

Efeito do concentrado de plaquetas xenólogo na cicatrização da córnea em coelhos

Effect of xenologous platelet concentrate on corneal healing in rabbits

Duvaldo Eurides^{1*}, Matheus M. Mantovani¹, Gabriel F. Menezes¹, Luiz A.F. da Silva²,
Luiz A. Souza¹, Benito J.N.A. Oliveira¹, Letícia B. Baungarten¹, Ana F.P.A. Delben¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, MG. Brasil. Av. Pará 1720. Campus Umuarama. 38400-9002. Uberlândia, MG. Brasil

²Escola de Veterinária. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, GO. Brasil

Resumo: As lesões da córnea são comuns em oftalmologia veterinária e podem ocasionar perda da capacidade visual. Dezoito coelhos machos adultos foram submetidos a ceratectomia superficial após a qual foram separados em três grupos para avaliação macroscópica e histológica aos 7, 15 e 30 dias no período pós-operatório. As córneas do bulbo ocular esquerdo foram tratadas com aplicação tópica de concentrado de plasma de bovino rico em plaquetas (PRP) e de antibiótico tobramicina, e as do bulbo direito, apenas com aplicação do antibiótico tópico tobramicina. Decorrida a cicatrização nos olhos tratados apenas com antibiótico as lesões encontravam-se cobertas por epitélio delgado e havia desorganização intensa da substância própria com áreas de necrose. Nos olhos medicados com PRP observou-se reepitelização aparentemente normal com áreas de acantose e a substância própria exibia fibras colágenas delgadas. Conclui-se que o concentrado de plaquetas xenólogas estimula o processo de cicatrização de lesões das córneas de coelhos com diminuição das áreas de necrose e opacidade corneanas.

Palavras-chave: concentrado de plasma de bovino rico em plaquetas, córnea, cicatrização, coelhos, córnea

Summary: Corneal injuries are common in veterinary ophthalmology and can sometimes cause loss of visual capacity. Eighteen adult rabbits were submitted to superficial keratectomy procedures and then separated into three groups for macroscopic and histological evaluation on the 7th, 15th and 30th of the postoperative period. The corneas of the left eye received topical administration to bovine concentrated plasma rich in platelets (PRP) as well as topical antibiotic tobramycin while the right eye received only topical antibiotic tobramycin. It was noted that in the eyes treated with topical application of the antibiotic, the corneal lesion was covered by a thin epithelium and there was an intense disorganization of substancia propria with areas of necrosis. In the eyes medicated with PRP reepithelialization was apparently normal, with smaller areas of acanthosis and substancia propria had thin collagen fibers. We concluded that the bovine concentrated plasma rich in platelets

stimulates and organizes the process of repairing of corneas injuries in rabbits with reduction of necrosis areas and corneal opacity.

Keywords: bovine concentrated plasma riche in platelets, cornea, healing, rabbits

Introdução

As lesões de córnea ainda são um grande problema na clínica de pequenos animais, produzindo perdas oculares e cicatrizes que interferem na qualidade visual. Na terapêutica clínica das lesões corneais tem sido utilizado inibidores da colagenase para evitar infecções secundárias e antibioticoterapia tópica (Bolson *et al.*, 2004). Na terapêutica cirúrgica, várias técnicas para reparo de lesões corneais foram descritas como enxertos conjuntivais pediculados (Habin, 1995), desepitelização manual (Pickett, 1995), lentes de contato (Wolfer e Grahn, 1994), escama de sardinha conservada em glicerina (Laus *et al.*, 2000), adesivos de cianocrilato (Mota *et al.*, 2004), película de Biofill (Pippi e Sampaio, 1990). Assim como a cápsula renal de coelhos (Eurides *et al.*, 1998) e capsula esplênica (Eurides *et al.*, 1998). Foi referido por Rosenthal *et al.* (1975) a aplicação de um composto de plaquetas, fibrinogênio e trombina para a fixação de enxertos lamelares corneanos em coelhos com obtenção de bons resultados após 21 dias de avaliação.

Existem inúmeros fatores de crescimento plaquetário no plasma sanguíneo denominado 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 e Paus, 2001). Possuem ação angiogênica, ativam a microcirculatório local e ativam vários grupos celulares na integração e vitalidade de tecidos (Vick *et al.*,

*Correspondência: duvaldo@ufu.br
Tel: +55 34 32182213; Fax: +55 34 32182523

2006). Os grânulos plaquetários contêm fatores como de crescimento de transformação semelhante à insulina (Giannobile, 1999). Quando em contato com seus respectivos receptores nucleares estimulam a angiogênese e a replicação dos tecidos e, como antiinflamatórios, induzem a cicatrização e o crescimento de novas estruturas orgânicas (Leme *et al.*, 2004).

Os concentrados de plaquetas autólogos foram utilizados com bons resultados no tratamento de úlceras corneanas refratárias ao tratamento em humanos (Rezende *et al.*, 2007), em implantes dentários, na regeneração de tecido ósseo e em cirurgias plásticas (Gimeno *et al.*, 2006). Neste concentrado existem fatores de crescimento úteis na epitelização corneana que induzem a migração e a diferenciação de células epiteliais (Hartwig *et al.*, 2004). Um dos contribuintes para a ativação plaquetário é um lipídio (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 no remodelação da matriz tecidual e proteínas mitogênicas auxiliando, dessa forma, na reparação dos tecidos (Ma e Bazan, 2000).

A córnea desencadeia a síntese do FAP após sofrer lesão e no epitélio favorece a entrada intracelular de Ca²⁺ e a ativação de enzimas responsáveis pela reorganização da matriz extracelular (Chandrasekher *et al.*, 2002). Concomitantemente podem proteger, ao lado de outros fatores de crescimento, os ceratócitos da apoptose (Rezende *et al.*, 2007).

Este trabalho tem por objetivos avaliar a reparação cicatricial de córneas de coelhos submetidas a ceratectomia superficial após a administração tópica de concentrado de plaquetas de bovino, por meio de exames macroscópicos e histológicos dos aspectos do epitélio anterior e da substância própria.

Material e métodos

Dezoito coelhos hípidos, com idade compreendida entre 12 a 15 meses, machos, com peso entre 3,0 kg a 4,5 kg, da raça Nova Zelândia foram submetidos a ceratectomia superficial bilateral. Os animais foram separados em três grupos de igual número, sendo os do grupo I avaliados com sete dias de pós-operatório (PO), os do grupo II com 15 dias e os do grupo três com 30 dias de PO. No olho esquerdo dos coelhos foi realizada a administração tópica de concentrado de plasma rico em plaquetas (PRP) de bovino e com tobramicina, enquanto o olho direito foi utilizado como controle e tratado apenas com o antibiótico tobramicina. Experimento aprovado pelo comitê de ética, protocolo número CEUA/UFU 006/09.

Para obtenção das plaquetas colheu-se 5,0 mL de sangue da veia jugular externa de um bovino hírido,

que foi depositado num frasco contendo 0,5 mL de EDTA a 10%. O material foi centrifugado durante 20 minutos a 1200 rpm, para separação celular através de gradiente de concentração. Foi pipetada a fração de plasma e plaquetas contida na parte superior do tubo, e armazenada em recipiente sem coagulante. A porção recolhida foi novamente centrifugada durante 20 minutos a 2000 rpm. O componente superior do soro foi removido e o restante no fundo do frasco foi considerado o plasma rico em plaquetas. Para cada 0,5 mL do PRP foi adicionado 0,25 mL de cloreto de cálcio a 5%. A solução foi homogeneizada e mantida em repouso e decorridos 10 minutos apresentava-se gelatinosa.

Os animais foram submetidos em jejum hídrico e de alimentados sólidos de seis horas e anestesiados com cetamina (30 mg/kg, IM) e xilazina (0,5 mg/kg, IM). Após anti-sepsia tópica com polivinil-pirrolidona a 0,9%, as pálpebras foram mantidas afastadas com blefarostato de Castroviejo e o bulbo ocular imobilizado com pontos de suturas esclero-conjuntivais, com fio de nylon, 4-0. Em ambos os olhos promoveu-se ceratectomia superficial com trepano de Castroviejo de 5,0 mm com 0,2 mm de profundidade.

No pós-operatório (PO) aplicou-se, nos dois olhos, colírio contendo tobramicina de seis em seis horas e em forma de pomada à noite. No olho esquerdo administrou-se uma gota do concentrado de plaquetas xenólogas duas vezes ao dia, nos intervalos entre as aplicações do antibiótico. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com colar elisabetano e, diariamente, as córneas foram avaliadas com fonte luminosa e lupa, para verificar a presença de edema, opacidade, neovascularização, coloração e a evolução cicatricial. Foram também realizados testes com colírio de fluoresceína a cada sete dias, para acompanhamento da involução da área lesada. A extensão corada foi mensurada com paquímetro nos sentidos dorso-ventral e latero-medial.

Decorrido os períodos pré-determinados de PO, os coelhos foram submetidos à eutanásia para colheita das córneas, com sobredose de tiopental sódico 2,5% e cloreto de potássio 10%, conforme recomendado pelo código de ética para o uso de animais em pesquisas científicas (American Veterinary Medical Association, 2001; CRMV-MG, 2002). As córneas foram removidas com 0,3 mm da esclera e conservadas em formol 10% para confecções de laminas histológicas, fixadas durante 48 horas e desidratadas em solução de concentrações crescentes de etanol e incluída em parafina (JB₄). O material foi cortado em micrótomo Leica, modelo 2.065, com navalha de vidro com 8,0 mm de espessura, em cortes de 3 mm de profundidade. Os cortes foram corados pela hematoxilina e eosina (HE) e montados entre lâmina e lamínula com resina sintética e avaliadas em microscopia óptica para verificar as reações teciduais e a reparação cicatricial das córneas. Os dados obtidos foram analisados pelo teste t de

Student não emparelhado adotando-se nível de significância de 0,5%. Nas lesões que foram positivas ao teste realizou-se mensurações nos sentidos dorso-ventral e latero-medial após 7, 15 e 30 dias de PO.

Experiência aprovada pelo comitê de ética, protocolo número CEUA/URU 006/09.

Resultados

O gel do concentrado de plaquetas xenólogas foi obtido através da adição do cloreto de cálcio 5% que ativou o sistema de coagulação, resultando o PRP em colóide. Após 10 minutos da mistura foi aplicada uma gota da solução sobre a lesão, notando-se boa retenção do gel o que, possivelmente, permitiu maior período de atividade do concentrado sobre a lesão corneana.

No 7º dia de PO dos animais do grupo controle, as córneas de três coelhos (50%) apresentavam opacidade moderada e três (50%) apresentavam opacidade intensa. Nos do grupo tratado, quatro animais (66,6%) manifestavam opacidade corneana moderada e dois (44,4%) intensa.

Aos 15 dias de PO, quatro coelhos (66,6%) do grupo controle exibiam opacidade moderada e dois (44,4%) exibiam pouca opacidade. Já os tratados com PRP, cinco (83,3%) manifestavam opacidade moderada e um (17,7%) apresentava opacidade de pequena intensidade.

Decorrido 30 dias, no grupo controle observou-se em cinco animais (83,3%) pouca opacidade corneana e um (17,7%) opacidade moderada. No grupo dos animais tratados, um (17,7%) demonstrou moderada opacidade da córnea e cinco (83,3%) apresentaram pouca opacidade (Tabela 1).

Tabela 1 - Aspectos macroscópicos da opacidade corneana dos coelhos do grupo controle (GC) e tratado (GT), transcorrido 7, 15 e 30 dias de PO.

INTENSIDADE	7º PO		15º PO		30º PO	
	GC	GT	GC	GT	GC	GT
Pouca	-	-	-	3	5	1
Moderada	3	4	4	3	1	5
Intensa	3	2	2	-	-	-

Foi observado aos sete dias de PO que as córneas de cinco animais (83,3%) do grupo controle se apresentavam positivos ao teste de fluoresceína e enquanto que todas as tratadas com plasma rico em plaquetas (100%) demonstraram positividade à coloração. Decorrido 15 dias de PO, cinco coelhos (83,3%) do grupo controle manifestavam as córneas coradas e quatro (66,6%) de dentre os tratados, responderam de forma positiva ao teste. Procedido 30 dias de PO ocorreu coloração da lesão em três animais (44,4%) do grupo controle e dois animais (50%) do grupo tratado.

Decorrido 30 dias de PO, as lesões corneanas nos animais do grupo controle encontravam-se cobertas por

epitélio delgado e existia desorganização intensa da substância própria com áreas de necrose moderada (Figura 1-E). Entretanto, nas lesões tratadas com PRP a reepitelização apresentava-se aparentemente normal, com áreas de acantose, substância própria com fibras colágenas delgadas e ausência de necrose (Figura 1-F).

Os resultados obtidos referentes, mensurações das lesões de córnea coradas com fluoresceína dos animais do grupo controle e tratado com PRP, encontram-se relacionadas nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Mensurações das lesões de córnea coradas com fluoresceína dos animais do grupo controle e tratado com PRP, nos sentidos dorso ventral (DV) e latero-medial (LM), no 7º dia de PO.

GRUPO I Animal	CONTROLE		TRATADO	
	DV	LM	DV	LM
1	8,32	8,02	5,30	6,88
2	4,52	4,60	4,52	5,10
3	3,24	3,56	4,48	4,26
4	0,00	0,00	4,60	4,12
5	4,10	5,90	3,50	4,72
6	4,28	4,53	3,14	3,04
MÉDIAS ± SD	4,07±0,74	4,43±1,28	4,25±1,87	4,68±2,36

Tabela 3 - Mensurações das lesões de córneas coradas com fluoresceína dos coelhos do grupo controle e tratado com PRP, nos sentidos dorso ventral (DV) e latero-medial (LM), no 15º dia de PO.

GRUPO II Animal	CONTROLE		TRATADO	
	DV	LM	DV	LM
7	3,06	2,94	2,92	2,86
8	3,80	3,80	2,30	2,10
9	0,00	0,00	0,00	0,00
10	3,46	2,94	0,00	0,00
11	3,36	3,50	3,14	3,18
12	6,82	5,00	1,08	0,42
MÉDIA ± SD	3,41±2,17	3,03±1,66	1,57±1,41	1,42±1,46

Tabela 4 - Mensurações das lesões de córneas coradas com fluoresceína dos coelhos do grupo controle e tratado com PRP, nos sentidos dorso ventral (DV) e latero-medial (LM), no 30º dias de PO.

GRUPO III Animal	CONTROLE		TRATADO	
	DV	LM	DV	LM
13	6,18	4,48	4,42	3,40
14	0,00	0,00	0,00	0,00
15	0,00	0,00	0,00	0,00
16	4,80	4,80	4,50	4,70
17	3,38	4,50	0,00	0,00
18	0,00	0,00	0,00	0,00
MÉDIA ± SD	2,39±2,76	2,29±2,51	1,48±2,30	1,35±2,13

Discussão

Após lesão corneana o endotélio produz miofibroblastos que apresentam receptores para fator de crescimento tumoral sendo responsável pela apoptose

dos ceratócitos e conseqüentemente a opacidade da córnea. Portanto, é necessária a eliminação dos miofibroblastos (He e Bazan, 2006). Nesta experiência, o fator de crescimento plaquetário presente no PRP deve ter auxiliado na supressão dos miofibroblastos, além da ação antiinflamatório (Leme *et al.*, 2004), reduzindo a intensidade da opacidade corneana. O concentrado de plaquetas por ser uma fonte rica em fatores de crescimento essenciais (Rezende *et al.*, 2007) e auxiliar na reparação tecidual (Ma e Bazan, 2000), provavelmente, ocasionou aceleração do processo de cicatrização das feridas corneanas dos coelhos.

O menor índice de coloração à fluoresceína observado nos animais tratados, deveu-se a reepitelização exacerbada da lesão, estimulada pelos fatores de crescimento plaquetário (Ma e Bazan, 2000; Hartwig *et al.*, 2004), resultando na ausência de exposição da substância própria corneano.

Na apreciação dos resultados referentes à coloração da lesão do grupo controle e tratados aos 15 e 30 dias de PO, não houve diferença expressiva entre os grupos controle e tratado, embora o número de lesões corneanas coradas tenha sido menor no grupo tratado (Tabela 2, 3 e 4).

Nas córneas dos animais do grupo controle no 7º dia de PO, os bordos das lesões se exibiam cobertas pela camada basal do epitélio e a substância própria com intenso infiltrado de células heterofílicas e neovascularização moderada (Figura 1-A). Em duas córneas (33,3%) foi notada na porção central e superficial da substância própria, pequena quantidade de necrose. O

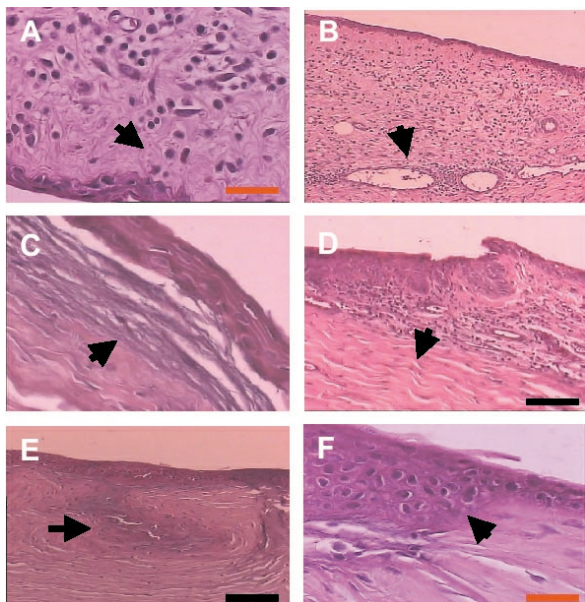


Figura 1 - Microfotografias das córneas de coelhos após ceratectomia parciais tratadas e não tratadas com concentrado de plaquetas xenólogas. Notar ao 7º dia PO no grupo controle (A) presença de infiltrado hidrofílico (seta) e no grupo tratado (B) neovascularização (seta). No grupo controle ao 15º dia (C) observar-se fibras colágenas delgadas e desorganizadas (seta) e no tratado (D) fibras colágenas organizadas (seta). No 30º dia de PO verifica-se, no grupo controle (E) área de necrose (seta) e no grupo tratado (F) espessamento do epitélio (seta). HE. Barra preta = 10 µm; barra vermelha = 100 µm.

que pode ser devido à contaminação bacteriana, mesmo com a administração tópica de antibiótico. Nas córneas do grupo tratado com concentrado de plaquetas xenólogas, observou-se intensa neovascularização, pouco infiltrado heterofílico, ausência de necrose tissular e resíduo do concentrado (Figura 1-B). As diferenças notadas entre as córneas tratada e não tratadas com PRP foram em conseqüência à propriedade angiogênica das plaquetas, como mencionado por Ma e Bazan (2000). O concentrado possui fatores de crescimento úteis na epitelização corneana (Gimeno *et al.*, 2006) e após processado, o líquido sobrenadante possui maior quantidade de fatores de crescimento, os quais induziram a migração e estimulou a diferenciação de células epiteliais (Hartwig *et al.*, 2004).

Após 15 dias de PO observou-se nas córneas dos animais do grupo controle reepitelização intensa com infiltrado heterofílico moderado e na substância própria presença de fibras colágenas delgadas em processo de formação e desorganizada (Figura 1-C). Nas córneas tratadas notou-se áreas do epitélio espessadas, substância própria com moderado infiltrado mononuclear e neovascularização (Figura 1-D).

A distinção entre a reparação do epitélio corneano nos animais dos dois grupos, pode ter sido devida à indução, migração e diferenciação de células epiteliais promovidas pelo concentrado de plaquetas que possui fatores de crescimento, como verificado em coelhos por Hartwig *et al.* (2004). As fibras colágenas neoformadas na substância própria eram delgadas e organizadas, resultados semelhantes aos encontrado em coelhos por Gimeno *et al.* (2006). O ocorrência deveu-se, possivelmente, ao fator ativador de plaquetas serem mediadores da inflamação e estimulador da expressão de genes envolvidos no remodelamento da matriz extracelular, como referido por Hartwig *et al.* (2004).

A necrose e o espessamento epitelial deveu-se ao facto de os ceratócitos possuir receptores para o fator de crescimento plaquetário que protege as células da apoptose e estimulam a mitose epitelial (Jackson, 2002).

Foi referido por Ma *et al.* (2004) que em coelhos ficou evidenciado a existência de um fator plaquetário que ativa o crescimento endotelial vascular e promove a angiogênese. É um lipídio bioativo que pode induzir a expressão de genes envolvidos no remodelamento da matriz extracelular. Ao mesmo tempo podem proteger, ao lado de outros fatores de crescimento, os ceratócitos da apoptose (Bazan e Ottino, 2002). O concentrado xenólogo utilizado neste trabalho causou redução da inflamação e do tempo de cicatrização, proveu crescimento do epitélio e da substância própria, portando, levou à reparação das feridas corneanas. Possivelmente, como foi demonstrado por Chandrasekher *et al.* (2002), o epitélio da córnea desencadeou a síntese do fator ativador plaquetário que favoreceu o influxo

intracelular de Ca²⁺ e a ativação de enzimas responsáveis pela reorganização da matriz extracelular. O fator de crescimento plaquetário deve ter alterado a expressão de metaloproteinases que tem como função a proteólise da matriz extracelular permitindo a migração de células endoteliais para a área da lesão através da quimiotaxia exercida pelo fator de ativação plaquetário (Murphy e Gavrilovic, 1999).

Os resultados deste estudo indicam que o concentrado coloidal de plaquetas xenólogas de bovino estimula e organiza o processo de reparação de lesões de córneas de coelhos com diminuição de áreas de necrose e da opacidade resultante da cicatrização.

Bibliografia

- American Veterinary Medical Association (2001). Report of the AVMA panel on euthanasia. *J Am Vet Med Assoc*, 218(5), 669.
- Bazan H e Ottino P (2002). The role of platelet-activating factor in the corneal response to injury. *Prog Retin Eye Res*, 21(1), 449-464.
- Bolson J, Cunha CG, Gonçalves GF, Leme MC, Martins LA, Ney LP, Pachaly JR, Sanches AWD, Stofela-Neto HC (2004). Efeito do uso tópico de açúcar cristal na cicatrização corneana em coelhos. *Medvop*, 2(6), 103-107.
- Chandrasekher G, MA X, Bazan HEP (2002). Delay of corneal epithelial wound healing and induction of keratocyte apoptosis by platelet-activating factor. *Investig Ophthalmol Vis Sci*, 43(5), 1422-1428.
- CRMV-MG (2002). Eutanásia: Resolução do CFMV instituiu normas e procedimentos para eutanásia em animais. *Vet Zootec MG*, 17(7), 25.
- Eurides D, Gonçalves GF, Mazzanti A, Beletti ME, Lima CAP, Leme MC, Dutra AT (1989). Utilização da cápsula renal de coelho no reparo de ceratectomias superficiais em cães. In: Congresso Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, 3, Belo Horizonte, 1998. Anais... Belo Horizonte: CBAV, 110.
- Giannobile WV (1999). Periodontal tissue regeneration by polypeptide growth factors and gene transfer. In: Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics. Illinois, Quintessence, 231-243.
- Gimeno FL, Gatto S, Ferro J (2006). Preparation of platelet-rich plasma as a tissue adhesive for experimental transplantation in rabbits. *Thromb J*, 4(18), 1-7.
- Habin D (1995). Conjunctival pedicle grafts. In *Practice*, 17(2), 61-65.
- Hartwig D, Harloff S, Liu L (2004). 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? *Transfus Med*, 44(12), 1724-1731.
- He J, Bazan HE (2006). Synergistic effect of platelet-activating factor and tumor necrosis factor-alpha on corneal myofibroblast apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(3), 883-891.
- Jackson PA (2002). Chronic superficial keratitis in dogs: a placebo controlled trial of topical cyclosporine treatment. *Progress Vet Comparative Ophthalmol*, 1(4), 269-275.
- Laus JL, Ferreira AL, Andrade AL (2000). Emprego da escama de sardinha (*Sardinella brasiliensis* – Steidachner, 1859), conservada em glicerina, em ceratoplastia lamelares. Estudo experimental. *Bra J Vet Anim Sci*, 37(1).
- Leme JJ, Rossi JRR, Villa N (2004). Análise do potencial osteogênico do plasma rico em plaquetas no reparo de cavidades ósseas: estudo histológico em cães. *Rev Paul Odontol*, 26(3), 4-15.
- Ma X, Bazan HEP (2000). Increased platelet-activating factor receptor gene expression by corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(7), 1696-1702.
- Ma X, Ottino P, Bazan HEP, Bazan NG (2004). Platelet-activating factor (PAF) induces corneal neovascularization and upregulates VEGF expression in endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(9), 2915-2921.
- Mota FCD, Eurides D, Freitas PMC, Beletti ME, Gulart MR, Silva LAF, Fioravanti MCS (2004). Use of the n-butyl cyanoacrylate adhesive and the polyglactine thread suture for corneal raphy in rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *J Vet Sci*, 5, 267-270.
- Murphy G, Gavrilovic J (1999). Proteolysis and cell migration: creating a path? *Current Opinion Cell Biology*, 11(5), 614-621.
- Pickett JP (1995). Treating persistent corneal erosions with a crosshatch keratotomy technique. *Vet Med*, 24, 561-572.
- Pippi NL e Sampaio AJSA (1990). Estudos preliminares sobre o comportamento do Biofill na ceratoplastia lamelar em coelhos. *Ver Cent Ciênc Rurais*, 20(3-4), 297-302.
- Rezende MSVM, Silva CAA, Antunes VC (2007). Uso do concentrado de plaquetas em doença da superfície ocular. *Rev Bras Oftalmol*, 66(4), 257-261.
- Rosenthal AR, Harbury C, Egbert PR, Rubenstein E (1975). Use of a platelet-fibrinogen-thrombin mixture as a corneal adhesive: experiments with sutureless lamellar keratoplasty in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 14(11), 872-875.
- Stenn KS e Paus R (2001). Controls of hair follicle cycling. *Physiol Rev*, 81, 449-494.
- Vick VL, Holds JB, Hartstein ME, Rich RM, Davidson BR (2006). Use of autologous platelet concentrate in blepharoplasty surgery. *Ophthalm Plast Reconstr Surg*, 22, 102-104.
- Wolfer J, Grahn B (1994). Diagnostic ophthalmology. *Can Vet J*, 35, 314-316.