização conjunta do PRP. Os fatores de crescimento presentes na membrana de L-PRF podem ter contribuído para a neovascularização, e essa tendência já foi observada aos sete dias de pós-operatorório, os pontos não sepultados também devem ser considerados, além disso, a membrana foi posicionada sempre com a parte celular para a região temporal para justamente observar se haveria diferença entre as regiões. Visibilizando-se a resposta da inflamação e cicatrização de úlceras mais profundas, a vascularização possui papel importante na cicatrização corneal, embora não deva ser excessiva devido a levarem alteração na arquitetura da córnea, opacificação e redução da visão³⁷.

Menor opacidade também foi observada nos coelhos tratados com membrana de PRF aos 30 dias, sugere-se que os fatores presentes na membrana também possam ter contribuído para esse resultado. Khiste eTari (2013) e Fujioka-Kobayashi et al.(2017) descreveram os principais fatores de

crescimento no L-PRF como o fator de crescimento transformador β (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento insulina (IGF-1), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento epidermal (EGF). Adicionalmente, no estudo com cultura celular do limbo, os autores concluíram que em termos de crescimento, migração e viabilidade celular, o uso o PRF foi superior em relação ao método tradicional que utiliza cultura de membrana aminiótica.

Na avaliação histopatológica tanto no HE como no tricrômico de Masson, não foi observada diferença entre os grupos em relação ao colágeno total, desestimulando um estudo imunohistoquímico de metaloproteinases ou fatores de crescimento; a espécie estudada e o tempo tardio desta avaliação, também contribuíram, pois, a córnea desses animais já apresentavam sinais de modulação. Em enxertos de conjutivoplastia associados com a membrana de L-PRF, foi observada a modulação inflamatória no período final aos 28 dias, atribuída a ação dos leucócitos e das citocinas na rede de fibrina presente na membrana de L-PRF ²², assim como encontrado neste trabalho, os autores ainda reforça que a utilização da membrana em desordens oculares inflamatórias apresentam grandes benefícios.

Considerando a vascularização, em estudos *in-vitro* descreve que o PRF induz ao processo de angiogênese, por meio do processo de proliferação endotelial, migração e formação do tubo vascular, além de demonstrar a capacidade angiogênica ^{38,39}.

Deve-se considerar que vascularização moderada a intensa da córnea não é interessante, pois interfere na sua transparência, os resultados satisfatórios obtidos em nosso estudo, principalmente na avaliação histomofométrica indicam uma vascularização leve e boa transparência, o que pode ser justificado pela presença dos leucócitos, células que foram mais prevalentes na avaliação da membrana de L-PRF, e que são responsáveis por essa modulação, a confirmação desta modulação inflamatória no período acima de 28 dias foi descrita por Can et al. (2016a). Além de apresentar uma boa epitelização da úlcera de córnea.

Em relação a histologia da membrana de L-PRF, as plaquetas dos coelhos não foram possíveis de serem identificadas nas lâminas de histologia, o que

difere do estudo descritivo de Dohan et al., (2006), em seres humanos, que descreve que as plaquetas estão presentes na camada leucocitária da membrana ("buff coat") entremeados com as hemácias. A camada leucocitária apresentou-se de forma bem distinta da camada da matriz de fibrina e na parte inferior, assim como o relatado por Dohan et al. (2006); entretanto diferente do estudo em aves, neste em algumas áreas da parte superior da membrana foi possível observar tanto os leucócitos isolados quanto os trombócitos ²⁸.

Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que:

A membrana de L-PRF constitui-se basicamente de fibrina e de camada leucocitária na sua extremidade inferior, similar a descrita em seres humanos.

A membrana de L-PRF auxilia na reparação de úlceras profundas na córnea de coelhos, resultando em maior transparência e vascularização leve no período final de cicatrização (30 dias).

Na avaliação histomorfométrica observou-se maior modulação na reparação tecidual, apresentando menor espessura do estroma e epitélio, e maior regularidade deste.

A membrana de L-PRF é uma opção viável para aplicação procedimentos cirúrgicos, de fácil e rápida obtenção, e pode ser suturada no leito da lesão da córnea.

Referências

1. Maggs DJ. CORNEA AND SCLERA. In: *SLATTER'S FUNDAMENTALS OF VETERINARY OPHTHALMOLOGY*. ; 2013:184-219.
2. Ledbetter EC, Gilger BC. Diseases and Surgery of the Canine Cornea and Sclera. In: *Veterinary Ophthalmology*. ; 2013:976-1049.
3. Barros PSM, Safatle AMV, Godoy CA, et al. Amniotic membrane transplantation for the reconstruction of the ocular surface in three cases. *Veterinary Ophthalmology*. 2005;8:189-192.
4. Barros PSM, Safatle AMV. Congenital scleral staphyloma in a dog repaired with preserved homologous peritoneum. *Veterinary Ophthalmology*. 2000;3:27-29. doi:10.1046/j.1463-5224.2000.00102.x.
5. Vanore M, Chahory S, Payen G, et al. Surgical repair of deep melting ulcers with porcine small intestinal submucosa (SIS) graft in dogs and

-
- cats. *Veterinary Ophthalmology*. 2007;10:93-99. doi:10.1111/j.1463-5224.2007.00515.x.
6. Hansen PA, Guandalini A. A retrospective study of 30 cases of frozen lamellar corneal graft in dogs and cats. *Veterinary Ophthalmology*. 1999;2:233-241. doi:10.1046/j.1463-5224.1999.00084.x.
 7. Zeiss CJ. Translational models of ocular disease. *Veterinary Ophthalmology*. 2013;16:15-33. doi:10.1111/vop.12065.
 8. Su CY, Kuo YP, Tseng YH, et al. In vitro release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF): a proposal to optimize the clinical applications of PRF. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 2009;108:56-61. doi:10.1016/j.tripleo.2009.02.004.
 9. Chen TM, Tzeng YS, Tsai JC, et al. Single-donor allogeneic platelet fibrin glue and osteoconductive scaffold in orbital floor fracture reconstruction. *Annals of Plastic Surgery*. 2013;70:370-374. doi:10.1097/SAP.0b013e31823b6880.
 10. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part V: Histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 2006;101:299-303. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.012.
 11. Khiste SV, Naik Tari R. Platelet-Rich Fibrin as a Biofuel for Tissue Regeneration. *ISRN Biomaterials*. 2013;2013:1-6. doi:10.5402/2013/627367.
 12. Madurantakam P, Yoganarasimha S, Hasan FK. Characterization of Leukocyte-platelet Rich Fibrin, A Novel Biomaterial. *Journal of Visualized Experiments*. 2015;2015:1-8. doi:10.3791/53221.
 13. Alio JL, Rodriguez AE, Martinez LM, et al. Autologous fibrin membrane combined with solid platelet-rich plasma in the management of perforated corneal ulcers: A pilot study. *JAMA Ophthalmology*. 2013;131:745-751. doi:10.1001/jamaophthamol.2013.2474.
 14. Castilho MS, Rahal SC, Dias Neto R das N, et al. Preparation and characterization of leukocyte- and platelet- rich fibrin membrane derived from cats' blood. *Microscopy Research and Technique*. March 2021;jemt.23737. doi:10.1002/jemt.23737.

15. Salgado-Peralvo ÁO, Salgado-García Á, Arriba-Fuente L. Nuevas tendencias en regeneración tisular: fibrina rica en plaquetas y leucocitos. *Revista Espanola de Cirugia Oral y Maxilofacial*. 2017;39. doi:10.1016/j.maxilo.2016.03.001.
16. Pinto NR, Ubilla M, Zamora Y, et al. Leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) as a regenerative medicine strategy for the treatment of refractory leg ulcers: a prospective cohort study. *Platelets*. 2018;29. doi:10.1080/09537104.2017.1327654.
17. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates? *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 2006;101. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.010.
18. Almeida RCC De, Baia AEC, Sousa ACS de, et al. A APLICABILIDADE DA MEMBRANA DE FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E LEUCÓCITOS (L-PRF) NA ODONTOLOGIA: UMA REVISÃO DE LITERATURA. *JORNADA ODONTOLÓGICA DOS ACADÊMICOS DA CATÓLICA – JOAC*. 2016;02.
19. Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ, Hernandez M, et al. Optimized Platelet-Rich Fibrin With the Low-Speed Concept: Growth Factor Release, Biocompatibility, and Cellular Response. *Journal of Periodontology*. 2017;88. doi:10.1902/jop.2016.160443.
20. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 2006;101:56-60. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.011.
21. Crisci A, Placido F, Crisci M, et al. A new instrument aid of plastic surgeon: membranes L-PRF (Platelet-Rich-Fibrin). *Journal of Plastic Dermatology*. 2015;11:3.
22. Can ME, Çakmak HB, Dereli Can G, et al. A Novel Technique for Conjunctivoplasty in a Rabbit Model: Platelet-Rich Fibrin Membrane Grafting. *Journal of Ophthalmology*. 2016;2016. doi:10.1155/2016/1965720.
23. SAS Institute. 2011.

24. GraphPad Software. 2007.
25. Ehrenfest DMD, Del Corso M, Diss A, et al. Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. *Journal of Periodontology*. 2010;81:546-555. doi:10.1902/jop.2009.090531.
26. Ehrenfest DMD, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in Biotechnology*. 2009;27:158-167. doi:10.1016/j.tibtech.2008.11.009.
27. Bai MY, Wang CW, Wang JY, et al. Three-dimensional structure and cytokine distribution of platelet-rich fibrin. *Clinics*. 2017;72:116-124. doi:10.6061/clinics/2017(02)09.
28. Fernandes LL, Rahal SC, Fabro AT, et al. Production and evaluation of leukocyte-and thrombocyte-rich fibrin membranes in birds. *Acta Veterinaria Hungarica*. 2019;67:296-306. doi:10.1556/004.2019.030.
29. Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Diss A, et al. Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. *Journal of Periodontology*. 2010;81:546-555. doi:10.1902/jop.2009.090531.
30. Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, et al. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets*. 2018;29:171-184. doi:10.1080/09537104.2017.1293812.
31. Aravindaksha SP, Batra P, Sood V, et al. Use of Platelet-Rich Fibrin Membrane as a Palatal Bandage. *Clinical Advances in Periodontics*. 2014;4:246-250. doi:10.1902/cap.2013.130011.
32. Visser LC, Arnoczky SP, Caballero O, et al. Platelet-Rich Fibrin Constructs Elute Higher Concentrations of - Vet surg 2010.pdf. 2010.
33. Arabacı T, Kose O, Albayrak M, et al. Advantages of Autologous Platelet-Rich Fibrin Membrane on Gingival Crevicular Fluid Growth Factor Levels and Periodontal Healing: A Randomized Split-Mouth Clinical Study. *Journal of Periodontology*. 2017;88:771-777. doi:10.1902/jop.2017.160485.

34. Cakmak HB, Dereli Can G, Can ME, et al. A novel graft option after pterygium excision: Platelet-rich fibrin for conjunctivoplasty. *Eye (Basingstoke)*. 2017;31:1606-1612. doi:10.1038/eye.2017.109.
35. Merlini NB, Fonzar JF, Perches CS, et al. Uso de plasma rico em plaquetas em úlceras de córnea em cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*. 2014;66:1742-1750. doi:10.1590/1678-6906.
36. Anitua E, Zalduendo MM, Alkhraisat MH, et al. Release kinetics of platelet-derived and plasma-derived growth factors from autologous plasma rich in growth factors. *Annals of Anatomy*. 2013;195:461-466. doi:10.1016/j.aanat.2013.04.004.
37. Lee P, Wang CC, Adamis AP. Ocular neovascularization: An epidemiologic review. *Survey of Ophthalmology*. 1998;43:245-269. doi:10.1016/S0039-6257(98)00035-6.
38. Ratajczak J, Vangansewinkel T, Gervois P, et al. Angiogenic Properties of 'Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin.' *Scientific Reports*. 2018;8. doi:10.1038/s41598-018-32936-8.
39. Can ME, Dereli Can G, Cagil N, et al. Urgent therapeutic grafting of platelet-rich fibrin membrane in descemetocoele. *Cornea*. 2016;35:1245-1249. doi:10.1097/ICO.0000000000000917.
40. ALVES PC, FERRAND N, HACKLANDER K. *Lagomorph Biology – Evolution, Ecology, and Conservation*. 1st ed. Berlim: Springer; Softcover reprint of hardcover; 2008.
41. Pessoa CA. Lagomorpha (Coelho, Lebre e Tapiti. In: *Tratado de Animais Selvagens*. ; 2014:1335-1365.
42. Andrew SE. Corneal diseases of rabbits. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice*. 2002;5:341-356. doi:10.1016/S1094-9194(01)00003-2.
43. Calasans-Maia MD, Monteiro ML, Áscoli FO, et al. The rabbit as an animal model for experimental surgery. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2009;24:325-328. doi:10.1590/S0102-86502009000400014.
44. Williams DL. *Ophthalmology of Exotic Pets*. Wiley-Blackwell; 2012.
45. Samuelson DA. Ophthalmic Anatomy. In: *Veterinary Ophthalmology*. ; 2013:39-170.
46. Gelatt KN, Gilger BC, Kern TJ. *Veterinary Ophthalmology*. Vol 12. 5th ed.;

-
2013. doi:10.1016/S0737-0806(06)81385-7.
47. Müller LJ, Pels E, Vrensen GFJM. The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature. *British Journal of Ophthalmology*. 2001;85:437-443. doi:10.1136/bjo.85.4.437.
 48. Müller LJ, Marfurt CF, Kruse F, et al. Corneal nerves: Structure, contents and function. *Experimental Eye Research*. 2003;76:521-542. doi:10.1016/S0014-4835(03)00050-2.
 49. Ximenes KF, Silva JV, Vasconcelos KFX, et al. The role of Descemet's membrane in the pathogeny of corneal edema following anterior segment surgery. *Revista Brasileira de Oftalmologia*. 2014;73:262-268. doi:10.5935/0034-7280.20140057.
 50. Dubielzing RR, Ketring K, McLellan GJ, et al. Diseases of the cornea and sclera. In: *Veterinary Ocular Pathology a Comparative Review*. ; 2010:201-243.
 51. Schulz D, Iliev ME, Frueh BE, et al. In vivo pachymetry in normal eyes of rats, mice and rabbits with the optical low coherence reflectometer. *Vision Research*. 2003;43:723-728. doi:10.1016/S0042-6989(03)00005-1.
 52. Ollivier FJ, Gilger BC, Barrie KP, et al. Proteinases of the cornea and preocular tear film. *Veterinary Ophthalmology*. 2007;10:199-206. doi:10.1111/j.1463-5224.2007.00546.x.
 53. Ljubimov A V., Saghizadeh M. Progress in corneal wound healing. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2015;49:17-45. doi:10.1016/j.preteyeres.2015.07.002.

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

Características do Coelho

O coelho pertence a família Leporidae e a ordem Lagomorpha ⁴⁰. Está presente em quase todos os continentes e seu tamanho pode variar de acordo com a raça ⁴¹. Alterações oculares nesses animais, são frequentemente diagnosticadas, e atendidas na rotina da oftalmologia veterinária ⁴². É considerado um ótimo modelo experimental pelo fácil manuseio e observação, permite trabalhos com número adequado de indivíduos, além de padronização do grupo de estudo, e manutenção de baixo custo ^{42,43}. Adicionalmente, afecções oftalmológicas em coelhos, podem ser encontrados em qualquer segmento do bulbo do olho. Entretanto, devido sua característica anatômica, bulbo do olho lateralizado e proeminente, a estrutura mais acometida é a córnea, pois aumenta o risco de traumas ^{42,44}.

Anatomia

Córnea

A córnea é a estrutura mais externa do bulbo ocular, compõe a túnica fibrosa, juntamente com a esclera ¹. Sua função é promover suporte tectônico para o conteúdo intraocular, auxiliar na refração e transmissão da luz por conta de sua curvatura e transparência, além atuar como uma barreira impermeável entre o olho e o meio ambiente (Ledbetter; Gilger, 2013; Samuelson, 2013).

As principais características relacionadas à transparência são: baixa densidade celular, estado de desidratação relativa, arranjo regular e organizado das lamelas de colágeno, axônios amielínicos, e ausência de vasos e melanócitos ⁴⁶. É composta por quatro camadas principais: epitélio, estroma, membrana de descemet e endotélio (Müller et al., 2001; Maggs, 2013) .

O epitélio corneal é estratificado, escamoso e não queratinizado, com células escamosas, poliédricas e colunares, sendo que esta ultima é aderida aos hemidesmossomos ¹.

O estroma é a camada mais espessa da córnea, representa 90% da espessura total, composto por colágeno, água, glicosaminoglicano; ceratócitos e fibras nervosas amielínicas predominantemente na porção anterior, raros linfócitos, macrófagos, neutrófilos e outros componentes da matrix extracelular. Suas lamelas de colágeno são organizadas e paralelas entre si (Müller et al., 2003; Maggs, 2013).

A membrana de descemet é a membrana basal do endotélio, localizada entre o estroma posterior e o endotélio, caracteriza-se por ser produzida por toda vida; dessa forma quanto mais idoso o animal, mais espessa será a sua córnea ^{1,49}.

O endotélio corneal é composto por uma única camada de células poligonais, possui baixa capacidade de replicação, e fica em contato direto com o humor aquoso, sendo responsável pela manutenção do estado de desidratação relativa do estroma pelas bombas de íons. Na maioria dos animais adultos, o endotélio possui uma limitada habilidade de se proliferar em resposta a uma lesão ^{1,50}.

A espessura da córnea central pode variar de acordo com a espécie e com o tipo de aparelho utilizado. A espessura corneal média do coelho foi de 378,94µm com o paquímetro ultrassônico e de 356,11 µm com o refletômetro óptico de baixa coerência ⁵¹.

A córnea é um dos tecidos mais densamente innervados do corpo, com presença de uma rica quantidade de nervos sensoriais e autônomos, sua integridade é de suma importância pois apresenta papel direto na cicatrização corneal ⁴⁸.

Cicatrização da Córnea

A úlcera de córnea, é uma das alterações mais comuns encontradas na oftalmologia veterinária e é definida pela perda da superfície epitelial, com exposição do estroma e, pode ocorrer, devido a presença de disfunções palpebrais, corpo estranho, alterações no filme lacrimal, traumas, ou até mesmo pela presença de agentes infecciosos ¹.

O processo de resposta a uma lesão epitelial envolve vários eventos, múltiplos sistemas são ativados, com uma série de processos celulares para resultar na cicatrização ⁵²:como a migração celular, proliferação, adesão e

diferenciação em camadas de células estratificadas, além de envolverem fatores de crescimento e citocinas, liberados pelas glândulas lacrimais (Ollivier et al., 2007; Ljubimov and Saghizadeh, 2015). A córnea é capaz de rapidamente responder a uma lesão, cobrindo o defeito por migração celular da região do limbo, e adesão a membrana basal pelo hemidesmosomos e, todo esse processo ocorre no período de 4 a 7 dias ^{1,50}.

Nas lesões mais superficiais do estroma, ocorre ativação dos ceratócitos de modo avascular, que são capazes de sintetizar colágeno ao redor da matriz extracelular e, nas lesões mais profundas, o processo de quimiotaxia ativa a recrutação de neutrófilos por meio da migração pelos vasos limbais, cerca de 48 horas após o início da lesão, os macrófagos são ativados e migram para a lesão, promovendo a remoção dos debris celulares ¹. Além disso, a presença de microorganismos, células inflamatórias e fibroblastos ativados produzem e realizam a liberação de enzimas proteolíticas e o desequilíbrio dessas produções podem levar a complicações graves como as úlceras em melting ⁵²

Uma lesão no endotélio é capaz de estimular a produção de colágeno pela matriz, resultando na duplicação da membrana de descemet ⁵⁰.

Fibrina Rica em Plaquetas (L-PRF)

O PRF é um biomaterial obtido por meio da colheita de sangue sem a adição de anticoagulantes e sua centrifugação imediata ¹⁵. A coagulação começa durante a centrifugação, e três partes aparecem no tubo, uma base de glóbulos vermelhos na parte inferior, plasma acelular como um sobrenadante (plasma pobre em plaquetas), e o coágulo de PRF no meio. Este último, rico em fibrina, plaquetas e leucócitos ¹⁶.

O PRF pode ou não conter leucócitos, sendo denominados respectivamente, L-PRF e fibrina rica em plaquetas pura (P-PRF). Independente do PRF, a ativação das plaquetas acontece sem a adição de substâncias ativadoras, com a finalidade de se conseguir uma estrutura de fibrina forte ¹⁵.

Trata-se de uma nova geração de concentrados de plaquetas e, ao contrário de outras técnicas, não há manipulação bioquímica do sangue, e é formado pelo processo de coagulação natural ¹⁷.

É um material rico em plaquetas, fatores de crescimento e que apresentam um concentrado imunológico que possibilita a osteocondução e intensificam a resposta regenerativa das células do próprio paciente ^{10,18}.

O PRF possui várias citocinas: fator de crescimento transformador β (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento insulina (IGF-1), fator de crescimento de fibroblastos (EGF) e fator de crescimento epidermal (EGE), que resultam na modulação da inflamação e aceleração do processo cicatricial ¹⁹.

Atua como uma membrana absorvível, com característica flexível e, elástica, resistente e com capacidade de ser suturada no leito da ferida (Khiste; Naik Tari, 2013; Madurantakam et al., 2015).

Sua aplicabilidade clínica é extensa, e iniciou-se na odontologia na França (Choukroun et al., 2006b; Alio et al., 2013; Crisci et al., 2015; Can et al., 2016a). O aproveitamento clínico com o uso da PRF é arquitetado em quatro episódios imprescindíveis para a cicatrização: angiogênese, controle imunológico, aproveitamento de células-tronco circulantes e recobrimento de ferida por epitélio ¹⁰.

Além disso, apresenta inúmeras vantagens, como suporte mecânico de proteção a lesão, estímulo da migração celular, necessário para neovascularização e sobrevivência do enxerto, além da presença de leucócitos e citocinas capazes de promover a auto regulação do processo infeccioso e inflamatório (Khiste; Naik Tari, 2013). É um método oferece uma opção terapêutica interessante, considerando a eficiência, o baixo custo e a segurança do uso de “coágulo sanguíneo otimizado” autólogo ¹⁶.

Atualmente há inúmeros trabalhos descrevendo sua aplicação com resultados favoráveis como nas cirurgias plásticas, ortopedias, oftalmologia, dentre outros ^{13,21,22}.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Maggs DJ. CORNEA AND SCLERA. In: *SLATTER'S FUNDAMENTALS OF VETERINARY OPHTHALMOLOGY*. ; 2013:184-219.
2. Ledbetter EC, Gilger BC. Diseases and Surgery of the Canine Cornea and Sclera. In: *Veterinary Ophthalmology*. ; 2013:976-1049.
3. Barros PSM, Safatle AMV, Godoy CA, et al. Amniotic membrane transplantation for the reconstruction of the ocular surface in three cases. *Veterinary Ophthalmology*. 2005;8:189-192.
4. Barros PSM, Safatle AMV. Congenital scleral staphyloma in a dog repaired with preserved homologous peritoneum. *Veterinary Ophthalmology*. 2000;3:27-29. doi:10.1046/j.1463-5224.2000.00102.x.
5. Vanore M, Chahory S, Payen G, et al. Surgical repair of deep melting ulcers with porcine small intestinal submucosa (SIS) graft in dogs and cats. *Veterinary Ophthalmology*. 2007;10:93-99. doi:10.1111/j.1463-5224.2007.00515.x.
6. Hansen PA, Guandalini A. A retrospective study of 30 cases of frozen lamellar corneal graft in dogs and cats. *Veterinary Ophthalmology*. 1999;2:233-241. doi:10.1046/j.1463-5224.1999.00084.x.
7. Zeiss CJ. Translational models of ocular disease. *Veterinary Ophthalmology*. 2013;16:15-33. doi:10.1111/vop.12065.
8. Su CY, Kuo YP, Tseng YH, et al. In vitro release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF): a proposal to optimize the clinical applications of PRF. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 2009;108:56-61. doi:10.1016/j.tripleo.2009.02.004.
9. Chen TM, Tzeng YS, Tsai JC, et al. Single-donor allogeneic platelet fibrin glue and osteoconductive scaffold in orbital floor fracture reconstruction. *Annals of Plastic Surgery*. 2013;70:370-374. doi:10.1097/SAP.0b013e31823b6880.
10. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part V: Histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surgery, Oral*

- Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 2006;101:299-303. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.012.
11. Khiste SV, Naik Tari R. Platelet-Rich Fibrin as a Biofuel for Tissue Regeneration. *ISRN Biomaterials*. 2013;2013:1-6. doi:10.5402/2013/627367.
 12. Madurantakam P, Yoganarasimha S, Hasan FK. Characterization of Leukocyte-platelet Rich Fibrin, A Novel Biomaterial. *Journal of Visualized Experiments*. 2015;2015:1-8. doi:10.3791/53221.
 13. Alio JL, Rodriguez AE, Martinez LM, et al. Autologous fibrin membrane combined with solid platelet-rich plasma in the management of perforated corneal ulcers: A pilot study. *JAMA Ophthalmology*. 2013;131:745-751. doi:10.1001/jamaophthalmol.2013.2474.
 14. Castilho MS, Rahal SC, Dias Neto R das N, et al. Preparation and characterization of leukocyte- and platelet-rich fibrin membrane derived from cats' blood. *Microscopy Research and Technique*. March 2021;jemt.23737. doi:10.1002/jemt.23737.
 15. Salgado-Peralvo ÁO, Salgado-García Á, Arriba-Fuente L. Nuevas tendencias en regeneración tisular: fibrina rica en plaquetas y leucocitos. *Revista Espanola de Cirugia Oral y Maxilofacial*. 2017;39. doi:10.1016/j.maxilo.2016.03.001.
 16. Pinto NR, Ubilla M, Zamora Y, et al. Leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) as a regenerative medicine strategy for the treatment of refractory leg ulcers: a prospective cohort study. *Platelets*. 2018;29. doi:10.1080/09537104.2017.1327654.
 17. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates? *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 2006;101. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.010.
 18. Almeida RCC De, Baia AEC, Sousa ACS de, et al. A APLICABILIDADE DA MEMBRANA DE FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E LEUCÓCITOS (L-PRF) NA ODONTOLOGIA: UMA REVISÃO DE LITERATURA. *JORNADA ODONTOLÓGICA DOS ACADÊMICOS DA CATÓLICA – JOAC*. 2016;02.

19. Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ, Hernandez M, et al. Optimized Platelet-Rich Fibrin With the Low-Speed Concept: Growth Factor Release, Biocompatibility, and Cellular Response. *Journal of Periodontology*. 2017;88. doi:10.1902/jop.2016.160443.
20. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 2006;101:56-60. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.011.
21. Crisci A, Placido F, Crisci M, et al. A new instrument aid of plastic surgeon: membranes L-PRF (Platelet-Rich-Fibrin). *Journal of Plastic Dermatology*. 2015;11:3.
22. Can ME, Çakmak HB, Dereli Can G, et al. A Novel Technique for Conjunctivoplasty in a Rabbit Model: Platelet-Rich Fibrin Membrane Grafting. *Journal of Ophthalmology*. 2016;2016. doi:10.1155/2016/1965720.
23. SAS Institute. 2011.
24. GraphPad Software. 2007.
25. Ehrenfest DMD, Del Corso M, Diss A, et al. Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. *Journal of Periodontology*. 2010;81:546-555. doi:10.1902/jop.2009.090531.
26. Ehrenfest DMD, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in Biotechnology*. 2009;27:158-167. doi:10.1016/j.tibtech.2008.11.009.
27. Bai MY, Wang CW, Wang JY, et al. Three-dimensional structure and cytokine distribution of platelet-rich fibrin. *Clinics*. 2017;72:116-124. doi:10.6061/clinics/2017(02)09.
28. Fernandes LL, Rahal SC, Fabro AT, et al. Production and evaluation of leukocyte-and thrombocyte-rich fibrin membranes in birds. *Acta Veterinaria Hungarica*. 2019;67:296-306. doi:10.1556/004.2019.030.
29. Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Diss A, et al. Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. *Journal of Periodontology*. 2010;81:546-555.

- doi:10.1902/jop.2009.090531.
30. Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, et al. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets*. 2018;29:171-184. doi:10.1080/09537104.2017.1293812.
 31. Aravindaksha SP, Batra P, Sood V, et al. Use of Platelet-Rich Fibrin Membrane as a Palatal Bandage. *Clinical Advances in Periodontics*. 2014;4:246-250. doi:10.1902/cap.2013.130011.
 32. Visser LC, Arnoczky SP, Caballero O, et al. Platelet-Rich Fibrin Constructs Elute Higher Concentrations of - Vet surg 2010.pdf. 2010.
 33. Arabacı T, Kose O, Albayrak M, et al. Advantages of Autologous Platelet-Rich Fibrin Membrane on Gingival Crevicular Fluid Growth Factor Levels and Periodontal Healing: A Randomized Split-Mouth Clinical Study. *Journal of Periodontology*. 2017;88:771-777. doi:10.1902/jop.2017.160485.
 34. Cakmak HB, Dereli Can G, Can ME, et al. A novel graft option after pterygium excision: Platelet-rich fibrin for conjunctivoplasty. *Eye (Basingstoke)*. 2017;31:1606-1612. doi:10.1038/eye.2017.109.
 35. Merlini NB, Fonzar JF, Perches CS, et al. Uso de plasma rico em plaquetas em úlceras de córnea em cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*. 2014;66:1742-1750. doi:10.1590/1678-6906.
 36. Anitua E, Zalduendo MM, Alkhraisat MH, et al. Release kinetics of platelet-derived and plasma-derived growth factors from autologous plasma rich in growth factors. *Annals of Anatomy*. 2013;195:461-466. doi:10.1016/j.aanat.2013.04.004.
 37. Lee P, Wang CC, Adamis AP. Ocular neovascularization: An epidemiologic review. *Survey of Ophthalmology*. 1998;43:245-269. doi:10.1016/S0039-6257(98)00035-6.
 38. Ratajczak J, Vangansewinkel T, Gervois P, et al. Angiogenic Properties of 'Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin.' *Scientific Reports*. 2018;8. doi:10.1038/s41598-018-32936-8.
 39. Can ME, Dereli Can G, Cagil N, et al. Urgent therapeutic grafting of platelet-rich fibrin membrane in descemetocoele. *Cornea*. 2016;35:1245-

1249. doi:10.1097/ICO.0000000000000917.
40. ALVES PC, FERRAND N, HACKLANDER K. *Lagomorph Biology – Evolution, Ecology, and Conservation*. 1st ed. Berlim: Springer; Softcover reprint of hardcover; 2008.
 41. Pessoa CA. Lagomorpha (Coelho, Lebre e Tapiti. In: *Tratado de Animais Selvagens*. ; 2014:1335-1365.
 42. Andrew SE. Corneal diseases of rabbits. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice*. 2002;5:341-356. doi:10.1016/S1094-9194(01)00003-2.
 43. Calasans-Maia MD, Monteiro ML, Áscoli FO, et al. The rabbit as an animal model for experimental surgery. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2009;24:325-328. doi:10.1590/S0102-86502009000400014.
 44. Williams DL. *Ophthalmology of Exotic Pets*. Wiley-Blackwell; 2012.
 45. Samuelson DA. Ophthalmic Anatomy. In: *Veterinary Ophthalmology*. ; 2013:39-170.
 46. Gelatt KN, Gilger BC, Kern TJ. *Veterinary Ophthalmology*. Vol 12. 5th ed.; 2013. doi:10.1016/S0737-0806(06)81385-7.
 47. Müller LJ, Pels E, Vrensen GFJM. The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature. *British Journal of Ophthalmology*. 2001;85:437-443. doi:10.1136/bjo.85.4.437.
 48. Müller LJ, Marfurt CF, Kruse F, et al. Corneal nerves: Structure, contents and function. *Experimental Eye Research*. 2003;76:521-542. doi:10.1016/S0014-4835(03)00050-2.
 49. Ximenes KF, Silva JV, Vasconcelos KFX, et al. The role of Descemet's membrane in the pathogeny of corneal edema following anterior segment surgery. *Revista Brasileira de Oftalmologia*. 2014;73:262-268. doi:10.5935/0034-7280.20140057.
 50. Dubielzing RR, Ketrang K, McLellan GJ, et al. Diseases of the cornea and sclera. In: *Veterinary Ocular Pathology a Comparative Review*. ; 2010:201-243.
 51. Schulz D, Iliev ME, Frueh BE, et al. In vivo pachymetry in normal eyes of rats, mice and rabbits with the optical low coherence reflectometer. *Vision Research*. 2003;43:723-728. doi:10.1016/S0042-6989(03)00005-1.
 52. Ollivier FJ, Gilger BC, Barrie KP, et al. Proteinases of the cornea and

- preocular tear film. *Veterinary Ophthalmology*. 2007;10:199-206.
doi:10.1111/j.1463-5224.2007.00546.x.
53. Ljubimov A V., Saghizadeh M. Progress in corneal wound healing.
Progress in Retinal and Eye Research. 2015;49:17-45.
doi:10.1016/j.preteyeres.2015.07.002.

APÊNDICE

Apêndice 1 - Medidas de resumo numérico para as variáveis da avaliação pré-operatória e comparação entre fêmeas e machos

Exame	Medida	Fêmeas	Machos	valor p
T Schirmer	média (erro padrão)	10,8 (1,2)	11,8 (0,6)	0,4668
PIO	média (erro padrão)	18,3 (0,6)	16,7 (0,3)	0,0309
Fluoresceína	mediana (min - max)	1 (1-1)	1 (1-1)	1
Hiperemia	mediana (min - max)	0 (0-0)	0 (0-0)	1

Valores $p < 0,05$ indicam diferença estatística

Apêndice 2 - Comparação entre os lados direito (controle) e esquerdo (tratado) em diversos exames oftalmológicos para as duas técnicas cirúrgicas (com e sem membrana) utilizadas ao longo dos dias observados.

	Direito	Técnica 1 Esquerdo	Valor p	Direito	Técnica 2 Esquerdo	Valor p
Dia 0						
T Schirmer	9,6 (1)	9,6 (1,2)	1	13,9 (1)	13 (1,2)	0,5935
PIO	17,6 (0,6)	16,5 (0,5)	0,1569	17,3 (0,6)	18 (0,9)	0,5049
Fluoresceína	1 (1-1)	1 (1-1)	1	1 (1-1)	1 (1-1)	1
Hiperemia	0 (0-0)	0 (0-0)	1	0 (0-0)	0 (0-0)	1
Dia 1						
PIO	17,3 (0,6)	11,5 (0,6)	<0,0001	17,1 (0,7)	12,2 (0,5)	<0,0001
Hiperemia	0 (0-0)	2 (1-3)	<0,0001	0 (0-0)	1 (1-3)	<0,0001
Dia 4						
PIO	16,8 (0,6)	12,6 (0,6)	<0,0001	16,3 (0,6)	14,2 (0,5)	0,0122
Fluoresceína	1 (1-1)	2 (1-2)	<0,0001	1 (1-1)	2 (2-2)	<0,0001
Hiperemia	0 (0-0)	1 (1-2)	<0,0001	0 (0-0)	1 (0-2)	<0,0001
Dia 7						
PIO	16,9 (0,4)	13,7 (0,6)	<0,0001	17,6 (0,5)	12,3 (0,8)	<0,0001
Fluoresceína	1 (1-1)	2 (1-2)	0,0007	1 (1-1)	2 (1-2)	0,0001
Hiperemia	0 (0-0)	1 (0-2)	<0,0001	0 (0-0)	0,5 (0-3)	0,0066
Dia 30						
T Schirmer	8,9 (1,2)	8,5 (1,1)	0,8074	9,4 (1,3)	11,6 (1,3)	0,2632
PIO	15,3 (0,5)	14,4 (0,6)	0,2922	15,6 (0,5)	16 (0,6)	0,5978
Fluoresceína	1 (1-1)	1 (1-2)	0,0243	1 (1-1)	1 (0-2)	0,0451
Hiperemia	0 (0-0)	0 (0-2)	0,3584	0 (0-0)	0 (0-1)	0,3613

Variáveis paramétricas -T Schirmer e PIO são indicadas com média (erro padrão)
 Variáveis não paramétricas (Fluoresceína e Hiperemia) são indicadas com mediana (min – max)
 Valores p < 0,05 indicam diferença estatística entre os olhos direito e esquerdo

Apêndice 3 - Análise semi-quantitativa dos vasos da córnea de coelhos, nos grupos com membrana de L-PRF e sem membrana (controle).

	Membrana	Sem membrana	
Mediana	1	1	P=0.4632
Range	1	1	
Número de campos	120	140	

* teste estatístico Mann Whitney test; Escores: 0 – ausente, 1- presença de um até três vasos por campo, 2- de quatro a seis vasos por campo e score 3- sete ou mais vasos por campo.

Apêndice 4 – Comparação da membrana de L-PRF entre fêmeas (F) e machos (M).

	F	M	
Fibrina X Leucócitos	2 (1-3)	3 (2-3)	p=0.1461

Fibrina X Hemácias	3 (2-3)	3 (3)	p=0.1770
Leucócitos X Hemácias	3 (2-3)	3 (3)	p=0.1770

Apêndice 5 -Relação entre fibrina e células (leucócitos e hemácias) nas membranas de L-PRF nas regiões inferior e superior.

	Fibrina / Leucócito Inferior	Fibrina / Hemáceas Inferior	P value	Teste
Mediana Min- Máx	2 (1-3)	3 (2-3)	P=0.1265	Mann Whitney test
	Fibrina / Leucócitos Superior	Fibrina / Hemácias Superior		
Mediana Min-Máx	3 (3-3)	3 (3-3)	P=1.0000	Wilcoxon matched- pairs signed rank test

Apêndice 6 - Relação entre leucócitos e hemáceas nas membranas de L-PRF na região inferior e superior

	Leucócito X Hemácias Inferior	Leucócitos X Hemácias Superior	p<0.001***	Mann- Whitney test
Mediana Min- Máx	3 (2-3)	0 (0-0)		

Apêndice 7 - Relação percentual média entre leucócitos e hemácias nas membranas de L-PRF (contagem de 100 células em 10 campos de cada região).

	Leucócitos inferior	Hemácias inferior		
Média DP	77.90 5.8	22.10 5.8	P=0.0060**	Mann- Whitney test
	Leucócitos Superior	Hemácias superior		

Mediana Min-máx	0 (0-0)	0 (0-0)	p=1.00	Wilcoxon matched pairs signed rank test
----------------------------	------------	------------	--------	--