

UNIVERSIDADE DE UBERABA  
CLÁUDIA DENILZE ANDREOLI

REPARAÇÃO DE ÚLCERAS EXPERIMENTAIS DA CÓRNEA TRATADAS COM  
PLASMA RICO EM PLAQUETAS HOMÓLOGO, PELAS VIAS TÓPICA E  
SUBCONJUNTIVAL: ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS

UBERABA, MG

2013

CLÁUDIA DENILZE ANDREOLI

REPARAÇÃO DE ÚLCERAS EXPERIMENTAIS DA CÓRNEA TRATADAS COM  
PLASMA RICO EM PLAQUETAS HOMÓLOGO, PELAS VIAS TÓPICA E  
SUBCONJUNTIVA: ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade de Uberaba.

Orientador: Prof. Dr. Renato Linhares Sampaio.

UBERABA, MG

2013

CLÁUDIA DENILZE ANDREOLI

REPARAÇÃO DE ÚLCERAS EXPERIMENTAIS DA CÓRNEA TRATADAS COM  
PLASMA RICO EM PLAQUETAS HOMÓLOGO, PELAS VIAS TÓPICA E  
SUBCONJUNTIVAL: ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade de Uberaba.

Área de concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos.

Aprovada em: \_\_\_/ \_\_\_/ \_\_\_.

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Renato Linhares Sampaio  
Universidade de Uberaba

---

Prof. Dr. Moacir S. Lacerda  
Universidade de Uberaba

---

Prof. Dr. Joaquim Pereira Paes  
Membro Externo

## AGRADECIMENTO

Ao Programa de Pós-Graduação Mestrado em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos, através de seus professores, acadêmicos do curso de Medicina Veterinária e funcionários do Hospital Veterinário de Uberaba, que possibilitaram a concretização desse grande sonho.

Ao Professor Doutor Renato Linhares Sampaio, Professor de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos e meu orientador, por seus ensinamentos, dedicação e competência.

À Professora Doutora Joely Ferreira Figueiredo Bittar o Professor Doutor Eustáquio Resende Bittar Coordenador do Curso de Mestrado em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos e o Professor Doutor Moacir Santos de Lacerda pelo inestimável apoio, auxiliando diretamente para realização deste trabalho.

Ao Professor André Belico de Vasconcelos Sub coordenador do Mestrado em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos, pelo incentivo e apoio na realização desta pesquisa.

Às alunas de iniciação científica, Francielle Jaqueline Martins e Letícia Oliveira que tanto contribuíram para o andamento dos trabalhos experimentais.

A aluna do mestrado, Renata C. Frange, que abraçou juntamente comigo a ideia de que poderíamos atingir nosso objetivo, pelo incentivo e companheirismo em todas as horas.

Aos colegas da primeira turma da Pós-Graduação no Mestrado em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos pela troca durante nossas aulas.

Aos amigos queridos Lia, Sam, Grasiela e Roberto que tiveram muita paciência e companheirismo nos momentos mais difíceis.

Ao meu pai Amadeu, pelo amor e dedicação de uma vida, minha mãe Elisa pela força e sabedoria.

A todos que, direta ou indiretamente, auxiliaram na realização deste trabalho, sem os quais seria impossível alcançar o objetivo final.

## RESUMO

O plasma rico em plaquetas (PRP), homólogo, tem sido indicado por promover a reparação dos tecidos. Seu uso terapêutico, descrito em trabalhos na oftalmologia humana, caracteriza-se pela presença dos fatores de crescimento derivados das plaquetas os quais estimulam as células mesenquimais e epiteliais locais a migrarem, dividir e aumentar a formação de matriz celular e colágeno. Sua aplicação clínica na oftalmologia veterinária, mais especificamente em coelhos é pouco conhecida. Este trabalho teve por objetivo avaliar, clínica e macroscopicamente, a utilização do plasma rico em plaquetas (PRP), em aplicações em olhos, na forma tópica e subconjuntival, em úlceras experimentais de córnea de coelhos. Foram avaliados 45 coelhos, ceratectomizados em procedimento cirúrgico, distribuídos em três grupos experimentais. Constituíram o grupo 1 (G1), olhos tratados com Plasma Rico em Plaquetas homólogo com aplicações subconjuntivais, grupo 2 (G2) olhos tratados com Plasma Rico em Plaquetas homólogo com aplicações tópicas, grupo controle (GC), animais ceratectomizados que não receberam tratamentos. Os grupos foram avaliados, por meio de avaliação clínica, macroscópica e análise por paquimetria da espessura da córnea nos momentos 24 horas, 72 horas, 7 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias. O PRP na forma tópica ou subconjuntival atingiu bons resultados para tratamento clínico da úlcera experimental de córnea em coelhos, pois atua na diminuição dos sinais inflamatórios, dor ocular e auxilia potencialmente na cicatrização do defeito epitelial.

**Palavras-chaves:** plasma rico em plaquetas, ceratectomia, córnea e coelhos.

## ABSTRACT

The platelet rich plasma has been used to assist in tissue repair. Its therapeutic use described in human ophthalmology papers is characterized by the presence of growth factors derivative from platelets, which stimulate the migration and division of local mesenchymal and epithelial cells, as well as the increase of cellular matrix and collagenous formation. The plasma's clinical usage in veterinary ophthalmology, specifically in rabbits, is hardly known. This paper intends to evaluate, clinically and macroscopically, the application of platelet rich plasma in a topic and subconjunctival way in corneal experimental ulcers in rabbits. Eyes of 54 rabbits, surgically keratomized, were evaluated in three experimental groups. The first group (G1) contained rabbits with eyes treated with platelet rich plasma by the subconjunctival way. The second group (G2) contained rabbits with eyes treated with platelet rich plasma by the topic manner. A third group acted as a control group (GC), in which keratomized animals did not receive treatment. Clinical alterations were evaluated and changes in central thickness of the cornea were analyzed through pachymetry at the periods of 24 hours, 72 hours, 7 days, 14 days, 21 days and 28 days. The platelet rich plasma in the topic manner aided corneal experimental ulcers repair, reducing epithelization time, while the group treated in the subconjunctival way presented results similar to the control group in this subject. Both were well tolerated, and increase in the inflammatory reaction in the ocular surface had not been observed. Although usage of platelet rich plasma by the topic manner, after the epithelization of the corneal ulcer, stimulated corneal vascularization, having effect on its transparence, indicating that treatments in this manner must be halted after the conclusion of corneal cicatrization.

**Key-words:** platelet rich plasma, keratectomy, cornea and rabbits.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** Sistema utilizado para colheita do sangue mediante a punção cardíaca, constituído por cateter 14G, torneira de 3 vias, extensor e seringa de 60 ml..... 33
- Figura 2** Fotografias ilustrando a sequência de manobras executadas com o objetivo de se produzir a úlcera experimental na córnea de coelhos. (A) Delimitação de campo; (B) aplicação de n-heptanol;(C) remoção do epitélio com lâmina de bisturi (D) aplicação de colírio de fluoresceína..... 35
- Figura 3** Fotografia ilustrando a aplicação subconjuntival do plasma rico em plaquetas, na qual se observa o botão de armazenamento do concentrado plaquetário..... 36
- Figura 4** Fotografia ilustrando o paquímetro utilizado na mensuração da espessura central da córnea (A) e a aplicação da sonda sobre a área central da córnea no momento de aferição da espessura (B)..... 38
- Figura 5** Representação gráfica da evolução clínica da fotofobia e blefarospasmo em animais submetidos à ceratectomia. G1: grupo representando os animais submetidos à ceratectomia e tratado com PRP pela via subconjuntival; G2: grupo representando animais submetidos à ceratectomia e tratados com PRP pela via tópica. GC (grupo controle): animais submetidos à ceratectomia que não receberam tratamento..... 42
- Figura 6** Representação gráfica da evolução clínica da secreção ocular em animais submetidos à ceratectomia. G1: grupo representando os animais submetidos a ceratectomia e tratado com PRP pela via subconjuntival; G2: grupo representando animais submetidos à ceratectomia e tratados com PRP pela via tópica. GC (grupo controle): animais submetidos à ceratectomia que não receberam tratamento..... 43
- Figura 7** Representação gráfica da evolução clínica da hiperemia conjuntival em animais submetidos à ceratectomia. G1: grupo representando os animais submetidos a ceratectomia e tratado com PRP pela via subconjuntival; G2: grupo representando animais submetidos à ceratectomia e tratados com PRP pela via tópica. GC (grupo controle): animais submetidos à ceratectomia que não receberam tratamento..... 44

- Figura 8** Representação gráfica da evolução clínica da quemose em animais submetidos à ceratectomia. G1: grupo representando os animais submetidos à ceratectomia e tratado com PRP pela via subconjuntival; G2: grupo representando animais submetidos à ceratectomia e tratados com PRP pela via tópica. GC (grupo controle): animais submetidos à ceratectomia que não receberam tratamento..... 46
- Figura 9** Representação gráfica da evolução clínica da neovascularização em animais submetidos à ceratectomia. G1: grupo representando os animais submetidos a ceratectomia e tratado com PRP pela via subconjuntival; G2: grupo representando animais submetidos à ceratectomia e tratados com PRP pela via tópica. GC (grupo controle): animais submetidos à ceratectomia que não receberam tratamento..... 47
- Figura 10** Fotografia demonstrando olho submetido à ceratectomia superficial e tratamento com plasma rico em plaquetas pela via subconjuntival. Nota-se a formação da bolha no local de aplicação do concentrado plaquetário após a 1ª aplicação do concentrado plaquetário..... 55
- Figura 11** Fotografia demonstrando olho submetido à ceratectomia superficial e tratamento com plasma rico em plaquetas pela via subconjuntival, após 24 horas de observação. Nota-se leve edema difuso da córnea (B) e hiperemia conjuntival moderada (A), principalmente no local de aplicação do concentrado plaquetário..... 55
- Figura 12** Fotografia demonstrando olho submetido à ceratectomia superficial e tratamento com plasma rico em plaquetas pela via subconjuntival, após 72 horas de observação. Nota-se que 72 horas após a realização da ceratectomia e 3ª aplicação subconjuntival do concentrado plaquetário pela via subconjuntival ainda não houve início da epitelização da úlcera experimental, o que se comprova pela impregnação da fluoresceína sobre toda a superfície corneana... 56
- Figura 13** Fotografia demonstrando olho submetido à ceratectomia superficial e tratamento com plasma rico em plaquetas pela via subconjuntival, após 7 dias de observação. Nota-se que 7 dias após a realização da ceratectomia e 3ª aplicação subconjuntival do concentrado plaquetário houve início da epitelização da úlcera experimental..... 56

- Figura 14** Fotografia demonstrando olho submetido à ceratectomia superficial e tratamento com plasma rico em plaquetas pela via subconjuntival, após 14 dias de observação. Nota-se que 14 dias após a realização da ceratectomia e 5ª aplicação subconjuntival do concentrado plaquetário a epitelização da úlcera experimental já se encontra em estágio avançado (A). Observa-se vascularização da córnea (B), principalmente na região próxima à área de aplicação do concentrado plaquetário..... 57
- Figura 15** Fotografia demonstrando olho submetido à ceratectomia superficial e tratamento com plasma rico em plaquetas pela via subconjuntival, após 21 dias de observação. Nota-se que 21 dias após a realização da ceratectomia e 7ª aplicação subconjuntival do concentrado plaquetário a epitelização da úlcera experimental já se encontra em estágio final (seta) ..... 57
- Figura 16** Fotografia demonstrando olho submetido à ceratectomia superficial e tratamento com plasma rico em plaquetas pela via subconjuntival, após 28 dias de observação. Nota-se que 28 dias após a realização da ceratectomia e 8ª aplicação subconjuntival do concentrado plaquetário a epitelização da úlcera experimental já se completou..... 58
- Figura 17** Fotografia demonstrando olho submetido à ceratectomia superficial e tratamento com plasma rico em plaquetas pela via tópica, após 24 horas de observação. Nota-se que há quemose moderada (A) e completa impregnação do corante fluoresceína(B) sobre a superfície da córnea ..... 58
- Figura 18** Fotografia demonstrando olho submetido à ceratectomia superficial e tratamento com plasma rico em plaquetas pela via tópica, após 72 horas de observação. Nota-se que há quemose (A) e hiperemia moderada (B) e início do processo de epitelização (C) no epicanto lateral..... 59
- Figura 19** Fotografia demonstrando olho submetido à ceratectomia superficial e tratamento com plasma rico em plaquetas pela via tópica, após 7 dias de observação. Nota-se que há quemose e hiperemia leve (A) e processo de epitelização em estágio intermediário(B) ..... 59
- Figura 20** Fotografia demonstrando olho submetido à ceratectomia superficial e tratamento com plasma rico em plaquetas pela via tópica, após 14 dias de observação. Nota-se que a quemose e hiperemia (A) estão ausentes e o processo de epitelização em estágio final (B)..... 60

- Figura 21** Fotografia demonstrando olho submetido à ceratectomia superficial e tratamento com plasma rico em plaquetas pela via tópica, após 21 dias de observação. Nota-se que a vascularização apresenta um aumento significativo em sua intensidade, atingindo níveis moderados neste estágio de observação (setas) ..... 60
- Figura 22** Fotografia demonstrando olho submetido à ceratectomia superficial e tratamento com plasma rico em plaquetas pela via tópica, após 28 dias de observação. Nota-se que a vascularização se mantém moderada neste estágio de observação (seta) ..... 62
- Figura 23** Representação gráfica da variação da espessura da córnea ( $\mu\text{m}$ ) aferida pela paquimetria ultrassônica. G1M0: Valor médio da espessura da córnea intacta dos animais submetidos posteriormente à ceratectomia superficial e tratamento com PRP pela via subconjuntival; G1M1: Valor médio da espessura da córnea dos animais tratados com PRP subconjuntival imediatamente após a ceratectomia; G1M2: Variação da espessura da córnea dos animais submetidos à ceratectomia e tratados com PRP pela via subconjuntival nos momentos de observação; GC: Variação da espessura córnea dos animais do grupo controle, submetidos à ceratectomia e que não receberam tratamento ..... 63
- Figura 24** Representação gráfica da variação da espessura da córnea ( $\mu\text{m}$ ) aferida pela paquimetria ultrassônica. G2M0: Valor médio da espessura da córnea intacta dos animais submetidos posteriormente à ceratectomia superficial e tratamento com PRP pela via tópica; G2M1: Valor médio da espessura da córnea dos animais tratados com PRP tópico imediatamente após a ceratectomia; G2M2: Variação da espessura da córnea dos animais submetidos à ceratectomia e tratados com PRP pela via tópica nos momentos de observação; GC: Variação da espessura da córnea dos animais do grupo controle, submetidos à ceratectomia que não receberam tratamento ..... 64
- Figura 25** Representação gráfica comparativa da paquimetria em animais submetidos à ceratectomia em diferentes tempos. G1M2: Variação da espessura central da córnea de coelhos tratados com PRP pela via subconjuntival; G2M2: Variação da espessura da córnea de coelhos tratados com PRP pela via tópica e; GC: Variação da espessura córnea dos animais do grupo controle, que não receberam tratamento ..... 66

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Interpretação dos índices de escore utilizados na avaliação clínica dos olhos em estudo ..... 37
- Tabela 2** Momentos utilizados na medida da espessura da córnea por paquimetria ..... 62
- Tabela 3** Médias de valores obtidos na paquimetria em  $\mu\text{m}$ , referentes aos tempos em relação aos grupos experimentais descritos. Para o grupo 1, nos momentos M0 e M1 (G1M0 e G1M1), olhos tratados com PRP subconjuntival, foi apurado o cálculo da média da córnea esquerda intacta com valor de 392,8  $\mu\text{m}$ , e média da córnea esquerda pós ceratectomia 367,38 $\mu\text{m}$ ..... 62
- Tabela 4** Médias de valores obtidos na paquimetria em  $\mu\text{m}$ , referentes aos tempos em relação aos grupos experimentais descritos. Para o grupo 2, nos momentos M0 e M1 (G2M0 e G2M1), olhos tratados com PRP subconjuntival, foi apurado o cálculo da média da córnea esquerda intacta com valor de 393,33  $\mu\text{m}$ , e média da córnea esquerda pós ceratectomia 369,14  $\mu\text{m}$ ..... 63
- Tabela 5** Média comparativa de valores obtidos na paquimetria em  $\mu\text{m}$ , referentes aos diferentes tempos em relação aos grupos experimentais descritos para G1M2 e G2M2, olhos tratados com PRP subconjuntival, olhos tratados com PRP tópico e GC foi apurado, foi apurado o cálculo da média da córnea esquerda intacta com valor de 393,33  $\mu\text{m}$ , e média da córnea esquerda pós ceratectomia 369,14 $\mu\text{m}$ ..... 65

## SUMÁRIO

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 12 |
| 2     | <b>OBJETIVOS</b> .....   | 15 |
| 2.1   | OBJETIVO GERAL .....   | 15 |
| 2.2   | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 15 |
| 3     | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....   | 16 |
| 3.1   | ANATOMOFISIOLOGIA DA SUPERFÍCIE OCULAR.....  | 16 |
| 3.1.1 | <b>Mecanismos de defesa da superfície ocular</b> .....   | 18 |
| 3.1.2 | <b>Mecanismos de reparação da córnea</b> .....   | 20 |
| 3.1.3 | <b>Atuação dos Fatores de Crescimento (FC) no olho</b> .....   | 22 |
| 3.2   | A PLAQUETA.....  | 23 |
| 3.2.1 | <b>Morfologia</b> .....  | 23 |
| 3.3   | PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) .....   | 24 |
| 3.3.1 | <b>Aplicações do plasma rico em plaquetas</b> .....  | 25 |
| 3.3.2 | <b>Composição e mecanismo de ação do PRP</b> .....   | 27 |
| 4     | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | 31 |
| 4.1   | OBTENÇÃO E SELEÇÃO DOS ANIMAIS UTILIZADOS NO<br>PROCEDIMENTO DE CERATECTOMIA E TRATAMENTO COM PRP..... | 31 |
| 4.2   | MÉTODOS DE OBTENÇÃO DO PRP .....   | 32 |
| 4.3   | PROCEDIMENTO CIRÚRGICO PARA REALIZAÇÃO DA CERATECTOMIA   | 34 |
| 4.3.1 | <b>Pré-operatório</b> .....  | 34 |
| 4.3.2 | <b>Transoperatório</b> .....   | 34 |
| 4.3.3 | <b>Aplicação do PRP</b> .....  | 36 |
| 4.3.4 | <b>Pós-operatório</b> .....  | 36 |
| 4.4   | PROTOCOLOS DE AVALIAÇÃO.....   | 37 |
| 4.4.1 | <b>Avaliação clínica</b> .....   | 37 |
| 4.4.2 | <b>Avaliação morfométrica através da paquimetria corneana</b> .....                                    | 38 |
| 4.5   | ANÁLISE ESTATÍSTICA.....   | 39 |
| 5     | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | 40 |
| 5.1   | RESULTADOS DA PAQUIMETRIA NO MODELO EXPERIMENTAL<br>(COELHOS) .....                                    | 61 |
| 6     | <b>CONCLUSÕES</b> .....  | 72 |
|       | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 73 |

## 1 INTRODUÇÃO

Os mecanismos protetores da superfície ocular são diversos, sendo que parte destes não são específicos, conhecidos também como paraimunológicos. Estes não possuem memória imunológica, agindo independentemente da origem do agente agressor, e são dependentes de propriedades anatômicas e fisiológicas de estruturas anexas como pálpebras, filme lacrimal e a superfície da mucosa conjuntival, além da ação de substâncias com atividade proteolítica. Outros mecanismos são mais complexos e específicos, possuindo memória imunológica; sendo, portanto, dependentes da resposta imune propriamente dita. Desta forma, é previsível que qualquer material estranho aplicado sobre a superfície ocular estimule uma resposta inflamatória. Recentes pesquisas têm revelado que antígenos da superfície ocular são processados por agregados linfóides especializados no interior da conjuntiva, mais especificamente no tecido linfóide associado à conjuntiva, ou nas células de Langherans, encontradas no limbo. Estes são assimilados pelo epitélio conjuntival e, posteriormente, transportados no interior de células fagocíticas, diretamente para a substância própria da conjuntiva, onde ocorre um processamento imunológico local. Após esta etapa, o antígeno capturado é encaminhado para um linfonodo regional, através de células mononucleares circulantes ou via canais linfáticos adjacentes. Linfócitos estimulados migram, então, para a conjuntiva (células T) e glândulas lacrimais (células B) onde participam das reações imunes mediadas por células e produção local de imunoglobulinas, respectivamente. (SAMPAIO, et al. 2013).

Cerca de 90% dos medicamentos disponíveis são produzidos na forma de colírios sendo administrados pela via tópica. [...] a aplicação tópica do medicamento diretamente na córnea e conjuntiva é ideal, devido à sua simplicidade, eficácia e segurança. Já para o tratamento de doenças intraoculares, as diversas barreiras que o fármaco deve ultrapassar dificultam a obtenção de doses terapêuticas no tecido alvo, especialmente na retina e no vítreo. Estima-se que a absorção intraocular na câmara anterior seja entre 1 e 5% da dose administrada (FORRESTER et al., 2002 apud MELLO FILHO et al., 2010).

Uma das particularidades da prática oftalmológica são as vias alternativas de administração de medicamentos, entre elas a via de administração periocular, seja subconjuntival, subtenoniana ou retrobulbar. Essas vias não enfrentam as barreiras exercidas pelo epitélio da córnea e da conjuntiva e, portanto, apresentam algumas vantagens sobre as vias sistêmica e tópica no que diz respeito à obtenção de concentrações adequadas no meio

intraocular (GEROSKI, EDELHAUSER 2001 apud MELLO FILHO et al., 2010). Comparada às injeções intravítreas, a administração periocular anterior é mais segura por ser menos invasiva. Ela pode apresentar absorção imediata ou sustentada ao longo do tempo, conforme a fórmula do medicamento utilizado (OKABE et al. 2003 apud MELLO FILHO et al., 2010). Diversos grupos utilizam a via de administração transescleral de medicamentos como primeira escolha para que se obtenham concentrações terapêuticas na cavidade vítrea, na retina e coróide (AMBATI; ADAMIS, 2002 apud MELLO FILHO, 2010).

O PRP é um grande concentrado de plaquetas em um pequeno volume de plasma, obtido através da centrifugação do sangue total via gradiente de densidade. Além de apresentar alta concentração de plaquetas, contém fatores de crescimento que são ativamente secretados pelas plaquetas para iniciar o processo de cicatrização (MARX, 2004b).

O PRP possui propriedades osteoindutoras e tem sido utilizado desde a década de 90 como fonte autógena de fatores de crescimento combinado aos diferentes enxertos e substitutos ósseos no intuito de estimular a regeneração óssea, aumentando a velocidade de formação óssea e sua qualidade. É geralmente utilizado no homem para reconstruções ósseas maxilofaciais, levantamento de seios maxilares, defeitos ósseos alveolares, bolsas periodontais e em implantodontia, com a finalidade de melhorar a osteointegração dos implantes dentários. Em animais, a aplicação experimental do PRP em procedimentos maxilofaciais e peri-implantes dentários apresentam resultados controversos, sugerindo a possibilidade do processo de regeneração óssea no modelo animal diferir do processo no homem (SILVA et al., 2007).

Trabalhos demonstram que o PRP pode ser utilizado para repor os fatores de crescimentos (FC) e estimular a cicatrização em enxertos de pele em feridas crônicas (VENDRAMIN; FRANCO; FRANCO, 2010).

Atualmente o PRP tem sido amplamente utilizado em medicina esportiva para acelerar o processo de reparação tecidual em lesões tendíneas e ligamentos, no intuito de proporcionar um retorno mais rápido às atividades esportivas (ALMEIDA, 2011).

O preparado rico em plaquetas oferece um potencial adicional para o tratamento de lesões graves da superfície ocular e se torna uma nova opção de tratamento com um efeito superior na proliferação celular (ENKELA et al., 2001). Segundo Alio et al. (2007a), as plaquetas permanecem intactas e podem aderir-se à superfície ocular atuando de forma biológica e bioquímica.

Os fatores de crescimento presentes no PRP suprimem a liberação de citocinas pró-inflamatórias mediadas pelos monócitos, controlando assim a resposta inflamatória local e

promovendo a regeneração tecidual (EL-SHARKA et al., 2007). Segundo Wang et al. (2006), a reparação dos tecidos moles pode ser acelerada de duas a três vezes em relação ao processo de reparação fisiológica normal, quando presentes os fatores de crescimento derivados do PRP.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Pesquisar os efeitos da aplicação do plasma rico em plaquetas, pelas vias tópica e subconjuntival, sobre a cicatrização de úlceras superficiais da córnea, utilizando o coelho como modelo experimental.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar as manifestações clínicas da aplicação do plasma rico em plaquetas homólogo, pelas vias tópica e subconjuntival, durante a cicatrização de córneas de coelhos, mediante a avaliação dos seguintes parâmetros: fotofobia/blefarospasmo, hiperemia conjuntival, quemose, secreção ocular e neovascularização.

Registrar através de fotografias e classificar as alterações clínicas, observando os resultados do processo de cicatrização de úlceras experimentais da córnea em animais tratados com plasma rico em plaquetas aplicado pelas vias tópica e subconjuntival.

Mensurar, através da paquimetria ultrassônica, a variação da espessura das córneas durante todos os intervalos de observação em animais submetidos à ceratectomia superficial e tratados com plasma rico em plaquetas.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 ANATOMOFISIOLOGIA DA SUPERFÍCIE OCULAR

Como partes integrantes do arcabouço do bulbo ocular, córnea e esclera formam, juntas, a túnica fibrosa do olho, dando-lhe forma e sustentação física. Estas duas estruturas unem-se no limbo, sendo que a córnea diferencia-se da esclera por se localizar na porção anterior do olho e ser naturalmente transparente, o que faz desta o maior meio de refração dos raios luminosos incidentes na superfície ocular, com cerca de 80% de refração total (SCROGGS; KLINTWORTH, 1992; SCHOENAU; PIPPI, 1993; GELATT, 1999).

A transparência corneana, aliada ao seu alto poder de refração, é um atributo importante para a perfeita formação da imagem pelo aparelho visual, estando isto relacionado a algumas características que diferenciam a córnea de outros tecidos, entre os quais pode-se destacar: ausência de vasos sanguíneos e linfáticos, ausência de pigmento, tamanho e disposição das fibras de colágeno, fibras nervosas amielínicas, epitélio não queratinizado e um estado de relativa desidratação que mantém o arranjo perfeito de suas camadas, denominado estado de deturgescência (SLATTER, 1990; LAUS et al., 1993; GELATT, 1999).

A camada presente na superfície da córnea constitui-se de tecido epitelial do tipo pavimentoso estratificado não queratinizado, que tem continuidade com o epitélio conjuntival bulbar (SWANK; HOSGOOD, 1996; GELATT, 1999). Apesar da semelhança do epitélio que reveste a córnea com o epitélio conjuntival, ambos apresentam características próprias, as quais estão diretamente relacionadas com as funções desempenhadas pelas estruturas que revestem. Como exemplo, cita-se a presença de células caliciformes no epitélio conjuntival, responsáveis pela produção de glicoproteínas que formam o componente mucoso da lágrima, importante mecanismo envolvido na proteção da superfície ocular. Histologicamente, a conjuntiva é formada por uma fina camada de tecido conjuntivo frouxo, recoberto em toda a sua extensão por uma lâmina de tecido epitelial colunar, que varia de estratificado para pseudoestratificado, e que se assemelha ao epitélio corneano; porém, apresenta-se, na conjuntiva, mais espesso e com grânulos de melanina no citoplasma das células poliédricas. Observa-se, portanto, que existe uma perfeita interação entre os epitélios que revestem a superfície do bulbo ocular e que a integridade de ambos é essencial para o perfeito

funcionamento do olho como órgão da visão (PRABHASAWAT et al., 1997; MELLER; TSENG, 1999; KIM et al., 2000; CHOI; TSENG, 2001).

A conjuntiva ainda se caracteriza por ser a maior porção de mucosa exposta do organismo e, juntamente com o sistema lacrimal, representa uma extensão do sistema imune de mucosa, sendo, portanto, rica em células do sistema de defesa (AXELROD; CHANDLER, 1978; CHANDLER; GILLETTE, 1983; FRANKLIN; REMUS, 1984; FRANKLIN, 1989; DUA; GOMES; JINDAL, 1994; FINI; STRAMER, 2005; CHANG et al., 2006).

A película de lágrima pré-corneal é, em grande parte, responsável pelas características peculiares à córnea, mantendo a sua superfície sempre lubrificada e brilhante. Além disto, exerce importante função na manutenção do grau de hidratação da córnea, produzindo hipertonicidade durante sua evaporação e, desta maneira, extraíndo água por osmose. A lágrima é ainda responsável pela remoção de material estranho à córnea, condução de oxigênio, metabólitos, células inflamatórias, proteínas do sistema complemento e imunoglobulinas, além de conter substâncias com propriedades antibacterianas inespecíficas como lisozima,  $\beta$ -lisina, lactoferrina, entre muitas outras (BALLOW; MENDELSON, 1980; HRDLICKOVÁ-CELA et al., 2001; YAMADA et al., 2005; PERRY et al., 2006; SONODA et al., 2006).

O limbo é outra importante região presente na superfície ocular. Até pouco tempo, esta era considerada apenas a região de transição entre a córnea e a esclera; porém, mais recentemente, tem sido reconhecida como o berçário da linhagem de células tronco da superfície ocular, também conhecidas como células germinativas, indispensáveis na reparação dos defeitos da córnea. Ao que tudo indica, o limbo apresenta condições especiais para abrigar estas células, possuindo um micro ambiente favorável para a sua sobrevivência e diferenciação. As células germinativas do limbo são capazes de migrar sobre o defeito epitelial da córnea, sofrendo diferenciação e restaurando a área agredida com bastante rapidez e eficiência, quando encontram-se em número adequado (DUA; AZUARA-BLANCO, 1999a; ANDERSON et al., 2001; GRUETERICH et al., 2002; STOIBER et al., 2002; DONISI et al., 2003; ESPANA et al., 2003; MARINHO et al., 2003).

### 3.1.1 Mecanismos de defesa da superfície ocular

Devido à frequente exposição das estruturas que compõem a superfície ocular ao meio ambiente, é possível encontrar, neste local, uma grande variedade de mecanismos protetores. Muitos destes são mecanismos não específicos, também conhecidos como paraimunológicos. Estes mecanismos não possuem memória imunológica, agindo independentemente da origem do agente agressor e são, na sua maioria, dependentes de propriedades anatômicas e fisiológicas de estruturas anexas como pálpebras, filme lacrimal e a superfície mucosa conjuntival, além da ação de substâncias com atividade proteolítica (LEMP; BLACKMAN, 1981; GACHON; LACAZETTE, 1998; CORDEIRO; KROLOW, 1999; ENGLISH, 1999; HAYNES; TIGHE; DUA, 1999).

Outros mecanismos são mais complexos e específicos, possuindo memória imunológica; sendo, portanto, dependentes da resposta imune propriamente dita. Com exceção do trato uveal e da conjuntiva, o olho não possui drenagem linfática própria. Antígenos da superfície ocular são processados por agregados linfoides especializados no interior da conjuntiva, mais especificamente no tecido linfoide associado à conjuntiva; ou nas células de Langherans, encontradas no limbo (GILLETTE; CHANDLER; GRINER, 1982; CHIE, 2000; ENKELA et al., 2001; LEONARDI, 2005).

Recentes pesquisas têm revelado que os antígenos presentes na superfície ocular são assimilados pelo epitélio conjuntival e, posteriormente, transportados no interior de células fagocíticas diretamente para a substância própria da conjuntiva, onde ocorre um processamento imunológico local. Após esta etapa, o antígeno capturado é encaminhado para um linfonodo regional, através de células mononucleares circulantes ou via canais linfáticos adjacentes. Linfócitos estimulados migram, então, para a conjuntiva (células T) e glândulas lacrimais (células B) onde participam das reações imunes mediadas por células e produção local de imunoglobulinas, respectivamente. Todas as cinco classes de imunoglobulinas são encontradas na superfície do estroma conjuntival, apesar da imunoglobulina A (IgA) parecer ser a única imunoglobulina que é ativamente secretada. As outras imunoglobulinas são cogitadas por ganhar acesso à superfície ocular quando a integridade da superfície é comprometida por um processo inflamatório (GILLETTE et al., 1982; PEDERSEN et al., 1982; SULLIVAN; ALLANSMITH, 1984; PEPPARD; MONTGOMERY, 1987; BISTNER, 1994; DAY, 1996; GACHON; LACAZETTE, 1998; CORDEIRO; KROLOW, 1999; HAYNES; TIGHE; DUA, 1999; CHIE, 2000; ENKELA et al., 2001).

Já nas inflamações agudas, como as causadas pela agressão da superfície ocular; ou, mesmo aquelas que se seguem após o transplante de córnea ou aplicação de membranas biológicas sobre lesões presentes na córnea, pesquisas têm demonstrado que as estruturas que compõem a superfície ocular apresentam infiltrado inflamatório formado basicamente de células polimorfonucleares. Sampaio (2004) observou, através de análise imunoistoquímica que, até 21 dias após a ceratoplastia com membrana amniótica xenógena, não houve resposta imune específica na superfície ocular, o que foi testado pela ausência de linfócitos T CD4 e CD8 em cortes de córnea, conjuntiva e glândula lacrimal. Ao mesmo tempo, no período avaliado, observou-se, através da microscopia, grande infiltrado inflamatório composto exclusivamente por células polimorfonucleares, com maior população de células nos sete primeiros dias.

Mais recentemente, com a introdução das técnicas imunoenzimáticas no estudo dos mecanismos imunológicos da superfície ocular, novas proteínas têm sido identificadas. Muitas desempenham atividades relacionadas à defesa; porém, outras, alternam suas funções entre a defesa e a reparação dos defeitos provocados pela agressão das estruturas que compõem a superfície do olho. Como exemplo, pode-se citar a galectin-3, recentemente isolada da superfície ocular em humanos, mas reconhecida por estar presente em todos os mamíferos. Esta proteína, cujo peso molecular varia entre 29.000 e 35.000 daltons, de acordo com a espécie em estudo, pode ser secretada e expressada na superfície de inúmeras células, entre as quais, destacam-se: monócitos, macrófagos, mastócitos e células epiteliais, incluindo aquelas presentes na superfície da córnea. A galectin-3 possui importante ação mitogênica, estimulando a proliferação das células presentes na superfície ocular, particularmente dos fibroblastos, além de funcionar como agente inibidor de apoptose e estimulador do crescimento celular. O que torna mais interessante estes achados é o fato de que, apesar da galectin-3 ser normalmente secretada por vários tipos celulares, a mesma só foi isolada na secreção ocular de pacientes cuja superfície conjuntival se mostrava inflamada no momento da colheita, não tendo sido isolada de olhos assintomáticos. Outro achado revela que esta proteína, derivada das lecitinas, não está presente na glândula lacrimal. Isto permite especular que a superfície ocular possui mecanismos próprios de comunicação que ativam determinadas vias de proteção, quando os sistemas normais de defesa e reparação falham na sua função (HRDLICKOVÁ-CELA et al., 2001).

Deve-se imaginar que estas substâncias não agem isoladamente, estando presentes simultaneamente no filme lacrimal, o que permite concluir que uma boa parte dos

microorganismos invasores tem seu desenvolvimento inibido por estes agentes antibacterianos presentes em olhos saudáveis.

### 3.1.2 Mecanismos de reparação da córnea

Nos mamíferos, as lesões que são seguidas pela perda de substância tecidual normalmente são reparadas por um processo denominado de cicatrização, o qual se caracteriza pela deposição de tecido fibrótico sobre a área afetada. Além de se diferenciar morfológicamente do tecido original, a cicatriz não restaura as funções normais da estrutura afetada, o que contribui para comprometer o seu funcionamento (FINI; STRAMER, 2005).

Os estudos sobre os métodos de reparação dos diversos tecidos que compõem o organismo animal demonstram que, de uma maneira geral, o mecanismo de reparação é bastante semelhante; porém, a córnea apresenta características anatômicas, celulares, moleculares e funcionais que exigem considerações particulares sobre os métodos de reparação presentes na sua estrutura. A pele é o principal modelo de estudo dos mecanismos envolvidos na reparação e, histologicamente, apresenta algumas semelhanças com a córnea. Ambas possuem uma camada de estroma composta de colágeno, a qual se encontra recoberta por um tecido epitelial escamoso. Apesar de ser histologicamente análogo à derme, o estroma corneano possui algumas características específicas. A mais importante está relacionada ao tipo e organização do colágeno, representado no estroma da córnea por fibras dos tipos I e V, as quais se encontram dispostas de forma extremamente organizada e distribuídas em camadas simétricas de forma ortogonal. Além disto, as fibras tipo I e V apresentam uma perfeita semelhança entre o diâmetro das fibras que compõem estas camadas e encontram-se envolvidas por um tipo especializado de proteoglicano que contribui para manter a estabilidade do arranjo das fibras e auxilia na hidrodinâmica da córnea (ESQUENAZI et al., 2005; FINI; STRAMER, 2005; SINGH et al., 2005; YAMAGAMI et al., 2005).

Outra importante característica inerente à córnea diz respeito ao seu baixo metabolismo, que torna este tecido refratário a vários estímulos que, em outros locais, como a pele, estimulam o início dos mecanismos de reparação, o que, conseqüentemente, termina com a deposição de tecido cicatricial e alteração funcional e morfológica. Desta forma, mesmo quando submetida a pequenas agressões, a córnea faz uso de mecanismos próprios para reparar o defeito, retardando o início da cicatrização e mantendo a sua transparência

normal. Segundo Fini e Stramer (2005), isto pode ser observado após a realização de ceratectomias radiais, quando, raramente, ocorre replicação das células estromais e, nestes casos, não há produção de nova matriz extracelular. De acordo com as conclusões dos autores, estas características têm o objetivo de limitar mudanças indesejáveis na estrutura normal do tecido corneano.

Em adição ao que foi comentado acima, a relativa deficiência de células do sistema imune e a ausência de suprimento sanguíneo na córnea intacta fazem com que este tecido tenha uma baixa taxa de resposta imunológica, o que o torna um sítio privilegiado para o transplante e aplicação de membranas biológicas. Porém, durante agressões mais graves ou nos processo inflamatórios crônicos da córnea, esta passa a receber suprimento sanguíneo a partir do limbo e, conseqüentemente, tem sua imunogenicidade alterada pela presença de um maior número de células inflamatórias. Além disto, a lágrima e a conjuntiva também respondem à condição do olho inflamado e passam a responder também contra a presença dos agentes estranhos, o que pode comprometer a técnica de reparo utilizada (BARROS et al., 1998; AVILA et al., 2001; SAMPAIO, 2004; FINI; STRAMER, 2005).

Os primeiros sinais de inflamação da superfície ocular aparecem após a lesão celular, quando os fosfolípidios oriundos da membrana das células epiteliais agredidas dão origem a inúmeras substâncias vasoativas, as quais aumentam o fluxo de sangue para o local afetado e alteram a permeabilidade vascular. Na superfície ocular, esta etapa pode ser vista na forma de hiperemia, edema conjuntival, aumento da secreção ocular e dor (WILKIE, 1990).

Além das substâncias vasoativas, outros elementos solúveis estão presentes na lágrima, dentre os quais, destacam-se as citocinas, que são glicoproteínas com capacidade mensageira e responsáveis pela comunicação intercelular, agindo de forma não enzimática e em concentrações infinitamente pequenas. Dentre as atividades desempenhadas pelas citocinas, particularmente na fase aguda da resposta inflamatória, pode-se destacar a quimiotaxia ou atração de células com atividade fagocítica e outras com capacidade de processar e apresentar os antígenos presentes na superfície ocular. As citocinas participam ainda da modulação da ação do sistema imune celular e humoral e da resposta de reparação que se instala após a eliminação do agente agressor. Grande parte dos mecanismos fisiológicos envolvidos na resposta imune é coordenada pelas citocinas, que agem de forma organizada e complexa através uma grande reação em cascata, com a participação de várias proteínas com atividade mensageira (SOTOZONO, 2000; TEIXEIRA, 2000; ESQUENAZI et al., 2005; LEONARDI, 2005; SINGH, et al., 2005; YAMAGAMI et al., 2005).

Além dos aspectos relacionados à função de substâncias mensageiras, tem sido sugerido que as citocinas, em situações específicas, dão início a um ciclo vicioso na superfície ocular, perpetuando o processo inflamatório e conseqüentemente a agressão sobre a córnea. No âmbito desta questão, discute-se a inter-relação entre o processo inflamatório da superfície ocular e a destruição dos tecidos inflamados (GARRANA et al., 1999; JUMBLATT et al., 1999; SMITH; HOH; EASTY, 1999; SOTOZONO, 2000; SOLOMON et al., 2001; LEONARDI, 2005).

Das substâncias envolvidas neste mecanismo, a matriz de metaloproteinases é, até o presente momento, a mais estudada. De acordo com a literatura, estas substâncias são enzimas capazes de clivar proteínas, atacando diretamente os componentes proteicos da matriz extracelular e da membrana basal. As metaloproteinases são secretadas como proenzimas e ativadas através de seriadas clivagens proteolíticas, em uma região da molécula denominada de terminal N, localizada no compartimento extracelular. Após esta etapa, as proenzimas sofrem mudanças na sua conformação bioquímica e alteração do peso molecular (SMITH; HOH; EASTY, 1999; SOLOMON et al., 2001).

### **3.1.3 Atuação dos Fatores de Crescimento (FC) no olho**

Pelo fato do PRP ter pH entre 6,5 e 6,7, ele atua inibindo o crescimento bacteriano, mas mesmo assim, deve ser preparado de maneira asséptica (MARX, 2004a).

Os fatores de crescimento celular são produzidos pelo epitélio, estroma, endotélio da córnea e pela glândula lacrimal (KLENKLER; SHEARDOWN, 2004). Deste modo, minutos após a lesão corneana, há um aumento da produção lacrimal, resultando em maior quantidade de fatores de crescimento disponíveis para reparar a lesão. Além disso, o humor aquoso contém vários fatores de crescimento que regulam a função corneana e mantém a homeostasia no interior do bulbo ocular (KLENKLER; SHEARDOWN, 2004).

Além dos fatores de crescimento, muitas citocinas inflamatórias contribuem para o processo de reparação corneana; elas são produzidas pelas células inflamatórias como linfócitos (T e B), monócitos/macrófagos, leucócitos polimorfonucleares, basófilos e eosinófilos; regulam a proliferação e induzem a migração das células epiteliais da superfície corneana (OBATA et al., 2012).

Vários fatores de crescimento presentes no PRP estão envolvidos na manutenção da estrutura e função corneana, especialmente os relacionados à manutenção da transparência durante o processo de reparação. Assim que a córnea é lesionada, sinais são transmitidos para as células germinativas presentes na região do limbo que iniciam um processo de proliferação e diferenciação (OBATA et al., 2012).

As plaquetas aderem-se ao tecido corneano lesado, liberam numerosas citocinas e fatores de crescimento que induzem a mitose de fibroblastos, resultando na produção de colágeno. Além disso, o fibrinogênio é transformado em fibrina que promove suporte estrutural ao tecido corneano lesado (ALIO et al., 2007b).

## 3.2 A PLAQUETA

### 3.2.1 Morfologia

As plaquetas são as menores células do sangue. São fragmentos anucleados de megacariócitos da medula óssea e possuem um tempo de vida de aproximadamente 10 dias. Durante a megacariocitopoiese, o megacariócito sofre endomitose. Uma vez que a célula poliplóide atinge a maturação, ela forma extensões pró-plaquetárias a partir das quais as plaquetas são liberadas (ITALIANO; SHIVDASANI, 2003).

Os megacariócitos são células precursoras altamente especializadas que se diferenciam para produzir plaquetas sanguíneas via intermediários de extensões citoplasmáticas conhecidas como proplaquetas (cadeias alongadas de citoplasma de megacariócitos que se estendem para cavidades da medula óssea, sua fragmentação produz as plaquetas).

Embora sejam anucleadas, as plaquetas são células altamente organizadas e ricas em diferentes organelas, como mitocôndrias viáveis, glicogênio e pelo menos três tipos de grânulos morfológicamente diferentes que estocam diferentes tipos de constituintes: os grânulos alfa ( $\alpha$ -grânulos), os grânulos densos e os lisossomas (RENDU; BROHARD-BOHN, 2001).

Os grânulos densos estocam íons bivalentes e moléculas pequenas não proteicas, como o difosfato de adenosina (ADP), o trifosfato de adenosina (ATP), serotonina e pirofosfato, que são secretadas para recrutar outras plaquetas e exercem funções centrais na amplificação da

ativação e agregação plaquetárias, assim como na modulação do endotélio vascular e da função leucocitária. Os grânulos alfa contêm moléculas de adesão importantes para as interações entre a plaqueta e outras plaquetas, células sanguíneas e tecidos. Contêm ainda fatores mitogênicos, proteínas plasmáticas e fatores relevantes para a coagulação e fibrinólise. Os grânulos lisossômicos contêm glicosidases, proteases e proteínas catiônicas com atividade bactericida. As enzimas hidrolíticas liberadas digerem material dos agregados plaquetários circulantes. As plaquetas apresentam um complexo citoesqueleto, consistindo de microtúbulos e de sistema tubular denso, que exercem importante papel na ativação plaquetária, secreção granular e na retração do coágulo (RENDU; BROHARDBOHN, 2001).

As plaquetas carregam alguns componentes específicos através de todo o organismo. Na circulação, elas são reativas a vários estímulos e liberam o material contido em seus grânulos. Essa reação de secreção é um passo importante na hemostasia primária. A energia e os mensageiros necessários para a reatividade plaquetária são fornecidos pela mitocôndria e pelo sistema tubular denso. Cada população de grânulos tem propriedades específicas relacionadas tanto com a estrutura quanto com o conteúdo liberado (RENDU; BROHARDBOHN, 2001).

### 3.3 PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

Plasma rico em plaquetas ou plasma rico em fatores de crescimento é uma suspensão concentrada de sangue centrifugado contendo altas concentrações de plaquetas. Nos últimos anos, este produto tem aparecido repetidamente na literatura científica fica como um produto cujas características contribuem para estimular a reparação de tecidos através da aceleração da cicatrização (LAGUNAS, 2006).

O plasma sanguíneo é um líquido cor de palha, formado em grande parte por água e compostos bioquímicos, principalmente proteínas, servindo como meio de transporte destas substâncias e das células do sangue, através dos vasos sanguíneos. Neste conjunto de células, proteínas e água, denominado de sangue, encontram-se as plaquetas ou trombócitos, que são fragmentos de células gigantes e multinucleadas da medula óssea vermelha, denominadas megacariócitos (APPEL et al., 2002; EPPLEY; PIETRZAK; BLANTON, 2006).

O plasma rico em plaquetas é atóxico, não imunogênico e contém citocinas que agem como fatores promotores do crescimento tecidual em altas concentrações (HAYNESWORTH; KADIYALAS; LIANG. 2002; UEBEL; SILVA; CANTARELLI, 2006).

O PRP é uma grande concentração de plaquetas em um pequeno volume de plasma, com a consequente presença de FC liberados por estas plaquetas, além de proteínas osteocondutoras, que também servem de matriz para migração epitelial e formação óssea e de tecido conectivo. A técnica para obtenção do PRP envolve, basicamente, o sequestro e a concentração das plaquetas no plasma sanguíneo, com sua subsequente aplicação na área da ferida em cicatrização. Foi observado, em humanos, que a cicatrização do osso e dos tecidos moles pode ser potencializada pela aplicação do PRP em uma concentração de 1.000.000 plaquetas/ $\mu$ L, ou seja, em uma concentração 338% maior que as encontradas habitualmente no sangue (MESSORA, 2009).

A concentração final de plaquetas em suspensão no plasma depende diretamente da contagem inicial de plaquetas no sangue. Não existe ainda um valor padronizado para a caracterização do plasma rico em plaquetas, sendo que alguns autores passam a denominá-lo como tal, quando o produto final possui uma concentração plaquetária três vezes superior à contagem no sangue. Por isto, a definição do plasma rico em plaquetas ainda não está bem estabelecida na literatura, em particular por existirem estudos com diversas espécies animais, e as mesmas apresentam taxas de concentração no produto final diferentes entre si. Por outro lado, sabe-se que a densidade final de plaquetas pode interferir na capacidade dos concentrados plaquetários em promover o crescimento dos tecidos.

### **3.3.1 Aplicações do plasma rico em plaquetas**

A obtenção do PRP, inicialmente, era realizada através de máquinas de plasmaferese e utilizava-se a trombina bovina para sua ativação. Para diminuir custos e facilitar a obtenção do PRP, surgiram algumas máquinas automatizadas e diversos protocolos, inclusive com substituição da trombina bovina por trombina autóloga. As máquinas automatizadas com seus "kits" tornam simples a obtenção do PRP; porém, os custos ainda são elevados. Assim, alguns protocolos foram criados para se obter pequenas quantidades de PRP e trombina autólogos, utilizando-se centrífugas comuns e reduzindo muito os custos na preparação do produto.

O primeiro relato da utilização terapêutica do plasma rico em plaquetas data de 1970, quando uma grande quantidade de sangue era necessária para produzir o concentrado plaquetário. Esta, entre outras experiências, permitiu o avanço das técnicas de preparo do sangue, bem como promoveram o desenvolvimento de equipamentos que permitiram alcançar, nos dias de hoje, a produção de concentrados plasmáticos de plaquetas com volumes de sangue muito inferiores (SANCHEZ et al., 2003).

Os concentrados de plaquetas autólogos foram utilizados com bons resultados no tratamento de úlceras corneanas refratárias ao tratamento em humanos (REZENDE; SILVA; ANTUNES, 2007), em implantes dentários, na cicatrização de tecido ósseo e em cirurgias plásticas. Neste concentrado existem fatores de crescimento úteis na epitelização corneana que induzem a migração e a diferenciação de células epiteliais (HARTWIG et al., 2004 apud EURIDES et al., 2010).

Preparações contendo plaquetas são usadas em seres humanos por meio de transfusão intravenosa em pacientes apresentando neoplasias e para prevenir ou tratar hemorragias secundárias a trombocitopenias; mas estudos recentes demonstraram que o uso tópico destas preparações pode oferecer fatores de crescimento fundamentais na regeneração óssea e reparação tecidual (ZIMMERMANN et al., 2001).

O concentrado rico em plaquetas tem apresentado destaque na medicina humana como adjuvante em cirurgias de implantes dentários, em cirurgias ortopédicas, na reparação de músculos e/ou tendões, no tratamento de úlceras de pele, em cirurgias plásticas e em outras situações nas quais é altamente desejável e necessária a aceleração da epitelização (ALIO et al., 2007a).

Em oftalmologia, o PRP tem sido observado em alguns trabalhos em medicina humana. A vantagem do seu uso, com relação ao de soro autólogo, é que o plasma enriquecido contém maior concentração de vitaminas e de fatores de crescimento, além disso, como as plaquetas permanecem intactas, podem aderir-se à superfície ocular, atuando de forma biológica e mecânica (ALIO et al., 2007b).

### 3.3.2 Composição e mecanismo de ação do PRP

As plaquetas atuam no processo de hemostasia, ou seja, no conjunto de mecanismos que o organismo emprega para coibir a hemorragia. Para tal, é formado um trombo que obstrui a lesão na parede vascular. Esse trombo não é constituído de coágulo e sim de plaquetas. A coagulação, além de fornecer pequena quantidade de fibrina para o trombo plaquetário, colabora na estabilização do trombo (COSTA, 2008). As plaquetas atuam também na cicatrização de feridas e reepitelização. Elas liberam diversos (FC) fatores de crescimento que estimulam a angiogênese, promovendo crescimento vascular e proliferação de fibroblastos, que por sua vez proporcionam um aumento na síntese de colágeno. Estas propriedades das plaquetas tornam o PRP um produto com grande potencial de melhorar a integração de enxertos, sejam eles ósseos cutâneos ou cartilagosos; bem como estimular a cicatrização de feridas. Nas cirurgias em que se trabalha com retalhos cutâneos, o PRP ajuda na hemostasia e estimula o desenvolvimento da neovascularização, diminuindo assim complicações como hematomas, seromas e sofrimento vascular dos retalhos. Estas propriedades podem ser empregadas para melhorar o tratamento de feridas no membro inferior que costumam evoluir com uma cicatrização mais lenta e com a incidência de complicações nos retalhos locais numa frequência maior que aquelas localizadas em outras partes do corpo.

As plaquetas apresentam funções importantes, atuam no reparo de pequenas lesões vasculares, formando o tampão hemostático primário, além de amplificar o estímulo para a produção de fibrina e formação do *plug* hemostático secundário. As ações hemostáticas das plaquetas podem ser divididas em cinco categorias: adesão, agregação, secreção, facilitação da coagulação e retração do coágulo (STOCKHAM; SCOTT, 2002).

Apesar de serem apenas fragmentos de células, as plaquetas são ricas em adenosina trifosfato (ATP) e contêm muitas das organelas normalmente presentes nas células. As plaquetas exercem importante função na hemostasia, sendo essenciais no mecanismo de coagulação, quando se agrupam, a fim de formar um tampão na fase inicial do controle da hemorragia (YAMAZAKI; NAKAJIMA; OCASAWARA, 1999).

Um dos contribuintes para a ativação plaquetária é um lipídio fator de agregação plaquetária (FAP) que se acumula na córnea após a lesão, favorecendo a síntese de precursores da reação inflamatória e a cicatrização. O FAP induz a produção de fosfolipase A2 e de prostaglandinas associadas à reação inflamatória. Além disso, ativa a expressão de

genes envolvidos na remodelação da matriz tecidual e proteínas mitogênicas, auxiliando, desta forma, na reparação dos tecidos (EURIDES et al., 2010).

A reparação espontânea dos diferentes tecidos do organismo é mediada por fatores de crescimento num processo que se inicia pela formação do coágulo sanguíneo e continua pela degranulação subsequente das plaquetas que liberam os fatores de crescimento (WILSON, BARBIERI e MAZZER, 2006). Estes são importantes durante o processo de regeneração tecidual, pois regulam as células mesenquimais recrutadas durante o processo de regeneração e a angiogênese (MAZZUCCO et al., 2004).

Existem inúmeros fatores de crescimento derivados das plaquetas no plasma sanguíneo, denominados citocinas, que pertencem a um grupo de polipeptídios secretados por várias moléculas reguladoras do organismo. Atuam como mediadores na maturação celular e são responsáveis pelos processos de reparação tecidual (STENN; PAUS, 2001 apud EURIDES et al., 2010). Possuem ação antigênica, ativam a micro-circulação local e vários grupos celulares na integração e vitalidade de tecidos (VICK et al., 2006 apud EURIDES et al., 2010). Os grânulos plaquetários contêm fatores como de crescimento de transformação semelhante à insulina. Quando em contato com seus respectivos receptores nucleares, estimulam a angiogênese e a replicação dos tecidos e, como antiinflamatórios, induzem a cicatrização.

No PRP são descritos três isômeros do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF $\alpha\alpha$ , PDGF $\beta\beta$ , PDGF $\alpha\beta$ ), dois fatores de crescimento transformador- $\beta$  (TGF $\beta$ 1 e TGF $\beta$ 2), fator de crescimento do endotélio vascular, fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (MARX, 2004a; FERREIRA et al., 2005; WANG, 2006), fator de crescimento dos fibroblastos (FGF), fator angiogênico derivado das plaquetas (FLORYAN; BERGHOFF, 2004) e fator plaquetário 4 (PF-4) (SANCHEZ et al., 2003; ALIO et al., 2007b).

Os fatores de crescimento presentes no PRP suprimem a liberação de citocinas pró-inflamatórias mediadas pelos monócitos, controlando, assim, a resposta inflamatória local e promovendo a regeneração tecidual (EL-SHARKA et al., 2007). Segundo Wang (2006), a reparação dos tecidos moles pode ser acelerada de duas a três vezes em relação ao processo de reparação fisiológica normal, quando presentes os fatores de crescimento derivados do PRP.

O PDGF estimula a divisão celular no local da lesão, promove angiogênese, reepitelização e formação do tecido de granulação, além de estimular os osteoblastos, promover a quimiotaxia de fibroblastos e produção de colágeno. Receptores para PDGF são

encontrados nas células endoteliais e nos fibroblastos da córnea (KLENKLER; SHEARDOWN, 2004; FLORYAN; BERGHOFF, 2004).

O TGF estimula a proliferação de fibroblastos, além de inibir a proliferação de leucócitos, células epiteliais e endoteliais. Está presente no humor aquoso e é capaz de inibir a angiogênese corneana (KLENKLER; SHEARDOWN, 2004).

O EGF é um potente agente mitogênico para as células epiteliais; receptores com afinidade para EGF foram encontrados nas células epiteliais da córnea, principalmente na região do limbo e nas células endoteliais. É considerado um estimulador em potencial da motilidade das células epiteliais corneanas “*in vitro*” (KLENKLER; SHEARDOWN, 2004).

O PF-4 é um quimioatrativo para neutrófilos e fibroblastos, além de ser um potente agente antiheparina (SANCHEZ et al., 2003).

Além dos fatores de crescimento o PRP contém fibrina, fibronectina e vitronectina, proteínas que atuam como moléculas de adesão celular para a osteocondução e para migração epitelial, como matriz óssea e tecido conjuntivo (MARX, 2004a; WANG, 2006, NIKOLIDAKIS; JANSEN, 2008).

A concentração dos fatores de crescimento no PRP é significativamente maior do que no sangue total, apresentando cerca de 10 a 25 vezes mais PDGF e TGF do que os níveis basais (FLORYAN; BERGHOFF, 2004); resultando no único produto disponível que contém altas concentrações de diversos fatores de crescimento simultaneamente (ALIO et al., 2007b). A concentração dos fatores de crescimento aumenta proporcional e diretamente ao número de plaquetas; entretanto, a concentração destes fatores pode variar de paciente para paciente, dependendo da contagem inicial de plaquetas no sangue (EPPLEY et al., 2006).

Na literatura, o uso dos concentrados ricos em plaquetas frequentemente ignora o impacto dos leucócitos e da fibrina; entretanto, os leucócitos desempenham um papel importante contra as infecções, regulando a imunidade e produzindo grandes quantidades do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), importante para promover a angiogênese, desempenhando, desta forma, um efeito sinérgico juntamente com as plaquetas (EHRENFEST, RASMUSSEN e ALBREKTSSON, 2009).

O modo de atuação dos fatores de crescimento é complexo, já que apresentam propriedades diferentes no mesmo tecido, bem como respostas diferenciadas dependendo do tipo de tecido em que se encontram. Eles interagem entre si, amplificando e formando uma cascata de sinais que resultam na produção proteica. Por este motivo, há vantagens de se utilizar os fatores de crescimento provenientes das plaquetas (SANCHEZ et al., 2003).

A resposta celular adequada ao PRP inicia-se quando há um aumento no número basal de plaquetas de quatro a cinco vezes (MARX, 2004b). Segundo Froum et al. (2002), a concentração de plaquetas no PRP pode variar de três a oito vezes a concentração de plaquetas observada no sangue total.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO E SELEÇÃO DOS ANIMAIS UTILIZADOS NO PROCEDIMENTO DE CERATECTOMIA E TRATAMENTO COM PRP

O projeto está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, adotados pelo comitê de ética animal (CEEA/UNIUBE) regido pela lei nº 11.704/09, protocolo número 004/2010 do ofício CEEA-009/2010.

Foram utilizados 54 coelhos da raça Nova Zelândia, com média de idade de seis meses, machos e fêmeas, sem distinção de cor da pelagem e com peso médio de 3,0 kg. Os animais foram fornecidos pelo setor de cunicultura das Faculdades Associadas de Uberaba (FAZU).

Os animais selecionados foram numerados de 1 a 54 e distribuídos, aleatoriamente, por sorteio, em 3 grupos, com 18 animais cada.

**a) Grupo 1 (G1):** grupo de 18 animais, selecionados aleatoriamente, que foram submetidos à ceratectomia superficial e aplicação subconjuntival do PRP. Estes 18 animais foram divididos em 6 subgrupos, de 3 animais cada, correspondentes aos períodos de avaliação e colheita dos materiais, nos intervalos de 24 horas (T1), 72 horas (T2), 7 dias (T3), 14 dias (T4), 21 dias (T5) e 28 dias (T6).

**b) Grupo 2 (G2):** grupo de 18 animais, selecionados aleatoriamente, que foram submetidos à ceratectomia superficial e aplicação tópica do PRP. Estes 18 animais foram divididos em 6 subgrupos, de 3 animais cada, correspondentes aos períodos de avaliação e colheita dos materiais, nos intervalos de 24 horas (T1), 72 horas (T2), 7 dias (T3), 14 dias (T4), 21 dias (T5) e 28 dias (T6).

**c) Grupo controle (GC):** grupo de 18 animais, selecionados aleatoriamente, que foram submetidos à ceratectomia superficial e não receberam tratamento de nenhuma natureza. Estes 18 animais foram divididos em 6 subgrupos, de 3 animais cada, correspondentes aos períodos de avaliação e colheita dos materiais, nos intervalos de 24 horas (T1), 72 horas (T2), 7 dias (T3), 14 dias (T4), 21 dias (T5) e 28 dias (T6).

## 4.2 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DO PRP

Os animais utilizados como doadores para a obtenção do concentrado plaquetário (PRP) foram os mesmos utilizados no estudo clínico. Para tanto, iniciou-se a colheita com os animais do grupo controle, planejando-se o experimento de forma que a data das análises clínicas e a colheita dos materiais coincide-se com a colheita do sangue para obtenção do PRP. O delineamento foi planejado para que a cada 3 dias, um grupo fosse doador, mantendo uma constante renovação no estoque de PRP. Para os animais dos grupos tratados, as cirurgias foram planejadas para que sempre houvesse PRP fresco no momento da primeira aplicação tópica. Todas as aplicações dos animais do grupo 1, que receberam o PRP pela via subconjuntival, foram realizadas com PRP fresco.

Para tanto, colheu-se 60 ml de sangue, através de punção cardíaca, de cada coelho doador. Os animais foram anestesiados previamente com cetamina 10% (60 mg/kg), acepromazina 1% (1 mg/kg) e cloridrato de fentanila (0,3 mL/kg). A punção cardíaca foi realizada com uso de cateter estéril 14G, acoplado a uma seringa de 60 ml estéril através de um extensor (FIGURA 1). A seringa foi preenchida com 2 ml de citrato de sódio e 1 ml de heparina, sendo que esta mistura foi colocada em contato com todo o sistema coletor. O sangue de cada coelho foi homogeneizado cuidadosamente e dividido em 12 tubos de plástico à vácuo, tipo vacutainer, contendo o citrato de sódio como anticoagulante.

Todos os materiais utilizados na colheita e processamento do sangue foram manufaturados em plástico, para evitar perda na contagem das plaquetas, que ocorre pela aderência das mesmas nas paredes dos tubos de vidro. Primeiramente realizou-se a contagem de plaquetas do sangue total de cada coelho, para, posteriormente, avaliar a capacidade de concentração das mesmas.

Para se obter o PRP, utilizou-se uma centrífuga de laboratório, com raio de 16 cm, velocidade de 1.500 rotações por minuto e força de 402,4 (g). Após a primeira centrifugação, com o tempo (T) de 8 minutos, observou-se a separação do sangue em duas camadas: o concentrado de hemácias no fundo (contendo a “buffy coat” - zona da névoa, rica em leucócitos e plaquetas maiores) e o plasma sobrenadante, que na sua porção mais inferior foi denominada como primeiro plasma rico em plaquetas (PRP1); e a porção superior o primeiro plasma pobre em plaquetas (PPP1). Com o auxílio de um pipetador, foram colhidos 10 $\mu$ l do PRP1 para uma primeira mensuração da concentração das plaquetas. A porção mediana, contendo o PRP1, mais a porção superior do concentrado de hemácias foram pipetados e transferidos para outro tubo estéril, sem anticoagulante, num total de 2 ml. Este tubo foi submetido a uma nova centrifugação, com o tempo (T) de 10 minutos.

Após a segunda centrifugação, observou-se novamente a separação do concentrado de hemácias e do plasma, observando-se que na porção inferior foi denominado o segundo plasma rico em plaquetas (PRP2) e a porção superior o segundo plasma pobre em plaquetas (PPP2). Com auxílio de uma pipeta foram colhidos novamente 10µl do PRP2 para uma nova mensuração da concentração das plaquetas. Pipetou-se 1 ml do PRP2 e transferiu-se para um novo tubo estéril, obtendo-se assim o plasma rico em plaquetas, na forma líquida, que conforme o protocolo, está pronto para ser utilizado clinicamente. O material foi submetido à análise laboratorial imediatamente após o preparo, para a contagem de plaquetas finais, verificando se houve aumento da concentração em relação ao sangue total.

A mensuração das plaquetas foi feita através da contagem manual, pela técnica do oxalato de amônia 1%. Misturou-se 90µL de oxalato de amônia 1% e 10µL da amostra em um tubo de ensaio, a qual foi transferida para o retículo da Câmara de Neubauer, aguardando a sedimentação por 10 minutos. Efetuou-se a leitura através de microscopia de luz, aplicando-se um aumento de 40X, procedendo-se à contagem da quantidade de plaquetas em cinco quadrantes. Seguindo o protocolo, o resultado foi multiplicado por 1.000, obtendo-se assim a quantidade de plaquetas na amostra. O valor médio da contagem de plaquetas no sangue total foi de 692.000/mm<sup>3</sup> antes dos ciclos de centrifugação e de 1.844.000/ mm<sup>3</sup> após os dois ciclos de centrifugação, correspondendo ao plasma rico em plaquetas.

O material colhido foi armazenado em tubos de 3 ml, para posterior utilização clínica, sendo mantidos armazenados sob refrigeração a 4°C e agitados periodicamente, por um período máximo de 72 horas.



**Figura 1:** Sistema utilizado para colheita do sangue mediante a punção cardíaca, constituído por cateter 14G, torneira de 3 vias, extensor e seringa de 60 ml.

### 4.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO PARA REALIZAÇÃO DA CERATECTOMIA

#### 4.3.1 Pré-operatório

Antecedendo à conduta operatória propriamente dita, procedeu-se aos cuidados relativos ao preparo dos animais para a cirurgia, incluindo jejum hídrico de 2 horas e alimentar de 6 horas. Os animais foram pesados e anestesiados com uma mistura de acepromazina<sup>1</sup> na dose de 1,0 mg/kg de peso corpóreo, cetamina<sup>2</sup> na dose de 60 mg/Kg de peso corpóreo e cloridrato de fentanila<sup>3</sup> na dose de 0,3 mL/Kg de peso corpóreo, pela via intramuscular. Imediatamente antes do início do procedimento cirúrgico foi instilada uma gota de colírio anestésico à base de cloridrato de tetracaína, cloridrato de fenilefrina e ácido bórico, sobre o olho a ser operado.

#### 4.3.2 Transoperatório

Tomados os cuidados no período pré-operatório, e tendo atingido o plano anestésico adequado ao procedimento, determinado pela perda da sensibilidade da córnea ao toque digital e ausência de reação do animal ao estímulo da manipulação da superfície ocular, os animais dos grupos 1, 2 e 3 foram cuidadosamente posicionados em decúbito lateral direito. Inicialmente, promoveu-se limpeza da superfície ocular com solução fisiológica estéril 0,9%, visando a remoção de partículas contidas no espaço conjuntival, seguida da antissepsia com colírio à base de vitelinato de prata a 10%<sup>4</sup>. O campo operatório foi coberto com pano de campo fenestrado, com orifício de 5 cm de diâmetro, ao redor da área a ser operada (FIGURA 2 A). Com o campo operatório devidamente protegido, prosseguiu-se ao preparo da área para a remoção do epitélio da córnea, que foi realizada através da associação de um agente químico com manobras mecânicas (FIGURA 2 B e C). Para tanto, utilizou-se uma pequena

---

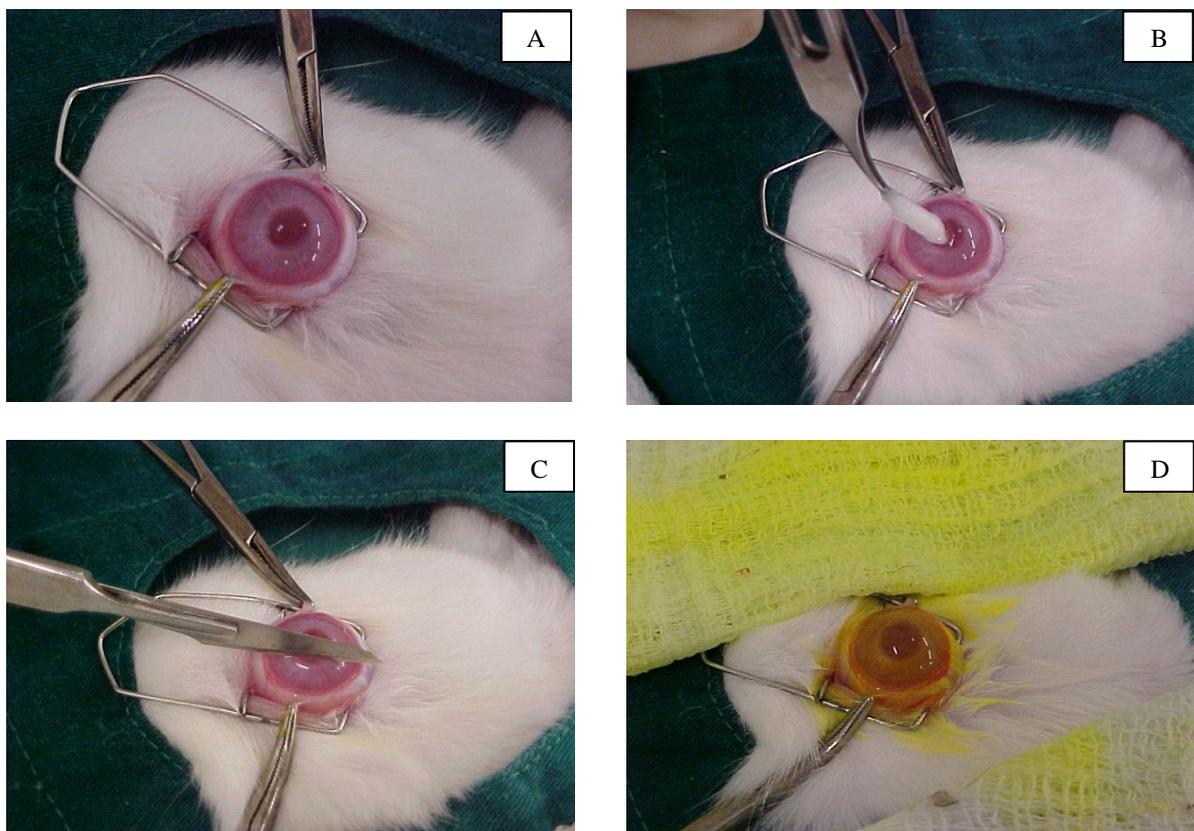
<sup>1</sup> Acepran 0,2% ® - Venil

<sup>2</sup> Ketamin ® - Cristália

<sup>3</sup> Fentanila® - Cristália

<sup>4</sup> Argirol® - Allergan

porção de algodão fixado em uma haste e embebido em n-heptanol<sup>5</sup>, o qual possui ação abrasiva sobre o epitélio. Após a aplicação do n-heptanol, a porção do epitélio que se desprende foi removida com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº11, levemente aplicada sobre a superfície da córnea, com movimentos horizontais, de uma extremidade do limbo até a outra. A confirmação da remoção do epitélio foi realizada mediante a aplicação do colírio de Fluoresceína<sup>6</sup>, o qual foi instilado sobre o olho, observando-se, com ajuda de uma fonte luminosa, a impregnação do estroma pelo corante, após lavagem da superfície ocular com solução fisiológica 0,9% (FIGURA 2 D).



**Figura 2:** Fotografias ilustrando a sequência de manobras executadas com o objetivo de se produzir a úlcera experimental na córnea de coelhos. (A) Delimitação de campo; (B) aplicação de n-heptanol;(C) remoção do epitélio com lâmina de bisturi (D) aplicação de colírio de fluoresceína.

<sup>5</sup> N-heptanol – Yonghua

<sup>6</sup> Colírio de Fluoresceína: Allergan

#### 4.3.3 Aplicação do PRP

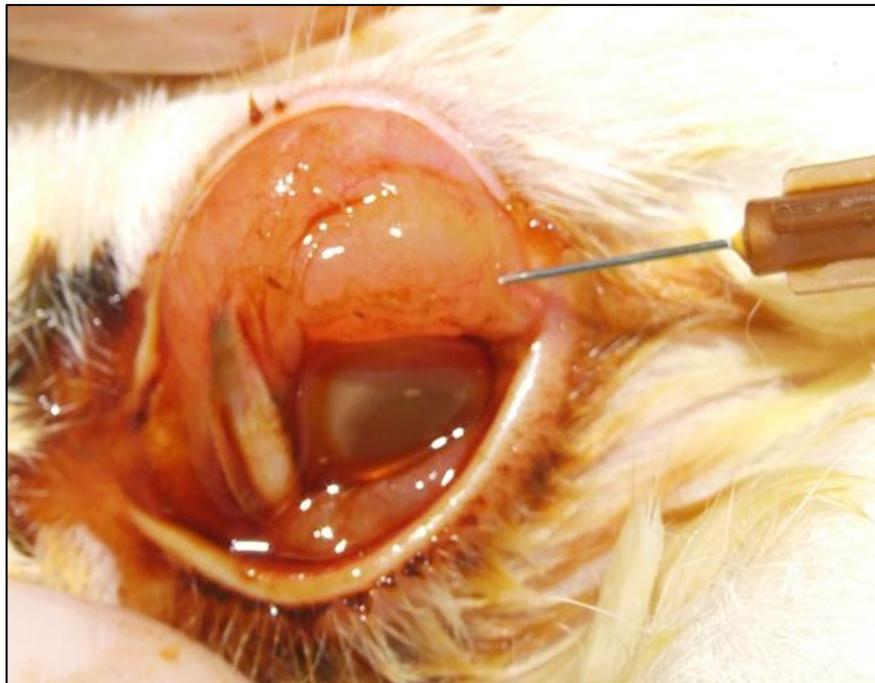
Grupo 1: Aplicação subconjuntival de 0,5 mL de PRP, a cada 72 horas, durante 21 dias (FIGURA 3).

Grupo 2: Aplicação tópica de 2 gotas de PRP, 4 vezes ao dia, durante 21 dias.

Grupo controle: nenhuma aplicação.

#### 4.3.4 Pós-operatório

Aguardou-se o retorno anestésico dos animais, com posterior aplicação de colares do tipo Elisabetano, com o objetivo de se evitar traumas sobre o local operado. Os animais foram identificados e conduzidos para suas respectivas gaiolas, para se proceder à avaliação clínica dos olhos operados, por um período de 28 dias.



**Figura 3:** Fotografia ilustrando a aplicação subconjuntival do plasma rico em plaquetas, na qual se observa o botão de armazenamento do concentrado plaquetário.

## 4.4 PROTOCOLOS DE AVALIAÇÃO

### 4.4.1 Avaliação clínica

Todos os animais foram avaliados em intervalos pré-determinados, de acordo com o item 4.1, onde foram observados parâmetros relacionados com a evolução clínico-cirúrgica dos pacientes, tais como: sinais de fotofobia e blefarospasmo, hiperemia conjuntival, secreção ocular, edema da conjuntiva (quemose), neovascularização corneana. Observou-se, ainda, o intervalo de tempo necessário para a total epitelização da área de ceratectomia. Estas alterações permitiram estabelecer a cinética do processo inflamatório da superfície ocular e a capacidade de cicatrização do epitélio da córnea tratada pelo método proposto. Todas as alterações foram qualificadas e, posteriormente quantificadas, de forma subjetiva de acordo com a Tabela 1.

**Tabela 1:** Interpretação dos índices de escore utilizados na avaliação clínica dos olhos em estudo.

| <b>ESCORE</b>           | <b>0</b>         | <b>1</b>          | <b>2</b>              | <b>3</b>             |
|-------------------------|------------------|-------------------|-----------------------|----------------------|
| Interpretação do Escore | Sem manifestação | Manifestação leve | Manifestação moderada | Manifestação intensa |

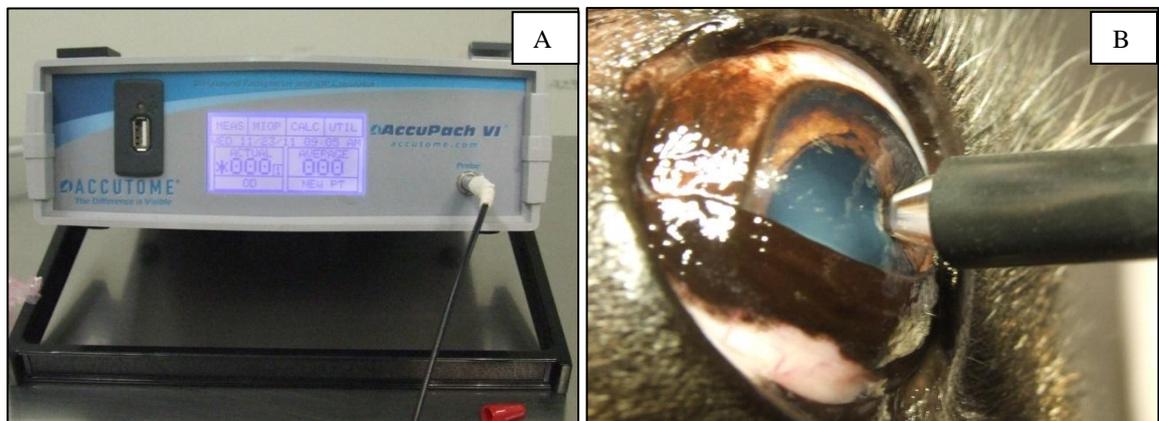
A técnica para o exame deu-se pela abertura da fissura palpebral e identificação das alterações anteriormente relacionadas. Inicialmente, o exame foi realizado sem aplicação de qualquer colírio. Após esta inspeção prévia, os olhos foram lavados com solução fisiológica estéril 0,9%, e receberam a aplicação do colírio de fluoresceína.

As alterações macroscópicas foram registradas através de fotografias, as quais foram realizadas durante a execução do exame clínico, respeitando-se os intervalos anteriormente citados para a colheita dos materiais para análise. Os valores referentes à avaliação dos parâmetros pesquisados para cada animal, de acordo com a Tabela 1, foram armazenados em tabelas e posteriormente analisados de acordo com a evolução média do grupo em cada momento de observação, para cada parâmetro pesquisado. O estudo da evolução clínica foi realizado pela elaboração de gráficos com os valores médios do grupo para cada momento de observação, a saber: 24 horas, 72 horas, 7 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias.

#### 4.4.2 Avaliação morfométrica através da paquimetria corneana

Além dos parâmetros acima descritos, foi monitorada também a variação da espessura da córnea de todos os animais, para a determinação da capacidade de restauração do tecido corneano tratado pela técnica proposta. Para tanto, todas as córneas foram mensuradas, através da paquimetria, antes da realização da ceratectomia e nos intervalos de tempo determinados no item 4.1. Para tanto, após a anestesia dos animais e antes da colheita dos tecidos, as córneas foram submetidas à análise da sua espessura, através da aplicação da sonda do paquímetro<sup>7</sup> sobre a área central da córnea. Este método utiliza um feixe focalizado de ultrassom para medir a espessura da córnea. Foram realizados nove aferições sequenciais e apresentou o resultado das médias, o que conferiu maior confiabilidade no resultado final, apresentado em  $\mu\text{m}$ . Neste experimento foi realizada a mensuração da espessura central da córnea nos momentos definidos no item 4.1.

Imediatamente após o término dos procedimentos de colheita, os animais foram submetidos à eutanásia, de acordo com as normas vigentes de bioética.



**Figura 4:** Fotografia ilustrando o paquímetro utilizado na mensuração da espessura central da córnea (A) e a aplicação da sonda sobre a área central da córnea no momento de aferição da espessura (B).

<sup>7</sup> Paquímetro Acupach VI® (Accutome)

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada pelo estudo da análise de variância (ANOVA) complementada pelo teste de Bonferroni, com nível de significância de 5%, através do programa BIOESTAT 5.3.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não são raras as situações de agravo à superfície ocular, com comprometimento da integridade das estruturas que a compõem. Muitos destes episódios colocam em risco a visão, quando já não estão lhe causando grande desconforto. O comprometimento da visão traz prejuízos irreparáveis tanto para o homem quanto para os animais; podendo, para estes últimos, determinar a sua própria sobrevivência.

São inúmeras as doenças que podem se manifestar na superfície ocular, devendo-se destacar aquelas com capacidade de lesar a córnea e alterar a sua transparência, o que impede a sua função refrativa e conseqüentemente a visão. Outras vezes, as lesões podem determinar a destruição do tecido corneano, colocando em risco a integridade do bulbo ocular, já que a córnea está presente na porção anterior do olho, funcionando como interface entre o meio ambiente e as estruturas intra-oculares.

Sabendo-se que os ferimentos da superfície ocular são os principais responsáveis pela perda temporária ou definitiva da visão, e que o comprometimento das células germinativas do limbo constitui-se em grave complicação, que além de retardar a reparação dos ferimentos permite intensa vascularização e conjuntivalização da córnea, inúmeras pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de se investigar novas terapias que contribuam para uma boa cicatrização da córnea, mesmo naquelas condições em que as células germinativas do limbo encontram-se ausentes.

O reconhecimento da importância da córnea na execução do complexo processo da visão fez com que, ao longo de muitos anos, inúmeros pesquisadores se empenhassem no estudo da etiologia das enfermidades que afligem a superfície ocular, seus mecanismos no desenvolvimento das doenças e as possibilidades terapêuticas específicas para cada uma. Além disto, a identificação dos mecanismos de reparação da córnea foi importante para que se pudessem determinar as condições necessárias para o restabelecimento da transparência e conseqüentemente da sua capacidade refrativa. O conjunto de conhecimentos científicos acumulados por tantos anos vem contribuindo para que métodos empíricos deem lugar a técnicas comprovadamente eficientes na recuperação da função das estruturas oculares.

Pesquisas comprovam que o epitélio anterior da córnea exerce importante função no controle da população de microorganismos presentes na superfície ocular. A descamação das células epiteliais superficiais, auxiliada pela ação da lágrima e dos movimentos palpebrais, remove microorganismos com bastante eficiência, inibindo a adesão e penetração destes à

córnea. A remoção do epitélio anterior da córnea expõe o estroma aos microorganismos locais que exercem ação quimiotática, o que pode contribuir para aumentar a infiltração de células inflamatórias na superfície da córnea (CRESTA; ALVES, 2007).

Um conjunto de elementos intimamente relacionados à córnea faz com que se acredite que existe um perfeito equilíbrio entre as estruturas que compõem a superfície ocular. A córnea, naturalmente transparente e, pelos motivos que lhe conferem esta característica, mais indefesa, está cercada pela conjuntiva e pelo limbo.

A conjuntiva é ricamente vascularizada e com capacidade de defender a superfície ocular por meios específicos e inespecíficos, enquanto que o limbo serve de berçário para a linhagem de células germinativas da córnea, importantes na reposição de células epiteliais da superfície corneal.

O plasma rico em plaquetas tem sido amplamente investigado como método alternativo na cicatrização de diversos tecidos, com resultados promissores. Constitui-se num concentrado plaquetário, obtido mediante centrifugação de sangue total que, por esse motivo, tem baixo custo de produção e é de fácil obtenção.

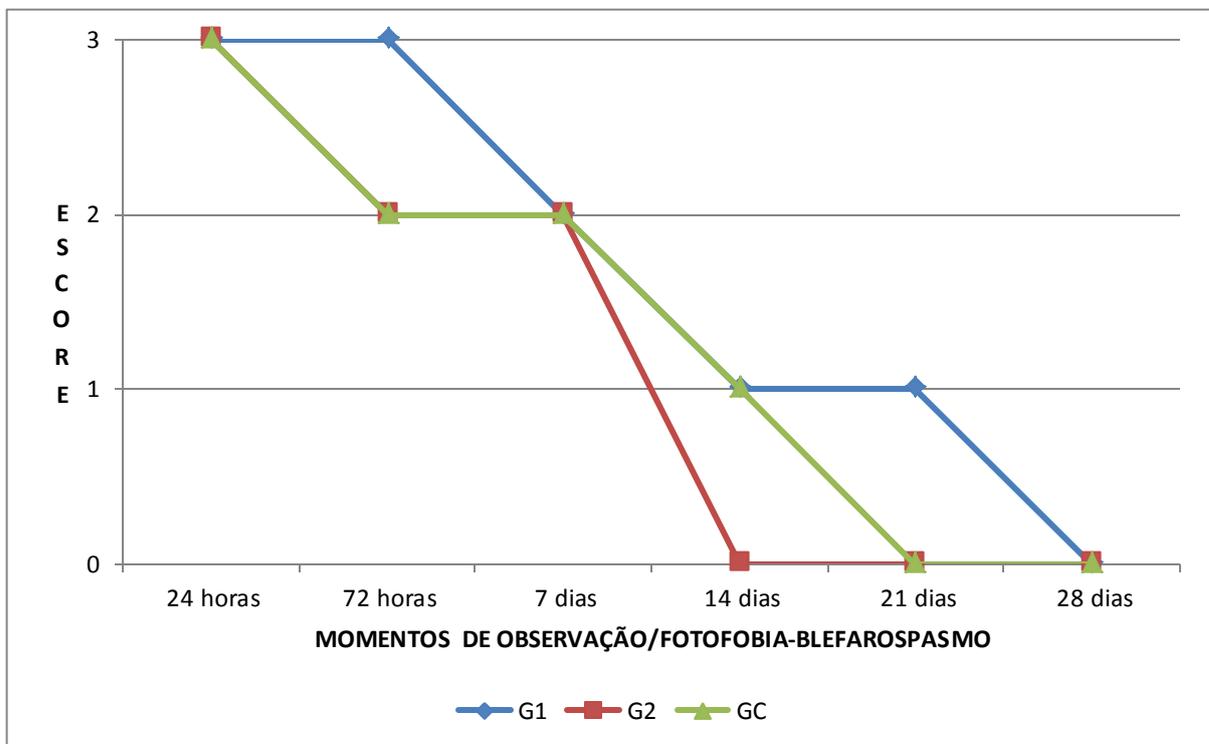
A despeito da utilização do plasma rico em plaquetas na oftalmologia, com destaque para o tratamento das lesões da superfície ocular, poucos estudos têm sido realizados. A expectativa é de que a liberação lenta dos fatores de crescimento pela degranulação das plaquetas proveria concentração suficiente para desencadear a estimulação do crescimento tissular na superfície ocular (WILSON et al., 2006).

A secreção dos fatores de crescimento inicia-se dez minutos após a formação do PRP e mais de 95% dos fatores de crescimento pré-sintetizados são secretados durante a primeira hora. Após a liberação inicial destes fatores, as plaquetas sintetizam e secretam fatores de crescimento adicionais durante sete dias (NIKOLIDAKIS; JANSEN, 2008). Segundo Froum et al. (2002), a liberação dos fatores de crescimento derivados do PRP, ocorre com três a cinco dias e estes permanecem ativos por sete a dez dias.

Com base nestas evidências e objetivando-se estudar a influência do concentrado plaquetário na cicatrização de úlceras experimentais da córnea de coelhos, desenvolveu-se o presente modelo experimental, através do qual se observou a cinética da inflamação e da reparação de úlceras experimentais da córnea, tratadas ou não com plasma rico em plaquetas pelas vias tópica e subconjuntival. Os resultados, obtidos mediante a comparação entre os três grupos propostos por um período de 28 dias, são descritos a seguir.

Ao avaliar o desconforto ocular através da mensuração da fotofobia e do blefarospasmo, observou-se que, nas primeiras 24 horas, todos os animais apresentaram

intensa manifestação destes sinais. A análise posterior demonstrou que os animais dos grupos G2 e GC evoluíram para índices moderados entre 72 horas e 7 dias, enquanto que o G1 permaneceu com manifestação intensa destes sinais às 72 horas, evoluindo para índices moderados aos 7 dias. Os animais que receberam a aplicação tópica do PRP já não apresentaram sinais clínicos de desconforto aos 14 dias, momento em que os animais do grupo controle e daqueles que receberam o PRP pela via subconjuntival apresentaram sinais leves de fotofobia e blefarospasmo. Aos 21 dias, os animais do grupo controle já não apresentaram sinais de desconforto, enquanto que os animais do grupo 1 mantiveram sinais leves aos 21 dias e ausente apenas aos 28 dias de observação (FIGURA 5).



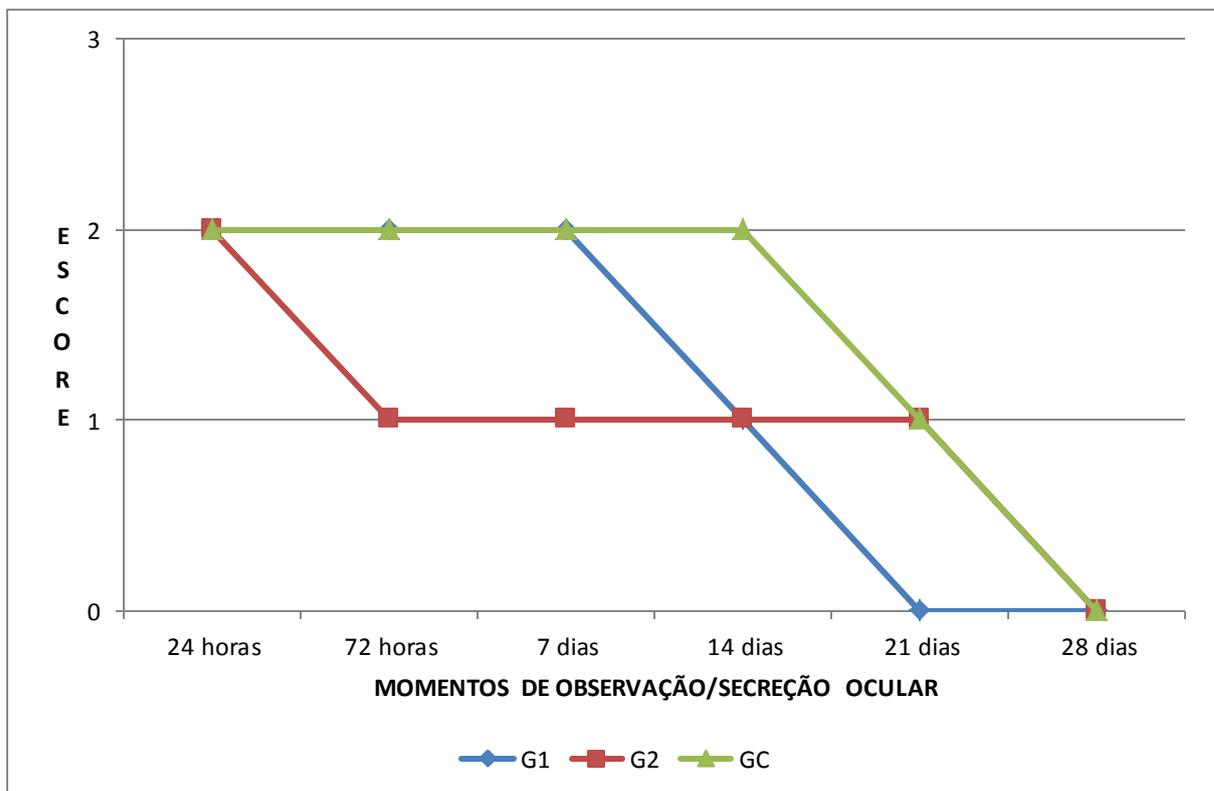
**Figura 5:** Representação gráfica da evolução clínica da fotofobia e blefarospasmo em animais submetidos à ceratectomia. G1: grupo representando os animais submetidos à ceratectomia e tratado com PRP pela via subconjuntival; G2: grupo representando animais submetidos à ceratectomia e tratados com PRP pela via tópica. GC (grupo controle): animais submetidos à ceratectomia que não receberam tratamento.

Nota-se que a intensidade da fotofobia e do blefarospasmo é igual no 1º dia de pós-operatório para todos os grupos, o que demonstra que o desconforto neste momento é provocado pela ceratectomia e consequente estimulação e exposição dos terminais nervosos presentes na superfície da córnea desepitelizada.

A secreção ocular mostrou-se moderada em todos os grupos no primeiro dia de observação. O G2 apresentou secreção leve no intervalo observado entre 72 horas e 21 dias,

sendo que a mesma estava ausente aos 28 dias. A secreção ocular manteve-se moderada até o 7º dia no G1, diminuindo para índices leves aos 14 dias e ausente a partir do 21º dia de observação. Já os animais do grupo controle apresentaram secreção moderada até o 14º dia, leve aos 21 dias e ausente aos 28 dias de pós-operatório. O tipo predominante de secreção foi mucoso, característico dos processos inflamatórios decorrentes de traumas da superfície ocular; não tendo sido observado secreção purulenta característica de infecção ao longo do período de observação, em nenhum dos animais (FIGURA 6).

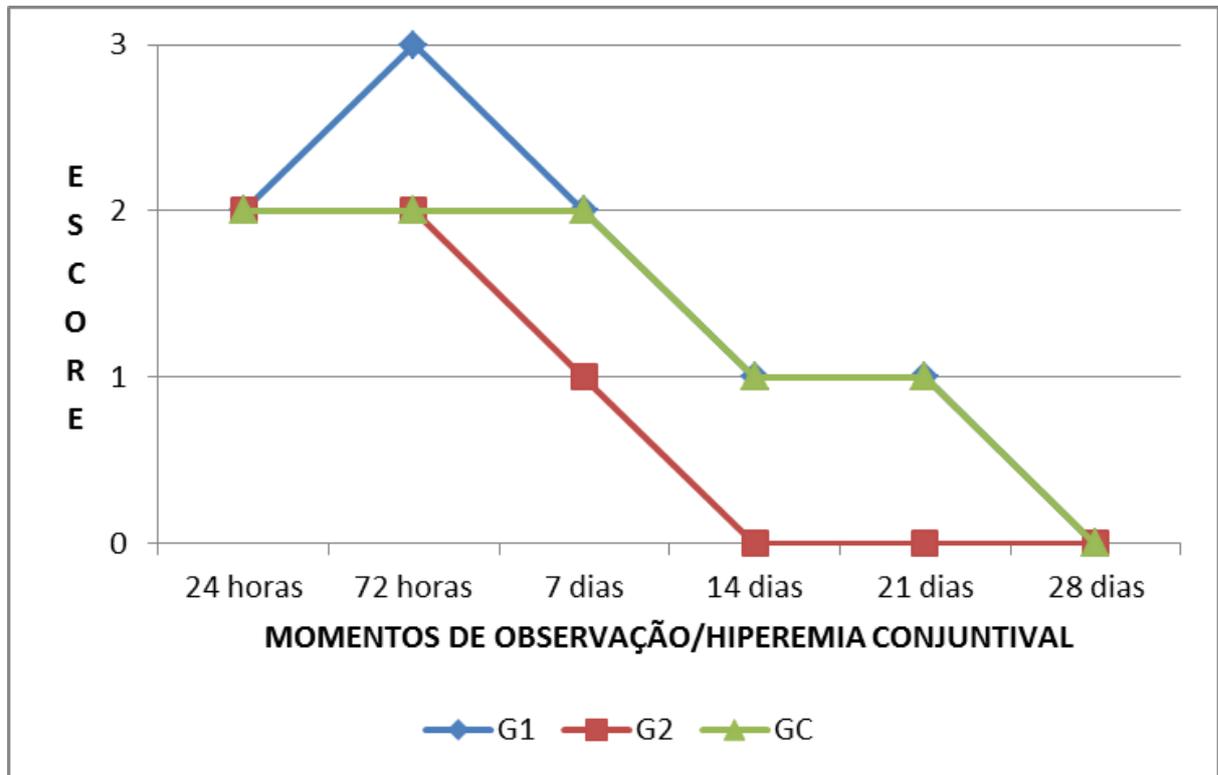
A inflamação, provocada pelos procedimentos adotados na metodologia, estimula a proliferação das células caliciformes da conjuntiva, o que provoca aumento na produção da secreção mucosa, o que justifica a evolução clínica deste parâmetro.



**Figura 6:** Representação gráfica da evolução clínica da secreção ocular em animais submetidos à ceratectomia. G1: grupo representando os animais submetidos a ceratectomia e tratado com PRP pela via subconjuntival; G2: grupo representando animais submetidos à ceratectomia e tratados com PRP pela via tópica. GC (grupo controle): animais submetidos à ceratectomia que não receberam tratamento.

Observou-se hiperemia conjuntival moderada nos animais do grupo 1, após 24 horas do início do tratamento (FIGURA 11), a qual progrediu para intensa nas 72 horas seguintes e assim seguindo para leve entre o 14º e o 21º dia, estando ausente aos 28 dias. O grupo 2 (G2) passou do nível moderado que apresentava nas primeiras 24 horas, para leve entre 72 horas

(FIGURA 18) e 7 dias (FIGURA 19), estando ausente a partir do 14º dia (FIGURA 20). O grupo controle manteve níveis moderados de hiperemia conjuntival até o 7º dia, diminuindo, então, no 14º dia, para o nível leve, e mantendo-se assim até o 21º dia, quando registrou-se ausência deste parâmetro aos 28 dias (FIGURA 7).



**Figura 7:** Representação gráfica da evolução clínica da hiperemia conjuntival em animais submetidos à ceratectomia. G1: grupo representando os animais submetidos a ceratectomia e tratado com PRP pela via subconjuntival; G2: grupo representando animais submetidos à ceratectomia e tratados com PRP pela via tópica. GC (grupo controle): animais submetidos à ceratectomia que não receberam tratamento.

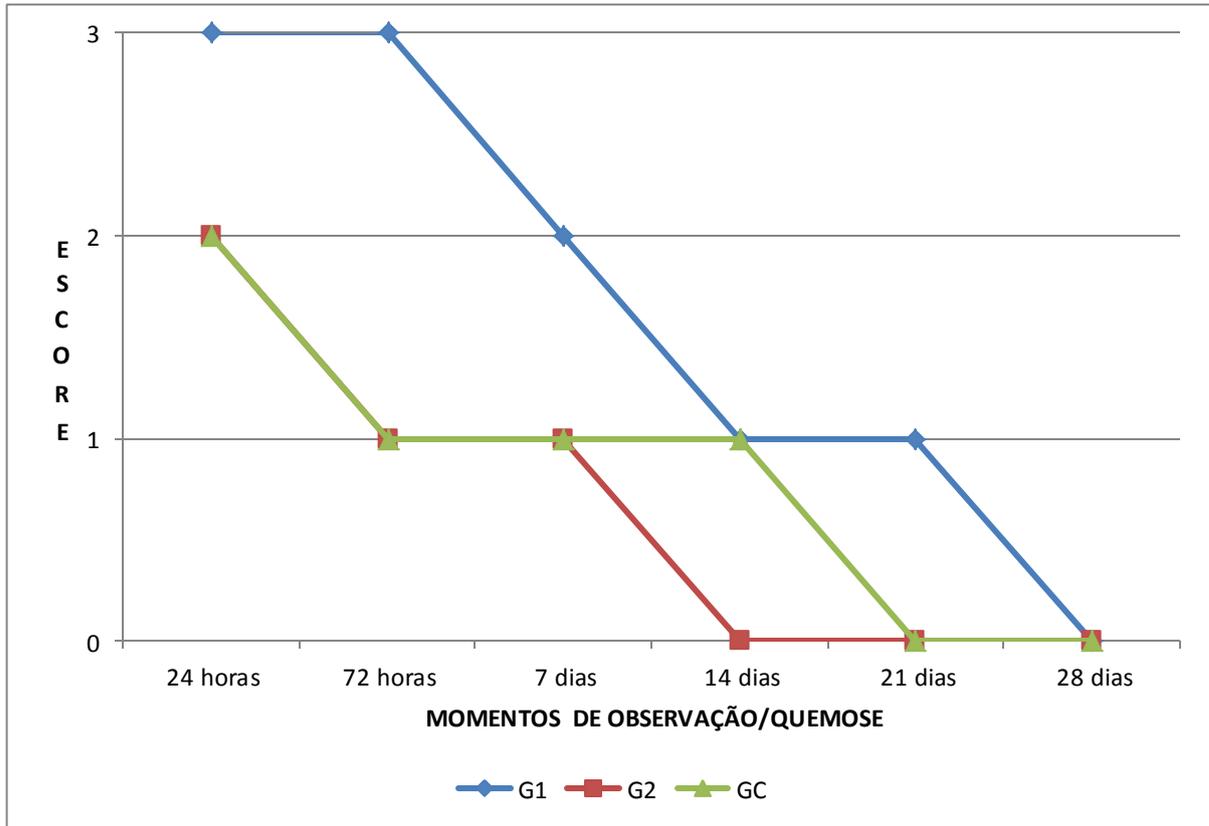
A hiperemia conjuntival reflete diretamente a intensidade da resposta inflamatória local, sendo consequência da liberação dos fatores vasoativos na superfície ocular em decorrência do dano celular direto provocado pelo procedimento adotado na realização da ceratectomia (FIGURA 7).

A quemose (FIGURA 8) apresentou-se de forma intensa no grupo 1 nas primeiras 72 horas de observação, quando então evoluiu para índices moderados aos 7 dias e leve aos 14 dias, mantendo-se assim até 21 dias, estando ausente ao final das observações. O grupo 2 e o grupo controle evoluíram de forma simétrica até o 7º dia (FIGURA 19). Ambos manifestaram quemose moderada nas primeiras 24 horas (FIGURA 20) e leve entre as primeiras 72 horas (FIGURA 21) e 7 dias de pós-operatório. A partir desse momento, o grupo 2 apresentou diminuição progressiva da quemose, a qual já não mais estava presente a partir do 14º dia de

observação (FIGURA 22). Já o grupo controle manteve níveis moderados até o 14º dia, estando ausente a partir do 21º dia de pós-operatório.

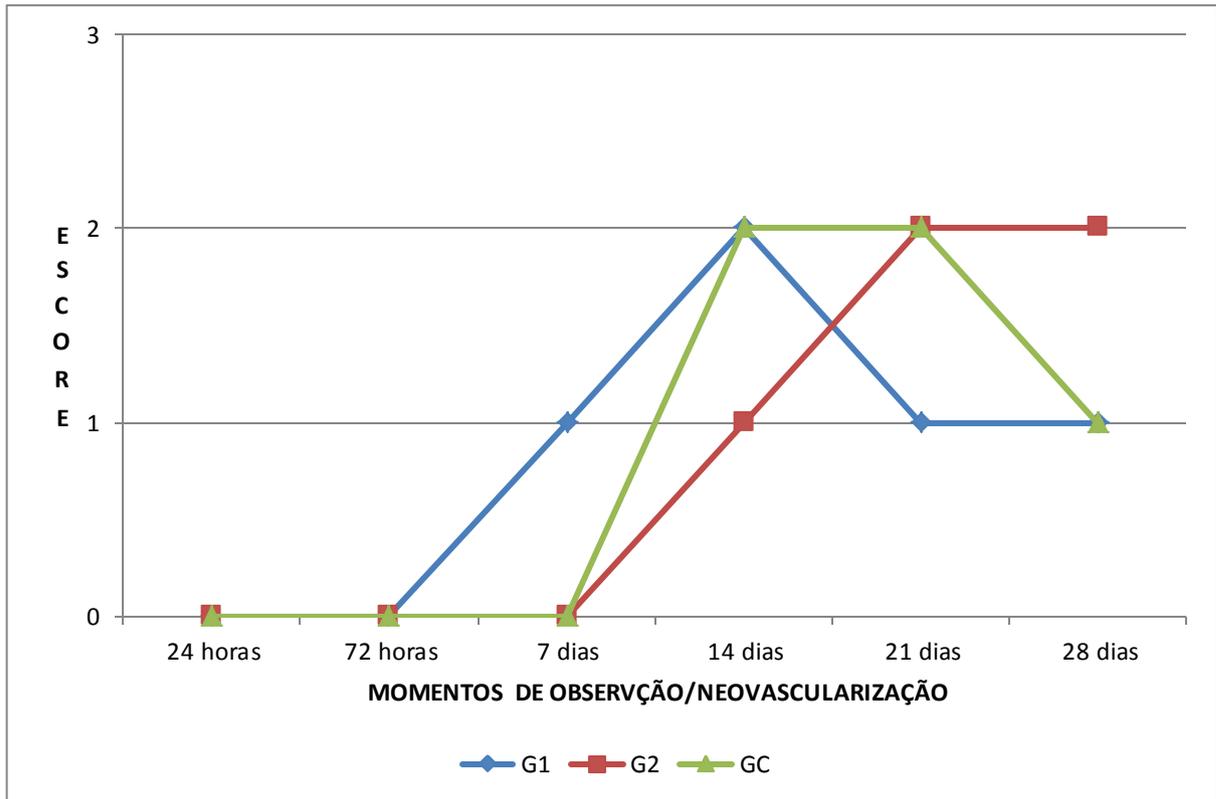
A quemose, bem como a hiperemia conjuntival, são reflexos da intensidade da inflamação, sendo causados pela liberação dos fatores vasoativos após a lesão da superfície ocular. Os fosfolipídios das membranas das células lesionadas são transformados em ácido araquidônico, mediador universal do processo inflamatório, pela ação da enzima fosfolipase A2. A partir desta reação, o ácido araquidônico é transformado em fatores vasoativos pela via da ciclooxigenase. Desta forma, quanto mais rápido se der o processo de reparação, menores serão os índices de inflamação representados pelos sinais de quemose e hiperemia conjuntival (FIGURA 23). A persistência destes sinais por um período maior, no grupo 1, se explica pela frequente aplicação do PRP pela via subconjuntival, já que para isto é necessário inocular 0,5 mL do concentrado plaquetário na intimidade do tecido conjuntival, promovendo expansão tecidual e desarranjo celular, além do aspecto invasivo no procedimento de aplicação do concentrado plaquetário que exige a perfuração do local de aplicação com agulha hipodérmica (13 x 0,3 mm). Apesar disto, observou-se que o volume aplicado por esta via era absorvido rapidamente e que, mesmo após oito aplicações, em intervalos de 72 horas, não foram observados efeitos colaterais deste procedimento no local de depósito.

Não se observou neovascularização corneana em nenhum dos grupos nas primeiras 72 horas de avaliação. Aos 7 dias o grupo 1 apresentou leve neovascularização que evoluiu para índices moderados aos 14 dias (FIGURA 9), regredindo novamente para níveis leves aos 21 dias, o qual se manteve até o final das observações. A neovascularização no grupo 2 teve início apenas aos 14 dias, progredindo para índices moderados aos 21 dias (FIGURA 20) mantendo-se assim até o 28º dia (FIGURA 21). Para o grupo controle (GC) a neovascularização esteve ausente até o 7º dia, momento em que houve um aumento dos índices para moderado aos 14 dias, mantendo-se assim até o 21º dia, quando se observou uma redução desses índices para leve até o 28º dia (FIGURA 9).



**Figura 8:** Representação gráfica da evolução clínica da quemose em animais submetidos à ceratectomia. G1: grupo representando os animais submetidos à ceratectomia e tratado com PRP pela via subconjuntival; G2: grupo representando animais submetidos à ceratectomia e tratados com PRP pela via tópica. GC (grupo controle): animais submetidos à ceratectomia que não receberam tratamento.

A neovascularização da córnea, como observado neste estudo, também está relacionada à disfunção das células germinativas, as quais foram eliminadas durante a realização da ceratectomia, deixando de atuar como o principal meio de reparação do epitélio corneano lesionado e de barreira contra a penetração das células conjuntivas e da proliferação vascular (HUANG; TSENG, 1991; TSENG et al., 1996).



**Figura 9:** Representação gráfica da evolução clínica da neovascularização em animais submetidos à ceratectomia. G1: grupo representando os animais submetidos a ceratectomia e tratado com PRP pela via subconjuntival; G2: grupo representando animais submetidos à ceratectomia e tratados com PRP pela via tópica. GC (grupo controle): animais submetidos à ceratectomia que não receberam tratamento.

Independentemente da metodologia aplicada aos modelos experimentais de cicatrização da córnea, a cinética da resposta inflamatória do tecido corneano é semelhante em seu início. Após a remoção epitelial, diferentes citocinas, além dos fatores vasoativos comuns à inflamação, são secretadas, entre elas a interleucina 1 (IL- 1), responsável pela mediação da resposta celular imediata. O fator de necrose tumoral alfa (TNF  $\alpha$ ), secretado pelas células epiteliais e pela glândula lacrimal promove intensa quimiotaxia, atraindo ceratócitos vizinhos à área lesionada (NETTO et al., 2005).

Ainda na fase aguda, citocinas do sistema ligante FAS, fator medular ósseo 2 e 4 (FMO-2 e 4), fator de crescimento epitelial (FCE) e fator de crescimento plaquetário (FCP) são secretadas no local. Citocinas e fatores de crescimento estão normalmente presentes nas células epiteliais, sendo importantes na reparação da córnea. A ruptura da barreira epitelial após o trauma estimula a secreção destas substâncias em quantidades mais expressivas, permitindo a ampla exposição das citocinas ao tecido estromal, onde as mesmas se ligam a receptores específicos nos ceratócitos. A inativação do fator traumático e a reparação da lesão

resultam na diminuição da síntese de fatores vasoativos e inflamatórios, contribuindo para a regressão dos sinais de inflamação (HONG et al., 2001).

A inflamação prolongada e mais intensa no grupo tratado com PRP pela via subconjuntival (G1), quando comparada com o grupo que recebeu PRP pela via tópica (G2), pode ser explicada pela irritação provocada quando de repetidas agressões das injeções subconjuntivais, ocasionando assim maior síntese das citocinas envolvidas nos fenômenos vasoativos (SOLOMON et al., 2001).

A avaliação da progressão da epitelização dos ferimentos permitiu registrar que aos 14 dias o grupo que recebeu o PRP pela via subconjuntival apresentou uma taxa de aproximadamente 50% de superfície epitelizada, principalmente na porção superior, próxima à área de aplicação do PRP. Aos 21 dias observou-se que houve cerca de 90% de epitelização, e aos 28 dias não mais se observou a presença do ferimento (FIGURA 16). O grupo tratado com PRP pela via tópica apresentou cicatrização mais rápida e de forma mais regular que o Grupo 1. Aos sete dias, observou-se aproximadamente 50% de superfície epitelizada, notando-se tingimento pela fluoresceína apenas na região central. Aos 14 dias, cerca de 90% da área de ceratectomia já havia sido coberta por novo tecido epitelial e, no 21º dia, as córneas já se mostraram inteiramente epitelizadas. Já o grupo controle apresentou início de epitelização apenas no 7º dia, com aproximadamente 50% da área epitelizada aos 14 dias; 90% aos 21 dias e completa epitelização aos 28 dias.

Observou-se que a aplicação do PRP em ambos os grupos tratados antecipou os fenômenos reparativos, quando comparado com grupo controle. Enquanto que, para o grupo 2, a cicatrização aconteceu entre o 14º e 21º dia, no grupo 1 a mesma se completou entre o 21º e 28º dia; sendo que, no grupo controle, observou-se completa epitelização apenas no 28º dias de observação.

Hartwig et al. (2004), estudou a capacidade de epitelização da córnea utilizando um preparado de fatores de crescimento produzido a partir de concentrados de plaquetas. A aplicação tópica de plasma na forma de colírio foi avaliada para acelerar a cura de defeitos persistentes da superfície ocular. Supõe-se que os fatores de crescimento presentes no plasma auxiliem no processo de cicatrização da ferida. O plasma rico em plaquetas é farto em fatores de crescimento e facilmente obtido como concentrado a partir de bancos de sangue. Por conseguinte, as preparações de fatores de crescimento a partir deste plasma, poderão servir como um novo e superior agente terapêutico para a cicatrização da córnea. Os resultados obtidos nesse experimento permitiram aos autores sugerir que, devido ao seu elevado teor de

fatores de crescimento, o PRP poderá ser uma nova opção de tratamento para os ferimentos da superfície ocular.

Conforme Bazan e Ottino (2002), o fator ativador de plaquetas (PAF) é um potente lipídio bioativo gerado na córnea após lesão e cujas ações são mediadas através de receptores específicos. Estudos realizados em laboratório demonstraram que as interações do PAF com o seu receptor ativam vários sinais transmembrana envolvidas na inflamação, cicatrização de feridas e apoptose. Ocorre uma ampla variedade de respostas deste lipídio, o que implica em muitas respostas da córnea após um estímulo patológico. O PAF é capaz de induzir a expressão de genes específicos envolvidos na remodelação de componentes da matriz extracelular, tais como metaloproteinases, uroquinase, ativador do plasminogênio e inibidores seletivos de metaloproteinases. Estas enzimas, quando expressas, podem levar à ulceração da córnea ou potencializar ferimentos já existentes. A exposição contínua ao PAF durante a inflamação prolongada produz aumento da apoptose de ceratócitos e inibição da adesão epitelial para a membrana basal que, de acordo com as observações, não é inibida pela ação de fatores de crescimento presentes no local. A adição de uma fonte exógena de fatores de crescimento parece ter potencial de suprimir a ação deletéria do PAF durante a cicatrização de feridas crônicas e em ferimentos recorrentes da córnea.

Resultados semelhantes aos encontrados por Bazan e Ottino (2002) foram encontrados pela presente pesquisa, quando se observou que a aplicação do concentrado plaquetário antecipou os fenômenos reparativos. A completa epitelização do grupo tratado pela via tópica, anteriormente ao observado nos animais que receberam o mesmo produto pela via subconjuntival, sugere que o tratamento proposto para o grupo 2 inibiu de forma mais eficiente a apoptose dos ceratócitos, ao mesmo tempo que estimulou a proliferação de novas células epiteliais responsáveis pelo recobrimento do ferimento e promoveu a diminuição da inflamação no local. Isto permitiu a antecipação da inibição do PAF com consequente interrupção da apoptose de ceratócitos e estímulo à adesão do epitélio recém formado sobre a superfície da córnea lesionada. Assim, sugere-se que o tratamento proposto para o grupo 2 contribuiu para suprimir a ação deletéria do PAF pela adição complementar de fatores de crescimento provenientes do concentrado plaquetário no modelo de cicatrização da córnea com ablação da células germinativas do limbo.

Ma, Bazan e Bazan (2004), ao avaliar a ação do fator ativador de plaquetas na cicatrização de feridas epiteliais da córnea, descreveu que este fator plaquetário classificado como lipídio bioativo induz a expressão de genes envolvidos no remodelamento da matriz

extracelular e que os efeitos deletérios como indução à apoptose de ceratócitos pode ser inibida pela ação de fatores de crescimento presentes nos concentrados plaquetários.

Com isto, como verificado na presente pesquisa, justifica-se a capacidade do plasma rico em plaquetas acelerar o processo de cicatrização. Porém, como o PAF aumenta a expressão de genes responsáveis pela neovascularização corneana, deve-se estabelecer um limite para aplicação dos concentrados plaquetários, com o objetivo de se evitar o efeito sinérgico do PAF e dos fatores de crescimento presentes no PRP, em estimular uma neovascularização exacerbada da córnea, o que contribui para diminuir a transparência da mesma.

Utilizando soro para aplicação tópica, Hartwig et al. (2004) observaram uma cicatrização acelerada das feridas da superfície ocular. Supõe-se que os fatores de crescimento, vitaminas e fibronectina presentes no soro estimulam a proliferação de células epiteliais da córnea. Estudou-se o soro e plasma fresco congelado, investigando a composição de fatores epiteliotróficos e seu efeito sobre as células epiteliais da córnea. O sangue total foi obtido a partir de cinco doadores. O soro e plasma fresco congelado foram preparados e as concentrações de fator de crescimento epitelial, fator de crescimento derivado das plaquetas, o fator de crescimento transformante-beta 1, fibronectina e a vitamina A foram determinados. Células epiteliais íntegras da córnea humana foram utilizadas para investigar o crescimento, migração e diferenciação, em resposta a ambos os produtos sanguíneos. Foram encontradas diferenças significativas em relação à composição do soro e plasma fresco congelado. No soro, a concentração de fatores de crescimento, migração e diferenciação celular foram significativamente superiores às do plasma fresco congelado. A capacidade epiteliotrófica dos produtos do sangue depende da composição de fatores de crescimento e vitaminas. A capacidade epiteliotrófica superior de soro pode ser justificada devido à maior concentração de mediadores de proliferação, tais como fator de crescimento epitelial e fator de crescimento derivado de plaquetas e o seu maior teor de vitamina A.

Comparando estes resultados com aqueles obtidos pela presente pesquisa, pode-se inferir que o plasma rico em plaquetas agrega uma concentração de citocinas responsáveis pela antecipação dos fenômenos reparativos da córnea, quando utilizado pela via tópica. Porém, há de se considerar que a utilização destes compostos derivados do sangue, após a conclusão da cicatrização do ferimento, expõe a superfície ocular a permanente ação dos fatores de crescimento que possuem ação angiogênica, favorecendo o aumento da vascularização da córnea nessas situações.

Alio et al. (2007a), utilizaram plasma rico em plaquetas como terapia de úlceras indolentes da córnea. O experimento investigou, comparativamente, o uso de plasma rico em plaquetas autólogo e tratamento com um coágulo sólido de plasma rico em plaquetas autólogo combinado com o transplante de membrana amniótica em córneas perfuradas. Os resultados obtidos mostraram que o plasma rico em plaquetas autólogo promoveu a cicatrização de úlceras corneanas indolentes, mesmo em olhos ameaçadas por perfuração da córnea e foi acompanhada por uma redução da dor e da inflamação. Nos olhos tratados com a membrana amniótica, observou-se que a mesma funcionou como adjuvante no processo de cicatrização, sendo possível concluir que, embora a inflamação e os sintomas de dor tenham melhorado em todos os pacientes, houve um número maior de animais com resultados positivos com o uso da membrana amniótica.

Eurides et al. (2010), ao testarem o efeito do concentrado de plaquetas heterólogas na cicatrização de córnea em coelhos, observaram que decorridos 30 dias de pós operatório, 2 de um total de 6 animais tratados apresentavam coloração positiva para fluoresceína indicando a presença do ferimento. Já no grupo controle, no mesmo período, 3 de um total de 06 animais apresentaram a presença do ferimento. Com relação à opacidade da córnea, os autores não observaram diferenças ao final do experimento, entre o grupo tratado e o grupo controle. As observações clínicas e análises microscópicas permitiram aos autores concluir que o concentrado de plaquetas heterólogas estimula o processo de cicatrização da córnea de coelhos, com diminuição das áreas de necrose e opacidade corneanas.

Ao comparar os resultados acima com o presente trabalho, observa-se que a utilização do PRP homólogo apresenta melhor capacidade de antecipar os fenômenos reparativos, visto que, tanto a aplicação pela via tópica; quanto pela via subconjuntival, promoveram a cicatrização em menores períodos de observação, quando comparados com o grupo controle. Além da origem do PRP, existiu diferença na metodologia em relação à frequência da aplicação tópica dos concentrados de plaquetas utilizados nos 2 experimentos, visto que enquanto o PRP heterólogo foi aplicado na forma de gel com frequência de 2 aplicações diárias, o PRP homólogo foi utilizado na forma líquida, com 4 aplicações diárias. Com isto, pode se suspeitar que a forma líquida, aplicada 4 vezes ao dia, manteve uma concentração mais adequada de fatores de crescimento para a promoção da cicatrização.

O efeito positivo sobre a reepitelização corneana diante da resposta inflamatória e formação de cicatriz têm sido relatado com o uso de membrana amniótica humana (MAH), pois a mesma possui um tecido biológico complexo, constituído de proteínas antiangiogênicas e anti-inflamatórias, e tem demonstrado efeitos benéficos em limitar o dano ocular após

injúrias à superfície ocular. Parte estes efeitos são atribuídos ao ácido hialurônico, que é um polissacarídeo linear de alto peso molecular, conhecido por reduzir a formação de cicatriz por inibir a migração linfocitária, a proliferação e quimiotaxia, a fagocitose granulocítica e a degranulação, além da motilidade do macrófago.

Em estudo publicado sobre a utilização do líquido amniótico tópico em doenças da superfície ocular, Quinto et al. (2008), demonstram que a cicatriz corneana pode ser reduzida através da aplicação de MAH, após foto-ablação da córnea, sugerindo que o ácido hialurônico presente na membrana atua na diferenciação, motilidade e aderência celular, com efeitos antiinflamatórios e capacidade de aumentar a regeneração tecidual através da retenção de grandes quantidades de água.

Lee e Kim (1996) avaliaram o efeito da aplicação tópica do líquido amniótico humano (LAH) na recuperação da sensibilidade corneana, na regeneração nervosa e na formação de cicatriz em córnea após ceratectomia fotorrefrativa com “excimer laser” em 18 coelhos. Após a ceratectomia, o LAH, foi topicamente aplicado no olho direito (grupo LAH) e solução salina balanceada (BSS) foi aplicados no olho esquerdo (grupo BSS), ambos administrados cinco vezes ao dia pelo período de um mês. Relatou-se que a sensibilidade corneana se recuperou em 75% no grupo LAH e 63% no grupo BSS em uma semana. Em síntese, ficou demonstrado que o restabelecimento da sensibilidade e da regeneração nervosa foram mais rápidos no grupo LAH. Estes achados sugerem que os fatores do LAH ajudaram a restabelecer a sensibilidade corneana, regeneração nervosa e reduzir a formação de cicatrizes corneanas.

Estudos envolvendo a utilização de células tronco como método terapêutico para as doenças oculares também têm sido empreendidos. As principais características das células-tronco são: capacidade de se multiplicar, mantendo seu estado indiferenciado e proporcionando uma reposição ativa de sua população de maneira constante nos tecidos; além da capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares. Desta forma, acredita-se que células-tronco presentes nos diferentes tecidos tenham papel regenerativo quando estes sofrem uma lesão ou injúria (BYDLOWASKI et al., 2009).

De acordo com Gomes et al. (2009), a terapia da superfície ocular com células tronco tem sido particularmente citada no tratamento de lesões que provocam deficiência límbica, com destruição das células germinativas presentes nesta região, a qual forma a 1ª linha de renovação do epitélio corneano. A deficiência límbica é caracterizada pela conjuntivalização, que pode ser definida como a invasão do epitélio conjuntival sobre a córnea. Este processo é acompanhado por graus variáveis de alterações corneanas, como neovascularização, inflamação, erosões recorrentes, defeitos epiteliais persistentes, destruição da membrana basal

do epitélio e cicatrização estromal. Frequentemente, estas alterações estão associadas à diminuição da acuidade visual, fotofobia e desconforto ocular. O melhor tratamento para essa afecção não é conhecido e possibilidades variam em casos uni ou bilaterais. Entre os tratamentos disponíveis, o transplante de limbo autólogo ou alógeno é um dos mais utilizados. Para melhorar os resultados dos transplantes alógenos, alguns pesquisadores utilizam o transplante de epitélio da córnea cultivado em laboratório pela expansão ex vivo de células-tronco epiteliais límbicas. Mas, devido à limitada disponibilidade de tecido autólogo do limbo e o risco de complicações associadas à imunossupressão em transplante de tecido alógeno, pesquisas de outras opções de células-tronco cultivadas ex vivo têm sido descritas em fase experimental e clínica.

Brunelli et al. (2007), avaliaram os efeitos do transplante de células tronco autógenas do limbo esclerocorneano de cães sobre lesões córneo-limbais. A destruição do limbo resultou em completa excisão das células tronco com perda da transparência corneana. O transplante do limbo evitou a conjuntivalização na área em que foi realizado. Os animais do grupo controle manifestaram conjuntivalização em 360° e vascularização corneana. Ao exame microscópico, em nenhum dos períodos foi possível distinguir o enxerto do epitélio corneal normal. O transplante autógeno foi eficiente em possibilitar a melhoria da transparência da córnea, sem intercorrências oculares. De acordo com os autores, a utilização do cão como modelo para destruição do limbo total é viável e fiável nas reparações oculares de feridas graves de superfície. A análise dos resultados permitiu concluir que o transplante autógeno de células tronco do limbo foi eficaz em restaurar a transparência da córnea sem complicações oculares.

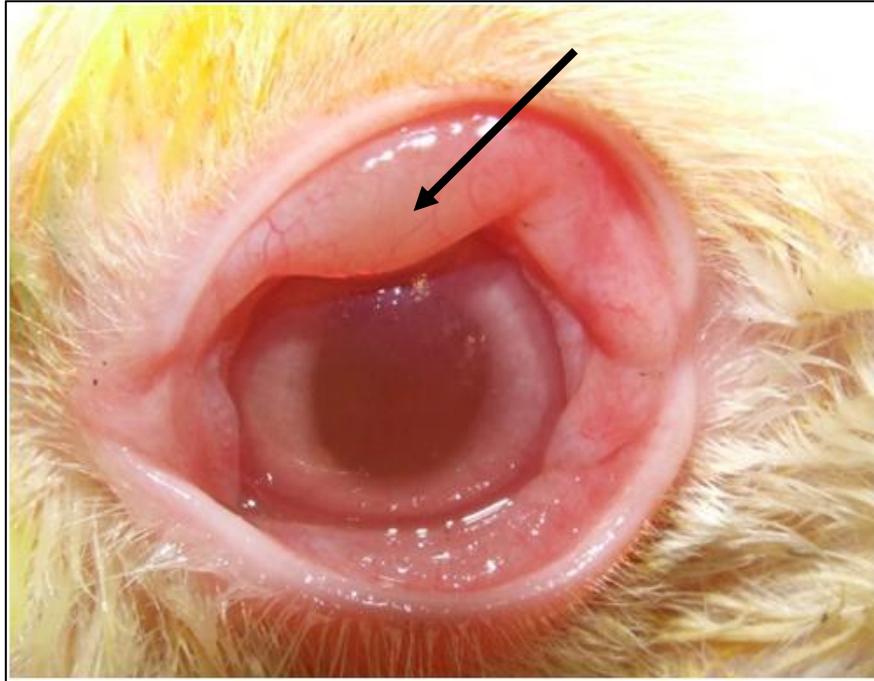
O método adotado na pesquisa de que se trata este documento promoveu a ablação das células germinativas do limbo, também conhecidas como células tronco limbais. Os resultados obtidos indicam que a ausência destas células influencia diretamente na intensidade da inflamação, visto que retarda o início do processo de epitelização da córnea e na fase mais crônica permite a vascularização corneana, como atestado por Brunelli et al. (2007).

O estudo comparativo entre a aplicação tópica e subconjuntival do concentrado plaquetário contribuiu para acelerar o processo de epitelização da córnea mesmo na ausência das células germinativas do limbo. O grupo 2 demonstrou antecipação dos fenômenos reparativos em comparação aos grupos 1 e controle, o que pode ser explicado pela manutenção de concentrações adequadas de fatores de crescimento derivados das plaquetas na superfície ocular, pelo período necessário para complementação do recobrimento epitelial. As aplicações subconjuntivais, em intervalos de três dias, não demonstraram o mesmo efeito

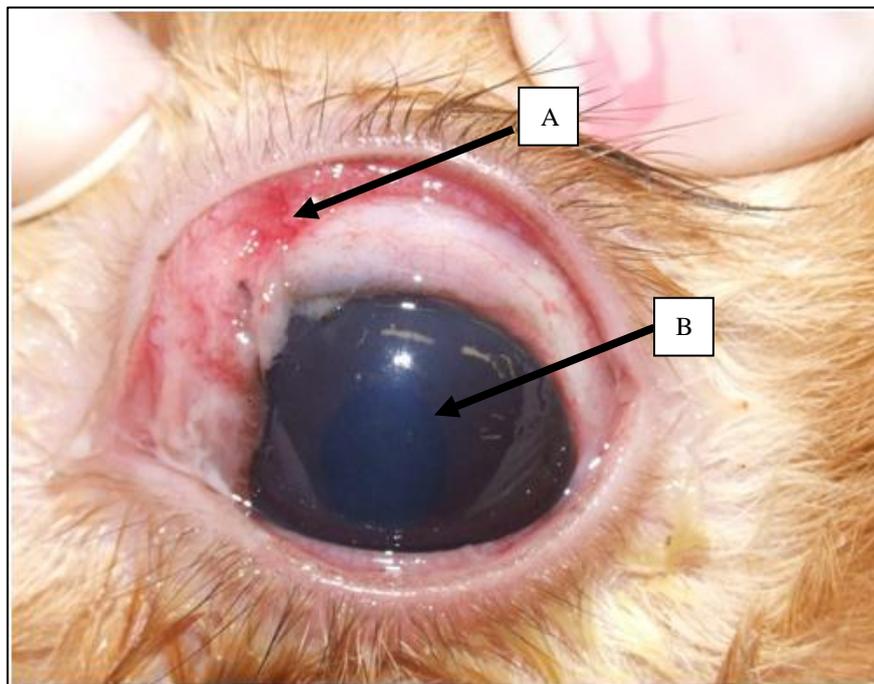
sobre a velocidade de epitelização da córnea no modelo proposto, visto que o período necessário para completa epitelização se aproximou daqueles observados no grupo controle. Há de se considerar que apesar dos resultados não terem demonstrado uma importante antecipação dos fenômenos reparativos neste grupo, observou-se boa tolerância à aplicação do concentrado plaquetário homólogo pela via subconjuntival, visto que não se observou, ao longo de todo o experimento, reações indesejáveis no local de depósito do PRP.

Alio et al. (2007b), investigaram os efeitos do PRP tópico no tratamento de ceratoconjuntivite seca. Dezoito pacientes sintomáticos para olho seco foram tratados através da aplicação tópica do concentrado plaquetário e avaliados por um mês. Observou-se o desaparecimento dos sintomas subjetivos e a diminuição da inflamação, entre outros fatores. Os autores concluíram que houve melhora significativa no aspecto clínico dos olhos tratados, com diminuição da opacificação, melhora na qualidade do filme lacrimal e hiperemia conjuntival. A citologia revelou aumento da população das células caliciformes da conjuntiva.

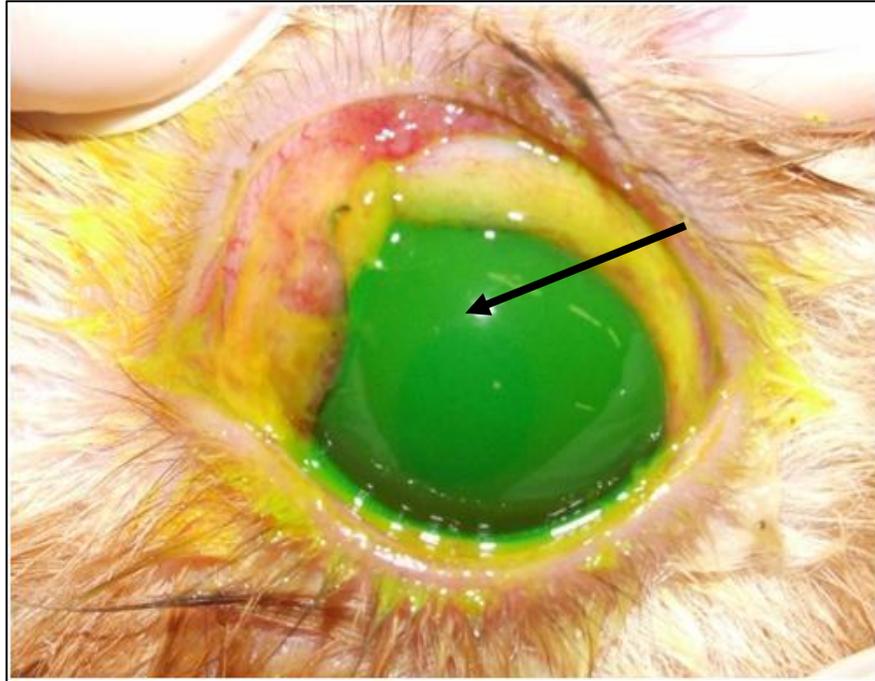
A partir da revisão da literatura, pode-se constatar que os concentrados plaquetários possuem inúmeras indicações terapêuticas para as doenças da superfície do olho. Considerando-se que os ferimentos da córnea constituem a maior causa da perda da visão no homem e no cão, e que as doenças que afetam a produção lacrimal tendem a evoluir de forma progressiva, exigindo tratamento contínuo, o plasma rico em plaquetas se torna um importante aliado na resolução e controle destas doenças.



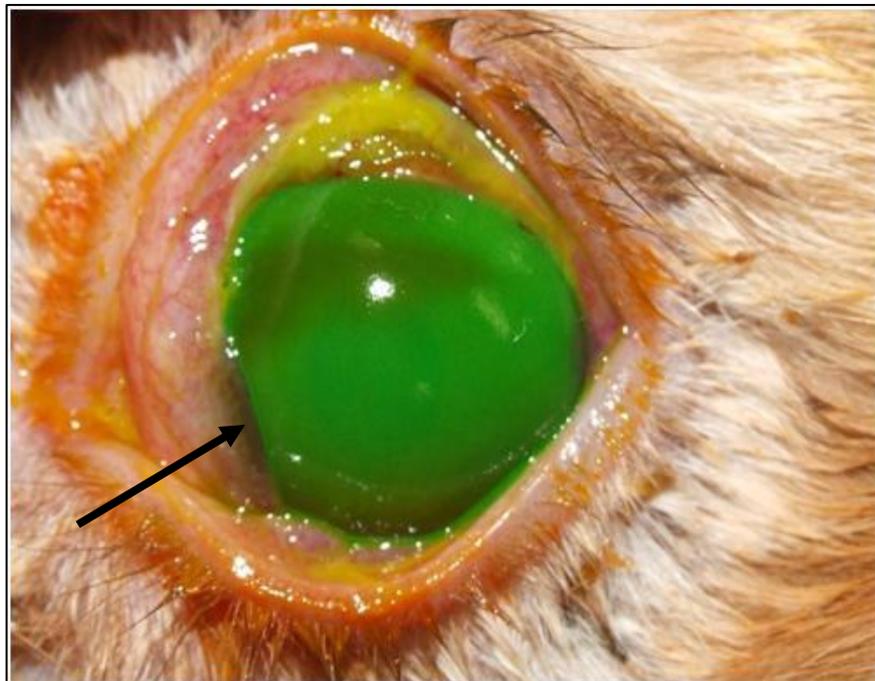
**Figura 10:** Fotografia demonstrando olho submetido à ceratectomia superficial e tratamento com plasma rico em plaquetas pela via subconjuntival. Nota-se a formação da bolha no local de aplicação do concentrado plaquetário após a 1ª aplicação do concentrado plaquetário.



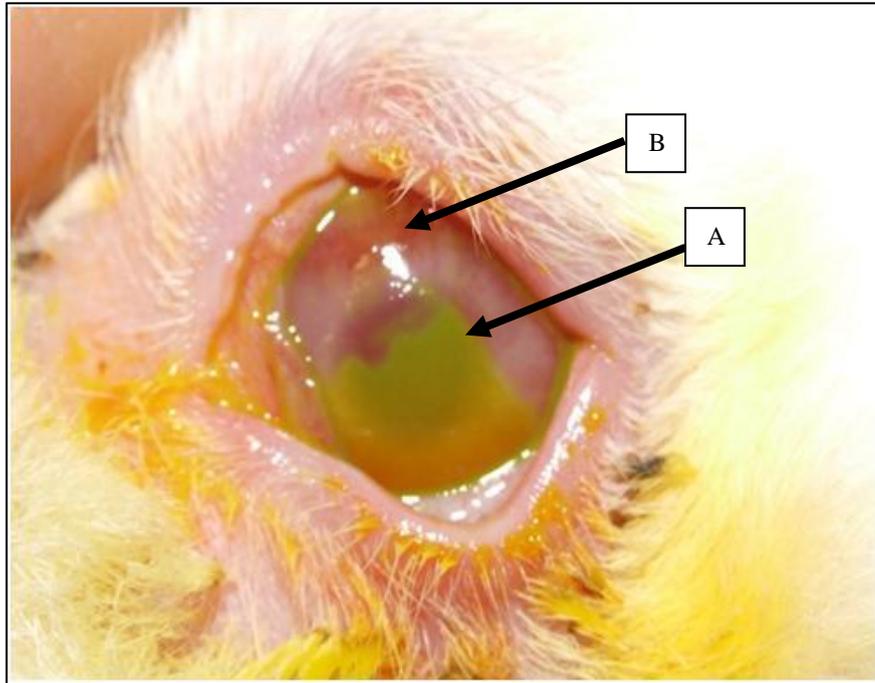
**Figura 11:** Fotografia demonstrando olho submetido à ceratectomia superficial e tratamento com plasma rico em plaquetas pela via subconjuntival, após 24 horas de observação. Nota-se leve edema difuso da córnea (B) e hiperemia conjuntival moderada (A), principalmente no local de aplicação do concentrado plaquetário.



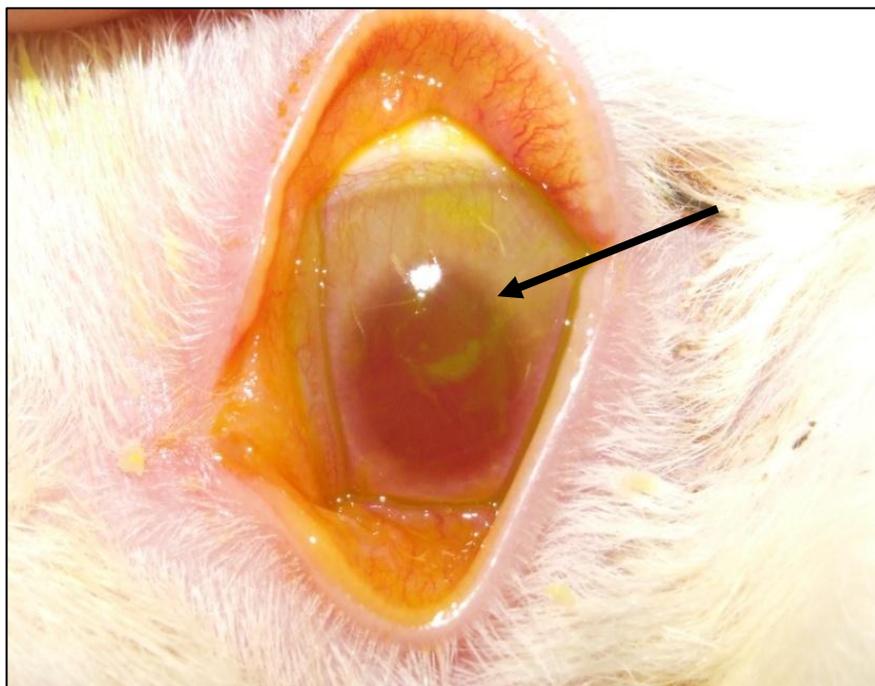
**Figura 12:** Fotografia demonstrando olho submetido à ceratectomia superficial e tratamento com plasma rico em plaquetas pela via subconjuntival, após 72 horas de observação. Nota-se que 72 horas após a realização da ceratectomia e 3ª aplicação subconjuntival do concentrado plaquetário pela via subconjuntival ainda não houve início da epiteliação da úlcera experimental, o que se comprova pela impregnação da fluoresceína sobre toda a superfície corneana.



**Figura 13:** Fotografia demonstrando olho submetido à ceratectomia superficial e tratamento com plasma rico em plaquetas pela via subconjuntival, após 7 dias de observação. Nota-se que 7 dias após a realização da ceratectomia e 3ª aplicação subconjuntival do concentrado plaquetário houve início da epiteliação da úlcera experimental.



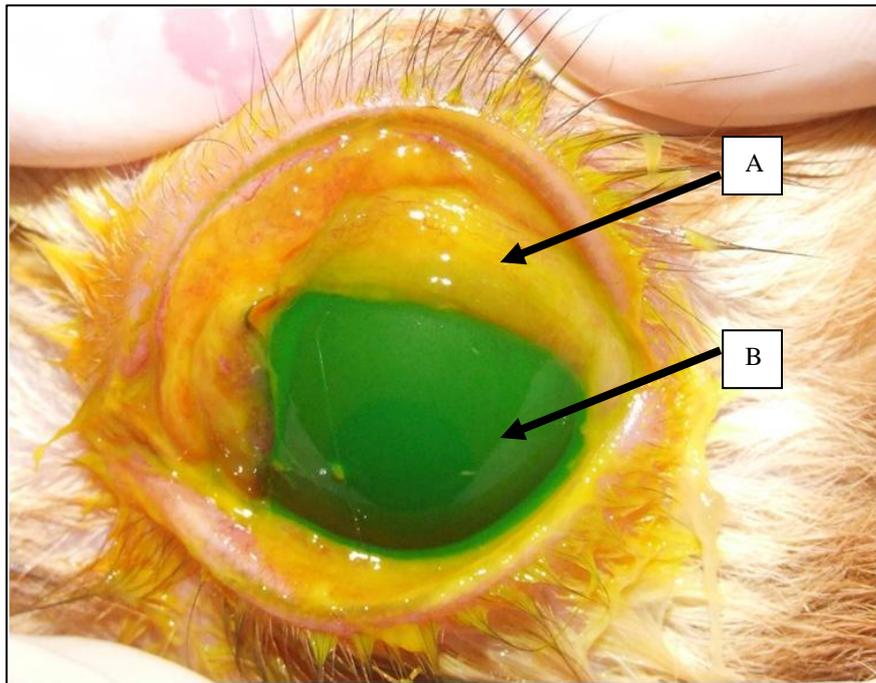
**Figura 14:** Fotografia demonstrando olho submetido à ceratectomia superficial e tratamento com plasma rico em plaquetas pela via subconjuntival, após 14 dias de observação. Nota-se que 14 dias após a realização da ceratectomia e 5ª aplicação subconjuntival do concentrado plaquetário a epiteliação da úlcera experimental já se encontra em estágio avançado (A). Observa-se vascularização da córnea (B), principalmente na região próxima à área de aplicação do concentrado plaquetário.



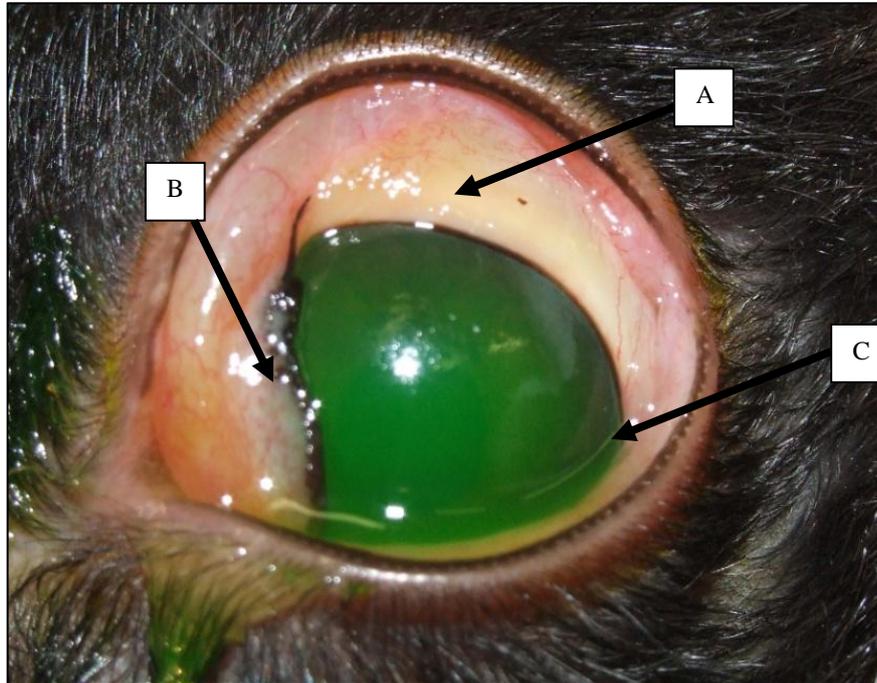
**Figura 15:** Fotografia demonstrando olho submetido à ceratectomia superficial e tratamento com plasma rico em plaquetas pela via subconjuntival, após 21 dias de observação. Nota-se que 21 dias após a realização da ceratectomia e 7ª aplicação subconjuntival do concentrado plaquetário a epiteliação da úlcera experimental já se encontra em estágio final (seta).



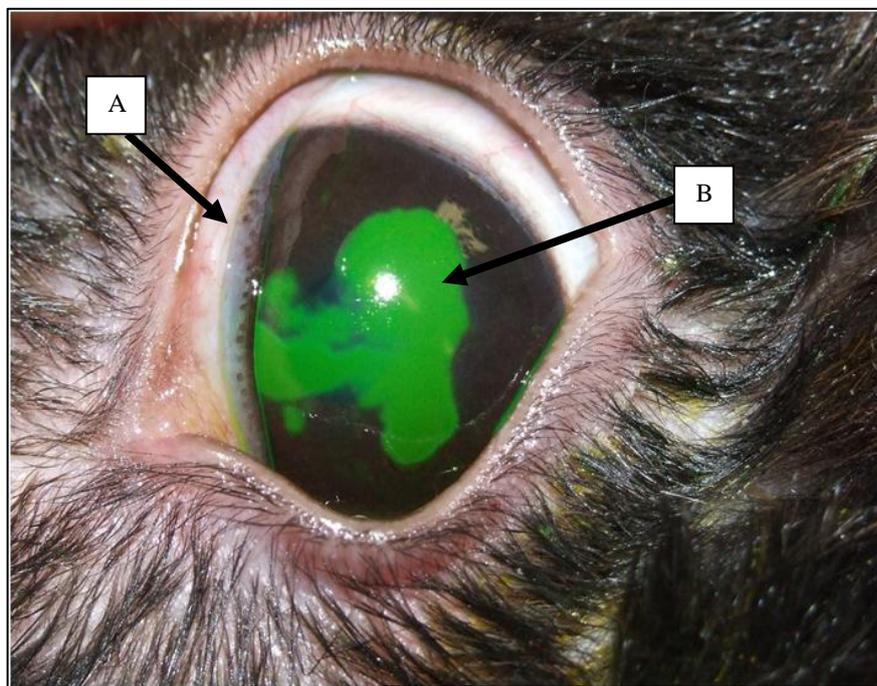
**Figura 16:** Fotografia demonstrando olho submetido à ceratectomia superficial e tratamento com plasma rico em plaquetas pela via subconjuntival, após 28 dias de observação. Nota-se que 28 dias após a realização da ceratectomia e 8ª aplicação subconjuntival do concentrado plaquetário a epiteliação da úlcera experimental já se completou.



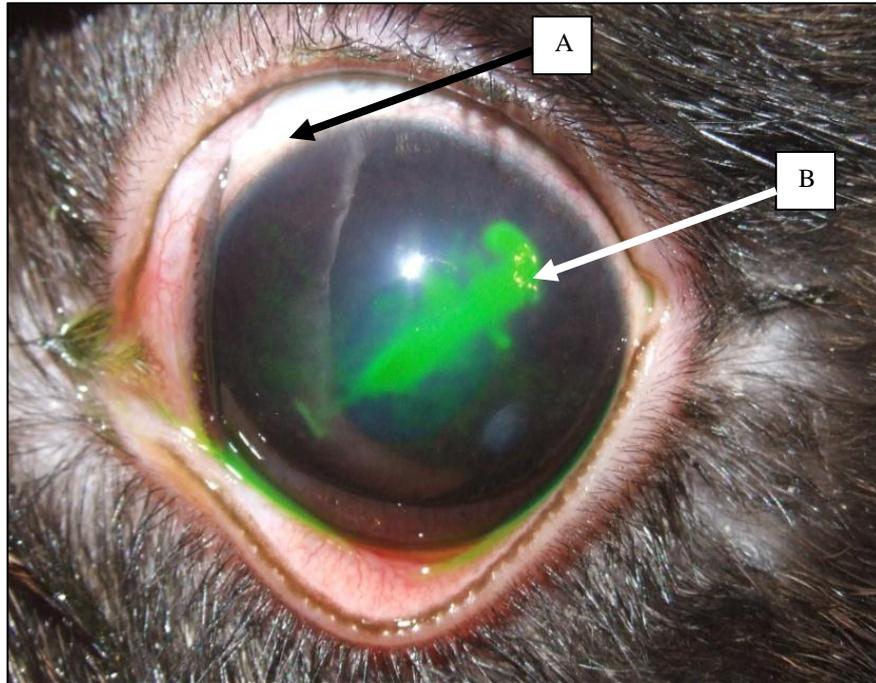
**Figura 17:** Fotografia demonstrando olho submetido à ceratectomia superficial e tratamento com plasma rico em plaquetas pela via tópica, após 24 horas de observação. Nota-se que há quemose moderada (A) e completa impregnação do corante fluoresceína(B) sobre a superfície da córnea.



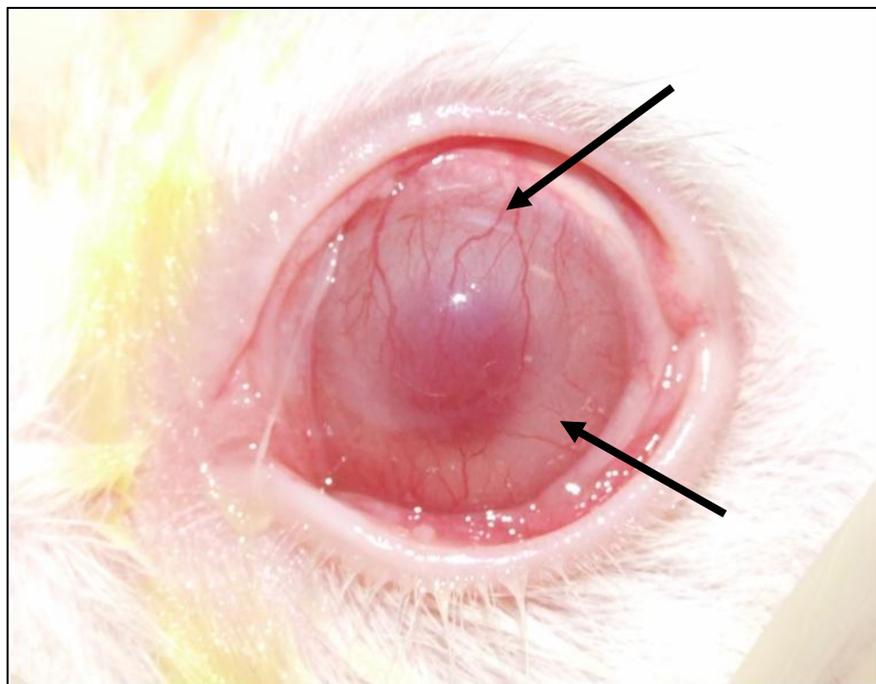
**Figura 18:** Fotografia demonstrando olho submetido à ceratectomia superficial e tratamento com plasma rico em plaquetas pela via tópica, após 72 horas de observação. Nota-se que há quemose (A) e hiperemia moderada (B) e início do processo de epitelação (C) no epicanto lateral.



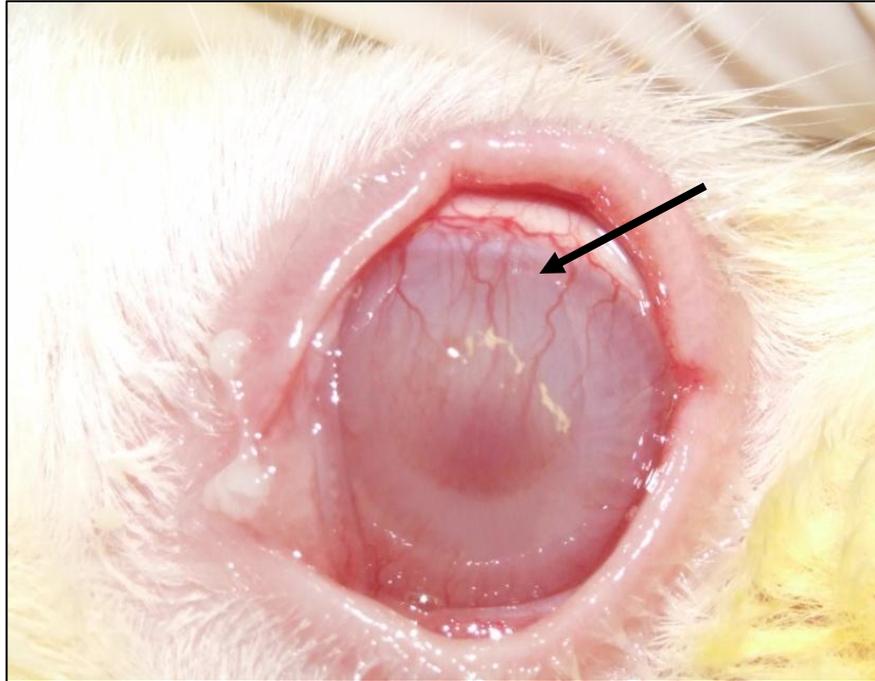
**Figura 19:** Fotografia demonstrando olho submetido à ceratectomia superficial e tratamento com plasma rico em plaquetas pela via tópica, após 7 dias de observação. Nota-se que há quemose e hiperemia leve (A) e processo de epitelação em estágio intermediário (B).



**Figura 20:** Fotografia demonstrando olho submetido à ceratectomia superficial e tratamento com plasma rico em plaquetas pela via tópica, após 14 dias de observação. Nota-se que a quemose e hiperemia (A) estão ausentes e o processo de epitelação em estágio final (B).



**Figura 21:** Fotografia demonstrando olho submetido à ceratectomia superficial e tratamento com plasma rico em plaquetas pela via tópica, após 21 dias de observação. Nota-se que a vascularização apresenta um aumento significativo em sua intensidade, atingindo níveis moderados neste estágio de observação (setas).



**Figura 22:** Fotografia demonstrando olho submetido à ceratectomia superficial e tratamento com plasma rico em plaquetas pela via tópica, após 28 dias de observação. Nota-se que a vascularização se mantém moderada neste estágio de observação (seta).

### 5.1 RESULTADOS DA PAQUIMETRIA NO MODELO EXPERIMENTAL (COELHOS)

A paquimetria é indicada para acompanhar a evolução de doenças que influenciam na espessura da córnea. Desta forma, é utilizado para avaliar alterações que levam à redução da mesma por doenças ectásicas, como ceratocone, traumatismos e úlceras de córnea. Além disso, pode ser útil na avaliação de córneas com doenças que levam ao aumento de sua espessura (edema após traumatismo, distrofias endoteliais e estromais, ceratites herpéticas ou autoimunes e alguns tipos de degenerações). Há casos de malformações oculares com aumento da espessura da córnea (esclerocórnea, megalocórnea) e casos com redução (síndrome da disgenesia mesoectodérmica de Peters).

Este método utiliza um feixe focalizado de ultrassom para medir a espessura da córnea (paquimetria). Pode ser realizado na área central, paracentral e na periferia da córnea, fornecendo medidas em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ). Em caso de afinamento corneano localizado, pode-se medir em um ponto isolado. Conforme representado nas figuras 23,24 e 25.

Segundo Marchi et al. 2010, a espessura corneana medida através de paquímetro ultrassônico em coelhos fêmeas da espécie leporina (*Oryctolagus cuniculus*), raça Norfolk, com idade variando entre 70 e 100 dias e peso entre 2 e 3kg de  $393,1 \pm 24,2$ .

**Tabela 2:** Momentos utilizados na medida da espessura da córnea por paquimetria.

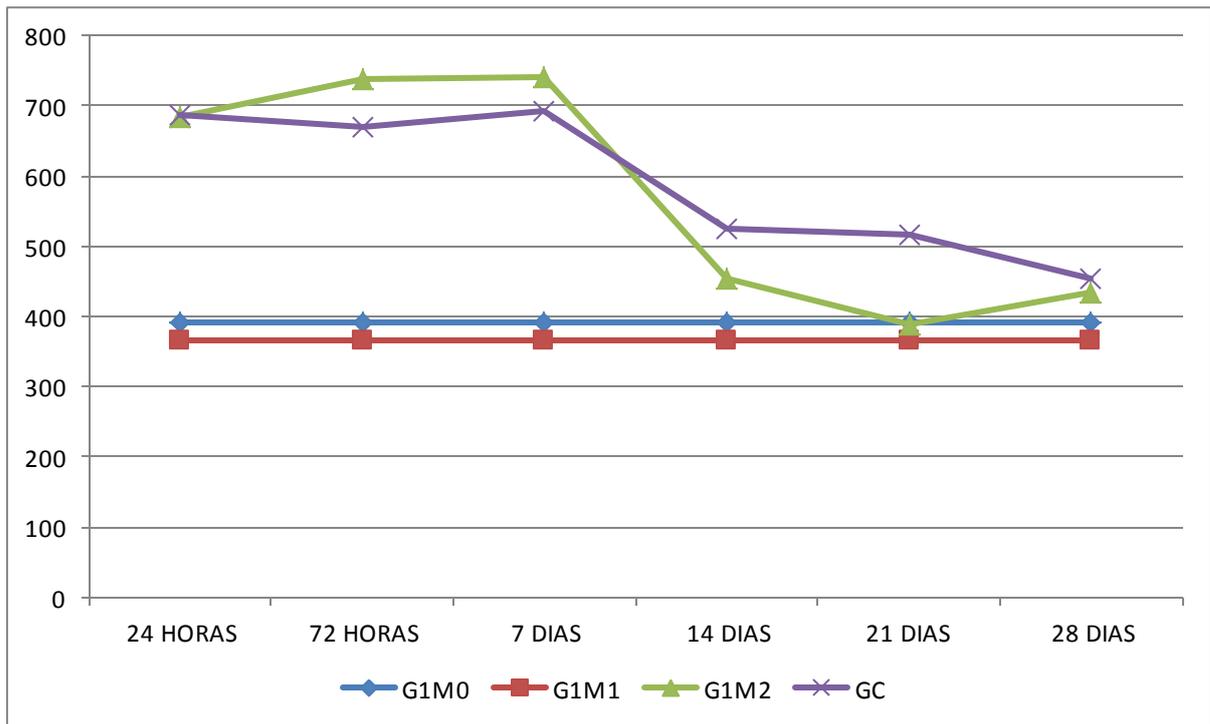
| M0                    | M1                  | M2                     |
|-----------------------|---------------------|------------------------|
| Antes da ceratectomia | Após a ceratectomia | Momentos de observação |

**Tabela 3:** Médias de valores obtidos na paquimetria em  $\mu\text{m}$ , referentes aos tempos em relação aos grupos experimentais descritos. Para o grupo 1, nos momentos M0 e M1 (G1M0 e G1M1), olhos tratados com PRP subconjuntival, foi apurado o cálculo da média da córnea esquerda intacta com valor de 392,8  $\mu\text{m}$ , e média da córnea esquerda pós ceratectomia 367,38 $\mu\text{m}$ .

| Momentos de aferição | G1M0* | G1M1*  | G1M2** | GC**  |
|----------------------|-------|--------|--------|-------|
| <b>24 HORAS</b>      | 392,8 | 367,38 | 684    | 686   |
| <b>72 HORAS</b>      | 392,8 | 367,38 | 737,3  | 669,6 |
| <b>7 DIAS</b>        | 392,8 | 367,38 | 742,3  | 693   |
| <b>14 DIAS</b>       | 392,8 | 367,38 | 453,3  | 524   |
| <b>21 DIAS</b>       | 392,8 | 367,38 | 387,6  | 516   |
| <b>28 DIAS</b>       | 392,8 | 367,38 | 434    | 453,3 |

\* Média de todos os animais avaliados (18 animais). \*\* Média dos animais do grupo (3 animais).

Na variação da espessura da córnea do grupo que recebeu tratamento com PRP na forma subconjuntival; mensurou-se valores significativamente maiores em G1M2 (684  $\mu\text{m}$ ) nas primeiras 24 horas, comparativamente com a média de G1M0 e G1M1 (392,8 e 367,37  $\mu\text{m}$ ); seguido de um discreto aumento da espessura em G1M2 (737,3  $\mu\text{m}$ ) em 72 horas; mantendo-se assim até o 7º dia (742,3  $\mu\text{m}$ ); já para GC ocorre pouca variação da espessura durante as mensurações de 72 horas até o 7º dia, com medidas de 453,3  $\mu\text{m}$  e 524  $\mu\text{m}$  respectivamente. No 14º dia, observa-se que G1M2 (453,3  $\mu\text{m}$ ) e GC (524  $\mu\text{m}$ ) sofrem uma diminuição na espessura. Aos 21 dias, notou-se que em G1M2 (387,6  $\mu\text{m}$ ) e GC (516  $\mu\text{m}$ ) a espessura diminuiu. No 28º dia de mensuração, a espessura da córnea em G1M2 voltou a aumentar (434  $\mu\text{m}$ ) e o grupo controle GC, diminuiu (453,3  $\mu\text{m}$ ) conforme representação da Figura 23.



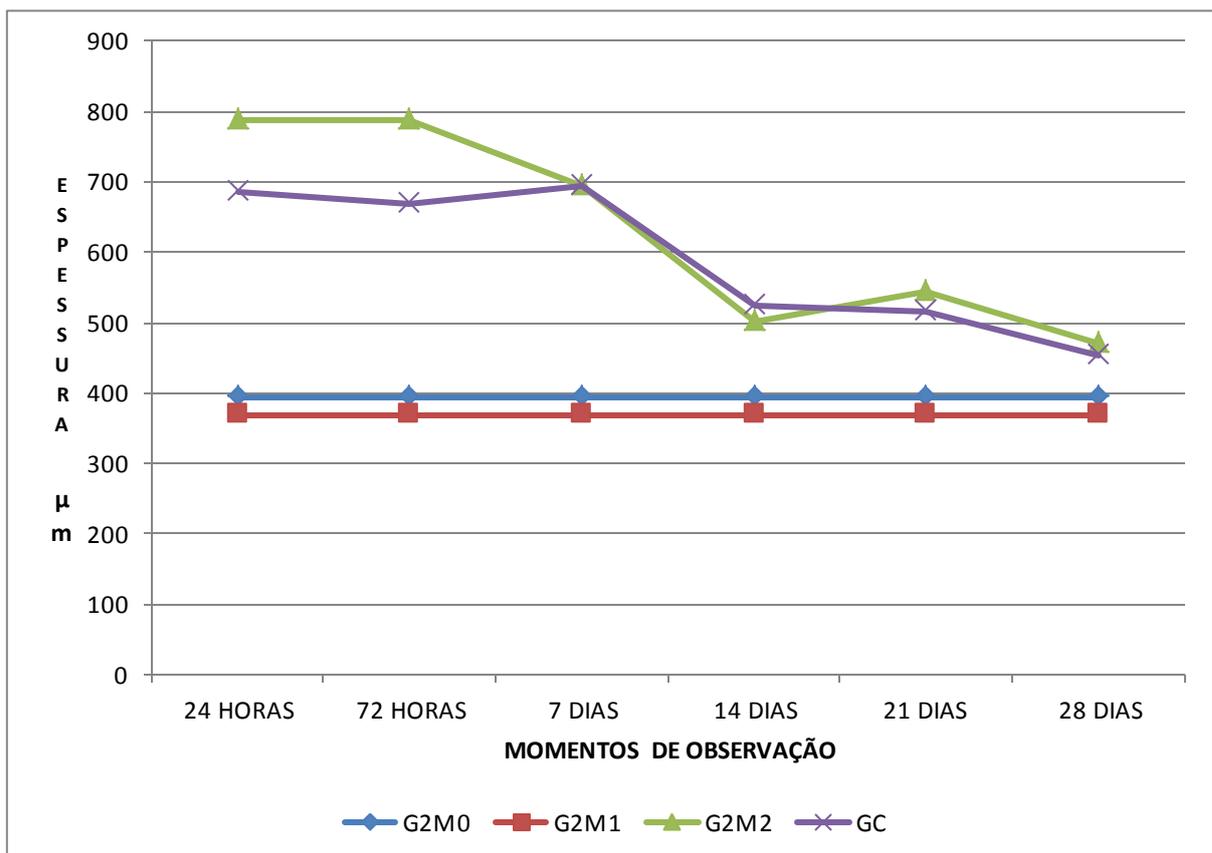
**Figura 23:** Representação gráfica da variação da espessura da córnea ( $\mu\text{m}$ ) aferida pela paquimetria ultrassônica. G1M0: Valor médio da espessura da córnea intacta dos animais submetidos posteriormente à ceratectomia superficial e tratamento com PRP pela via subconjuntival; G1M1: Valor médio da espessura da córnea dos animais tratados com PRP subconjuntival imediatamente após a ceratectomia; G1M2: Variação da espessura da córnea dos animais submetidos à ceratectomia e tratados com PRP pela via subconjuntival nos momentos de observação; GC: Variação da espessura córnea dos animais do grupo controle, submetidos à ceratectomia e que não receberam tratamento.

**Tabela 4:** Médias de valores obtidos na paquimetria em  $\mu\text{m}$ , referentes aos tempos em relação aos grupos experimentais descritos. Para o grupo 2, nos momentos M0 e M1 (G2M0 e G2M1), olhos tratados com PRP subconjuntival, foi apurado o cálculo da média da córnea esquerda intacta com valor de  $393,33 \mu\text{m}$ , e média da córnea esquerda pós ceratectomia  $369,14 \mu\text{m}$ .

| Tempos          | G2M0 * | G2M1*  | G2M2** | GC**   |
|-----------------|--------|--------|--------|--------|
| <b>24 HORAS</b> | 393,33 | 369,14 | 787    | 686    |
| <b>72 HORAS</b> | 393,33 | 369,14 | 788,30 | 669,60 |
| <b>7 DIAS</b>   | 393,33 | 369,14 | 694,70 | 693    |
| <b>14 DIAS</b>  | 393,33 | 369,14 | 500,30 | 524    |
| <b>21 DIAS</b>  | 393,33 | 369,14 | 542,70 | 516    |
| <b>28 DIAS</b>  | 393,33 | 369,14 | 469    | 453,30 |

\* Média de todos os animais avaliados (18 animais). \*\* Média dos animais do grupo (3 animais).

Na Figura 24, no grupo tratado com PRP na forma de colírio, observou-se valores significativamente maiores em G2M2 (787 $\mu\text{m}$ ) e GC (686  $\mu\text{m}$ ), nas primeiras 24 horas, comparativamente com a média de G2M0 (393,33 $\mu\text{m}$ ) e G2M1(369,14 $\mu\text{m}$ ). Observa-se uma diminuição da espessura da córnea nas 72 horas seguintes até o 7º dia de mensuração no G2M2 (788,3 e 694,7  $\mu\text{m}$ , respectivamente). Já para GC ocorre pouca variação da espessura durante as mensurações de 72 horas até o 7º dia com medidas 453,3  $\mu\text{m}$  e 524  $\mu\text{m}$ ; no 14º dia observamos uma diminuição da espessura da córnea, em ambos os grupos mensurados, com 500,3  $\mu\text{m}$  para G2M2 e 524  $\mu\text{m}$  para o GC. Notou-se que aos 21 dias houve um pequeno aumento em G2M2 para 542,7  $\mu\text{m}$ , e no grupo controle (GC) uma discreta diminuição da espessura da córnea para 516  $\mu\text{m}$ . No final das mensurações aos 28 dias, a espessura da córnea para o G2M2 e GC apresentou uma discreta diminuição (469  $\mu\text{m}$  e 453,3  $\mu\text{m}$  respectivamente).



**Figura 24:** Representação gráfica da variação da espessura da córnea ( $\mu\text{m}$ ) aferida pela paquimetria ultrassônica. G2M0: Valor médio da espessura da córnea intacta dos animais submetidos posteriormente à ceratectomia superficial e tratamento com PRP pela via tópica; G2M1: Valor médio da espessura da córnea dos animais tratados com PRP tópico imediatamente após a ceratectomia; G2M2: Variação da espessura da córnea dos animais submetidos à ceratectomia e tratados com PRP pela via tópica nos momentos de observação; GC: Variação da espessura da córnea dos animais do grupo controle, submetidos à ceratectomia que não receberam tratamento.

**Tabela 5:** Média comparativa de valores obtidos na paquimetria em  $\mu\text{m}$ , referentes aos diferentes tempos em relação aos grupos experimentais descritos para G1M2 e G2M2, olhos tratados com PRP subconjuntival, olhos tratados com PRP tópico e GC foi apurado, foi apurado o cálculo da média da córnea esquerda intacta com valor de  $393,33 \mu\text{m}$ , e média da córnea esquerda pós ceratectomia  $369,14 \mu\text{m}$ .

| Momentos de aferição | G1M2  | G2M2  | GC    |
|----------------------|-------|-------|-------|
| 24 HORAS             | 684   | 787   | 686   |
| 72 HORAS             | 737,3 | 788,3 | 669,6 |
| 7 DIAS               | 742,3 | 694,7 | 693   |
| 14 DIAS              | 453,3 | 500,3 | 524   |
| 21 DIAS              | 387,6 | 542,7 | 516   |
| 28 DIAS              | 434   | 469   | 453,3 |

A Figura 25 compara os resultados obtidos após a ceratectomia, nas variações de espessura da córnea do grupo que recebeu tratamento com PRP na forma subconjuntival, do grupo que recebeu PRP na forma tópica e do grupo controle GC, que sofreu ceratectomia, porém, não recebeu nenhum tratamento.

Comparando-se G1M2 medindo de  $684 \mu\text{m}$ , G2M2  $787 \mu\text{m}$  e GC  $686 \mu\text{m}$  observamos que na terapia tópica (G2), a espessura da córnea nas primeiras 24 horas, é um pouco maior que a de G1 e GC mantendo-se assim até as 72 horas seguintes. Os parâmetros são semelhantes em nos tempos seguintes de 7 e 14 dias. Na mensuração do 14º dia, o G1M2 indica uma queda maior na medida da espessura da córnea para  $453,3 \mu\text{m}$ , ocorrendo queda também no G2M2 ( $500,3 \mu\text{m}$ ) e GC ( $524 \mu\text{m}$ ). No 21º dia, observou-se que a espessura da córnea continua diminuindo no grupo 1 (G1M2  $387,6 \mu\text{m}$ ), e também GC ( $516 \mu\text{m}$ ), porém no grupo que recebeu o tratamento tópico (G2M2), mensurou-se um aumento na espessura da córnea para  $516 \mu\text{m}$ . No 28º dia de mensuração, ocorre um novo aumento da espessura da córnea no G1M2 para  $434 \mu\text{m}$ , diminuição na espessura do G2M2 para  $469 \mu\text{m}$ , e no grupo controle para  $453,3 \mu\text{m}$ .

Com relação à variação da espessura da córnea, não houve diferença estatística entre os grupos controle G1 e G2 nos mesmos intervalos de observação. No grupo controle, não se observou diferença estatística entre os intervalos de observação dentro do grupo.

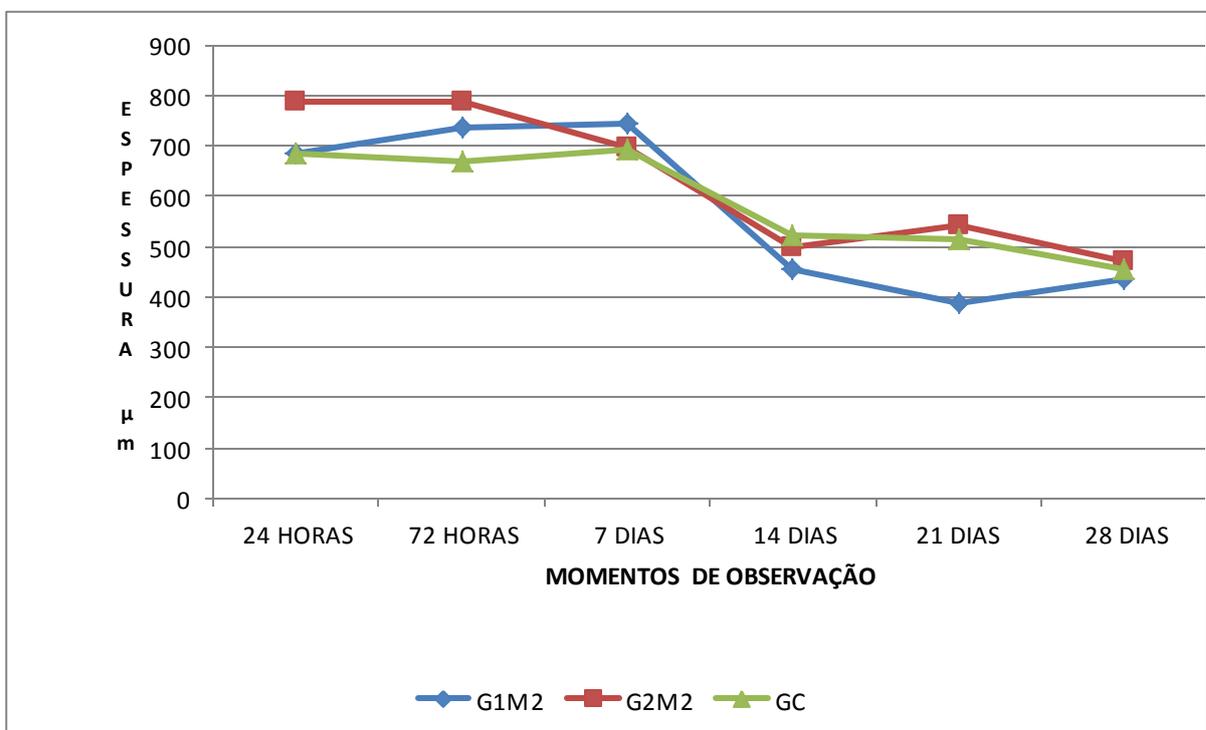
A paquimetria ultrassônica permitiu observar com precisão a resposta biomecânica da córnea durante o processo de reparação de úlceras experimentais da córnea, tratados com plasma rico em plaquetas homólogo com aplicações subconjuntivais e tópicas.

No grupo 1, houve diferença estatística entre 24 horas e 21 dias de observação, entre 72 horas e os intervalos de 14 dias e 28 dias; entre os intervalos de 7 dias, 14 dias e 21 dias.

Com relação ao grupo 2, observou-se diferença estatística na comparação entre 24 horas de observação e os intervalos de 14 e 28 dias. Neste mesmo grupo também observou-se diferença estatística na comparação entre 72 horas de observação e os intervalos de 14 e 28 dias.

A análise estatística demonstra que houve uma maior diferença na espessura da córnea dos animais do grupo 1, quando comparado com o grupo 2, evidenciando assim uma diminuição significativa na espessura da córnea, entre os intervalos de 7 e 14 dias.

Já, a análise estatística do grupo 2, demonstra que houve diferença significativa apenas entre os intervalos de 24 e 72 horas, com os intervalos de 14 e 28 dias. Esta análise demonstra que o aumento na espessura da córnea no intervalo de 21 dias aproximou-se daqueles registrados nos primeiros dias de pós operatório, quando o edema é mais intenso em resposta a grande área de estroma exposto após a ceratectomia. Aos 21 dias, após a completa epitelização o aumento da espessura da córnea está relacionado à maior vascularização nos animais deste grupo, quando comparado com o grupo controle e o grupo 1.



**Figura 25:** Representação gráfica comparativa da paquimetria em animais submetidos à ceratectomia em diferentes tempos. G1M2: Variação da espessura central da córnea de coelhos tratados com PRP pela via subconjuntival; G2M2: Variação da espessura da córnea de coelhos tratados com PRP pela via tópica e; GC: Variação da espessura córnea dos animais do grupo controle, que não receberam tratamento.

A córnea, por concentrar a maior parte do poder dióptrico do bulbo ocular e devido à sua fácil acessibilidade, tornou-se a principal estrutura anatômica modificada na cirurgia refrativa. Atualmente, os métodos mais empregados visam alterar sua curvatura por meio de incisões, subtração de tecido ou adição de material em sua periferia.

Além disto, a córnea sofre alteração da sua espessura quando ferimentos atingem a integridade de suas camadas ou quando a inflamação implica na formação de tecido cicatricial. A ruptura dos epitélios anterior e posterior implica em afluxo de água para o estroma, que tem alterada sua deturgescência e assim passa a ficar mais espesso.

Dentre os parâmetros clínicos utilizados na avaliação da integridade corneana, a paquimetria, que avalia a espessura da córnea, associada à ceratometria, que avalia a curvatura, se destacam entre os mais importantes. Enquanto a paquimetria é útil na avaliação da função da bomba endotelial e das alterações decorrentes de defeitos no epitélio anterior e no endotélio que podem determinar o espessamento da córnea pela formação do edema, a ceratometria define a intensidade dos defeitos refrativos. Medidas pontuais centrais são tradicionalmente obtidas com o ultrassom, sendo o parâmetro clínico mais comumente utilizado. Entretanto, mapas paquimétricos, desenvolvidos por sistemas de tomografia de córnea, permitem a determinação do real ponto mais fino e sua localização, bem como avaliar a variação e progressão desses valores na córnea (URSULIO; CASTAÑEDA; AMBRÓSIO JR, 2006).

A medida da espessura média da córnea antes da ceratectomia foi de 392,8  $\mu\text{m}$  para o grupo 1 (G1M0) e de 393,33  $\mu\text{m}$  para o grupo 2 (G2M0), não havendo diferença estatística entre os olhos avaliados (FIGURAS 6 e 7). Também não se observou diferença estatística na espessura da córnea após a ceratectomia, quando a aferição demonstrou que a espessura média para o grupo 1 (G1M1) foi de 367,38  $\mu\text{m}$  e para o grupo 2 (G2M1) de 369,14  $\mu\text{m}$ . Esta similaridade só foi possível utilizando o paquímetro, indicando quanto tecido seria necessário remover com as manobras adotadas na metodologia para padronizar o modelo de estudo. Desta forma, as variações na espessura da córnea, aferidas nos grupos de estudo, são decorrentes do processo de reparação e das reações inflamatórias, não sofrendo alteração na espessura ocasionadas pelas manobras adotadas para a realização da ceratectomia (FIGURAS 23 e 24).

Assim, a análise dos resultados da paquimetria para os animais submetidos à ceratectomia, demonstrou que houve um aumento significativo na espessura da córnea no 1º dia de pós-operatório nos animais submetidos à aplicação subconjuntival (G1M2-24 horas/684  $\mu\text{m}$ ) e dos animais submetidos à aplicação tópica (G2M2/787  $\mu\text{m}$ ), quando

comparados com a espessura média dos mesmos animais antes da realização da ceratectomia (G1M0/392,8,16  $\mu\text{m}$ ) e (G2M0/393,33  $\mu\text{m}$ ) (FIGURAS 6 e 7). Isto se explica pela perda da proteção do epitélio anterior com a realização da ceratectomia superficial e exposição do estroma, com formação de edema difuso e intenso nas primeiras 24 horas. A maior espessura da córnea dos animais do grupo 2, neste momento, se explica pela aplicação tópica do PRP, que contribuiu para aumentar a hidratação da superfície ocular e do estroma corneano, devido ao alto teor de proteína do concentrado plaquetário que provavelmente exerceu ação colóido-osmótica, atraindo água em maior quantidade e contribuindo para o incremento da espessura da córnea neste grupo, quando comparado com aquele que recebeu o PRP pela via subconjuntival.

O início da epitelização ajuda a restringir a entrada de água no estroma, o que pode ser verificado pela diminuição progressiva da espessura da córnea nos animais dos grupos 1 e 2 a partir do 7º dia de observação. A partir desta data, a epitelização começa a limitar o fluxo da água da lágrima para o interior do estroma e, à medida que a epitelização avança, o edema tende a diminuir. O efeito hipertônico da lágrima e o sistema de bombas do epitélio posterior da córnea tendem a drenar o líquido presente no estroma, diminuindo a intensidade do edema, que se manifesta na diminuição da espessura da córnea. Este efeito fica evidente quando comparamos os gráficos referentes à evolução da espessura de G1M2 e G2M2 até o 14º dia, quando se observa redução progressiva da espessura corneana. A partir desta data, verifica-se que há um leve aumento da espessura da córnea nos animais do grupo 2, o que coincide com o aumento dos índices de vascularização de leve para moderado nos animais deste grupo, enquanto que o oposto ocorre com os animais do grupo 1.

Assim, a maior espessura da córnea dos animais do grupo 2 no 21º dia de observação pode ser explicada pela maior intensidade de vascularização, com persistência da inflamação da córnea e conseqüente edema pela saída de líquido dos vasos sanguíneos. Esta maior vascularização no grupo 2 pode ser explicada pela ação direta dos fatores de crescimento presentes no concentrado plaquetário que, simultaneamente à estimulação da epitelização, atuam como fatores angiogênicos, estimulando o crescimento vascular e contribuindo para a maior espessura da córnea neste momento. A suspensão da aplicação do concentrado plaquetário a partir do 21º dia resultou em diminuição da espessura corneana aos 28 dias nos animais do grupo 2, reforçando a teoria da ação angiogênica promovida pelos fatores de crescimento liberados a partir das plaquetas. A análise comparada da evolução gráfica da espessura da córnea demonstrou que o grupo 2 apresentou maior espessura da córnea aos 28 dias (G2M2- 469  $\mu\text{m}$ ), quando comparado aos grupos 1 (G1M2- 434  $\mu\text{m}$ ) e grupo controle

(GCM2- 453,3  $\mu\text{m}$ ); porém, estes valores não foram estatisticamente significativos quando comparados entre si.

O menor tempo para a epitelização da área de ceratectomia observada nos animais do grupo 2, aliada ao aumento progressivo da neovascularização por um período de tempo maior que aqueles registrados para o grupo 1, demonstraram que a aplicação tópica do PRP pela via tópica foi mais eficiente na transferência de fatores de crescimento para a superfície ocular, quando comparado com a aplicação pela via subconjuntival.

Ranzani et al. (2008), avaliaram a espessura corneana central de 13 gatos normais com microscópio especular de não-contato Topcon SP-2000P e paquímetro ultrassônico. A pesquisa demonstrou diferença nas medidas entre os dois equipamentos, com valores maiores nas medições realizadas com o paquímetro ultrassônico quando comparado ao microscópio especular. Para a paquimetria ultrassônica, os valores da espessura foram de  $515 \pm 73\mu\text{m}$  para o olho direito e  $523 \pm 68\mu\text{m}$  para o olho esquerdo. Já a paquimetria utilizando o microscópio especular apresentou  $510 \pm 85\mu\text{m}$  para o olho direito e  $504 \pm 83\mu\text{m}$  para o olho esquerdo. A variação no valor foi maior para a paquimetria especular, conferindo menor precisão deste método. Os autores comentam que a paquimetria especular exige anestesia geral e manutenção da abertura palpebral por um período mais longo. Com isto, ocorre desidratação da superfície ocular levando ao afinamento, com diferenças que podem chegar a  $30\mu\text{m}$ . A pesquisa também não padronizou a idade dos animais, o que pode justificar a grande variação nas medidas de ambos os métodos.

A aferição da espessura da córnea é ferramenta fundamental nos períodos pré, trans e pós-operatório das cirurgias refrativas. Entretanto, estudos têm indicado que o valor central pode não corresponder à região mais delgada. Nesse caso, argumenta-se sobre a obrigatoriedade da realização de um mapa paquimétrico. Acrescenta-se a isto o fato de que a medida da espessura da córnea é um parâmetro a ser considerado em pacientes com glaucoma, hipertensão ocular ou suspeita de glaucoma. A influência da resistência corneana na medida da pressão intraocular vem sendo cada vez mais reconhecida. O valor da medida da pressão intraocular obtido poderá ser subestimado ou hiper-estimado de acordo com a resistência da córnea ao aplanamento durante a tonometria. De modo geral, assume-se que quanto mais fina é a córnea, menor será a resistência e menor será a medida da pressão (ANDREASSEN; SIMONSEN; OXLUND, 1980; AMBRÓSIO JR, 2003).

Pesquisas tem demonstrado que a espessura central da córnea é importante fator preditivo do desenvolvimento de lesão do nervo óptico decorrente de glaucoma. Estima-se que para cada 40 micra de diminuição da espessura central da córnea há um risco duas vezes

maior de desenvolvimento de lesão glaucomatosa em cinco anos de hipertensão ocular. Outros estudos têm relacionado espessura corneana mais baixa com maior gravidade na apresentação da lesão glaucomatosa, indicando que a associação entre a influência da espessura corneana no desenvolvimento da neuropatia óptica glaucomatosa pode ser explicada pelo fato de que córneas mais finas apresentam uma influência negativa na medida da pressão intraocular aferida pela tonometria de aplanção. Assim, pacientes com córneas mais finas tendem a apresentar medidas de pressão intra-ocular menos elevada e seriam subestimados, não indicando o tratamento, o que aumenta o risco de lesão do nervo óptico (SHAH et al.,1999; HERNDON; WEIZER; STINNETT, 2004).

Silva et al. (2011), ao estudar as correlações entre a área do disco óptico e as características geométricas e biomecânicas da córnea relataram que o valor absoluto da espessura corneana é importante não só para o diagnóstico de doenças corneanas, mas também para estimar a pressão intraocular, funcionando como um método indireto de avaliação da integridade estrutural e da fisiologia endotelial corneana. Além de refletirem mudanças na hidratação e metabolismo corneano, a variação da espessura total da córnea é um importante fator para se avaliar os pacientes glaucomatosos, visto que a espessura central corneana afeta a precisão da tonometria de aplanção, sendo a paquimetria ultrassônica, nas palavras dos autores, um método preciso e de alta reprodutibilidade, como verificado nesta pesquisa.

Ursulio et al. (2006), ao estudarem a variação e a progressão dos valores paquimétricos, a partir do ponto mais fino da córnea em direção ao limbo em pacientes normais e com ceratocone, verificaram que a média dos valores no ponto mais fino dos pacientes normais foi igual a 511,60  $\mu\text{m}$  (desvio padrão de 30,60). A média dos valores do ponto mais fino dos pacientes portadores de ceratocone foi 424,48  $\mu\text{m}$  (desvio padrão de 56,57). Observaram-se diferenças estatisticamente significativas na comparação dos valores médios de todas as circunferências ( $p < 0,01$ ), sendo que para os valores de 6 mm e 7 mm, observou-se  $p = 0,01$ . Com isto, concluíram que há maior variabilidade de valores paquimétricos nas córneas com ceratocone, bem como há progressão mais acentuada que em olhos normais.

Como na presente pesquisa, os autores reafirmam que a progressão paquimétrica representa uma complementação à propedêutica tradicional da paquimetria pontual central que deve ser considerada no pré-operatório de cirurgias refrativas entre outros procedimentos realizados na superfície ocular, como as ceratectomias para tratamento de áreas de opacidade

decorrentes de cicatrizes exuberantes ou na pigmentação secundária à ceratite superficial crônica.

Resultados de pesquisas envolvendo mapa paquimétrico da córnea têm demonstrado que a biomecânica do tecido corneano está relacionada à sua espessura, mas não apenas com um ponto, mas com a distribuição da espessura em toda sua extensão. A resistência do tecido corneano é um fator mais complexo pois mostra que dois pacientes podem apresentar a mesma espessura de córnea, mas com características viscoelásticas diferentes e, com isso, diferentes influências na medida da pressão intra-ocular. Os dados fornecidos pela curva de normalidade da progressão dos valores paquimétricos e o cálculo de índices de progressão paquimétrica podem representar indiretamente a biomecânica do tecido corneano (MAURICE, 1984; VILLAS-BOAS et al., 2009).

Mérula et al. (2008), investigaram a espessura corneana central e a densidade das células endoteliais corneanas centrais após trabeculectomia com e sem mitomicina e concluíram que esta é significativamente maior em pacientes com crise aguda de glaucoma de ângulo fechado, o que não ocorre nos demais subtipos de glaucoma de ângulo fechado e que este mesmo parâmetro apresenta importância em relação a uma série de outras doenças oculares, como distrofias ectásicas, olho seco, glaucoma e diabetes mellitus. A paquimetria é considerada também importante fator para o acompanhamento de indivíduos usuários crônicos de lentes de contato e para aqueles que irão ser submetidos a procedimentos refrativos. Para estes autores, a determinação dos níveis de edema da córnea pode ser parâmetro para permitir que o usuário continue ou não utilizando lentes de contato.

## 6 CONCLUSÕES

As argumentações anteriormente apresentadas sobre os aspectos relacionados à inflamação e reparação de córneas submetidas à ceratectomia e tratadas com plasma rico em plaquetas homólogo, permitem inferir que a metodologia proposta é exequível como modelo experimental para o estudo das reações inflamatórias, nos aspectos clínicos, quando aplicado o tratamento para reparação da córnea com PRP na forma subconjuntival e tópica, com base na análise dos resultados, conclui-se que:

1) A superfície ocular respondeu à agressão de suas estruturas por meio de uma resposta inflamatória aguda;

2) As avaliações clínicas, e pela paquimetria ultrassônica permitiram concluir que existe um antagonismo entre a cinética da resposta inflamatória e a consolidação dos fenômenos reparativos dos tecidos que compõem a superfície ocular, demonstrando que enquanto persiste a fase mais aguda da inflamação, a cicatrização se apresenta de forma lenta;

3) A superfície ocular demonstrou tolerância à aplicação tópica e subconjuntival do plasma rico em plaquetas;

4) A aplicação tópica do concentrado plaquetário homólogo, no método proposto por esta pesquisa, reduziu o tempo de cicatrização da córnea;

5) Apesar das aplicações em intervalos de três dias do plasma rico em plaquetas pela via subconjuntival, onde ocorre trauma produzido pela agulha, não se observou reação adversa no local, pois não houve agravamento da reação inflamatória;

6) A utilização do PRP é benéfica para o processo de cicatrização da córnea; porém o período de tratamento deverá ser reduzido ao tempo necessário para a cicatrização, visto que a utilização, além deste período, estimula a vascularização da córnea, diminuindo a reabilitação visual pela persistência da opacidade.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro (RJ): Elsevier, 2008. 564 p.

ALIO, J. L.; COLECHA, J. R.; ABAD, M.; RODRIGUEZ-PRATS, J.; PASTOR, S.; RUIZ-COLECHA, J. Use of Autologous Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Dormant Corneal Ulcers. **Ophthalmology**, v. 114, n. 7, p. 1286–1293, 2007a.

ALIO, J. L.; COLECHA, J. R.; PASTOR, S.; RODRIGUEZ, A.; ARTOLA, A. Symptomatic Dry Eye Treatment with Autologous Platelet-Rich Plasma. **Ophthalmic research journal**, n. 39, p. 124-129, 2007b.

ALMEIDA, A. M. de. **Efeito do plasma rico em plaquetas na regeneração do terço central do ligamento da patela: estudo prospectivo randomizado**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ortopedia e Traumatologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5140/tde-17062011-162301/>>. Acesso em: 18 fev. 2013.

AMBRÓSIO JR, R. Resistência corneana: variável fundamental em glaucoma e cirurgia refrativa. **Revista oftalmologia em foco**, v.86, p.14-6, 2003.

ANDERSON, D. F.; ELLIES, P.; PIRES, R. T.; TSENG, S. C. G. Amniotic membrane transplantation for partial limbal stem cell deficiency. **British Journal of Ophthalmology** ., v. 85, n. 5, p. 567-75, 2001.

ANDREASSEN, T.T.; SIMONSEN, A.H.; OXLUND, H. Biomechanical properties of keratoconus and normal corneas. **Experimental Eye Research**, v.31, n.4, p.435-41, 1980.

APPEL, T.R.; PÖTZSCH, B.; MÜLLER, J.; VON LINDERN, J.; BERGÉ, S. J.; REICH, R. H. Comparison of three different preparations of platelet concentrates for growth factor enrichment. **Clinical Oral Implants Research**, v. 13, n. 5, p. 522–8, 2002.

AVILA, M.; ESPANA, M.; MORENO, C.; PENA, C. Reconstruction of ocular surface with heterologous limbal epithelium and amniotic membrane in rabbit model. **Cornea**, v. 20, n. 4, p. 414-20, 2001.

AXELROD, A. J.; CHANDLER, J.W. Morphologic characteristics of conjunctival-associated lymphoid tissue in the rabbit. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, n. 17, p. 182, 1978.

BALLOW, M.; MENDELSON, L. Specific immunoglobulin E antibodies in tear secretions of patients with vernal conjunctivitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 66, n. 2, p. 112-8, 1980.

BARROS, P. S. M.; GARCIA, J. A.; LAUS, J. L.; FERREIRA, A. L.; SALLES G. T. L. The use of xenologous amniotic membrane to repair canine corneal perforation created by penetrating keratectomy. **Veterinary Ophthalmology**, v. 1, n. 2-3, p. 119-23, 1998.

BAZAN, H. E. P.; OTTINO, P. The role of platelet-activating factor in the corneal response to injury. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 21, n. 5, p. 449-464, 2002.

BISTNER, S. Allergic and immunologic mediated diseases of the eye and adanexae. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 24, n. 4, p. 711-734, 1994.

BRUNELLI, A. T. J.; VICENTI, F. A. M.; ORIÁ, A. P.; DORIA NETO, F. A.; BOLZAN, A. A.; CHAHUD, F.; ORIÁ, P.; BOLZAN, A. A.; CAMPOS, C. F.; LAUS, J. L. Sclerocorneal limbal stem cell autograft transplantation in dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 5, p. 1194-1204, 2007.

BYDLOWSKI, P. S.; DEBES, A. A.; MASELLI, L. M. F.; JANZ, F. L. Características Biológicas Das Células-Tronco Mesenquimais. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia** [online], v. 31, p. 25-35, 2009.

CHANDLER, J. W.; GILLETTE, T. E. Immunologic defense mechanisms of the ocular surface. **Ophthalmology**, v. 90, n. 6, p. 585-91, 1983.

CHANG, J. H.; MCCLUSKEY, P. J.; WAKEFIELD, D. Toll-like receptors in ocular immunity and the immunopathogenesis of inflammatory eye disease. **British Journal of Ophthalmology**, v. 90, n. 1, p. 103-8, 2006.

CHIE, S. Second injury in the cornea: the role of inflammatory cytokines in corneal damage and repair. **Cornea**, v. 19, n. 6, p. 155-159, 2000.

CHOI, T. H.; TSENG, S. C. In vivo and in vitro demonstration of epithelial cell-induced myofibroblast differentiation of keratocytes and an inhibitory effect by amniotic membrane. **Cornea**, v. 20, n. 2, p. 197-204, 2001.

CORDEIRO, J. M. C.; KROLOW, R. C. Mecanismos de defesa da superfície ocular. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, n. 112, p. 62-7, 1999.

COSTA, L. M. M. **Estudo do perfil antiagregante plaquetário de uma nova série de derivados nacilidrazônicos otimizados a partir do protótipo lassbio-129**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

CRESTA, F. B.; ALVES, M. R. Avaliação da cinética do epitélio corneano com marcadores de proliferação celular. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia** [online]. v.70, n.6, p. 953-960, 2007.

DAY, M. J. Low IgA concentration in the tears of german shepherd dogs. **Australian Veterinary Journal**, v. 74, n. 6, p. 433-436, 1996.

DEKARIS, I.; GABRIC, N.; MRAVICIC, I.; KARAMAN, Z.; KATUSIC, J.; LAZIC, R.; SPOLJARIC, N. Multilayer vs. monolayer amniotic membrane transplantation for deep corneal ulcer treatment. **Collegium Antropologicum**, v. 25, p. 23-8, 2001.

DONISI, P. M.; RAMA, P.; FASOLO, A.; PONZIN, D. Analysis of limbal stem cell deficiency by corneal impression cytology. **Cornea**, v. 22, n. 6, p. 533-538, 2003.

DUA, H. S.; AZUARA-BLANCO, A. Allo-limbal transplantation in patients with limbal stem cell deficiency. **British Journal of Ophthalmology**, v. 83, p. 414-9, 1999a.

DUA, H. S.; AZUARA-BLANCO, A. Amniotic membrane transplantation. **British Journal of Ophthalmology**, v. 83, n. 6, p. 748-52, 1999b.

DUA, H. S.; GOMES, J. A.; JINDAL, V. K. Mucosa specific lymphocytes in the human conjunctiva, corneoscleral limbus and lachrymal gland. **Current Eye Research**, v. 13, n. 87, 1994.

EHRENFEST, D. M. D.; RASMUSSEN, 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**, v. 27, n. 3, p. 158-167, 2009.

EICHSTAEDT, R. M.; ENGLISH, R. V. Immune response and the eye. In: \_\_\_\_\_. **Veterinary Ophthalmology**. 3. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 239-58.

EL-SHARKA, W. Y. H.; KANTARCI, A. D. J.; HASTURK, H. L.; ALSHAHAT, M.; VAN DYKE, T. E. Platelet-rich plasma: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties. **Journal of Periodontology**, Departamento de Periodontia e Biologia Oral, Boston University Goldman School of Dental Medicine, Boston, v. 78, n.4, p. 661-669, 2007.

ENGLISH, R. V. Immune response and the eye. In: \_\_\_\_\_. **Veterinary Ophthalmology**. 3. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 239-58.

ENKELA, H.; JAN, P.; KAREL JR, S.; MELKOVÁ, Z.; KALTNER, H.; FILIPEC, M.; LIU, F. T.; GABIUS, H. J. Detection of galectin-3 in tear fluid at disease states and immunohistochemical and lectin histochemical analysis in human corneal and conjunctival epithelium. **British Journal of Ophthalmology**, v. 85, n. 11, p. 1336-40, 2001.

EPPLEY, B. L.; PIETRZAK, W. S.; BLANTON, M. Plasma rico em plaquetas: uma revisão da biologia e aplicações em cirurgia plástica. **Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery**. Indianapolis, p. v. 6, p. 118-147, 2006.

ESPANA, E. M.; GRUETERICH, M.; SENG, E. T.; TSENG, S. C. G. Phenotypic study of a case receiving a keratolimbal allograft and amniotic membrane for total limbal stem cell deficiency. **Ophthalmology**, v. 110, n. 3, p. 481-486, 2003.

ESQUENAZI, S.; HE, J.; BAZAN, H.; BAZAN, N. Use of autologous serum in corneal epithelial defects post-lamellar surgery. **Cornea**, v. 24, n. 8, p. 992-997, 2005.

EURIDES, D.; GONÇALVES, G. F.; MAZZANTI, A.; BELETTI, M. E.; LIMA, C. A. P.; LEME, M. C.; DUTRA, A. T. Utilização da cápsula renal de coelho no reparo de ceratectomias superficiais em cães. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIAOLOGIA VETERINÁRIA, 3., Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: UFMG, 1998.

EURIDES, D.; MANTOVANI, M. M.; MENEZES, G. F.; SILVA, L. A. F.; SOUZA, L. A.; OLIVEIRA, B. J. N. A.; BAUNGARTEN, L. B.; DELBEN, A. F. A.; Efeito do concentrado de plaquetas xenólogo na cicatrização da córnea em coelhos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, n. 109, p. 39-43, 2010.

FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. et al. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344 p.

FERREIRA, C. F.; GOMES, M. C. C.; SCARSO FILHO, J.; GRANJEIRO, J. M.; SIMOES, C. M. O.; MAGINO, R. S. **Influência de plasma rico em plaquetas sobre o crescimento de osteoblastos humanos.** [Online], 2005.

FLORYAN, K.M.; BERGHOFF, W.J. Intraoperative use of autologous platelet-rich and platelet-poor plasma for orthopedic surgery patients. **Association of perioperative Registered Nurses (AORNJ)**, v.80, p.668-674, 2004.

FRANKLIN, R. M. The ocular secretory immune system: a review. **Current Eye Research**, v. 9, p. 599-606, 1989.

FRANKLIN, R. M.; REMUS, L. E. Conjunctival-associated lymphoid tissue: evidence for a role in the secretory immune system. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, n. 25, p. 181-7, 1984.

FROUM, S. et al. Effet of plastelet rich plasma on bone growth and osseintegration in human maxilan maxillary sinus grafts: there bilateral case reports. **The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, v. 22, n. 1, p. 45-53, 2002.

GACHON, A.F.; LACAZETTE, E. Tear lipocalin and the eye's front line of defence. **British Journal of Ophthalmology**, v. 82, p. 453-55, 1998.

GARRANA, R. M. R.; ZIESK, J. D.; ASSOULINE, M.; GIPSON, I. K. Matrix metalloproteinases in epithelia from human recurrent corneal erosion. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 40, n. 6, p. 1266-79, 1999.

GELATT, K.N. **Veterinary Ophthalmology**. 3. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. 1544 p.

GILLETTE, T. E.; CHANDLER, J. W.; GRINER, J. V. Langehans cells of the ocular surface. **Ophthalmology**, n. 89, p. 700, 1982.

GOMES, J. A. P.; PAZOS, H. S. B.; SILVA, A.; B. E.; CRISTOVAM, P. C.; BELFORT JUNIOR, R. Transplante de células-tronco epiteliais límbicas alógenas expandidas ex vivo sobre membrana amniótica: relato de caso. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 72,n. 2, p. 254-256, 2009.

GRUETERICH, M.; ESPANA, E. M.; TOUHAMI, A.; TI, S. E.; TSENG, C. G. S. Phenotypic study of a case with successful transplantation of ex vivo expanded human limbal epithelium for unilateral total limbal stem cell deficiency. **Ophthalmology**, v. 109, n. 8, p. 1547-52, 2002.

HARTWIG, D.; HARLOFF, S.; LIU, L.; SCHLENKE, P.; WEDEL, T.; GEERLING, G. Epitheliotropic capacity of a growth factor preparation produced from platelet concentrates on corneal epithelial cells: a potential agent for the treatment of ocular surface defects?. **Transfusion**, v. 44, n. 12, p. 1724-1731, 2004.

HAYNES, R. J.; TIGHE, P. J.; DUA, H. S. Antimicrobial defensive peptides of the human ocular surface. **British Journal of Ophthalmology**, v. 83, p. 737-41, 1999.

HAYNESWORTH, S. E.; KADIYALA, S.; LIANG, L. Chemotactic and mitogenic stimulation of human mesenchymal stem cells by platelet rich plasma suggests a mechanism for enhancement of bone repair. In: ANNUAL MEETING OF THE ORTHOPAEDIC RESEARCH SOCIETY, 48., Dallas, TX, 2002. **Anais...** Dallas, TX, 2002.

HERNDON, L. W.; WEIZER, J.S.; STINNETT, S.S. Central corneal thickness as a risk factor for advanced glaucoma damage. **Archives of Ophthalmology**, v. 122, n.1, p.17-21, 2004.

HONG, J.W.; LIU, J.J.; LEE, J.S.; MOHAN, R.R.; MOHAN, R.R.; WOODS, D.J. HE, Y.G.; WILSON, S.E. Proinflammatory chemokine induction in keratocytes and inflammatory cell infiltration into the cornea. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 42, n.12, p. 2795-803, 2001.

HRDLICKOVÁ-CELA, E.; PLZÁK, J.; SMETANA, K.; MELKOVÁ, Z.; KALTNER, H.; FILIPEC, L.; FU-TONG; GABIUS, H.J. Detection of galectin-3 in tear fluid at disease states and immunohistochemical and lectin histochemical analysis in human corneal and conjunctival epithelium. **British Journal of Ophthalmology**, v. 85, n 11, p. 1336-40, 2001.

HUANG, A. J. W.; TSENG, S. C. G. Corneal epithelial wound healing in the absence of limbal epithelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 32, p.96-105, 1991.

ITALIANO, J. E.; SHIYDASANI, R. A. Megacariócitos e além: o nascimento de plaquetas. **Jornal Thromb Haemost**, v. 1, n. 6, p. 1174-1182, 2003.

JUMBLATT, M. M.; McKENZIE, R.W.; JUMBLATT, J. E. MUC5AC mucin is a component of the human precorneal tear film. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 40, p. 43-9, 1999.

KIM, J. S.; KIM, J. C.; NA, B. K.; JEONG, J. M.; SONG, C. Y. Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn. **Experimental Eye Research**, v. 70, n. 3, p. 329-37, 2000.

KLENKLER, B.; SHEARDOWN, H. Growth factors in the anterior segment: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology. **Experimental Eye Research**, v.79, p.677-688, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15500826>>. Acesso em: 11 jun. 2012.

LAGUNAS, J, G. Plasma rico em plaquetas. **Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial**, Madrid, v. 28, n. 2, 2006. Disponível em: <[http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S113005582006000200001&lng=es&nrm=iso](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S113005582006000200001&lng=es&nrm=iso)>. Acesso em: 03 mar. 2012.

LAUS, J. L.; ROSSI, M. A.; SOUZA, M. S. B.; BARROS, P. S. M.; MORALES, A. Avaliação dos efeitos de um novo adesivo para fins biológicos (Colagel®) na ceratoplastia experimental em cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 30, p. 183-93, 1993.

LEE, A. S.; KIM, J. C. **Efeito do líquido amniótico na sensibilidade corneana e regeneração após a foto-ablação da córnea**. Corena: Ed. Wolters Kluwer Healt, 1996.

LEMP, M.A.; BLACKMAN, J.H. Ocular surface defense mechanisms. **Annals of Ophthalmology**, v. 13, n. 1, p. 61-3, 1981.

LEONARDI, A. In-vivo diagnostic measurements of ocular inflammation. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology.**, v., n.5, p 464–72, 2005.

MA, O. P.; BAZAN, EP, BAZAN NG Platelet-activating factor (PAF) induces corneal neovascularization and upregulates VEGF expression in endothelial cells. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 45, n.9, p. 2915-2921, 2004.

MARCHI, P. N. et al. **Avaliação das células endoteliais da córnea em coelhos (*oryctolagus cuniculus*) utilizando microscopia especular**. Tese (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2010.

MARINHO, D.; HÖFLING-LIMA, A. L.; KWITKO, S.; TSENG, S.C.G. Does amniotic membrane transplantation improve the outcome of autologous limbal transplantation. **Cornea**, v. 22, n. 4, p. 338-42, 2003.

MARX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to suport its use. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, E.U.A. v.62, p.489-496, 2004a.

MARX, R. E., Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP?. **Implant Dentistry**, v. 10, p. 225–228, 2004b.

MAURICE, D.M. The cornea and sclera. In: DAVSON, H. **The eye: vegetative physiology and biochemistry**. 3. ed. Orlando: Academic Press, 1984.

MAZZUCCO, L; MEDICI, D.; SERRA, M.; PANIZA, R.; RIVARA, G.; ORECCHIA, S.; LIBERNER, R.; CATTANA, E.; LEVIS, A.; BETTA, P. G.; BORZINI, P. The use of autologous platelet gel to treat difficult-to-heal wounds: a pilot study. **Transfusion**, v. 44, p. 1013-1018, 2004.

MELLER, D.; PIRES, R. T.; MACK, R. J.; FIGUEIREDO, F.; HEILINGENHAUS, A.; PARK, W.C.; PRABHASAWAT, P.; JOHN, T.; McLEOD, S.D.; STEUHL, K.P.; TSENG, S.C.G. Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns. **Ophthalmology**, v. 197, n. 5, p. 980-9, 2000.

MELLER, D.; TSENG, T. S. Conjunctival epithelial cell differentiation on amniotic membrane. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 40, n. 5, p 878-86, 1999.

MELLO FILHO, P. A. A.; MAIA, M.; RODRIGUES, E. B.; FARAH, M. Farmacologia ocular aplicada no tratamento de doenças do vítreo, retina e coróide. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, [online], v.73, n.3, p. 294-299, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27492010000300018>>. Acesso em: 20 jun. 2013.

MÉRULA, R.V.; DINIZ FILHO, A.; GOMES, G.A.; CRONEMBERGER, S.; CALIXTO, N. Espessura corneana central e densidade das células endoteliais corneanas centrais após trabeculectomia com e sem mitomicina C. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 67, n.1, p. 25-31, 2008.

MESSORA, M. R.; NAGATA, M. J. H. A.; MELO, L. G. N.; FURLANETO, F. A.; DELIBERADOR, T. M.; GARCIA, V. G.; BOSCO, Á. F. Análise de um Protocolo de centrifugação única para fazer preparo do Plasma Rico los Plaquetas (PRP) – Estudo em coelhos. **Revista Sul Brasileira de Odontologia**, v. 6, n. 2, p. 135-141, 2009a.

NETTO, M.V.; AMBRÓSIO JR, R.; CHALITA, M.R.; KRUEGER, R.R.; WILSON, S.E. Resposta cicatricial corneana em diferentes modalidades de cirurgia refrativa. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia** ,v. 68, n. 1, p.140-9, 2005.

NIKOLIDAKIS, D.; JANSEN, J.A. A biologia do plasma rico em plaquetas e sua aplicação em cirurgia bucal: revisão da literatura. **Tissue Engineering Part B**, v. 14, n. 3, p. 249-258, 2008.

OBATA, S.; AKEDA, K.; IMANISHI, T.; MASUDA, K.; WON, B.; MORIMOTO, R.; ASANUMA, Y.; KASAI, Y.; UCHIDA, A.; SUDO, A. Effect of autologous platelet-rich plasma-releasate on intervertebral disc degeneration in the rabbit anular puncture model: a preclinical study. **Arthritis Research & Therapy**, v. 12, n. 241, 2012.

PEDERSEN, B.; ANDERSEN, M.S.; KLAUBER, A.; OTTOVAY, E.; PRAUSE, J.U.; ZHONG, C.; NORRILD, B. Secretory IgA specific for herpes simlex virus in lacrmal fluid from patients with herpes keratitis-a possible diagnostic parameter. **British Journal of Ophthalmology**, v. 6, n. 10, p. 648-53, 1982.

PEPPARD, J. V.; MONTGOMERY, P. C. Studies on the origin and composition of IgA in rat tears. **Immunology**, v. 62, p. 193-8, 1987.

PERRY, H.; DOSHI-CARNEVALE, S.; DONNENFELD, E.D.; SOLOMON, R.; BISER, S.A.; BLOOM, A.H. Efficacy of commercially available topical cyclosporine A 0.05% in the treatment of meibomian gland dysfunction. **Cornea**, v. 25, n. 2, p 171-175, 2006.

PRABHASAWAT, P.; BARTON, K.; BURKETT, G.; TSENG, S.C.G. Comparison of conjunctival autografts, amniotic membrane grafts, and primary closure for pterygium excision. **Ophthalmology**, v. 104, n. 6, p. 974-85, 1997.

QUINTO, G. G.; MARTINS, S. A. R.; TIEMI, R.; CAMPOS, M.; BEHRENS, A. Líquido amniótico tópico: uma potencial nova alternativa para doenças da superfície ocular. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, n. 71, p. 55-60, 2008.

RANZANI, J. J. T.; MOBRICCI, L. A. L.; BRANDÃO, C. V. S.; CHIURCIU, J. L.V.; CREMONINI, D.N.; RODRIGUES, G.N. Espessura corneana mensurada pelo paquímetro ultra-sônico e pelo microscópio especular Topcon; SP-2000P em gatos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.2, p.356-358, 2008.

RENDU, F.; BROHARD-D, B. **A reação de libertação de plaquetas: grânulos constituintes, secreção e funções.** U428 INSERM, Faculté de Pharmacie, 4 Avenue de l'Observatoire, Paris, 2001.

REZENDE, M. S. V. M; SILVA, C.A.A.; ANTUNES, V. C. Uso do concentrado de plaquetas em doença da superfície ocular. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 66, n. 4, p. 257-261, 2007.

SAMPAIO, R. L. **Avaliação clínica, histopatológica e imunoistoquímica de córneas tratadas por ceratoplastia com membrana amniótica xenógena a fresco e conservada em glicerina. Estudo experimental em coelhos.** 2004. 212p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, Botucatu, São Paulo, 2004.

SAMPAIO, R. L. **Imunopatologia e morfometria do mecanismo de reparação de úlceras experimentais da córnea tratadas por ceratoplastia com membrana amniótica xenógena experimental em coelhos.** Projeto de pesquisa CVZ-APQ 00509-08, FAPEMIG, 2013.

SANCHEZ, A. R. et al. Is Platelet-rich Plasma the Perfect Enhancement Factor. A Current Review. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 18, p. 93-103, 2003.

SCHOENAU, J.S.F.; PIPPI, N.L. Aspectos morfológicos e funcionais da córnea: uma breve revisão. **A Hora veterinária**, v. 12, p. 49-53, 1993.

SCROGGS, M.W.; KLINTWORTH, G.K. Normal eye and adanexa. In:\_\_\_\_\_. **Histology for pathologists**. New York: Raven Press, ;1992.

SHAH, S.; CHATTERJEE, A.; MATHAI, M.; KELLY, S.P.; KWARTZ, J.; HENSON, D.; MCLEOD, D. Relationship between corneal thickness and measured intraocular pressure in a general ophthalmology clinic. **Ophthalmology**, v.106, n. 11, p.2154- 60, 1999.

SILVA, R. L. et al. Plasma rico em plaquetas combinado a hidroxiapatita na formação do calo ósseo em fraturas induzidas experimentalmente no rádio de cães. **Ciência Rural**, Santa Maria. v. 37, n. 4, p. 1045-1051, 2007.

SILVA, R.S.; SILVA, J.A.S.; LIMA, F.B.F.; VALBON, B.F.; SALOMÃO, M.Q.; AMBRÓSIO JUNIOR, R. Estudo das correlações entre a área do disco óptico e as características geométricas e biomecânicas da córnea. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 70, n.6, p. 349-57, 2011.

SINGH, R.; JOSEPH, A.; UMAPATHY, T.; DUA, H.S. Impression cytology of ocular surface. **British Journal of Ophthalmology**, v. 89, n. 12, p. 1655-9, 2005.

SLATTER, D. Cornea and sclera. In: \_\_\_\_\_. **Fundamentals of Veterinary Ophthalmology**. 2 ed. Philadelphia: Saunders, 1990. p. 257 - 303.

SMITH, V.A.; HOH, H.B.; EASTY, D.L. Role of ocular matrix metalloproteinase in peripheral ulcerative keratitis. **British Journal of Ophthalmology**, v. 83, p. 1376-81, 1999.

SOLOMON, A.; ROSENBLATT, M.; MONROY, D. J. Z.; PFLUGFELDER, S.C.; TSENG, S.C.G. Suppression of interleukin 1(alfa) and interleukin 1 (beta) in human epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. **British Journal of Ophthalmology**, v. 85, n. 4, p. 444-4449, 2001.

SONODA, S.; UCHINO, E.; NAKAO, K.; SAKAMOTO, T. Inflammatory cytokine of basal and reflex tears analysed by multicytokine assay. **British Journal of ophthalmology**, v. 90, n. 1, p. 120-2, 2006.

SOTOZONO, C. Second injury in the cornea: the role of inflammatory cytokines in corneal damage and repair. **Cornea**, v. 19, n. 6, p. 155-9, 2000.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. Leukocytes. In: \_\_\_\_\_. **Fundamentals of veterinary clinical pathology**. Iowa: Iowa State, 2002.

STOIBER, J.; MUSS, W.H.; POHLA-GUBO, G.; RUCKHOFER, J. GRABNER, G. Histopathology of human corneas after amniotic membrane and limbal stem cell transplantation for severe chemical burn. **Cornea**, v. 21, n. 5, p. 482-9, 2002.

SULLIVAN, D. A.; ALLANSMITH, M. R. Source of IgA in tears of rats. **Immunology**, v. 53, p. 791-9, 1984.

SWANK, A.; HOSGOOD, G. Corneal wound healing and the role of growth factors. **Compendium of continuing education small animal practice**, v. 18, p. 1007 - 1016, 1996.

TEIXEIRA, R. B. **Efeitos da aplicação tópica da Ciclosporina "A" a 2% sobre a córnea de cães submetidos à ceratoplastia lamelar com implante de pericárdio de equino preservado em glicerina: avaliação clínica e morfológica**. 2000. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

TSENG, S. C. G. Regulation and clinical implications of corneal epithelial stem cells. **Molecular Biology Reports**, v. 23, p. 47-58, 1996.

UEBEL, C. O.; SILVA, J.B.; CANTARELLI, D.; MARTINS, P. The Role of Platelet Plasma Growth Factors in Male Pattern Baldness Surgery. **Plastic And Reconstructive Surgery**, v. 118, n. 6, p. 1458-66, 2006.

UETA, M.; KWEON, M. N.; SANO, Y.; SOTOZONO, C.; YAMADA, J.; KOIZUMI, N.; KIYONO, H.; KINOSHITA, S. Immunosuppressive properties of human amniotic membrane for mixed lymphocyte reaction. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 129, n. 3, p. 464-70, 2002.

URSULIO, A.L.M.; CASTAÑEDA, D.; AMBRÓSIO JR, R. Progressão da espessura corneana do ponto mais fino em direção ao limbo: estudo de uma população normal e de portadores de ceratocone para criação de valores de referência. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia** , v.69, n. 4, p.579-83, 2006.

VENDRAMIN, F. S.; FRANCO, D.; FRANCO, T. R. Utilização do plasma rico em plaquetas autólogo nas cirurgias de enxertos cutâneos em feridas crônicas. **Revista Brasileira de cirurgia Plástica**, v. 25, n. 4, p. 589-94, 2010.

VILLAS-BÔAS, F.S.; DOI, L.M.; SOUSA, A.K.S.; MELO JR, L.A.S. Correlation between diurnal variation of intraocular pressure, ocular pulse amplitude and corneal structural properties. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia** , v. 72, n.3, p.296-301, 2009.

WAN, D.C.; LONGAKER, M.T.; WOODSELL, M. Producing Accurate Platelet Counts For Platelet Rich Plasma: Validation of a Hematology Analyzer and Preparation Techniques for Counting. **The Journal Of Craniofacial Surgery**, v. 16, n. 5, p. 757-9, 2005.

WANG, M.; YOSHIDA, A.; KAWASHIMA, H.; ISHIZAKI, M.; TAKAHASHI, H.; HORI, J. Immunogenicity and antigenicity of allogeneic amniotic epithelial transplants grafted to the cornea, conjunctiva, and anterior chamber. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 47, n. 4, p. 1522 -32, 2006.

WILKIE, D.A. Control of ocular inflammation. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 20, n. 3, p. 693-713, 1990.

WILSON, E. M. K.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N. Estimulação da cicatrização óssea pelo plasma autógeno rico em plaquetas. Estudo experimental em coelhos. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.14, n. 4, p. 208-212, 2006.

YAMADA, M.; MOCHIZUKI, H.; KAWAI, M.; TSUBOTA, K.; BRYCE, T.J. Decreased tear lipocalin concentration in patients with meibomian gland dysfunction. **British Journal of Ophthalmology**. v. 89, n 7, p. 803-5, 2005.

YAMAGAMI, S.; USUI, T.; AMANO, S.; EBIHARA, N. Bone Marrow-Derived Cells in Mouse and Human Cornea. **Cornea**, v. 24, n. 8, p. 71-74, 2005.

YAMAZAKI, M.; NAKAJIMA, F.; OGASAWARA, A. Spatial and temporal distribution of CD 44 and osteopontin in fracture callus. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 81, p. 508-15, 1999.

ZIMMERMANN, R. et al. Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. **Transfusion**, v. 41, p. 1217-1224, 2001.