

KAREN MEDINA TEIXEIRA

**USO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO TRATAMENTO DE
ULCERAÇÕES CORNEANAS SUPERFICIAIS EM EQUINOS**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área: Clínica e Cirurgia

Orientadora: Profa Maristela Silveira Palhares

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
2014

T266u Teixeira, Karen Medina, 1983-
 Uso de plasma rico em plaquetas no tratamento de ulcerações corneanas superficiais em equinos / Karen Medina Teixeira. – 2014.

71 p. : il.

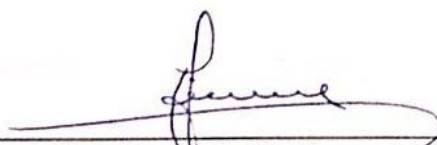
Orientadora: Maristela Silveira Palhares
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

1. Equino – Doenças – Teses. 2. Oftalmologia veterinária – Teses.
3. Córneas – Doenças – Tratamento – Teses. I. Palhares, Maristela Silveira.
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

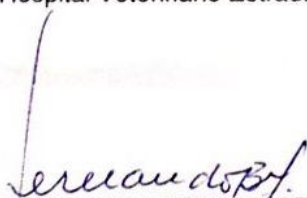
CDD – 636.108 977

Dissertação defendida e aprovada em 27 de fevereiro de 2014, pela Comissão Examinadora constituída por:

Prof^a. Maristela Silveira Palhares
Presidente - Orientadora



Dr. Leonardo Rodrigues de Lima
Hospital Veterinário Estrada Real



Prof. Fernando Antônio Bretas Viana
Escola de Veterinária - UFMG



Dr. Gustavo de Oliveira Fulgêncio



Profa. Fabíola de Oliveira Paes Leme
Escola de Veterinária - UFMG

"A compaixão para com os animais é uma das mais nobres virtudes da natureza humana."

(Charles Darwin)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Profa. Maristela Palhares, por dividir seu conhecimento com paciência, por toda ajuda com o experimento e a dissertação e pela confiança que depositou em mim quando, muitas vezes, esta me faltava.

Ao meu marido pelo amor, apoio e compreensão que me permitiram realizar o desejo de me tornar mestre.

Aos meus pais que me deram todo o apoio necessário para chegar até aqui.

Às minhas irmãs, que comemoram cada conquista. Esther, obrigada pelo abrigo, colo e paciência!

Ao Prof. Fernando Bretas por me inspirar a me dedicar à oftalmologia.

À Profa. Fabíola Paes Leme, pela amizade e tantos ensinamentos.

Aos amigos, especialmente Cinthya Brillante Cardinot e Gertrud E. Campos Edler, cuja enorme ajuda tornaram possível a realização desse experimento!

Às residentes da clínica de equinos Patrícia, Iolanda, Ana Luiza e Jackeline, pela amizade e colaboração.

Ao Sebastião Alves por agilizar a rotina diária de exames!

Ao Matheus Vilardo Lóis Moreira, residente da patologia veterinária, pela preparação das lâminas e a Profa. Rosilene Ecco pelo auxílio na avaliação histológica das úlceras induzidas experimentalmente.

Aos alunos da UFMG e estagiários pela ajuda com o manejo dos animais.

Ao Gustavo Fulgêncio pela amizade e tantas idas à UFMG na tentativa de me auxiliar de alguma forma no experimento.

Aos cavalos que emprestaram seus olhos para geração de conhecimento.

A todos os que, de alguma forma, colaboraram no desenvolvimento dessa pesquisa, meu muito obrigado!

À Universidade Federal de Minas Gerais pelas oportunidades oferecidas a mim na residência e no mestrado.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Tabelas	8
Lista de Figuras	10
Lista de Abreviaturas	11
Resumo	12
Abstract	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	15
2.1. A córnea equina	15
2.1.1. Considerações anatômicas	15
2.1.2. Ceratite ulcerativa	16
2.1.3. Processo de reparação corneana	17
2.1.4. Indução experimental de úlcera de córnea	19
2.2. Exame oftalmológico do equino	21
2.2.1. Anamnese	21
2.2.2. Exame clínico	21
2.2.3. Termografia ocular infravermelha	23
2.3. Plasma Rico em Plaquetas (PRP)	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Experimento 1: Avaliação histológica dos olhos de equinos submetidos à técnica de indução da úlcera de córnea, com o uso do <i>Diamond Burn</i> ...	27
3.2. Experimento 2: Tratamento da úlcera de córnea superficial, em cavalos, com plasma rico em plaquetas autólogo e heterólogo	28
3.2.1. Condições experimentais	28
3.2.2. Seleção dos animais experimentais	28
3.2.3. Exame clínico	29
3.2.3.1. Exame termográfico	29
3.2.3.2. Exame oftalmológico	31
3.2.3.3. Teste da fluoresceína	36
3.2.3.4. Mensuração da úlcera de córnea	36
3.2.4. Indução da úlcera de córnea superficial	36
3.2.5. Processamento e aplicação do PRP	36
3.2.6. Avaliação do PRP	37
3.3. Experimento 3: Avaliação termográfica no diagnóstico da úlcera de córnea equina	37
3.4. Análises estatísticas	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. Experimento 1: Avaliação histológica dos olhos de equinos submetidos à técnica de indução da úlcera de córnea, com o uso do <i>Diamond Burr</i>	39
4.2. Experimento 2: Tratamento da úlcera de córnea superficial, em cavalos, com plasma rico em plaquetas autólogo e heterólogo	41
4.2.1. Indução de úlcera superficial de córnea com equipamento de <i>Diamond Burr</i>	41
4.2.2. Preparação e avaliação do Plasma Rico em Plaquetas	41
4.2.3. Avaliação clínica e termográfica de equinos com úlcera de córnea induzida pelo DB e tratados com PRP autólogo ou heterólogo	44

4.2.4.	Reparação da úlcera de córnea em equinos tratados com PRP autólogo e heterólogo	55
4.3.	Experimento 3: Avaliação termográfica no diagnóstico da úlcera de córnea equina	63
5.	CONCLUSÕES	65
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
8.	ANEXOS	72

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Média \pm erro padrão da temperatura ambiente máxima e mínima e umidade relativa do ar, no momento dos exames termográfico e clínico	29
Tabela 2	Cronograma dos exames oftalmológicos em equinos com úlcera de córnea induzida	31
Tabela 3	Avaliação dos constituintes do sangue e do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) nos grupos autólogo e heterólogo, através da contagem automática por impedância	42
Tabela 4	Avaliação do Plasma Rico em Plaquetas (PRP), utilizado nos grupos autólogo e heterólogo	42
Tabela 5	Concordância entre os examinadores 1 e 2, na avaliação clínica da presença de alopecia, em pacientes equinos, independentemente da presença de úlcera de córnea *	45
Tabela 6	Frequência da ocorrência de epífora, alopecia e fotofobia, de acordo com o momento do exame, em equinos com úlcera de córnea induzida e tratados com Plasma Rico em Plaquetas (PRP)	46
Tabela 7	Concordância entre os examinadores 1 e 2, na avaliação clínica da presença de fotofobia, em pacientes equinos, independentemente da presença de úlcera de córnea *	46
Tabela 8	Concordância entre os examinadores 1 e 2, na avaliação clínica da presença de epífora, em pacientes equinos, independentemente da presença de úlcera de córnea *	47
Tabela 9	Concordância entre os examinadores 1 e 2, na avaliação clínica da presença de blefaroespasm, em pacientes equinos, independentemente da presença de úlcera de córnea *	48
Tabela 10	Média \pm Erro padrão e mediana do escore para blefaroespasm, de acordo com o momento do exame, em equinos com úlcera de córnea induzida e tratados com Plasma Rico em Plaquetas (PRP)	49
Tabela 11	Concordância entre os examinadores 1 e 2, na avaliação clínica da presença de hiperemia da conjuntiva, em pacientes equinos, independentemente da presença de úlcera de córnea *	49
Tabela 12	Média \pm Erro padrão e mediana do escore para hiperemia, de acordo com o momento do exame, em equinos com úlcera de córnea induzida e tratados com Plasma Rico em Plaquetas (PRP)	50
Tabela 13	Concordância entre os examinadores 1 e 2, na avaliação clínica da presença de quemose, em pacientes equinos, independentemente da presença de úlcera de córnea *	51
Tabela 14	Média \pm Erro padrão e mediana do escore para quemose, de acordo com o momento do exame, em equinos com úlcera de córnea induzida e tratados com Plasma Rico em Plaquetas (PRP)	51
Tabela 15	Concordância entre os examinadores 1 e 2, na avaliação clínica da presença de edema de córnea, em pacientes equinos, independentemente da presença de úlcera de córnea *	52
Tabela 16	Média \pm Erro padrão e mediana do escore para edema de córnea, de acordo com o momento do exame, em equinos com úlcera de córnea induzida e tratados com Plasma Rico em Plaquetas (PRP)	53

Tabela 17	Concordância entre os examinadores 1 e 2, no teste de fluoresceína, para diagnóstico da úlcera de córnea, em pacientes equinos	54
Tabela 18	Média \pm Erro padrão da temperatura ocular ($^{\circ}$ C) obtida pela termografia por infravermelho, de acordo com o momento do exame, em equinos com úlcera de córnea induzida e tratados com Plasma Rico em Plaquetas (PRP)	54
Tabela 19	Área pelas técnicas automática (área) e manual (XY) da úlcera de córnea, em equinos tratados com Plasma Rico em Plaquetas (PRP), de acordo com o dia	55
Tabela 20	Percentual de redução pela mensuração automática (cm^2) e manual (cm^2) da úlcera, em relação ao dia anterior e em relação ao Dia 1, de acordo com o grupo, em equinos com úlcera de córnea	58
Tabela 21	Estatística descritiva do tempo de cicatrização (dias) da úlcera de córnea, em equinos tratados com Plasma Rico em Plaquetas (PRP)	60
Tabela 22	Percentual de equinos com úlcera de córnea ao final dos sete dias de tratamento	60
Tabela 23	Proporção de cicatrização (PC) da úlcera de córnea, em equinos tratados com Plasma Rico em Plaquetas (PRP), de acordo com o dia de cicatrização	60
Tabela 24	Taxa de risco ^a e com Intervalo de Confiança (IC) - 95%, para a cicatrização da úlcera de córnea em equinos sob diferentes tratamentos	60
Tabela 25	Frequência de opacidades corneanas 90 dias após a resolução da úlcera superficial em animais tratados com PRP autólogo, heterólogo e soro fisiológico	61
Tabela 26	Escore* para opacidade corneana observada 90 dias após a reparação da úlcera de córnea superficial em animais tratados com PRP autólogo, heterólogo e soro fisiológico (Controle positivo)	62
Tabela 27	Sensitividade, especificidade, taxa de verossimilhança (LR), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN), de acordo com a temperatura ocular obtida por termografia infravermelha, em equinos, no diagnóstico da úlcera de córnea	64

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Desenho esquemático das camadas corneanas	15
Figura 2.	Aplicação do <i>Diamond Burr</i> sobre a córnea de animal <i>ex vivo</i>	30
Figura 3.	Úlceras de córnea superficiais produzidas em animal <i>ex vivo</i> com auxílio do <i>Diamond Burr</i>	30
Figura 4	Termografia do olho direito de equino normal	30
Figura 5	Termografia do olho esquerdo de equino normal	30
Figura 6	Blefaroespasma em equinos.....	32
Figura 7	Epífora em equino	32
Figura 8	Alopecia na pálpebra superior de um equino	32
Figura 9	Quemose em equinos	33
Figura 10	Hiperemia conjuntival em equinos	34
Figura 11	Edema de córnea em equinos	35
Figura 12	Teste de fluoresceína positivo	35
Figura 13	Mensuração da área marcada em verde utilizando a escala observada à direita	35
Figura 14	Classificação do estado de ativação plaquetária	38
Figura 15	Fotomicrografia de córnea equina ulcerada experimentalmente	40
Figura 16	Percentual de reparação da úlcera de córnea induzida, de acordo com o dia e o grupo, em equinos tratados com Plasma Rico em Plaquetas (PRP)	57
Figura 17	Área (cm ²) da úlcera de córnea induzida, de acordo com o dia e o grupo, em equinos tratados com Plasma Rico em Plaquetas (PRP)	57
Figura 18	Percentual de equinos apresentando úlcera de córnea, de acordo com o grupo e os dias de tratamento	59
Figura 19	Avaliação da transparência corneana 90 dias após a resolução das úlceras de córnea	62
Figura 20	Sensibilidade e especificidade da temperatura ocular mensurada por termografia infravermelha, no diagnóstico da úlcera de córnea em equinos..	63

LISTA DE ABREVIATURAS

ACD	Ácido cítrico dextrose
CTGF	Fator de crescimento de tecido conectivo
EGF	Fator de crescimento epidermal
FCR	Força centrífuga relativa
FGFa	Fator de crescimento fibroblástico ácido
FGFb	Fator de crescimento fibroblástico básico
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
LR	<i>Likelihood Ratio</i>
LX	Lipoxina
LX-A4	Lipoxina A4
MB	Membrana basal
MMP	Metaloproteinases
OD	Olho direito
OS	Olhos esquerdo
PD-EGF	Fator de crescimento epidermal derivado de plaquetas
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PIO	Pressão intraocular
PMN	Polimorfonucleares
PRP	Plasma rico em plaquetas
TGF	Fator de crescimento transformador
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
VEGF	Fator de crescimento epitelial vascular

RESUMO

A técnica de indução de úlceras de córnea superficiais pelo debridamento com *Diamond Burr* foi avaliada quanto à padronização e segurança para a espécie equina. Após a validação, esta técnica foi empregada na indução experimental da lesão nos olhos de dezoito cavalos. Tratamentos com PRP autólogo e heterólogo foram avaliados e comparados aos grupos controle positivo (olhos debridados tratados apenas com solução fisiológica) e negativo (os olhos esquerdos não-debridados, mas tratados da mesma forma do olho contralateral). Adicionalmente, a termografia ocular infravermelha foi avaliada como recurso diagnóstico da ceratite ulcerativa em equinos. A concordância entre avaliadores na identificação de sinais clínicos oculares foi comparada, indicando o nível de dificuldade na identificação dos mesmos. O *Diamond Burr* gera lesões que não ultrapassam o estroma anterior, sendo seguro para a indução experimental de úlceras corneanas superficiais em equinos. Os resultados clínicos foram semelhantes ($p > 0,05$) entre os grupos PRP autólogo e heterólogo. O uso do PRP reduziu em 1,92 vezes o tempo de reparação da lesão. Os efeitos benéficos foram similares para o PRP autólogo e o heterólogo, não ocorrendo maior inflamação ocular nesse segundo grupo. A termografia ocular foi eficiente ao identificar 8,67 entre 10 olhos ulcerados e validada como um exame eficaz para a triagem das lesões ulcerativas superficiais de córnea em equinos. A transparência corneana, avaliada 90 dias após a resolução da lesão, foi melhor preservada nos animais tratados com PRP autólogo.

PALAVRAS-CHAVE: cavalo, úlcera de córnea, *Diamond Burr*, plasma rico em plaquetas, termografia ocular infravermelha.

ABSTRACT

Diamond Burr debridement technique was evaluated for inducing superficial corneal ulcers, assessing its safety and standardization for the equine species. After validation, it was employed in the corneal ulcers experimental induction on eighteen horses eyes. Treatments with autologous and heterologous PRP were evaluated and compared to the positive (debrided eyes treated only with saline solution) and negative control groups (the left and non-debrided eye, receiving the same treatment applied in positive contralateral eye). Additionally, infrared ocular thermography was evaluated as a diagnostic feature of ulcerative keratitis in horses. The concordance rate among examiners when identifying ocular clinical signs was compared, pointing the difficulty in interpreting each of them. *Diamond Burr* debridement does not exceed the anterior stroma, being safe for superficial corneal ulcers experimental induction in horses. Clinical results were similar ($p>0,05$) among autologous and heterologous PRP groups. PRP use reduced 1,92 times the wound reparation period. Beneficial effects were similar in autologous and heterologous PRP groups and did not increase differently ocular inflammation. Ocular thermography was efficient in identifying 8,67 of 10 ulcerated eyes, being validated as effective screening feature for superficial ulcerative corneal wounds in horses. Corneal transparency, assessed 90 days after wound repair, was better preserved in animals treated with autologous PRP.

KEY WORDS: horse, corneal ulcer, *Diamond Burr*, platelet rich plasma, ocular infrared thermography.

1. INTRODUÇÃO

A córnea é a porção mais externa do bulbo ocular, estando exposta ao risco de traumatismos e infecções (McGrath e Lee, 2014). A ceratite ulcerativa em equinos representa um risco para a visão e exige diagnóstico precoce e tratamento imediato (Brooks, 1999). Frequentemente o processo de reparação de úlceras resulta em alterações no formato, superfície e transparência da córnea, produzindo déficit visual (McGrath e Lee, 2014).

O cavalo que sofre perda parcial ou total da visão interage de forma diferente com o ambiente, podendo se tornar um perigo para si próprio e para aquele que realiza o seu manejo diário (Teixeira et al., 2009).

Modular o processo de reparação da córnea permite melhora a acuidade visual do animal e evitar repercussões indesejáveis da deficiência visual sobre a sua vida e a rotina dos seres humanos envolvidos com o cavalo (Teixeira et al., 2009).

O processo inflamatório e a reparação corneana são controlados por diversos fatores de crescimento, citocinas e enzimas, produzidos por células da própria córnea, células inflamatórias e patógenos. A manutenção dos tecidos oculares resulta de um equilíbrio entre o crescimento, reparação e apoptose (Andrew e Willis, 2005).

Nos grânulos- α do citoplasma das plaquetas ficam armazenados fatores pré-fabricados, liberados após sua ativação. Porém, normalmente, esses fatores não alcançam a córnea devido sua peculiar ausência de vasos (Harmon et al., 2014).

O plasma rico em plaquetas (PRP) é uma fonte concentrada de fatores de crescimento protegidos no interior dos grânulos plaquetários, liberados apenas no tecido alvo onde esse rico material biológico é aplicado (El-Sharkawy et al., 2007; Harmon et al., 2014). Por meio PRP é possível acelerar a reparação e modular a inflamação em tecidos como ligamentos e tendões, vasos, tecido nervoso, pele e olhos (local onde não teriam atuação naturalmente) (Constable et al., 1973; Farrag et al., 2007; Maia et al., 2009; Wroblewski et al., 2010;

Anitua et al., 2011; Kim et al., 2012; Mammoto et al., 2013).

Na medicina equina o PRP foi administrado com sucesso no tratamento de lesões musculoesqueléticas e cutâneas distais nos membros. O seu uso na terapia de artropatias é controverso, principalmente no que diz respeito à via intra-articular (DeRossi et al., 2009; Monteiro et al., 2009; Textor, 2011; Torricelli et al., 2011; Yamada et al., 2012; Carmona et al., 2005).

A avaliação de protocolos de tratamento para diversas injúrias frequentemente depende da indução experimental da lesão, de forma que se obtenha padronização do protocolo. Diversas técnicas de indução de úlceras experimentalmente induzidas foram propostas, entretanto a maioria das técnicas apresenta elevado nível de dificuldade ou produz efeitos indesejáveis, prejudicando a acuidade visual ou levando à perda visual (Tervo et al., 1989; Burns et al., 1990; Chung et al., 1996; Chung et al., 1998; Tognoli et al., 2009). A indução de úlceras corneanas superficiais através do *Diamond Burr* mostrou-se tecnicamente simples e segura para a aplicação em cães e camundongos (Pal-Gosh et al., 2011; Silva et al., 2011), porém não há relatos do seu uso em equinos.

Não foram encontrados estudos avaliando o tratamento de úlceras de córnea em equinos com PRP, assim como trabalhos comparando os efeitos do PRP autólogo e heterólogo, independente do sistema estudado. Apesar disso, acredita-se que o PRP heterólogo seria uma forma de simplificar e disseminar essa importante terapia regenerativa na medicina equina, pois permitiria seu uso em pacientes localizados em locais distantes dos laboratórios capazes de produzir o PRP.

Os objetivos deste estudo foram validar a técnica de indução de úlcera corneana superficial em equinos por *Diamond Burr*; tratá-las com plasma rico em plaquetas (PRP), autólogo e heterólogo; avaliar as técnicas de diagnóstico de lesões oculares, determinando o grau de dificuldade na identificação de sinais clínicos oculares e validar a termografia ocular como método de triagem de lesões corneanas em equinos.

2. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

2.1. A córnea equina

2.1.1. Considerações anatômicas

A córnea normal de equinos tem formato oval, com diâmetro horizontal discretamente maior que o vertical. A córnea equina apresenta aproximadamente 0,8 a 1,0 mm de espessura no centro, sendo discretamente mais espessa na periferia. Não há correlação da espessura corneana

com idade, sexo e densidade de células endoteliais (Andrew e Willis, 2005).

A maioria dos cavalos é emétrepe, entretanto, em um estudo 20,7% deles se mostraram míopes, 24,4% hipermetropes e 7,3% apresentavam astigmatismo (Stuhr et al., 1999).

A córnea de um cavalo normal é composta de cinco camadas: epitélio, fina membrana basal, estroma, membrana de Descemet e endotélio (Andrews e Willis, 2005) (Fig. 1).

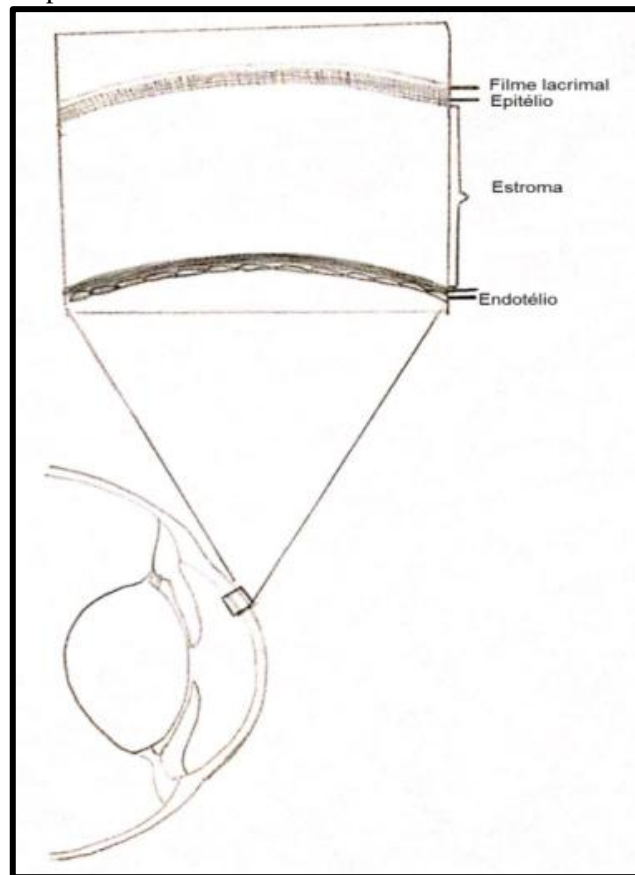


Figura 1. Desenho esquemático das camadas corneanas.

O epitélio, do tipo estratificado pavimentoso não queratinizado, é formado por dez camadas de células escamosas, podendo aumentar até 15 camadas devido à hipertrofia das camadas basais resultante de injúrias (Brooks, 2007).

A membrana basal é uma fina camada que ancora as células epiteliais ao estroma e desempenha um importante papel na fase final do processo de reparação corneana (Andrew e Willis, 2005).

O estroma é a camada mais espessa da córnea representando 90% da espessura total, sendo constituída basicamente por lamelas de tecido fibroso composto por colágeno tipo 1 e algumas poucas células, os fibroblastos (Andrew e Willis, 2005). A correta disposição dessas lamelas assegura a transparência da córnea (Viana, 2002).

A membrana de Descemet é uma membrana basal acelular do endotélio constituída principalmente por fibras colágenas (Viana,

2002).

O endotélio é formado por uma camada simples de células endoteliais, que possuem bombas de Na-K ATPase responsáveis por manter a córnea desidratada e transparente (Viana, 2002; Carastro, 2004). Essas células endoteliais têm baixo poder de regeneração e uma eventual perda de grande quantidade delas, como em consequência à uveíte, pode levar ao edema e opacidade permanente da córnea (Viana, 2002; Dwyer, 2008). A transparência da córnea é conferida pela disposição das lamelas, ausência de vasos, presença de nervos desmielinizados, e um sistema de bomba-aspirante permanente do endotélio que regula seus teores de água. A inervação corneana é realizada pelo ramo oftálmico do nervo trigêmeo. Os nutrientes são obtidos através da lágrima, humor aquoso e pelos vasos perilimbais e o oxigênio diretamente do ambiente (Viana, 2002). Alterações na distribuição e densidade das células endoteliais têm impacto direto na transparência corneana, pois a redução significativa de células endoteliais leva a incapacidade de bombear água para fora da córnea. A concentração média de células endoteliais na córnea normal de um cavalo é de 3155 ± 765 células/mm². O número de células reduz com a senilidade e diversos processos patológicos (Andrew e Willis, 2005).

Há um sistema de proteção da superfície ocular à infecções envolvendo barreiras físicas e químicas. O epitélio normal repele o filme lacrimal que contém os microorganismos evitando que esses penetrem em camadas mais profundas (Williams e Pinard, 2013). Através remoção mecânica desse filme lacrimal com a movimentação das pálpebras e membrana nictitante ocorre a drenagem dos microorganismos junto com a lágrima através do sistema lacrimal, auxiliando, assim, na proteção contra à invasão microbiana (Brooks, 1999). Além disso, há enzimas (lactoferrinas, lisozimas, betalinas) e imunoglobulina A lacrimais que têm ação antimicrobiana direta (Brooks, 1999). Contudo, pequena lesão epitelial pode resultar em aderência de micro-organismos e instalação de uma infecção corneana (Sauer et al., 2003).

2.1.2. Ceratite ulcerativa

É prudente considerar todo olho equino ulcerado potencialmente infectado. Muitos casos de úlcera de córnea, inicialmente, apresentam defeitos epiteliais muito pequenos, com mínima dor, blefaroespasma e fotofobia. À medida que a doença progride ocorre a neovascularização e edema, infiltrado inflamatório e sinais mais pronunciados de uveíte anterior, como miose intensa e hiperemia conjuntival. Por fim, há lise de proteínas da matriz extracelular no estroma por proteinases e a córnea apresenta aparência "derretida", denominada malácia (Brooks, 1999).

Acredita-se que traumatismos sejam a causa primária de ceratites ulcerativas no equino. Infecções bacterianas ou fúngicas são considerados invasores oportunistas quando ocorre remoção da barreira epitelial (Johns et al., 2011). Os defeitos no epitélio permitem aos micro-organismos presentes na microbiota normal ou patogênicos aderirem na córnea e estabelecerem infecção (Nasisse e Nelms, 1992).

Em qualquer infecção corneana os microorganismos precisam, primeiramente, aderir à superfície corneana para resistir aos mecanismos de defesa oculares naturais e, então, colonizar a superfície infectada (Brooks, 1999).

A patogenicidade de um micro-organismo está relacionado à sua habilidade de aderir ao epitélio lesionado. Essa habilidade está relacionada à expressão de adesinas, componentes estruturais ou químicos dos micro-organismos que interagem com receptores celulares ou com a membrana plasmática (Brooks, 1999). Entre as adesinas mais comuns nos patógenos oculares encontra-se o ácido teicóico e fímbrias, que interagem e se fundem à membrana de células epiteliais. A disseminação bacteriana no estroma corneano é facilitado pela produção de metaloproteinases, tanto bacterianas como teciduais e lacrimais (Brooks, 1999). Quando produzidas pelo hospedeiro as metaloproteinases são denominadas endógenas. Há duas famílias principais que acometem a córnea: metaloproteinases de matriz (MMP) e as séricas. As MMP's são

enzimas dependentes de zinco que incluem gelatinases, colagenases, protease alcalina e estromalinas. As MMP's são produzidas por fibroblastos do estroma, células epiteliais corneanas e polimorfonucleares (Brooks 1999, Strubbe et al., 2000).

As metaloproteinases endógenas estão em equilíbrio com fatores inibitórios que evitam a degradação excessiva de matriz. Determinadas proteinases podem levar à rápida degradação do colágeno e outros componentes da matriz extracelular (Strubbe et al., 2000).

Presença excessiva de MMP's foi encontrada no filme lacrimal do olho contralateral de cavalos com ceratite ulcerativa, em comparação com controle normal. Não se sabe se esse fato é devido a alta concentração da MMP previamente à lesão, predispondo ao avanço da infecção, ou se existe um controle central ou sistêmico que module a resposta semelhante em ambos os olhos, afetado e não afetado (Strubbe et al., 2000).

As úlceras de córnea são classificadas em simples, recorrentes e complicadas. As úlceras simples são caracteristicamente agudas e superficiais, envolvendo o epitélio e possivelmente um terço do estroma subjacente. Essas úlceras podem passar despercebidas ao exame oftálmico caso não seja realizado o teste com corante de fluoresceína (Williams e Pinard, 2013). Por isso, é recomendável aplicar o corante em todo e qualquer olho que apresente sinais de dor ocular (Brooks, 1999). O edema de córnea, geralmente, está entre ausente a discreto e a vascularização não é observada. No equino, apesar das úlceras superficiais serem consideradas potencialmente contaminadas, a infecção em camadas mais profundas nem sempre é visualizada (Williams e Pinard, 2013).

Úlceras recorrentes, refratárias ou indolentes são aquelas superficiais que persistem devido à falha na adesão do epitélio ao estroma adjacente. Nesse caso o epitélio é facilmente removido produzindo um defeito corneano superior ao observado inicialmente. A presença de edema e neovascularização é variável (Williams e Pinard, 2013).

Úlceras complicadas incluem uma variedade de lesões em que camadas profundas do estroma estão comprometidas com ou sem infecção estabelecida. O edema corneano pode ser moderado a severo, dependendo da severidade da ulceração e a neovascularização pode não ter ocorrido, mas se desenvolve em curto espaço de tempo. Pode ser observada malácia do estroma corneano, identificada pelo aspecto gelatinoso da córnea, devido à ação de metaloproteinases. A inflamação pode progredir para a reparação epitelial sem a completa reparação do estroma, levando à formação de um abscesso, que se apresenta como uma área opaca ou amarelada, bem delimitada, normalmente desacompanhada de neovasos (Williams e Pinard, 2013).

2.1.3. Processo de reparação corneana.

O epitélio corneano é mantido por um ciclo constante de remoção por apoptose das células superficiais e proliferação das células basais, únicas para realização de mitose. O equilíbrio entre apoptose das células superficiais, mitose das células basais e reposição celular devido à migração centrípeta de células tronco presentes no limbo permitem a manutenção da integridade e função do epitélio corneano (Andrew e Willis, 2005).

A reparação epitelial pode ser dividida em três estágios: latência, migração celular e adesão e proliferação celular. Quando há abrasão do epitélio corneano a mitose cessa e as células da borda da lesão se retraem, espessam e perdem os hemidesmossomos, que as ancoram na membrana basal, momento denominado fase de latência. Nessa fase ainda ocorrem a infiltração de polimorfonucleares e remoção de debris celulares. Em seguida, as células se alargam e se movem através de movimentos ameboides para cobrir o defeito epitelial (Andrew e Willis, 2005). Esse processo, denominado fase de migração e adesão, se inicia após as primeiras seis horas da ocorrência da lesão e se mantém durante 24 a 36 horas (Steele, 1999). A primeira camada a recobrir a lesão possui a espessura de uma célula, mas uma cobertura multilaminada composta por

células basais e escamosas posteriormente recobre essa primeira (Brooks, 1999). A fase final da reparação epitelial envolve a proliferação das células epiteliais de forma a restaurar a espessura normal do epitélio. Nessa fase há ativação das células tronco limbais, que se proliferam nas camadas basais, aumentando a densidade celular na área lesionada. Esse processo é observado após 36 horas do início da lesão e termina com a expressão dos hemidesmossomos e ancoramento do epitélio à membrana basal. Nessa fase há também o reestabelecimento das terminações nervosas trigeminais (Steele, 1999).

A taxa de reparação do epitélio corneano é, em média, 6 μm / dia. Sendo assim, o epitélio pode ser completamente repostado em duas semanas, mas caso a membrana basal seja removida, esta não será completamente formada até seis semanas após a lesão. Isso torna o epitélio recém-formado delicado e vulnerável a novas injúrias (Brooks, 1999, Andrew e Willis, 2005; Williams e Pinard, 2013).

A reparação de defeitos no epitélio corneano é mais rápida nos primeiros cinco a sete dias, quando o processo passa a ser mais lento. Esse fenômeno é atribuído à exaustão das células epiteliais ao redor da lesão ou às mudanças no estroma abaixo delas (Williams e Pinard, 2013).

Após lesões no estroma corneano os ceratócitos se diferenciam em fibroblastos e miofibroblastos, proliferam e sintetizam a matriz extracelular (Williams e Pinard, 2013).

Reparação retardada é geralmente resultado de úlceras de córnea infectadas, devido à infiltração de polimorfonucleares (PMN) e morte celular (Williams e Pinard, 2013). Nesses casos, células do sistema imune atraídas por citocinas, rapidamente extravasam dos vasos sanguíneos limbais e migram de acordo com o gradiente de quimiocinas estabelecido no estroma corneano em direção local da lesão (Carlson et al., 2010). Ocorre o início de um processo destrutivo em que há necrose de queratócitos do estroma e fagocitose das células mortas por PMN. Enquanto os PMN migram horizontalmente no estroma há destruição da membrana basal, levando ao

descolamento do epitélio sobre ela. O aumento no defeito epitelial, por sua vez, intensifica a migração de PMN. Se o processo não é contido adequadamente, a degradação do estroma progride até sua perda total e perfuração ocular (Brooks, 1999).

Tanto leucócitos como o próprio tecido e a lágrima são fonte de citocinas e fatores de crescimento que perpetuam e regulam o processo inflamatório (Williams e Pinard, 2013).

O processo de reparação de defeitos corneanos depende em grande parte do acesso de fatores de crescimento ao epitélio e estroma lesionados. Os fatores de crescimento são peptídicos produzidos, local e sistemicamente, que atuam coordenando e regulando o processo de reparação tecidual. Como a córnea é normalmente avascularizada, depende de fatores de crescimento que a alcancem através das lágrimas, humor aquoso e vasos perilimbais (Andrew e Willis, 2005). Diversos fatores de crescimento são conhecidos por seu importante papel na reparação corneana, destacando-se o fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e o fator de crescimento de tecido conectivo (CTGF) (Haber et al., 2003).

O EGF aumenta a síntese proteica, de DNA e RNA e mitoses no epitélio e em fibroblastos do estroma corneano. PDGF aumenta a síntese de fibronectina, ácido hialurônico, colagenase e de outros fatores de crescimento. Já o TGF- β estimula a quimiotaxia de células inflamatórias e aumenta a síntese de matriz extracelular. Este último pode inibir a proliferação de células epiteliais e queratócitos de córneas equinas (Haber et al., 2003).

O CTGF está presente na secreção lacrimal, sendo produzido, pelo menos em parte, pelas glândulas lacrimais (Andrew e Willis, 2005).

A avaliação dos efeitos da administração tópica de uma alta dose de EGF em córneas equinas, cujo epitélio havia sido removido cirurgicamente, demonstrou que apesar da aceleração no processo de reparação houve

intensa resposta inflamatória associada, acentuando o grau de inflamação, produzindo neovascularização, pigmentação e formação de cicatrizes corneanas (Burling et al., 2000).

Diversos fatores de crescimento como o Fator de Crescimento Fibroblástico Ácido (AFGF), Fator de Crescimento Fibroblástico Básico (BFGF), EGF e TGF induzem a proliferação de células endoteliais vasculares dentro da córnea (Burling et al., 2000).

Como sequela de um processo de reparação cursando com intensa inflamação ou descontrolado, há modificação da estrutura normal da córnea, com formação de neovasos, opacificação, pigmentação e alteração no formato e curvatura da córnea. A vascularização tem aspectos positivos e negativos no processo de reparação corneana. Algumas condições patológicas da córnea são resolvidas apenas após a completa neovascularização da área afetada, como por exemplo, abscessos de estroma e úlceras profundas. Procedimentos cirúrgicos para aplicação de enxertos conjuntivais visam a derivação de vasos para o local da lesão e através desses vasos antimicrobianos administrados por via sistêmica, leucócitos e anticorpos alcançam o local da lesão. Contudo a intensa neovascularização pode levar à perda de transparência e déficit visual significativo (Andrew e Willis, 2005).

A pigmentação é sequela de um processo de reparação crônico. A severidade da pigmentação está correlacionada à intensidade da inflamação produzida. A pigmentação superficial resulta da migração de melanócitos da região perilimbal ou limbal para o local da lesão. Pode ocorrer deposição de pigmento melanocítico nas camadas basais do epitélio e na porção superficial do estroma e até ser incorporado pelas células endoteliais devido à fagocitose (Andrew e Willis, 2005).

A opacificação corneana pode ser resultado de edema, aumento da densidade de células epiteliais e fibrose. O edema ocorre quando a injúria altera a função das células endoteliais, que perdem a capacidade de bombear a água presente no estroma corneano e manter a deturgência na área

afetada (Andrew e Willis, 2005).

A hiperplasia de células epiteliais, efeito fisiológico para cobrir o defeito corneano, pode aumentar a densidade de células nessa área, produzindo espessamento e perda de transparência (Mc Grath e Lee, 2014).

A fibrose ocorre quando intenso processo inflamatório no estroma corneano leva à deposição desorganizada de matriz extracelular, com produção de colágeno diferente daquele encontrado em córneas normais. O colágeno tipo I, que passa a apresentar disposição e espaçamento entre fibras alterados, contribui para a perda de transparência. Nesses processos cicatriciais os fibroblastos passam a expressar actina, presente nas fibras musculares lisas, o que numa fase tardia, será responsável pela contração do tecido cicatricial (Mc Grath e Lee, 2014).

Se a hiperplasia aumenta a densidade e espessura da córnea, áreas de hipoplasia se apresentam como depressões na superfície corneana, alterando sua forma e curvatura, o que interfere diretamente na refringência e piora a acuidade visual (Mc Grath e Lee, 2014). Dessa forma, estudos que desenvolvam medidas terapêuticas como o plasma rico em plaquetas, capazes de modular o processo de reparação visando a manutenção da arquitetura normal da córnea permitirão mais do que assegurar a reparação rápida e efetiva dos defeitos corneanos, mas também a preservação da visão e melhora da qualidade de vida dos pacientes.

2.1.4. Indução experimental de úlceras de córnea

A indução de úlceras de córnea em animais de experimento permitiu, ao longo dos anos, avaliar o potencial tóxico de diversos gases e compostos químicos sobre a córnea saudável, colaborando para o desenvolvimento de terapias para tratar seres humanos e animais acidentalmente expostos a esses agentes nocivos e frequentemente atendidos por serviços de oftalmologia (Robson, 1944).

Alguns métodos foram utilizados para indução experimental de úlceras de córnea: excisão cirúrgica, abrasão com álcali e,

mais recentemente, o *Diamond Burr* (DB). Técnicas cirúrgicas para a produção de lesões corneanas apresentam elevado grau de complexidade, exigindo anestesia geral e magnificação adequada para produzir lesões de tamanho e profundidade similares nos animais envolvidos (Tervo et al., 1989).

Os álcalis levam ao desenvolvimento de úlceras de córnea profundas, envolvendo o estroma e produzindo lise de colágeno. Esta técnica apresenta acentuado risco de perda visual por opacidade, perfurações e panuveíte. Nos trabalhos consultados os animais experimentais foram eutanasiados para exame histológico de suas córneas. Essa técnica tem pouca aplicabilidade quando o delineamento experimental mantém os animais vivos, priorizando a qualidade de vida, após o período de experimento (Burns et al., 1990; Chung et al., 1996; Chung et al., 1998 e Tognoli et al., 2009).

DB consiste na aplicação sobre a córnea de uma broca revestida por pó de diamante acoplada a um motor de baixa rotação. Existem diversos modelos de aparelhos manuais movidos à pilha com especificações técnicas similares. A velocidade média de rotação do motor é de 10.000 rpm e utiliza brocas descartáveis ou autoclaváveis de 05 a 5mm de diâmetro (McGrath e Lee, 2014).

O aparelho DB passou a ser utilizado na rotina oftalmológica mais recentemente, contudo a primeira aplicação de broca acoplada a motor de baixa rotação sobre a córnea data de 1898, em uma demonstração realizada por Ranvier. Frankle, em 1907, foi o primeiro a sugerir a sua aplicação para remoção mecânica do epitélio corneano, ainda associado à remoção química. Em 1936 houve um aprimoramento do aparelho com o revestimento com pó de diamante na superfície da broca (McGrath e Lee, 2014). Sua aplicação na medicina veterinária, entretanto, foi bem tardia, com o primeiro relato apenas em 2008 (Sila et al., 2009)

O polimento através do DB é uma técnica extremamente simples, de uso ambulatorial, que requer pouca tecnificação e baixo investimento, além de demandar instalações pouco sofisticadas para sua realização. Para sua utilização a técnica requer apenas

anestesia local e raramente, é necessária alguma contenção química, o que a torna segura em pacientes que apresentam acentuado risco anestésico (Sridhar et al., 2002; Soong et al., 2002). Atualmente é o método de escolha em diversos centros oftalmológicos para o tratamento de cicatrizes, lesões epiteliais associadas a distrofias corneanas, úlceras recorrentes e excisão de pterígio, tornando sua aplicação mais difundida (Mc Grath e Lee, 2014).

As técnicas de aplicação preconizam o uso ou não de agentes mecânicos ou químicos sobre o epitélio antes do polimento com DB. Dentre estas técnicas destacam-se: a remoção do epitélio de córneas íntegras (Silva et al., 2011); a utilização de esponja de celulose para remoção do epitélio de córneas apresentando erosão recorrente (Soong et al., 2002; Sridhar et al., 2002; Tzelikis et al., 2005; Aldave et al., 2009); aplicação de álcool 20% sobre área demarcada da córnea por 40 segundos e remoção da camada epitelial (Dua et al., 2006, McGrath e Lee, 2014) ou a aplicação do aparelho diretamente sobre o epitélio (Sila et al., 2008; Silva et al., 2011).

Em todas as técnicas analisadas foi realizada anestesia tópica com colírio de tetracaína a 1%, cloridrato de proximetacaína a 0,5% ou proparacaína a 0,5%, além de antisepsia com iodopovidona na concentração de 1:50 previamente ao procedimento (Sridhar et al., 2002; Tzelikis, 2005; Sila et al., 2009; Aldave et al., 2009; Silva et al., 2011; Pal-Gosh et al., 2011; Gosling et al., 2013; McGrath e Lee, 2014).

Silva et al. (2011) avaliaram histologicamente córneas de cães debridadas com DB diretamente sobre o epitélio ou sobre a membrana basal após a remoção do epitélio. Não foi observada diferença na profundidade da lesão, independente da aplicação sobre o epitélio ou sobre a MB, havendo áreas de perda desta última, e áreas em que se apresentava íntegra em todas as amostras avaliadas. Além disso, em nenhuma das córneas o debridamento havia ultrapassado a porção anterior do estroma.

Atualmente acredita-se que o debridamento por DB seja uma técnica segura e com altos

índices de sucesso no tratamento de úlceras recorrentes em seres humanos e em cães, produzindo melhora, inclusive, na acuidade visual por correção do índice refrativo resultante de reparação de defeitos epiteliais (Srhidhar et al., 2002; Tzelikis et al., 2005; Silva et al., 2011).

2.2 Exame oftalmológico do equino

2.2.1. Anamnese

Um histórico fidedigno é importante para o diagnóstico das lesões oculares. Determinadas informações podem sugerir alguma condição e até mesmo ajudar na elaboração do prognóstico. O indivíduo a ser entrevistado deve ser aquele que acompanhou o surgimento ou a evolução da afecção. Deve-se questionar sobre a queixa principal, ressaltando alterações na cor do olho, estrabismo, secreção ocular e seu aspecto, redução da visão e se a afecção é bilateral. Se a queixa principal for dificuldade visual, deve-se investigar se é observado em ambientes de maior ou menor iluminação. Deve-se questionar se a visão piora de perto ou de longe e se a identificação de objetos em movimento também está comprometida (Viana, 2002; Carastro, 2004).

Outras informações importantes devem ser obtidas, tais como: a duração dos sinais clínicos, há quanto tempo tem sido observados (horas, dias, semanas, meses), se o animal já havia apresentado alterações e se houve acometimento de outros animais, se foi realizado qualquer tratamento anterior e qual a medicação utilizada. Deve-se solicitar a medicação que está sendo usada no paciente, pois muitas vezes o cliente confunde-se a respeito da base usada (Carastro, 2004).

2.2.2. Exame clínico

Antes da manipulação do animal é interessante observar o paciente em busca de deficiências visuais e determinar o nível de conforto (Carastro, 2004). Além disso, deve-se avaliar a simetria das órbitas e fossa supraorbitais e da face, que em situações de déficits neurológicos com comprometimento do nervo facial,

apresenta assimetria labial ou ptose palpebral e auricular (Taylor e Hillyer, 1997).

A posição do bulbo ocular também precisa ser avaliada. Edema palpebral e conjuntival severos podem indicar trauma, acidente ofídico ou reação anafilática a picada de insetos. As pálpebras devem ser avaliadas quanto à simetria, lacerações, cicatrizes e sinais de dor (Hendrix, 2005).

Dentre os principais sinais de dor destacam-se o blefaroespasma, a fotofobia e diminuição da angulação normal dos cílios (Hendrix, 2005; Tayllor e Hillyer, 1997; Brooks, 2007). As pálpebras, o canto medial do olho e a terceira pálpebra devem ser avaliados quanto à presença de secreção ocular, epífora ou sangue. A protrusão da terceira pálpebra pode indicar enoftalmia devido à dor, ocorrência de neoplasias, afecções orbitais ou sistêmicas (Hendrix, 2005).

A posição do bulbo ocular deve ser observada e enoftalmia e exoftalmia devem ser diferenciadas, respectivamente, de microftalmia e buftalmia. Enoftalmia é a retração do globo ocular indicando dor ocular, sendo geralmente acompanhada por blefaroespasma. Exoftalmia pode ser um indicativo de tumores retrobulbares ou de processos infecciosos ou inflamatórios na órbita. A microftalmia é uma condição congênita em que o bulbo ocular tem tamanho menor do que normal ou quando este nem apresenta estruturas de um olho normal. A uveíte crônica ou traumas severos podem originar uma condição em que o olho se apresenta menor, denominada *phthisis bulbi*, em que há degeneração do globo ocular. A buftalmia é o aumento do bulbo ocular secundário ao glaucoma (Hendrix, 2005).

A movimentação do bulbo ocular deve ser observada em ambos os olhos, por meio da movimentação da cabeça do animal, ou de algum objeto pelo qual este apresente interesse à sua frente (Brooks, 2007).

Se há queixa de perda visual, deve-se fazer alguns testes antes da sedação. Cavalos frequentemente não cooperam com os testes visuais, mas pode se criar um percurso com barreiras, como baldes ou fardos de feno, facilitando a sua realização. A capacidade

visual de um olho é sempre testada fechando o olho oposto, com máscaras ou até com uma atadura. Torna-se importante simular condições de iluminação variada, especialmente a condição em que o cliente acredita que a visão seja mais afetada (Carastro, 2004).

Avaliar os reflexos auxilia no diagnóstico dos problemas oculares de origem neurológica ou de lesão nervosa secundária. A resposta de ameaça se desenvolve no córtex cerebral, não sendo considerado um reflexo, mas uma resposta cerebral treinada e complexa, raramente presente em potros ao nascimento. Eles só desenvolvem essa habilidade entre duas a quatro semanas de vida (Irby, 2011). A via aferente é gerada por um gesto inesperado no campo visual próximo. As respostas esperadas serão o fechamento das pálpebras e movimentação da cabeça para o lado oposto. Essa resposta é observada em potros às duas semanas de vida (Carastro, 2004).

Os quadrantes do campo visual devem ser avaliados com objetivo de se eliminar uma deficiência visual parcial. Não se deve proceder um gesto ameaçador, apesar do nome do teste, mas fazer um gesto notável que não gere corrente de ar para não estimular as abundantes terminações do nervo trigêmeo na córnea, evitando tocar os pelos sensitivos ao redor dos olhos. A via aferente da resposta de ameaça é iniciada na retina/nervo óptico (par II) pela observação do gesto, enquanto a via eferente é completada pelo nervo facial (VII) com o fechamento das pálpebras. A ausência de resposta à ameaça não quer dizer que haja perda visual. Alguns cavalos podem simplesmente não se importar com a presença e o gesto do examinador (Carastro, 2004; Irby, 2011).

O reflexo palpebral deve ser avaliado tocando as pálpebras superior e inferior nas comissuras lateral e medial, o que deve provocar o fechamento das pálpebras a cada toque. Na espécie equina a mobilidade da pálpebra superior é normalmente muito maior do que a da pálpebra inferior. A porção aferente desse reflexo é gerada pelo ramo maxilar do nervo trigêmeo, que é sensitivo na face. Quando toca a pálpebra superior o examinador avalia o ramo

oftálmico do nervo trigêmeo (par craniano V) e na pálpebra inferior avalia o ramo maxilar do mesmo nervo. A porção eferente é realizada pelo nervo facial (par VII) produzindo a contração do músculo orbicular ocular. Se ao tocar a pálpebra superior no canto medial não houver resposta, o examinador deve tocar a mucosa nasal ipsilateral, que é inervada pelo trigêmeo (Irby, 2011).

O reflexo à luz é subcortical, sendo iniciado pela incidência repentina de uma luz clara e brilhante diretamente no olho do animal. O fechamento parcial da pálpebra ou a retração do bulbo ocular são as reações esperadas. A porção aferente desse reflexo é gerada pelo nervo óptico (par II) e a porção eferente é via nervo facial (par VII) (Irby, 2011). Uma resposta positiva não indica necessariamente a integridade da visão, pois em alguns animais completamente cegos ainda há captação do estímulo luminoso pelo nervo óptico, mesmo que não haja a transformação desse estímulo em imagem (Carastro, 2004).

O exame pupilar deve ser realizado com auxílio de uma fonte de luz e cada olho deve ser avaliado quanto ao tamanho, forma e simetria das pupilas (Irby, 2011). Anisocoria, ou seja, o tamanho desigual das pupilas é sempre preocupante. As causas possíveis de anisocoria são o glaucoma, uveíte, sinéquias, atrofia da íris, uso de agentes farmacológicos como a atropina (cujo efeito residual pode durar até duas semanas nos cavalos), afecções de retina e nervo óptico, doença neurológica de origem central e paralisia do nervo oculomotor. O reflexo pupilar direto é testado por meio da incidência de uma fonte de luz forte sobre a pupila. A incidência de luz diretamente sobre a pupila permite a passagem desta para o fundo do olho e estimula melhor este reflexo. A reação esperada é a miose, ou seja, a constrição da pupila. O reflexo pupilar consensual é avaliado no olho oposto àquele em que se incide diretamente a fonte de luz. Nesse caso é esperada a constrição parcial da pupila (Carastro, 2004; Brooks, 2007).

Face e região orbital do animal devem ser devidamente palpados a fim de se avaliar a presença de edema, dor, fraturas orbitais,

tumores oculares e retrobulbares que poderiam produzir exoftalmia (Hendrix, 2005; Colitz et al., 2000; Moore et al., 2000; Gilger, 2013).

Para uma avaliação detalhada é interessante usar alguns instrumentos como uma fonte de luz, que pode ser desde uma lanterna de boa iluminação até um transiluminador ou otoscópio. Uma lupa pode ajudar a melhor visualização de lesões pequenas, juntamente à fonte de luz (Carastro, 2004; Dwyer, 2008). As pálpebras devem ser avaliadas quanto à presença de lacerações, edema, dor e neoplasias. Nas conjuntivas deve-se buscar por hiperemia, edema, hemorragias petequiais e neoplasias. A terceira pálpebra deve ser observada de forma a identificar hiperemia, petéquias, pigmentação da margem, neoplasias e corpos estranhos (Moore et al., 2000).

Antes de se iniciar o exame de córnea e câmara anterior é preciso avaliar as conjuntivas oculares. A ocorrência de conjuntivites primárias em equinos é rara, mas o acometimento das conjuntivas secundário a problemas bulbares é frequente. Sinais como, hiperemia, edema, congestão e hemorragias conjuntivais são sinais auxiliares no diagnóstico desses problemas (Cutler, 2004).

Como córnea é a localização mais comum das afecções oculares, todo olho com sinais de inflamação deve receber os corantes fluoresceína e rosa bengala (Williams e Pinard, 2013; Brooks, 1999).

A fixação da fluoresceína indica a defeitos na profundidade total do epitélio corneano. Entretanto, algumas vezes as afecções corneanas podem corar menos, ou serem menos visíveis, mesmo para um oftalmologista experiente. Avaliar o paciente em ambiente suficientemente escuro permite a identificação de opacidades discretas não ulcerativas (Cutler, 2004). A retenção do corante de fluoresceína secundária à exposição prolongada pode ocorrer. Nesse caso não será identificada opacidade, apenas a retenção do corante no centro da córnea. Por isso a aplicação dos corantes deve ser seguida de rápida lavagem com soro fisiológico, permitindo a fixação em áreas lesionadas, mas evitando a fixação sobre

superfícies intactas (Cutler, 2004).

A câmara anterior deve ser inspecionada com auxílio de uma fonte de luz, buscando a presença de sangue, fibrina e hipópio, facilmente observados com uso de uma simples lanterna. Para avaliar lesões por edema de córnea e pequenas fissuras é melhor utilizar um oftalmoscópio direto, em ambiente escuro (Hendrix, 2005).

2.2.3. Termografia ocular infravermelha

A termografia infravermelha é uma técnica não-invasiva para de mensuração da temperatura superficial, com a vantagem mostrar a distribuição de temperatura em tempo real (Tan et al., 2009).

O princípio físico aplicado à termografia preconiza que a radiação infravermelha emitida por diversas superfícies seja captada pela termocâmera, formando a imagem que é denominada termograma. Diferentemente da termometria infravermelha, que mostra apenas uma temperatura, a termografia apresenta uma escala de temperaturas captadas na superfície. (Tan et al., 2009).

A técnica foi pioneiramente introduzida na medicina moderna por Lawson em 1956 que correlacionou o aumento de temperatura com a incidência de câncer de mama em seres humanos. Nos últimos 50 anos essa tecnologia transformou o conceito de mensuração da temperatura corporal, sendo amplamente empregada na atualidade (Tan et al., 2009).

A partir dos anos 90, a termografia passou a ser empregada no diagnóstico de doenças oculares (Stefanie, 2009). Ela já foi avaliada quanto ao uso em seres humanos com dacriocistite, ceratoconjuntivite seca, glaucoma, iridociclite e neurite (Eremenko, 1990; Tukuola et al., 1990; Morgan et al., 1995). Na espécie equina mostrou-se um método rápido para indicar e mapear possíveis enfermidades na região toracolombar em animais de tração (Fantini, 2010).

Estudos recentes demonstram a relação entre a temperatura ocular e a corporal e relacionam sua elevação ao grau de estresse a que cavalos são submetidos durante

treinamento e competições, validando a termografia ocular como forma de avaliá-lo. (Johnson et al., 2011; McGreevy et al., 2012; Valera et al., 2012).

Um estudo feito na Clínica de Olhos da Universidade de Heidelberg apontou aumento de temperatura média de 2,2°C na superfície corneana de seres humanos com iridociclite em comparação a pessoas do grupo controle (Stefanie, 2009).

Outras técnicas de mensuração da temperatura ocular, relatadas antes do advento da termografia, eram extremamente invasivas e consistiam no posicionamento de agulhas na órbita como uma *probe*. Além de pouco eficazes, pois a movimentação da *probe* produz medidas erradas, essas técnicas eram intensamente traumáticas e exigiam contenção e anestesia tópica (Tan et al., 2010).

Dentre as dificuldades à realização da termografia na oftalmologia destaca-se o filme lacrimal fluido que recobre a córnea, após a qual encontra-se uma câmara repleta de humor aquoso cuja profundidade difere ao longo da estrutura curvilínea da córnea. Assim, dependendo do ponto mensurado na córnea, há certa variação na temperatura, o que gera divergências sobre a técnica mais adequada para alcançar uma medida acurada (Tan et al., 2009).

Diversas formas de alcançar a temperatura média da superfície ocular foram propostos: mensuração horizontal em diferentes quadrantes ou pontos ao longo da superfície corneana, de forma a se obter uma temperatura média de ângulos diferentes; realização de medidas ao redor do apex corneano e a utilização de um método automatizado de um sistema de algoritmo (Tan et al., 2012). A maioria dos pesquisadores determina a temperatura média com a medida de uma ou mais regiões da superfície ocular, mas são necessários mais estudos que demonstrem a técnica mais fidedigna de mensuração da temperatura da superfície corneana de olhos lesionados utilizando termocâmeras (Tan et al., 2009, Tan et al., 2010).

2.3. Plasma rico em plaquetas (PRP)

Plaquetas são fragmentos citoplásmicos de

megacariócitos e desempenham um papel central no complexo processo de hemostasia. A formação do coágulo e a ativação plaquetária são considerados os primeiros passos do processo de reparação (Wroblewski et al., 2010).

O plasma é um derivado do sangue, pobre em células, mas rico em proteínas e plaquetas. As plaquetas sanguíneas desempenham importante papel no processo de reparação tecidual, modulando a resposta inflamatória (Harmon et al., 2014).

As plaquetas possuem no seu citoplasma grânulos α , δ e λ , organelas contendo moléculas bioativas que provêm as propriedades cicatrizantes plaquetária. Os grânulos- α contém diversos fatores de crescimento que são liberados após a ativação plaquetária. O efeito combinado desses fatores cria um elaborado processo autócrino e parácrino que posteriormente resulta em resposta tissular (Wroblewski et al., 2010).

Em até uma hora após a ativação plaquetária são secretados 95% dos fatores pré-fabricados presentes nos grânulos. As plaquetas mantêm uma produção adicional de fatores durante alguns dias (Wroblewski et al., 2010).

Uma rica fonte de um complexo grupo de fatores de crescimento essenciais para a reparação tecidual é o plasma rico em plaquetas (PRP) (Carter et al., 2003; El-Sharkawy et al., 2007). Assim é denominado o plasma cujo processamento eleva a concentração inicial de plaquetas do sangue total de onde ele foi extraído. Entretanto, essa é uma descrição simplificada do PRP e não discorre sobre a variedade de tipos de PRP (Harmon et al., 2014).

Diversos parâmetros devem ser levados em consideração quando se classifica um PRP, como a concentração de plaquetas superior à inicial, a presença ou não de leucócitos, qual foi o anticoagulante utilizado e se é necessária ativação exógena (Harmon et al., 2014).

A contagem plaquetária absoluta do PRP varia conforme a contagem plaquetária inicial e ainda não foi determinada a concentração ideal de plaquetas no PRP. A

hipótese de que um maior número de plaquetas confere ao PRP uma maior concentração de fatores de crescimento e melhores resultados na aplicação terapêutica não foi comprovada (Harmon et al., 2014). Graziani et al. (2006) sugerem que uma concentração ótima de plaquetas no PRP deve ser duas vezes e meia superior à concentração inicial. Concentrações mais baixas poderiam ter efeitos inibitórios, principalmente por estarem associadas a alta concentração de leucócitos. Os leucócitos intensificam a inflamação e destruição tecidual oxidativa, mas a liberação de fatores pró-inflamatórios teciduais, leucocitários ou presentes no PRP, perpetua a inflamação (El-Sharkawy et al., 2007; Busso et al., 2008; Boilard et al., 2010).

Há dois sistemas para produção de PRP, o de baixa contagem, que separa o sangue total em dois componentes: celular e plasma contendo plaquetas em suspensão; e o de alta contagem que separa o sangue total em três frações: células vermelhas, capa leucocitária e plasma contendo plaquetas (Harmon et al., 2014). Dentre cada sistema existem vários protocolos para obtenção de PRP.

Inicialmente, o PRP era obtido através de equipamentos de plasmáfereze com *kits* de PRP contendo trombina bovina ou cálcio para ativação exógena das plaquetas. Como essa técnica apresentava alto custo para produção do PRP, novos protocolos mais econômicos permitiram a obtenção de pequenos volumes de PRP, utilizando centrífugas comuns. Vários dos protocolos mais econômicos preconizam duas centrifugações. A primeira para separar hemácias e leucócitos das plaquetas, pelas diferenças de densidade celular. A segunda centrifugação separa o plasma rico em plaquetas (PRP) do plasma pobre em plaquetas (PPP) (Vendruscolo et al., 2012).

Vendruscolo et al. (2012) analisou 10 diferentes protocolos preconizando duas centrifugações e observou que a quantidade de plaquetas no PRP variou conforme a força de centrifugação (FCR). Foi observado que protocolos com altas FCR não obtêm altas concentrações plaquetárias. Os autores acreditam que isso se deva à

lesão ou ativação das plaquetas durante a centrifugação. O tempo de centrifugação não apresentou influência na concentração plaquetária. Já a concentração de TGF- β foi a mesma, independentemente do protocolo utilizado.

Em uma técnica especificamente desenvolvida para obtenção de PRP de equinos, foi utilizado um equipamento denominado SmartPREP2 System, que conseguiu concentrar 3,77 vezes o número de plaquetas, associado à redução de células mononucleares em 1,85 vezes. Um resultado importante, uma vez que leucócitos propagam a inflamação produzindo mais lesão tecidual (Schnabel et al., 2007).

Muitos *kits* para a produção de PRP utilizam anticoagulantes como o ácido cítrico dextrose (ACD) para inibir a agregação plaquetária (Mammoto et al., 2013). O ACD além de prevenir a coagulação torna o PRP mais ácido do que é fisiológico. Como a ativação plaquetária pode ser induzida pelo pH tecidual, alguns protocolos contam com a diluição do PRP para corrigir o pH e torná-lo fisiológico antes da aplicação (Gimeno et al., 2006; Vendruscolo, 2012).

A ativação resulta em rápida liberação dos fatores de crescimento contidos nos grânulos presentes no citoplasma das plaquetas, levando à liberação de 90% dos fatores pré-fabricados em até dez minutos. Como muitos dos fatores de crescimento possuem meia-vida curta, melhores resultados são alcançados quando a ativação ocorre imediatamente antes da aplicação ou no sítio de ação. A aplicação de PRP inativado pode resultar em ativação plaquetária mais fisiológica pelo tecido onde foi depositado (Harmon et al., 2014).

Para evitar ativação indesejada a maioria dos protocolos preconiza o uso de agulhas de grosso calibre para obtenção do sangue e transferência do PRP do frasco com anticoagulante para o frasco de estoque. Para as técnicas envolvendo centrífugas é interessante que estas possuam controle da frenagem para evitar a ativação no fim do processamento. Entretanto ainda não existe um protocolo ideal que evite a ativação (Harmon et al., 2014).

O colágeno é um ativador natural do PRP, assim, não há necessidade de utilizar ativadores exógenos quando ele é aplicado em tecidos moles. Quando os fatores de crescimento são liberados se inicia um processo inflamatório, com duração aproximada de três dias (Fufa et al, 2008; Harrison et al., 2011; Harmon et al., 2014).

Como o potencial de liberação dos fatores de crescimento pelo PRP é pouco descrito, as reais alterações inflamatórias resultantes da aplicação do PRP são desconhecidas (El-Sharkawy et al., 2007).

Diversos fatores de crescimento plaquetários atuam diretamente na inflamação incitando, inibindo, ou realizando as duas vias. Entre os fatores encontrados no PRP estão o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador β -1 (TGF- β 1), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), fator de crescimento epitelial (EGF), fator de crescimento epitelial vascular (VEGF) e Fator de crescimento fibroblástico básico (FGF-b) (Constable, et al., 1973; El-Sharkawy et al., 2007). Ao PDGF, IGF-1 e TGF- β foram atribuídas importantes propriedades anabólicas e mitogênicas. O TGF- β parece ter atuação bifásica, agindo como mediador anti-inflamatório, adicionalmente às suas propriedades pró-inflamatórias. As propriedades reparadoras do TGF- β indicam uma ligação entre mecanismos envolvendo a resolução da inflamação e a reparação de tecidos lesionados (El-Sharkawy et al., 2007).

A resolução da inflamação também é mediada naturalmente por moléculas lipídicas endógenas derivadas do ácido araquidônico, denominadas lipoxinas (LX's). Essas moléculas são capazes de retardar a entrada de novos neutrófilos no local da inflamação e promover sua apoptose. As LX's também são quimiotáticas para monócitos e macrófagos, que fagocitam células apoptóticas, promovendo reparação e supressão da inflamação. A mais importante via de biossíntese de LX-A4 em seres humanos é a interação de neutrófilos e plaquetas nos vasos sanguíneos (El-Sharkawy et al., 2007).

El Sharkawy et al. (2007) demonstraram os efeitos pró e anti-inflamatórios do PRP. Os autores encontraram elevada concentração de fatores de crescimento liberados pelo PRP em tecidos lesionados, o que aumenta o processo regenerativo e possui atividade antiflogística. Esta atividade foi demonstrada pela ausência de ativação macrofágica, inibição da proteína quimiotática para macrófagos 1(MPC-1), aumento na citocina liberada sob ativação, expressada e secretada por células T normais (RANTES), presente nos grânulos alfa plaquetários. Além disso, comprovou-se sua dupla função: pró e anti-inflamatória. A aplicação de PRP suprimiu significativamente a resposta inflamatória ao promover a secreção de LX-A4. Os autores concluíram ser o PRP capaz de facilitar o processo de reparação tecidual ao controlar a resposta inflamatória local.

Outra característica interessante do PRP é a sua habilidade angiogênica. Diversos fatores pró-angiogênicos como o VEGF, PDGF, fator de crescimento epidermal derivado de plaquetas (PD-EGF), FGF-b, TGF- β e angiopoetinas, sinalizam e mediam a atividade pró-angiogênese do PRP, o que abre um novo leque de aplicações terapêuticas desse rico material biológico no campo da engenharia tissular e medicina regenerativa (Mammoto et al., 2013).

No campo da oftalmologia, diferentes protocolos de formulação de PRP produziram resultados significativos no tratamento de ceratoconjuntivite seca, ceratite infecciosa e úlcera de córnea indolente. O PRP é considerado uma importante terapia auxiliar em lesões corneanas refratárias a terapias convencionais, relacionando sua utilização à melhora dos sinais clínicos e à indução da reparação corneana, mesmo em casos complicados por perfuração corneana (Alio et al., 2007a; Alio et al., 2007b; Kim et al., 2012; Alio et al., 2013).

Recentes estudos mostram, todavia, certos efeitos indesejáveis dos fatores de crescimento presentes no PRP, que ao estimular excessivamente modificações celulares e a deposição de matriz extracelular, levam à perda da arquitetura

tecidual normal, podendo aumentar a densidade do estroma corneano e produzir opacidades (Mc Grath e Lee, 2014).

O TGF- β é considerado o mais importante fator de crescimento para reparação de lesões corneanas. Ele é capaz de induzir a transição dos ceratócitos para miofibroblastos, responsáveis pela deposição de matriz extracelular e contração da ferida, aumentando a síntese de fibras colágenas diversas e fibronectina, intensificando a expressão de actina com maior desenvolvimento de fibrose (Saika, 2006). Os TGF's também podem aumentar o edema e opacificação da córnea durante o processo de reparação devido à quimiotaxia de células inflamatórias e estímulo à angiogênese. A modulação da via inflamatória mediada por TGF pode contribuir para a prevenção das cicatrizes corneanas (Mc Grath e Lee, 2014).

A aplicação de plasma rico em fatores de crescimento - obtido na ativação exógena de plaquetas no PRP - intensificou a proliferação e migração de ceratócitos e fibroblastos conjuntivais, além de atuar na inibição e proteção contra a diferenciação de miofibroblastos induzida pelo TGF- β 1 (Anitua et al., 2011).

Terapias envolvendo plasma rico em plaquetas têm sido amplamente estudadas no campo da terapia regenerativa em diversos sistemas e tecidos, inclusive na oftalmologia principalmente no tratamento de úlceras de córnea complicadas e da ceratoconjuntivite seca em seres humanos (Gimeno et al., 2006; Cervelli et al., 2009.; Wroblewski et al., 2010; Gimeno et al, 2013; Mammoto et al., 2013; Ilhan, 2014). Mas na medicina veterinária os estudos ainda se restringem à ortopedia, no tratamento de lesões ligamentares, tendíneas, articulares, fraturas e no tratamento de feridas cutâneas (DeRossi et al, 2009; Monteiro et al., 2009; Textor, 2011; Torricelli et al., 2011; Yamada et al., 2012; Carmona et al., 2005). Até o momento não foram encontrados estudos sobre o uso do PRP na oftalmologia veterinária, assim como não há informação sobre os efeitos de terapias envolvendo PRP heterólogo,

3. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), recebendo certificação de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, sob Protocolo nº 294/2013 (Anexo 1). Dezoito cavalos foram incluídos na presente pesquisa após passarem por uma avaliação clínica e oftálmica e não apresentarem quaisquer condições patológicas. Os animais foram cedidos ao experimento conforme termo de consentimento previamente assinado por seus proprietários.

3.1. Experimento 1: Avaliação histológica dos olhos de equinos submetidos à técnica de indução da úlcera de córnea, com o uso do *Diamond Burr*

Foram utilizados seis olhos, de três cavalos que foram a óbito por motivos diversos, sem queixas oftalmológicas, em um período máximo de uma hora após o óbito.

O epitélio corneano foi debridado com o equipamento de *Diamond Burr*¹, em pontos diferentes da superfície corneana (Fig. 2). O aparelho foi mantido em funcionamento sobre a córnea durante 5, 10, 20, 30, 60 e 120 segundos, de acordo com o ponto pré-mapeado (Fig. 3).

Em seguida os olhos foram enucleados, conservados em formalina tamponada 10% e as córneas foram removidas com 0,3 mm da esclera, sendo fixadas por formalina tamponada 10% por 48 horas. O material foi desidratado em soluções crescentes de etanol, 70%, 80%, 90% e absoluto, diafanizadas em xilol e embebidas em parafina e as amostras emblocadas em parafina em equipamento histotécnico². O material foi cortado em micrótomo³, com navalha de 4 mm de espessura em cortes de 3 mm de profundidade. Posteriormente

¹ Algerbrush®, Alger Company, INC; Lago Vista/TX, EUA

² LEICA ASP 300S, Leica Microsystems Inc.; Buffalo/ NY, EUA

³ LEICA RM 2245, Leica Microsystems Inc.; Buffalo/ NY, EUA

foram corados pela técnica rotineira de hematoxilina-eosina (HE) e montadas entre lâmina e lamínula com bálsamo do Canadá sintético.

As lâminas foram analisadas através de microscópio óptico⁴ e as imagens foram gravadas digitalmente por câmera⁵ acoplada ao microscópio.

Os achados histológicos foram analisados através de estatística descritiva dos achados.

Após a avaliação histológica e comprovação da padronização na profundidade da lesão pela técnica foi dado seguimento ao experimento *in vivo*.

3.2. Experimento 2: Tratamento da úlcera de córnea superficial, em cavalos, com plasma rico em plaquetas autólogo e heterólogo

3.2.1. Condições experimentais

Cada animal foi mantido em piquete individual recebendo água fresca, capim Napiê picado e feno *ad libitum*, além de 1 kg de ração para equinos peletizada com 13% de proteína oferecida diariamente. Esses animais permaneceram alojados durante os nove dias do experimento ou até a completa resolução dos sinais clínicos oculares.

As condições climáticas, durante a realização do experimento, estão descritas na Tab.1.

3.2.2. Seleção dos animais experimentais

Foram utilizados sete machos e onze fêmeas, com idade média de 9,35 anos. Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos grupos experimentais abaixo descritos:

Grupo 1 (Controle positivo): Úlcera de córnea induzida, no olho direito e tratada com 100µl tópico de soro fisiológico estéril acondicionado a 5°C e aplicados à temperatura ambiente, a cada seis horas. No olho esquerdo foi utilizado 100µl tópico de soro fisiológico, a cada seis horas, sem indução da úlcera, como controle negativo;

Grupo 2 (PRP autólogo)- Úlcera de córnea induzida, no olho direito e tratada com 100µl tópico, a cada seis horas, de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) autólogo acondicionado a 5°C e aplicados à temperatura ambiente. No olho esquerdo foi utilizado 100µl tópico de PRP autólogo, a cada seis horas, sem indução da úlcera, como controle negativo do PRP autólogo;

Grupo 3 (PRP heterólogo)- Úlcera de córnea induzida, no olho direito e tratada com 100µl tópico, a cada seis horas, de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) heterólogo acondicionado a 5°C e aplicados à temperatura ambiente. No olho esquerdo foi utilizado 100µl tópico de PRP heterólogo, a cada seis horas, sem indução da úlcera, como controle negativo do PRP heterólogo.

⁴ LEICA DM 400B, Leica Microsystems Inc.; Buffalo/ NY, EUA

⁵ LEICA DFC 500, Leica Microsystems Inc.; Buffalo/ NY, EUA

Tabela 1: Média \pm erro padrão da temperatura ambiente máxima e mínima e umidade relativa do ar, no momento dos exames termográfico e clínico

Dia	Temperatura (°C)		Umidade relativa (%)
	Mínima	Máxima	
Dia 0	25,95 \pm 0,53	27,38 \pm 0,54	76,04 \pm 2,30
Dia 1	23,08 \pm 0,44	23,82 \pm 0,46	75,44 \pm 1,18
Dia 2	23,31 \pm 0,13	24,19 \pm 0,29	76,61 \pm 1,70
Dia 3	22,99 \pm 0,36	24,17 \pm 0,15	67,18 \pm 2,04
Dia 4	21,82 \pm 0,47	23,96 \pm 0,33	71,11 \pm 1,81
Dia 5	22,21 \pm 0,49	23,56 \pm 0,14	72,83 \pm 1,38
Dia 6	23,55 \pm 0,36	24,23 \pm 0,34	69,67 \pm 1,28
Dia 7	21,16 \pm 0,55	23,19 \pm 0,17	74,44 \pm 1,28
Dia 8	23,48 \pm 0,21	23,97 \pm 0,25	72,50 \pm 0,56

3.2.3. Exame clínico

Todos os animais passaram por criteriosa avaliação oftalmológica diária, seguindo uma tabela de escala desenvolvida para cada sinal ocular avaliado (Anexo 2). Sinais não classificados e demais observações eram anotados na ficha de cada animal. Nessa ocasião, a lesão era também fotografada utilizando uma escala, para posterior mensuração. Os exames oftalmológicos foram realizados durante os nove dias de experimento (do dia anterior ao tratamento até o dia seguinte à última aplicação), de acordo com a Tab. 2, respeitando o horário de início e a ordem dos animais avaliados.

3.2.3.1. Exame termográfico

Diariamente, com um intervalo mínimo de duas horas após a medicação das 6:00 horas, os animais tiveram seus olhos examinados por termografia, evitando-se a interferência da manipulação e da aplicação do tratamento.

O exame termográfico foi realizado com uma termocâmara infravermelha⁷, modelo i-40, com câmara digital e ajuste de imagem termográfica sobre a imagem digital. Esse aparelho detecta variações de temperatura entre -20 °C a 350 °C, possui sensibilidade térmica de 100 mK e precisão de 0,1°C.

A resolução termográfica foi calibrada automaticamente conforme a temperatura do ambiente.

Os animais foram contidos em tronco, sem utilização de nenhum tipo de sedação ou tranquilização que pudessem alterar a circulação periférica e conseqüentemente o exame termográfico. As imagens foram tomadas sem que houvesse qualquer manipulação ocular pré-exame termográfico, em ambiente aberto, com luz fraca a uma distância de um metro, focalizando o centro ou, apex corneano, e realizando uma ou mais imagens em cada momento. Entretanto, apenas uma das imagens realizadas no momento foi considerada para análise estatística, para que a temperatura fosse obtida de uma única mensuração, e não fosse uma média de várias mensurações. Realizou-se a mensuração da temperatura ambiente e da umidade relativa do ar no momento de cada exame, com o auxílio do Termo-higrômetro digital⁸.

As imagens foram processadas no programa FLIR QuickReport⁹, com ajuste automático da temperatura ambiente, considerando-se a porção central do bulbo ocular. Mensurou-se tanto a temperatura do olho direito quanto do esquerdo (Fig. 4) (Fig. 5).

⁷ FLIR i40 - FILR Systems Brasil, Sorocaba/ São Paulo, Brasil

⁸ Termo-higrômetro digital – Inconterm, Porto Alegre, Brasil

⁹ FLIR QUICKREPORT 1.2 - FILR Systems Brasil, Sorocaba/ São Paulo, Brasil



Figura 2. Aplicação do *Diamond Burr* sobre a córnea de animal *ex vivo*.



Figura 3. Úlceras de córnea superficiais produzidas em animal *ex vivo* com auxílio do *Diamond Burr*. Equipamento aplicado por 5, 10, 20, 30, 60 e 120 segundos sobre a córnea. Observar a lesão circular formada na córnea (seta).

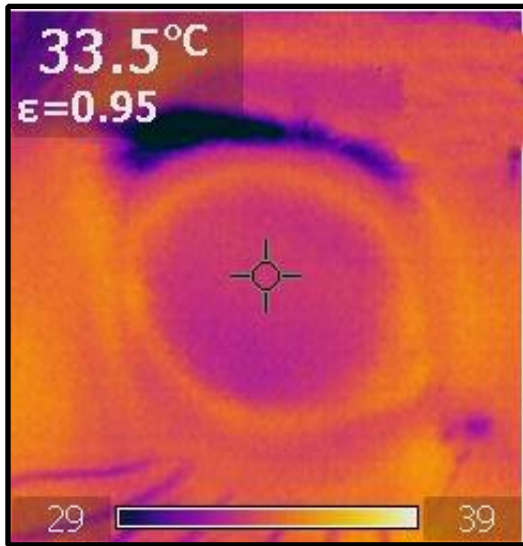


Figura 4. Termografia do olho direito de equino normal. Técnica de uma única mensuração no ápex corneano.

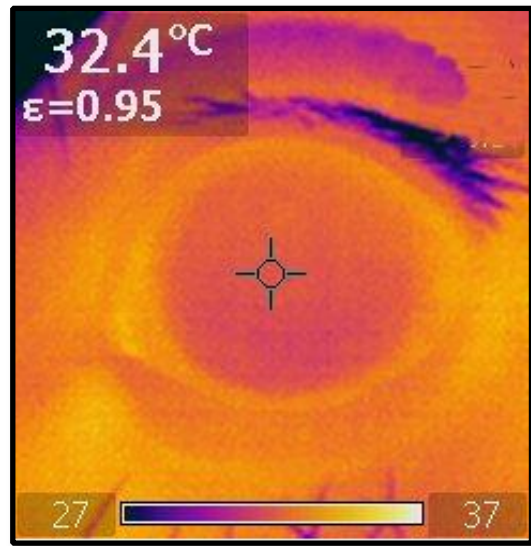


Figura 5. Termografia do olho esquerdo de equino normal. Técnica de uma única mensuração no ápex corneano.

Tabela 2: Cronograma dos exames oftalmológicos em equinos com úlcera de córnea induzida

Dia	Momento do exame
Dia 0	Antes do início da indução da úlcera
Dia 1:	12 horas após a indução e antes do início do tratamento
Dia 2	24 horas após o início do tratamento
Dia 3	48 horas após início do tratamento
Dia 4	72 horas após início do tratamento
Dia 5	96 horas após início do tratamento
Dia 6	120 horas após início do tratamento
Dia 7	144 horas após início do tratamento
Dia 8	168 horas após início do tratamento

3.2.3.2. Exame oftalmológico

O exame clínico foi realizado por três avaliadores, em sistema de duplo cego. Após a tabulação dos dados, considerou-se os resultados dos avaliadores 1 e 2 para determinação da concordância entre avaliadores. Para definição dos achados clínicos, em cada exame, utilizou-se os resultados do avaliador 3 quando houve discordância entre os avaliadores 1 e 2.

O exame clínico foi constituído por inspeção e impregnação por fluoresceína. À inspeção observou-se:

a) Presença de blefaroespasma (Fig. 6): classificado pelo ângulo formado entre cílios e a tangente da superfície corneana em: 0 - ausente - angulação normal aproximadamente 90° (Fig. 6A) (Gilger, 2013); 1 - discreto, com angulação entre 90 e 45° (Fig. 6B); 2 - moderado com angulação < 45° (Fig.6C) e 3 - intenso, com as pálpebras fechadas (Fig.6D);

b) Fotofobia - com auxílio de lanterna, observou-se a retração do bulbo ocular após a incidência da luz e classificou-se em: 1 -

ausente e 2 - presente;

c) Epífora: observou-se a presença de lacrimejamento, classificada em: 1 - ausente e 2 - presente (Fig. 7);

d) Alopecia: observou-se a área ao redor do bulbo ocular, onde houvesse perda de pelo, que pudesse ser associado a prurido, classificando em: 1 - ausente e 2 - presente (Fig. 8);

e) Quemose: observou-se o grau de edema da conjuntiva, classificado em: 0 - ausente (Fig. 9A); 1 - discreta (Fig. 9B) e 2 - intensa (Fig. 9C);

f) Hiperemia: observou-se a coloração da conjuntiva comparando-a com a de um animal normal, classificando-a em: 0 - ausente (Fig. 10A); 1 - discreta (Fig. 10B) e 2 - intensa (Fig. 10C);

g) Edema de córnea: exame realizado com auxílio de uma lanterna e classificado em: 0 - ausente (Fig. 11A), 1 - focal (Fig. 11B); 2 - difuso (Fig. 11C) e 3 - opacidade total (Fig. 11D).

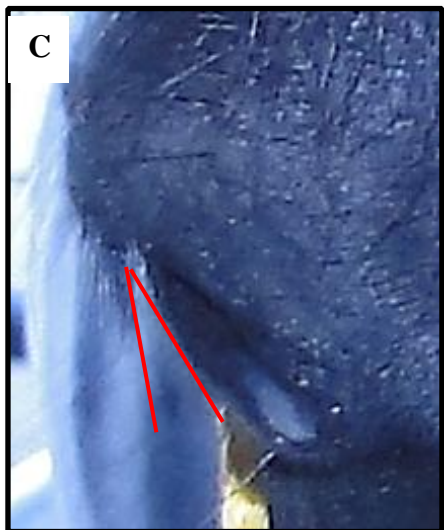
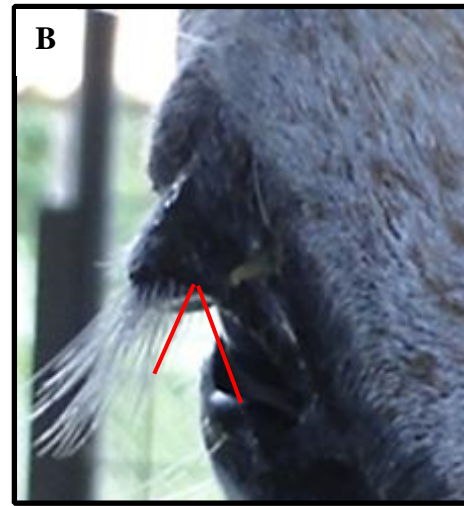
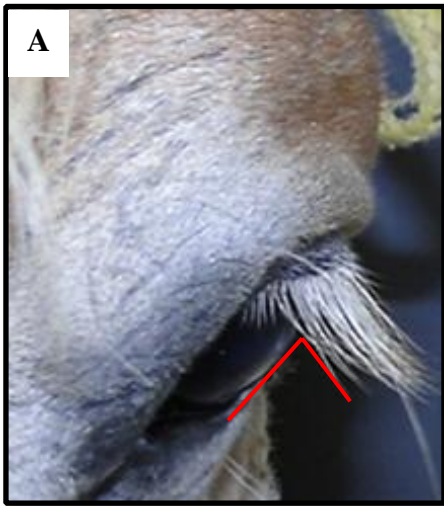


Figura 6. Blefaroespasmos em equinos: classificação da angulação formada pelos cílios e a tangente corneana. A: blefaroespasmos ausentes. Observar o ângulo de 90°. B: blefaroespasmos discretos. Observar o ângulo entre 90° e 45°. C: blefaroespasmos moderados: ângulo inferior a 45°. D: blefaroespasmos intensos: pálpebras completamente fechadas.



Figura 7. Epífora em equino. Observar o umedecimento da pele abaixo do canto medial.



Figura 8. Alopecia na pálpebra superior de um equino. Observar a ausência de pelos (setas).

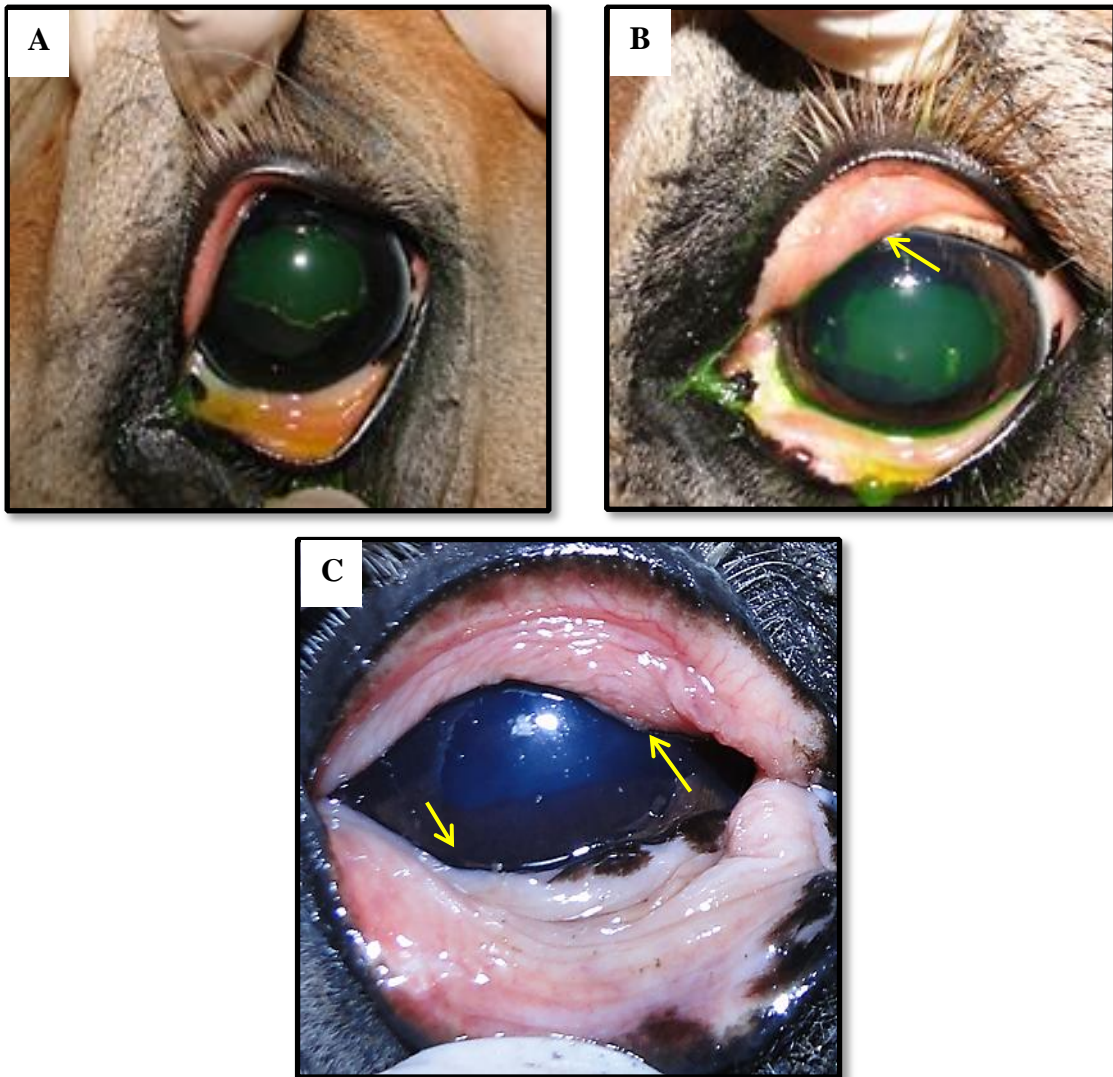


Figura 9. Quemose em equinos: classificação do edema conjuntival. A: conjuntiva de aspecto normal. B: quemose discreta. Observar a discreta insinuação da conjuntiva palpebral sobre a córnea (seta). C: quemose intensa. Observar a marcante insinuação da conjuntiva sobre a córnea (setas).

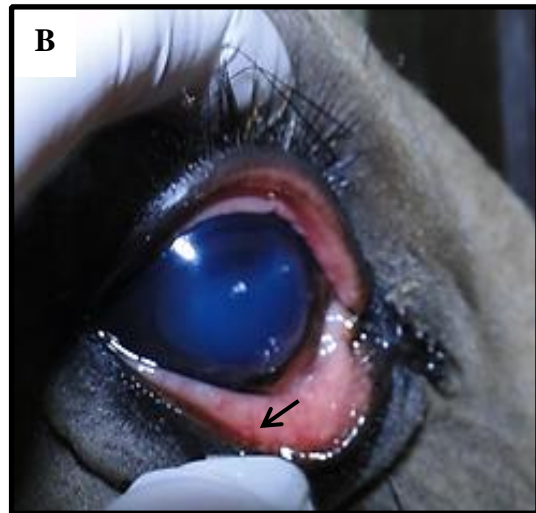


Figura 10. Hiperemia conjuntival em equinos: classificação da coloração da conjuntiva. A: conjuntiva de coloração normal. B: hiperemia discreta. Observar a coloração rosa escura e congestão de vasos conjuntivais (seta). C: hiperemia intensa. Observar a coloração avermelhada da conjuntiva.

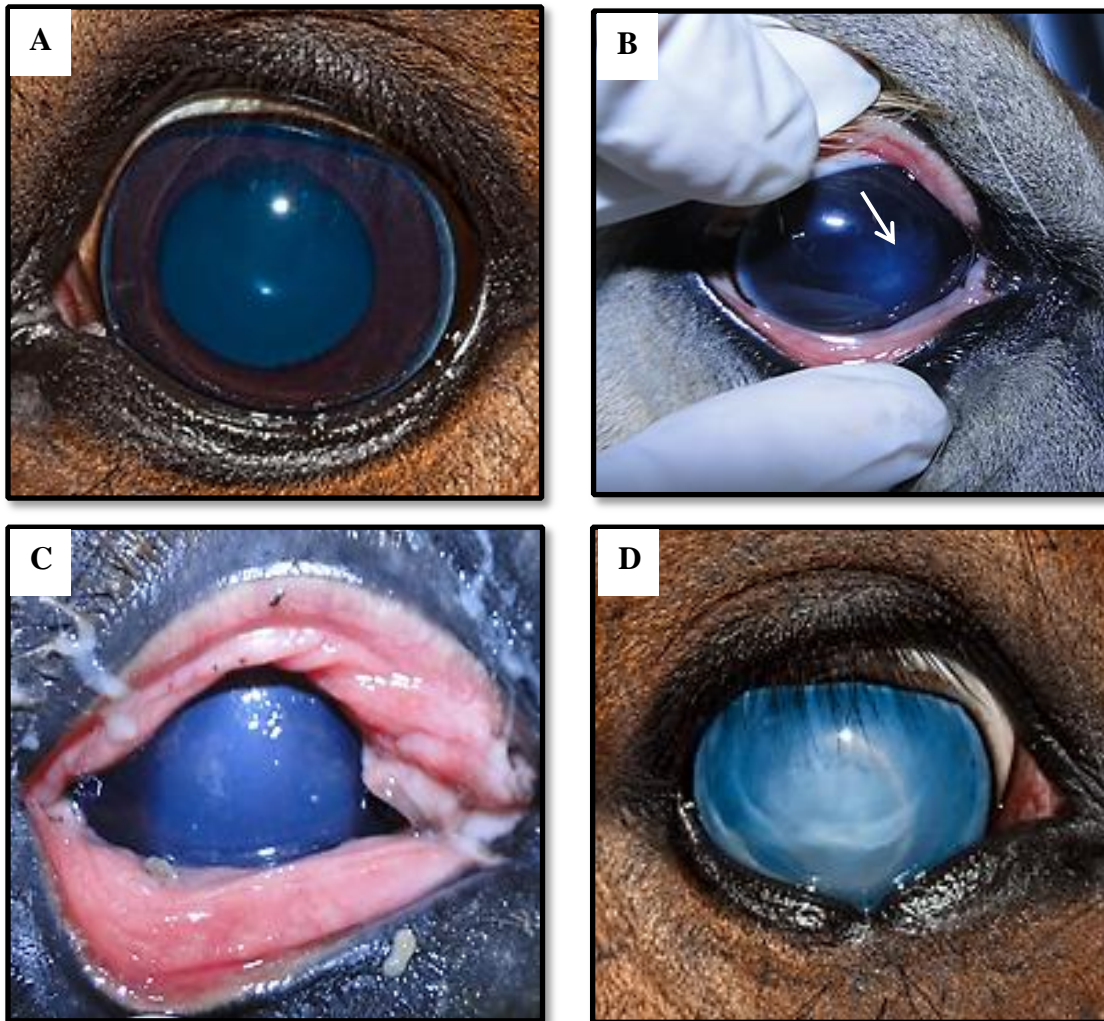


Figura 11. Edema de córnea em equinos: classificação da opacidade corneana. A: córnea com transparência normal. B: edema focal. Observar opacidade pontual (seta). C: edema difuso. Observar opacidade em ampla área da córnea. D: opacidade total. Observar a perda de transparência completa.



Figura 12. Teste de fluoresceína positivo. Observar a marcante impregnação do corante na córnea



Figura 13. Mensuração da área marcada em verde utilizando a escala observada à

(em verde).

direita.

3.2.3.3. Teste da fluoresceína

Após a inspeção, a córnea de ambos os olhos era corada com duas gotas de colírio de fluoresceína sódica a 1%¹³, sendo o excesso removido com 10 ml de solução fisiológica. Em seguida, foi avaliada quanto à presença de úlcera sob iluminação com filtro azul cobalto e o resultado classificado em: 1 – negativo ou 2 – positivo (Fig. 12).

3.2.3.4. Mensuração da úlcera de córnea

Após o uso do corante de fluoresceína, com auxílio de uma escala posicionada lateralmente à órbita, a córnea dos animais foi fotografada para posterior mensuração da úlcera através do software Image J¹⁴ (Fig. 13). O procedimento foi realizado diariamente, imediatamente após a o exame oftalmológico, conforme cronograma descrito acima.

O programa Image J permite que o operador selecione a área da imagem desejada para, posteriormente, calcular sua área em pixels. Comparando à escala existente na lateral da imagem o programa converte o valor em pixels para cm². A mensuração do tamanho do defeito corneano foi realizada por duas técnicas: selecionando a margem da área corada em verde e extraindo desse perímetro o valor correspondente à área; e marcando os maiores diâmetros horizontal e vertical encontrados na área corada.

Ao final dos sete dias de tratamento, aqueles animais cujo exame oftalmológico detectou falha na reparação da lesão ou manutenção de sinais de inflamação ocular, foram mantidos para posterior tratamento com antimicrobianos ou antiinflamatórios adequados à condição ocular de cada animal.

3.2.4. Indução da úlcera de córnea superficial

¹³ Fluoresceína®, Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda. São Paulo/SP, Brasil.

¹⁴ Image J./Fiji 1,46, domínio público.

No dia 0 os animais foram submetidos a termograma ocular utilizando a termocâmara infravermelho e exame oftalmológico completo.

Realizou-se a antissepsia de cada olho com 50 ml de solução de iodopovidona¹⁵ diluído a 0,05% em solução fisiológica, sendo o excesso removido com gaze estéril.

Em seguida os animais receberam anestesia tópica com colírio de cloridrato de proximetacaína a 0,5%¹⁶. Foram aplicadas duas gotas, em duas doses intervaladas de 5 a 10 minutos em cada olho. Quando necessária anestesia adicional mais duas gotas eram aplicadas. Não foi necessária contenção química e bloqueio anestésico.

Logo após a anestesia, o equipamento de *Diamond Burr* era gentilmente aplicado sobre a córnea intacta do olho direito à mão livre através de movimentos circulares durante trinta segundos, de forma a remover aproximadamente 80% do epitélio corneano (Fig. 13). O olho esquerdo não passou por debridamento, sendo considerado o controle negativo dos tratamentos a serem realizados. Para confirmação da presença da úlcera, sobre a córnea de ambos os olhos era aplicado o corante de fluoresceína, e o exame realizado como descrito anteriormente.

3.2.5. Processamento e aplicação do PRP

Diariamente, o sangue dos animais do Grupo PRP autólogo era coletado por venopunção da jugular em dois tipos de frasco, um contendo o anticoagulante EDTA e o outro contendo o anticoagulante ACD. O sangue coletado em ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) foi submetido à avaliação em hemocítmetro

¹⁵ PVPI® tópico a 10%, Vansil Indústria Veterinária, Descalvado/SP, Brasil

¹⁶ Anestalcon®, Alcon Laboratórios do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil

automático pela técnica de impedância¹⁷ para realização de hemograma. O outro frasco, contendo o anticoagulante ácido-cítrico-dextrose (ACD), foi utilizado para processamento do PRP. Como doadores do PRP para o grupo PRP-heterólogo foram utilizados dois animais do grupo PRP autólogo, sendo mantido sempre o mesmo doador para um equino do grupo PRP heterólogo. Os frascos contendo PRP foram acondicionados em centrífuga automática¹⁸, centrifugados a 130 g durante 8 minutos com tempo de frenagem de 2 minutos. A fração 1 mm superior à capa leucocitária foi assepticamente aspirada (aproximadamente 3 ml) com auxílio de uma seringa de 3 ml e cateter 14G, sendo colocada em microtubos autoclavados. Nesse momento 0,5 ml da amostra era utilizada para avaliação laboratorial e confecção de lâminas de citologia.

As amostras de PRP foram mantidas durante 24 horas, a 5°C. Cada amostra foi utilizada em um intervalo máximo de 18 horas após a obtenção do PRP. No momento da utilização para o tratamento, os microtubos referentes a cada animal eram mantidos em temperatura ambiente e homogeneizados previamente à aplicação.

No dia 1, 12 horas após a indução os animais recebiam a primeira dose de tratamento administrado via tópica em seringa estéril de 1 ml. Em cada animal foi aplicado, em ambos os olhos, 100µl de determinada solução, de acordo com o seu grupo de tratamento, a cada 6 horas (6:00, 12:00, 18:00 e 24:00 horas), até a reparação completa da úlcera, visualizada pela coloração por fluoresceína ou durante sete dias.

Ao final dos sete dias de tratamento, aqueles animais cujo exame oftalmológico detectou falha na reparação da lesão ou manutenção de sinais de inflamação ocular, foram mantidos tratados com antimicrobianos ou antiinflamatórios adequados à condição ocular de cada animal.

¹⁷ Abaccus Júnior®, Diatron Group, Budapeste, Hungria.

¹⁸ CT 6000R®, Cientec Instrumentos Científicos AS, Santiago, Chile

3.2.6. Avaliação do PRP

As amostras de sangue e PRP foram avaliadas quanto à concentração plaquetária, tamanho plaquetário, contagem de hemácias e leucócitos, em hemocítmetro de impedância¹⁹. As amostras de PRP foram, também, contadas em câmara de Neubauer. Para tanto as amostras foram diluídas a 1:200 no líquido de Hess-Ecker²⁰.

Após o preenchimento da câmara de Neubauer, com auxílio de tubo capilar paramicro hematócrito, esta era mantida em repouso, em placa de petri com algodão umedecido durante 30 a 40 minutos. contagem de plaquetas foi realizada nos 50 campos centrais da placa e o valor obtido multiplicado por 1000.

De cada amostra eram produzidas quatro esfregaços, sendo cada dois corados pela técnica de Romanovsky, corante Panótico rápido e outros dois pelo corante May-Grunwald Giemsa. Essas lâminas foram posteriormente utilizadas para avaliar o percentual de ativação das plaquetas, de acordo com a classificação proposta por Paes Leme et al., (2006), desenvolvida pelos autores através de microscopia eletrônica (Fig. 14), em:

- Inativada: quando a plaqueta encontra-se alongada, sem emissão de pseudópodes;
- Incerta: quando há aproximação no tamanho dos eixos da plaqueta, tornando-a arredondada. Ainda não devem ser observados pseudópodes;
- Ativada: plaqueta emitindo pseudópodes ou com membrana irregular.

3.3. Experimento 3: Avaliação termográfica no diagnóstico da úlcera de córnea equina

Neste estudo foram utilizados 305 exames

¹⁹ Abaccus Junior®, Diatron Group, Budapeste, Hungria

²⁰ Líquido de Hess-Hecker, Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil

de termografia infravermelha ocular e o teste de fluoresceína como *padrão ouro* para presença da úlcera, com objetivo de se determinar a eficiência da termografia no

diagnóstico da úlcera de córnea.

A técnica para realização da termografia e do teste de fluoresceína estão descritos nos itens 3.2.3.1 e 3.2.3.3., respectivamente.

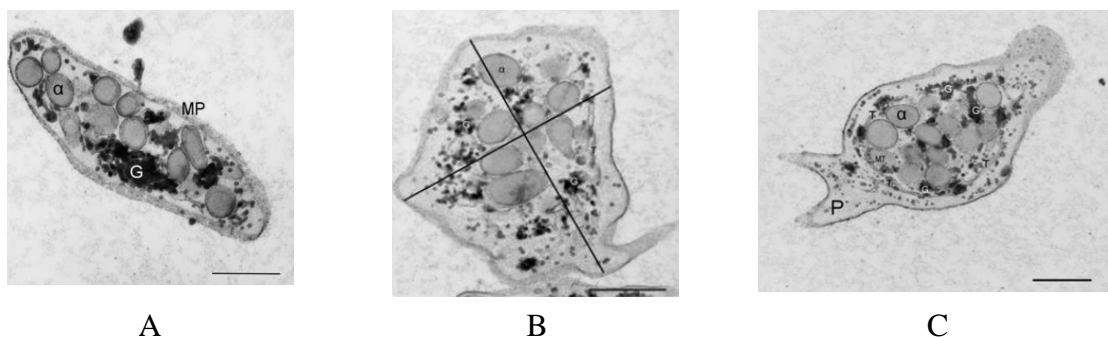


Figura 14. Classificação do estado de ativação plaquetária. Fotografia ultra-estrutural realizada em eletromicroscopia de transmissão de plaqueta inativada de equino (A). Fotografia ultra-estrutural, mostrando a medida dos eixos em plaqueta em estado incerto (B). Fotografia ultra-estrutural de plaqueta ativada de equino, mostrando emissão de pseudópodes (C). A escala representando 1µm. Fonte: Paes Leme et al. (2006).

3.4. Análises estatísticas

As análises do experimento 1 (Avaliação histológica da técnica de indução da úlcera de córnea em equinos com uso do *Diamnod Burr*) constaram apenas de estatística descritiva, não havendo comparação entre os grupos.

No experimento 2 (Tratamento de úlcera de córnea superficial, em cavalos, com plasma rico em plaquetas autólogo e heterólogo) o delineamento foi ao acaso em parcela subdividida, com três grupos e dois olhos na parcela e nove tempos na subparcela. As análises foram realizadas, de acordo com a característica da variável, como descrito abaixo:

a) Exame clínico

A comparação entre os resultados obtidos, para a concordância dos avaliadores 1 e 2, foi realizada pelo teste de Kappa, de acordo com o proposto por Landis e Koch em 1977, a partir do programa Lee (Laboratório de Epidemiologia e Estatística).

A avaliação do escore atribuído para as variáveis blefaroespasm, quemose, hiperemia e edema de córnea, por se tratarem de variáveis não paramétricas, foi

realizado pelo teste de Kruskal-Wallis para comparação de três ou mais médias ou pelo teste de Wilcoxon para comparação de duas médias. Os valores representados nas tabelas indicam as médias e medianas obtidas em um determinado grupo, em um dos dias de exame.

O escore atribuído às variáveis dicotômicas (fotofobia, epífora, alopecia e teste de fluoresceína) foi comparado, de acordo com o dia do exame e o grupo, pelo teste de Qui-quadrado. Os valores representados nas tabelas indicam o percentual de ocorrência do evento, em um determinado grupo, em um dos dias de exame.

A temperatura ocular obtida, por meio do termograma, foi submetida ao procedimento *PROC UNIVARIATE NORMAL*, para avaliação da distribuição dos dados, com aplicação do teste de Shapiro-Wilk (SW). Mesmo após conversão pelo $\log(x + 1)$, a distribuição permaneceu não paramétrica, sendo os valores médios comparados pelo teste de Kruskal-Wallis para comparação de três ou mais médias ou pelo teste de Wilcoxon para comparação de duas médias. Os valores obtidos, para cada grupo, em cada um dos dias de exame foram expressos de acordo com média \pm erro padrão (EP) e a mediana.

b) Preparação do PRP

As variáveis referentes à contagem e morfologia plaquetária, tanto em equipamento automático quanto em câmara de Neubauer foram submetidas ao procedimento *PROC UNIVARIATE NORMAL*, para avaliação da distribuição dos dados, com aplicação do teste de SW. Mesmo após conversão pelo $\log(x + 1)$, a distribuição permaneceu não paramétrica, sendo os valores médios comparados pelo teste de Kruskal-Wallis para comparação de três ou mais médias ou pelo teste de Wilcoxon para comparação de duas médias.

Realizou-se a correlação entre a contagem em câmara de Neubauer e aparelho automático.

Como apenas dois equinos foram utilizados como doadores de PRP para o grupo heterólogo, comparou-se o PRP utilizado os dois grupos. Denominou-se heterólogo o PRP utilizado nos animais do grupo heterólogo e autólogo aquele utilizado nos animais do grupo PRP autólogo.

c) Dados obtidos sobre a úlcera de córnea

Apenas no olho direito de cada animal foi induzida a úlcera superficial. Desta forma, todas as análises deste item foram realizadas apenas no olho direito.

A partir da área e do eixo XY, obtidos de cada mensuração da úlcera de cada animal, a cada dia, foram calculados o percentual de redução da úlcera em relação ao dia anterior e em relação ao Dia 0, com o objetivo de se verificar a velocidade de redução da úlcera, de acordo com o tratamento utilizado. Os valores obtidos foram submetida ao procedimento *PROC UNIVARIATE NORMAL*, para avaliação da distribuição dos dados, com aplicação do teste de KW. Os dados contínuos (área e eixo XY) foram convertidos pelo $\log(x + 1)$ e os percentuais pelo $\text{Arcos seno } \sqrt{x}$ e, novamente, foram submetidos ao procedimento de avaliação da distribuição. Mesmo após conversão a distribuição permaneceu não paramétrica, sendo os valores médios comparados pelo teste de Kruskal-Wallis para comparação de três ou mais médias ou pelo teste de Wilcoxon para comparação de duas médias. Os valores obtidos, para cada variável, grupo, em cada

um dos dias de exame foram expressos de acordo com média \pm erro padrão (EP).

Para verificação do número de dias

necessários para o fechamento da úlcera, comparou-se os grupos pelo Teste de Kaplan-Meier. Calculou-se, também, a taxa de risco com intervalo de confiança (IC) de 95%.

No experimento 3 avaliou-se a eficiência da termografia no diagnóstico da úlcera de córnea em equinos. Neste estudo foram utilizados 305 termogramas, sendo 106 positivos no teste da fluoresceína (padrão ouro) e 199 negativos. Os animais que apresentaram positividade no teste da fluoresceína e negativaram após a cicatrização da úlcera seus termogramas não foram incluídos na análise, a fim de se evitar que fatores não inerentes à úlcera pudessem interferir nas temperaturas obtidas. Para a avaliação da eficiência do termograma calculou-se a área sobre a curva ROC (*Receiver-operating characteristic curves*), a sensibilidade, a especificidade, a taxa de verossimilhança (*Likelihood ratio*) positiva e negativa (LR - e LR +), o valor preditivo positivo (VPP) e o valor preditivo negativo (VPN). Todos os

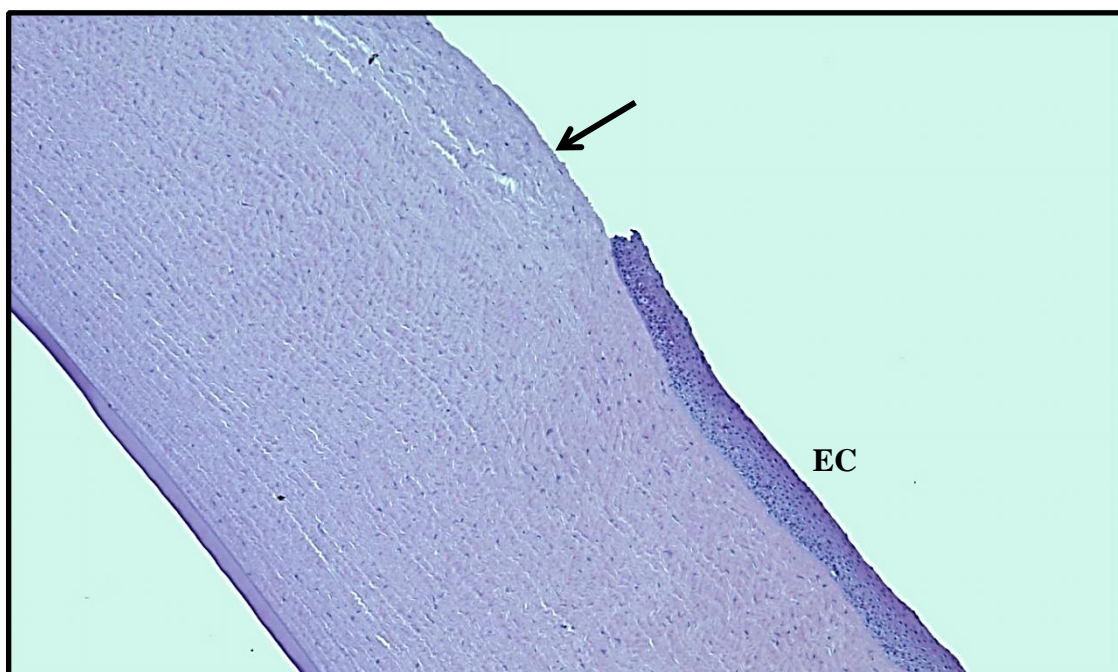
cálculos foram realizados com intervalo de confiança (IC) de 95%.

As análises foram realizadas utilizando-se os pacotes estatísticos SAS System for Windows 9.0 e MedCalc. Considerou-se a significância de 95% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Experimento 1: avaliação histológica de córneas de equinos submetidos à técnica de indução de úlcera de córnea com uso do *Diamond Burr*.

As amostras submetidas à avaliação histológica apresentaram ausência parcial do epitélio anterior da córnea, no local de realização do debridamento, com exposição da membrana basal. Observou-se também a preservação do estroma, membrana de Descemet e endotélio (Fig. 15 A e B).



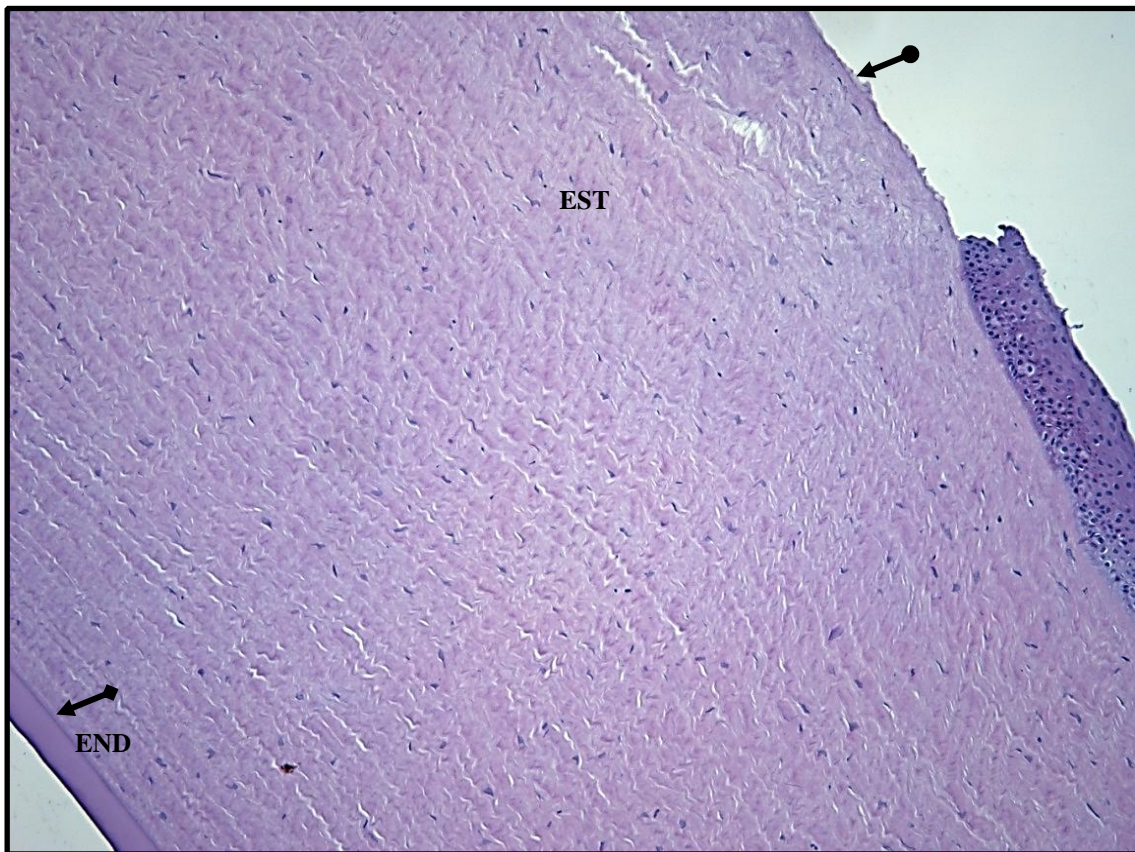


Figura 15. Fotomicrografia de córnea equina ulcerada experimentalmente. A: observar a ausência parcial do epitélio corneano (EC) com exposição do estroma anterior (seta \longrightarrow). Coloração por hematoxilina e eosina (HE, aumento de 50x). B: observar a exposição do estroma anterior da córnea (seta \longleftrightarrow), preservação do estroma (EST), membrana de Descemet (seta $\bullet\longrightarrow$) e endotélio (END). Coloração por hematoxilina e eosina (HE, aumento de 100x).

Independentemente da porção avaliada referente ao tempo de aplicação do *Diamond Burr* sobre a córnea, as características histológicas foram as mesmas. As lesões corneanas se caracterizaram como úlceras superficiais devido à perda do epitélio corneano com exposição da membrana basal, mas sem comprometimento do estroma.

Silva et al. (2011) em seu estudo histológico de córneas caninas debridadas com *Diamond Burr* encontrou áreas de perda da membrana basal, diferentemente dos achados histológicos aqui encontrados, mas manutenção da integridade do estroma, como foi observado no presente trabalho.

Pal-Gosh et al (2011), assim como ele, encontraram ausência da membrana basal do epitélio em olhos de camundongos debridados com DB. Essa diferença se deve a características intrínsecas das córneas dessas espécies, uma vez que a técnica de indução foi similar e o mesmo equipamento de DB foi utilizado nos três trabalhos.

McGrath e Lee (2014) apontam para a necessidade da manutenção de 1-2 mm de epitélio na periferia, de forma a preservar as células tronco corneanas, concordando com o achado de Huang e Tseng (1991). A remoção das células tronco presentes no limbo pode levar à retardo na reparação de defeitos corneanos e a respostas prejudiciais à acuidade visual, como neovascularização e alteração na organização das fibras colágenas do estroma, com formação de um tecido diferente do corneano, processo denominado conjuntivalização.

Concordando com Aldave et al. (2009), Sila

et al. (2009) e Silva et al. (2011), o debridamento por DB é uma técnica segura, cuja profundidade da lesão independe do tempo de aplicação do equipamento sobre a córnea, não alcançando o estroma quando seguido o presente protocolo.

4.2. Experimento 2: Tratamento da úlcera superficial, em cavalos, com plasma rico em plaquetas autólogo e heterólogo.

4.2.1. Indução de úlcera superficial de córnea com equipamento de *Diamond Burr*

Durante a realização da técnica os animais se apresentaram passivos, não demonstrando sinais de dor, apenas com a utilização tópica de colírio anestésico anteriormente ao procedimento, como indicado por Aldave et al. (2009) e Soong et al. (2014). O uso de colírio anestésico é indicado, uma vez que as terminações do nervo trigêmeo se localizam superficialmente no epitélio corneano, sendo lesionadas quando da aplicação do DB.

Não foi necessária a utilização de anti-inflamatórios não esteróides, para o controle da dor após o procedimento, como sugerido por Soong et al. (2014), que relatam sua utilização, por via tópica, devido a lesão e exposição das terminações nervosas em seres humanos. Apesar disso, essa terapia ainda é controversa na

oftalmologia veterinária, pois anti-inflamatórios quando administrados por via tópica podem atrasar a epitelização, além reduzirem a ativação plaquetária, o que entraria em conflito com o objetivo do presente estudo (Brooks, 1999; Andrew e Willis, 2005; Paes Leme et al, 2006).

A contenção realizada foi apenas com cabresto e em troca de contenção, com utilização tópica de colírio anestésico demonstrando ser uma técnica simples, de baixo custo e uso ambulatorial, que requer pouca tecnificação e baixo investimento por demandar instalações pouco sofisticadas para sua realização, como relatado por Sridhar et al. (2002).

Como forma de indução experimental de úlcera de córnea superficial a técnica foi considerada adequada, uma vez que o mecanismo de produção e a profundidade da lesão são conhecidos. A técnica é segura, não apresentando risco de perfuração com padronização do tamanho das lesões, pois este não apresentou diferença entre os grupos de tratamento analisados.

4.2.2. Preparação e avaliação do Plasma Rico em Plaquetas

A constituição do plasma rico em plaquetas utilizado nos tratamentos autólogo e heterólogo não apresentou diferença ($P > 0,05$) quanto aos valores de plaquetas e de volume plaquetário médio (MPV) (Tab. 3).

Tabela 3: Avaliação dos constituintes do sangue e do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) nos grupos autólogo e heterólogo, através da contagem automática por impedância

Parâmetro Avaliado*	Sangue Total		PRP	
	Autólogo	Heterólogo	Autólogo	Heterólogo
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	145,03 \pm 8,22 ^c	166,75 \pm 6,04 ^{bc}	176,05 \pm 7,25 ^{ab}	189,94 \pm 4,82 ^a
PCT (%)	0,09 \pm 0,01 ^b	0,11 \pm 0,003 ^b	0,12 \pm 0,0005 ^a	0,13 \pm 0,004 ^a
MPV (μm)	6,47 \pm 0,11 ^b	6,49 \pm 0,17 ^b	7,10 \pm 0,12 ^a	6,97 \pm 0,17 ^a
PDWC (%)	33,31 \pm 0,37	33,79 \pm 0,45	33,03 \pm 0,22	33,00 \pm 0,31

Contagem total de Plaquetas (Plaquetas), plaquetócrito (PCT), volume plaquetário médio (MPV) e amplitude de distribuição das plaquetas (PDWC) realizada em hemocitômetro automático (Abaccus Junior). Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, diferem ($P < 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis)

As amostras de PRP apresentaram maior concentração de plaquetas ($P < 0,05$) comparados ao valor basal encontrado no

sangue total, tanto na contagem automática por impedância (Tab. 4).

Tabela 4: Avaliação do Plasma Rico em Plaquetas (PRP), utilizado nos grupos autólogo e

Parâmetro Avaliado	Plasma Rico em Plaquetas	
	Autólogo	Heterólogo
Plaquetas (x 10 ³ /µl)*	241,80 ± 13,18	267,20 ± 22,23
Leucócitos (x 10 ³ /µl)	1,52 ± 0,12	1,42 ± 0,22
Eritrócitos (x 10 ³ /µl)	0,007 ± 0,001	0,008 ± 0,002
Ativação Plaquetária [#]		
Ativadas (%)	26,84 ± 1,83	24,44 ± 2,46
Ativação Incerta (%)	61,27 ± 1,90	62,06 ± 3,24
Inativadas (%)	11,89 ± 1,07	13,50 ± 1,58

p>0,05 ; *Contagem realizada em Câmara de Neubauer à diluição de 1:200 em líquido de Hess-Ecker; **Teste aplicado após transformação em log (x+1); [#]Classificação da ativação plaquetária de acordo com Paes et al, (2006), realizada em microscopia óptica no aumento de 400x.

A contagem de plaquetas no PRP considera como *padrão ouro* a avaliação na câmara de Neubauer, na ausência da citometria de fluxo. A correlação entre a contagem plaquetária na câmara de Neubauer e o contador automático Abaccus foi moderada (0,49) e significativa (p=0,003). Entretanto, a diferença entre os valores médios para total de plaquetas no PRP autólogo e heterólogo obtidos nas duas técnicas foi significativa. Deve-se ressaltar as limitações da contagem automática por impedância, já que o equipamento realiza a contagem através de um único parâmetro, o volume celular (Harrison et al., 2000).

A tecnologia de Análise de Impedância foi desenvolvida por Wallace Coulter e baseia-se na quantificação dos pulsos gerados pelas células ao passar por um orifício onde flui uma corrente contínua. Pelo fato das células sanguíneas não conduzirem bem a eletricidade, ao passar por esta pequena abertura ocorre um aumento mensurável da impedância elétrica. Deste modo são contadas e medidas as células, uma vez que o pulso é proporcional ao tamanho da célula analisada (Borges e Siqueira, 2009).

Assim, fragmentos de eritrócitos, micrócitos e complexos imunológicos podem ser erroneamente contados como plaquetas, excedendo o seu número real em casos de trombocitopenia. Em contrapartida, algumas macroplaquetas e plaquetas gigantes são discriminadas como eritrócitos devido ao aumento do volume (Harrison et al., 2000; Briggs, et al., 2007).

A técnica automatizada por citometria de fluxo apresenta maior acurácia, por basear-se em mais parâmetros, além do volume

celular. Ela consiste no direcionamento dos elementos celulares por uma tubulação delgada, envoltos em determinado solvente, até passar pelo ponto de análise ou *flow cell*, onde serão aplicadas as demais tecnologias para quantificação e diferenciação celular, como o laser, corrente contínua para impedância e corrente em radiofrequência para determinar a estrutura interna das células. Ao permitir a avaliação do volume e conteúdo das células, o procedimento acentua a precisão na contagem de plaquetas (Borges e Siqueira, 2009). Entretanto o elevado custo do equipamento e necessidade de padronização limitam sua aplicação na rotina veterinária.

A avaliação pela técnica manual, considerada *padrão ouro*, foi utilizada na padronização da contagem de equipamentos automáticos e apresentou algumas dificuldades. Além de necessitar de um protocolo demorado e pouco prático, exigiu um longo treinamento na fase pré-experimental e tem caráter subjetivo, apresentando elevado coeficiente de variação (CV: 10 - 25%). O CV irá variar de acordo com o treinamento do técnico que efetua a contagem. De acordo com Borges e Siqueira (2009) essas características não tornam o procedimento manual insatisfatório, apenas geram algumas discordâncias que podem ser resolvidas pela avaliação de profissionais experientes na realização do exame.

Há pouca informação a respeito da concentração ideal de plaquetas e leucócitos (WBC) em valores absolutos no PRP. A maioria dos trabalhos considera apenas

quantas vezes mais plaquetas deveriam ser encontradas no PRP em relação ao valor no sangue total, que seria de 2,5 vezes (Graziani et al., 2006). Esse valor é superior ao encontrado no protocolo de confecção do PRP através de centrifugação única do sangue à 133g, durante 8 minutos, cuja média foi de 1,67 vezes para o PRP do grupo autólogo e 1,6 vezes para o do grupo heterólogo. Entretanto, a concentração relativa de plaquetas permite apenas que haja uma caracterização do plasma como PRP (Graziani et al., 2006).

A concentração absoluta de plaquetas é, geralmente, extrapolada de trabalhos realizados em seres humanos, desconsiderando as variações interespecies na contagem plaquetária e na fisiologia da degranulação e constituição quanto aos fatores de crescimento. Ainda são necessários estudos que definam a concentração plaquetária mínima necessária para alcançar os benefícios biológicos do PRP em equinos, como também sugerido por Fontenot et al. (2012).

Fontenot et al. (2012) estimaram que concentrações plaquetárias superiores a 250.000/ml plaquetas no PRP seriam clinicamente relevantes. Valor semelhante à sua estimativa, foi encontrada na contagem manual em câmara de Neubauer (249,42 x 10³/μl), independente do PRP ter sido de origem autóloga ou heteróloga. Observou-se (Tab. 5) uma semelhança (P>0,05) na contagem do PRP autólogo e heterólogo, tanto nas contagens em Câmara de Neubauer quanto em aparelho automático. Apesar disso, a contagem foi superior (P<0,05) quando realizada em Câmara de Neubauer, independentemente do PRP ser autólogo ou heterólogo,.

É sabido que ocorre maior concentração plaquetária quando são realizadas duas centrifugações, e no presente estudo o protocolo contou com uma única centrifugação visando obter menor concentração de leucócitos. O que se confirma pelos resultados encontrados por Vendruscolo et al. (2012), que obteve concentração mais que duas vezes maior que a obtida no presente estudo (3,214 ± 3,739 x10³ de leucócitos/μl). Contudo a concentração de leucócitos aqui obtida foi

similar à encontrada por Álvares et al. (2011) (1,16 ± 1,4 x10³ /μl) e superior à encontrada por Kisiday et al. (2012) (0,04 + 0,001 x10³ /μl). Apesar disto, a contagem de leucócitos foi abaixo do limite considerado por Fontenot et al. (2012) como concentração ótima de leucócitos no PRP (<3,0 x10³ /μl). Com valores extremamente diversos para a concentração de leucócitos nos trabalhos realizados até o momento e sem estudos que relacionem a presença dos leucócitos no PRP à alterações reais na inflamação, é arriscado inferir qual seria sua concentração ideal, mas pode-se afirmar que o PRP não levou a alterações oculares de origem inflamatória que pudessem ser atribuídas à contagem leucocitária.

A diferença entre os valores do plaquetócrito (PCT) e do volume plaquetário médio encontrados (MPV) no sangue total e seus respectivos PRP autólogo e heterólogo, foi significativa (p<0,05; Tab. 3). Essa diferença pode refletir a ativação de plaquetas durante o processamento do PRP, uma vez que plaquetas ativadas mudam seu formato discóide, adquirindo formato esférico e aumentando, conseqüentemente, seu volume. A ativação plaquetária precoce não é desejada no PRP, uma vez que leva à liberação dos fatores de crescimento antes da aplicação no tecido alvo. O ideal seria o valor do MPV similar ao do sangue total, o que demonstraria o estado de inativação plaquetária (Fontenot et al., 2012).

A avaliação morfológica sob microscopia óptica permitiu avaliar as plaquetas quanto ao seu percentual de ativação. Esse tipo de avaliação é subjetiva, e como as plaquetas são estruturas extremamente pequenas, necessita de treinamento do avaliador, que identifica mudanças no formato das plaquetas observadas, classificando-as como inativadas, quando se apresentam discóides ou fusiformes com importante diferença entre os tamanhos dos eixos X e Y; ativação incerta, quando há aproximação entre os tamanhos dos eixos X e Y e mudança do formato para esférico; e ativadas, quando forem observadas emissões de pseudópodes, de acordo com o protocolo de Paes Leme et al. (2006).

Essa classificação permite inferir qual o

percentual de plaquetas iniciou suas modificações em direção à ativação, e aquelas cuja ativação é inevitável, pois seu estado é irreversível. Sendo assim, o percentual de plaquetas com ativação incerta é somado àquele de inativadas, pois essas não são capazes de liberar o conteúdo dos seus grânulos. O percentual médio de ativação para o grupo autólogo permaneceu em $26,48 \pm 1,83$; e heterólogo $24,44 \pm 2,46$ ($P > 0,05$), mantendo um percentual superior a 70% quando somadas as plaquetas inativadas e em estado de ativação incerto. Não há definição do percentual de ativação ideal para o PRP que não será imediatamente aplicado. Acredita-se que 90% dos fatores de crescimento de uma plaquetas são liberadas até 10 minutos após sua ativação, por isso, a ativação deve ocorrer imediatamente antes a aplicação, ou após o PRP ter sido aplicado, sendo essa última mais desejável, uma vez que o colágeno promove liberação mais lenta dos fatores de crescimento, considerada mais próxima da fisiológica (Wroblewski et al., 2010; Harmon et al., 2014).

Considerando a manutenção dos fatores de crescimento dentro dos grânulos α plaquetários como essencial para a preservação dos efeitos biológicos do PRP, é preciso buscar o menor percentual de ativação possível.

4.2.3. Avaliação clínica e termográfica de equinos com úlcera de córnea induzida pelo DB e tratados com PRP autólogo ou heterólogo

Para saber se uma dada caracterização/classificação é confiável, é necessário ter este objeto caracterizado ou

classificado várias vezes, como por exemplo, por mais de um avaliador. A concordância entre avaliadores reflete o grau de dificuldade na interpretação dos achados clínicos avaliados no exame oftalmológico. A análise de concordância foi realizada através do teste de Kappa, que é baseada no número de respostas concordantes, ou seja, no número de casos cujo resultado é o mesmo entre os avaliadores. Esta medida de concordância tem como valor máximo o 1, onde o valor 1 representa total concordância e os valores próximos e até abaixo de 0, indicam nenhuma concordância, ou a concordância foi exatamente a esperada pelo acaso. Um eventual valor de Kappa menor que zero, negativo, sugere que a concordância encontrada foi menor do aquela esperada por acaso (Lee, 2014).

Os critérios avaliados diariamente e submetidos ao teste do Kappa foram alopecia, fotofobia, epífora, edema de córnea, hiperemia, quemose, blefaroespasma e o teste de fluoresceína. Cada critério foi classificado e registrado por dois avaliadores, nos 320 exames realizados. O teste de fluoresceína, excepcionalmente, apresentou 318 registros devido a duas parcelas perdidas. Para a descrição dos achados clínicos, quando houve discordância entre os avaliadores 1 e 2, a classificação de um terceiro avaliador foi utilizada.

Apesar da alopecia ser um achado, teoricamente, de fácil interpretação, quando esta é discreta pode ser ignorada caso o examinador não observe com muita atenção. Provavelmente, a falha na identificação de perdas discretas de pelos levou à fraca concordância (0,173) entre os examinadores (Tab. 5).

Tabela 5: Concordância entre os examinadores 1 e 2, na avaliação clínica da presença de alopecia, em pacientes equinos, independentemente da presença de úlcera de córnea*

Examinador 1	Examinador 2			Kappa (IC=95%)
	Ausente	Presente	Total	
Ausente	257 (80,31%)	12 (3,75%)	269 (84,06%)	0,173(0,076-0,27) Fraca p < 0,001
Presente	42 (13,13%)	9 (2,81%)	51 (15,94%)	
Total	299 (93,44%)	21 (6,56%)	320 (100,0%)	

*Avaliação clínica do olho direito e esquerdo - apenas em um dos olhos a úlcera estava presente ou recém cicatrizada

Apenas os animais dos grupos de tratamento com PRP apresentaram alopecia ao redor do olho debridado, sendo dois animais do grupo heterólogo e, em relação ao autólogo, esse achado surgiu apenas ao final do experimento, a partir do dia 6, em apenas um animal. Nenhum animal do grupo controle ou nos controles negativos de cada grupo apresentaram alopecia (Tab. 6).

A alopecia foi considerada como um sinal ocasional para o auxílio no diagnóstico da úlcera de córnea. A primeira causa a ser investigada quando um cavalo apresenta alopecia é o prurido (Scott e Miller, 2003). A causa mais comum de prurido são infecções cutâneas parasitárias, bacterianas, fúngicas ou mesmo alergias (Fadok, 1995). Entretanto, o prurido é um dos sinais mais prevalentes indicando a ocorrência de dor ocular (Ferraro, 2009; Andrew e Willis, 2005), o que não pode ser descartado neste estudo.

A fotofobia é um sinal clínico caracteristicamente subjetivo, sendo mais um entre vários sinais de dor ocular. Apesar da subjetividade desse sinal ocular no presente trabalho, foi identificada concordância moderada entre os examinadores (0,487), demonstrando que avaliá-lo não representa uma dificuldade para um examinador treinado (Tab. 7). Nos

grupos com úlcera não houve diferença ($P>0,05$) entre os escores para fotofobia durante todo o tratamento. Quando se comparou os grupos com a presença de úlcera e seus respectivos controles negativos, observou-se maior frequência de animais com fotofobia nos grupos com a presença de úlcera ($P<0,05$; Tab. 6). Nos grupos controle negativo (ausência de úlcera), apenas um animal do grupo PRP autólogo e dois animais que receberam PRP heterólogo e soro fisiológico apresentaram fotofobia.

Era esperado que nenhum cavalo apresentasse fotofobia no olho esquerdo, que serviram de controle negativo, ou que este estivesse distribuído na mesma frequência dos seus respectivos tratamentos, no olho contralateral, porém isso não foi observado.

Na presença de fotofobia observa-se respostas como a oclusão palpebral, a retração do bulbo ocular e apresentação ou intensificação da epífora. Tais respostas podem ser discretas ou intensas, se apresentarem isoladamente ou em conjunto, e, muitas vezes, requerem um examinador atento e criterioso para discernir entre os sinais presentes anteriormente à incidência da luz e respostas à dor devido à fotofobia (Sauer et al., 2003).

Tabela 6: Frequência da ocorrência de epífora, alopecia e fotofobia, de acordo com o momento do exame, em equinos com úlcera de córnea induzida e tratados com Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

Tem- po	Olho direito - % (n)			Olho esquerdo (controle negativo) - % (n)		
	Controle positivo	PRP autólogo	PRP heterólogo	Controle	PRP autólogo	PRP heterólogo
EPÍFORA						
Dia 0	0,00 (0/6) ^B	0,00 (0/6) ^C	0,00 (0/6) ^B	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)
Dia 1	50,00 (3/6) ^{Aa}	83,33 (5/6) ^{Aa}	83,33 (5/6) ^{Aa}	0,00 (0/6) ^b	0,00 (0/6) ^b	0,00 (0/6) ^b
Dia 2	66,67 (4/6) ^{Aa}	50,00 (3/6) ^{ABa}	83,33 (5/6) ^{Aa}	0,00 (0/6) ^b	0,00 (0/6) ^b	0,00 (0/6) ^b
Dia 3	50,00 (3/6) ^{Aab}	83,33 (5/6) ^{Aa}	66,67 (4/6) ^{Aab}	0,00 (0/6) ^c	0,00 (0/6) ^c	16,67 (1/6) ^{bc}
Dia 4	66,67 (4/6) ^{Aa}	50,00 (3/6) ^{ABa}	83,33 (5/6) ^{Aa}	0,00 (0/6) ^b	0,00 (0/6) ^b	0,00 (0/6) ^b
Dia 5	66,67 (4/6) ^{Aa}	50,00 (3/6) ^{ABab}	83,33 (5/6) ^{Aa}	0,00 (0/6) ^c	16,67 (1/6) ^{bc}	0,00 (0/6) ^c
Dia 6	50,00 (3/6) ^{Aab}	66,67 (4/6) ^{ABa}	66,67 (4/6) ^{Aa}	0,00 (0/6) ^c	16,67 (1/6) ^{bc}	0,00 (0/6) ^c
Dia 7	66,67 (4/6) ^{Aa}	50,00 (3/6) ^{ABab}	66,67 (4/6) ^{Aa}	0,00 (0/6) ^c	16,67 (1/6) ^{bc}	0,00 (0/6) ^c
Dia 8	16,67 (1/6) ^{ABab}	16,67 (1/6) ^{BCab}	66,67 (4/6) ^{Aa}	0,00 (0/6) ^b	0,00 (0/6) ^b	0,00 (0/6) ^b
ALOPECIA						
Dia 0	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)
Dia 1	0,00 (0/6)	16,67 (1/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)
Dia 2	0,00 (0/6)	16,67 (1/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)

Dia 3	0,00 (0/6)	16,67 (1/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)
Dia 4	0,00 (0/6)	16,67 (1/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)
Dia 5	0,00 (0/6)	16,67 (1/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)
Dia 6	0,00 (0/6)	16,67 (1/6)	33,33 (2/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)
Dia 7	0,00 (0/6)	16,67 (1/6)	33,33 (2/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)
Dia 8	0,00 (0/6)	16,67 (1/6)	33,33 (2/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)

FOTOFOBIA

Dia 0	0,00 (0/6) ^B	0,00 (0/6) ^B	0,00 (0/6) ^B	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)
Dia 1	83,33 (5/6) ^A	50,00 (3/6) ^A	83,33 (5/6) ^A	16,67 (1/6)	16,67 (1/6)	16,67 (1/6)
Dia 2	100,00 (6/6) ^A	50,00 (3/6) ^A	66,67 (4/6) ^A	33,33 (2/6)	33,33 (2/6)	16,67 (1/6)
Dia 3	83,33 (5/6) ^A	83,33 (5/6) ^A	66,67 (4/6) ^A	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)	16,67 (1/6)
Dia 4	50,00 (3/6) ^A	16,67 (1/6) ^{AB}	66,67 (4/6) ^A	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)
Dia 5	50,00 (3/6) ^A	16,67 (1/6) ^{AB}	16,67 (1/6) ^{AB}	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)
Dia 6	66,67 (4/6) ^A	33,33 (2/6) ^{AB}	33,33 (2/6) ^{AB}	16,67 (1/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)
Dia 7	50,00 (3/6) ^A	33,33 (2/6) ^{AB}	33,33 (2/6) ^{AB}	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)	16,67 (1/6)
Dia 8	16,67 (1/6) ^{AB}	16,67 (1/6) ^{AB}	50,00 (3/3) ^A	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)

Médias seguidas por letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, diferem ($p < 0,05$).

Dia 0: antes do início da indução da úlcera; Dia 1: 12 horas após a indução e antes do início do tratamento; Dia 2: 24 horas após o início do tratamento, Dia 3: 48 horas após início do tratamento; Dia 4: 72 horas após início do tratamento; Dia 5: 96 horas após início do tratamento; Dia 6: 120 horas após início do tratamento; Dia 7: 144 horas após início do tratamento; Dia 8: 168 horas após início do tratamento. Grupo controle: soro fisiológico; olho direito - úlcera de córnea induzida; olho esquerdo - sem indução de úlcera

Tabela 7: Concordância entre os examinadores 1 e 2, na avaliação clínica da presença de fotofobia, em pacientes equinos, independentemente da presença de úlcera de córnea*

Examinador 1	Examinador 2			Kappa (IC=95%)
	Ausente	Presente	Total	
Ausente	206 (64,78%)	11 (3,46%)	217 (68,24%)	0,487(0,384-0,591) Moderada $p < 0,001$
Presente	52 (16,35%)	49 (15,41%)	101 (31,76%)	
Total	258 (81,13%)	60 (18,87%)	318 (100,0%)	

*Avaliação clínica do olho direito e esquerdo - apenas em um dos olhos a úlcera estava presente ou recém-cicatrizada.

Alguns animais apresentaram fotofobia em determinados momentos em ambos os olhos, independente do grupo a que pertenciam. Se isso se deveu a respostas neurogênicas ou inflamatórias sistêmicas, a aplicação dos tratamentos ou a própria manipulação diária, não é possível determinar. Outra possibilidade seria a interpretação incorreta do sinal clínico devido ao uso de lanternas de LED, que pode produzir reflexo de ofuscamento.

A epífora, apesar de ser, teoricamente, um sinal de fácil observação, apresentou uma concordância moderada (0,487). Possivelmente isso se deva à consideração errônea do lacrimejamento como consequência de determinado evento, como a contenção ou o incômodo gerado pela presença de insetos no ambiente, levando o examinador a classificar o sinal como ausente (Tab. 8).

Tabela 8: Concordância entre os examinadores 1 e 2, na avaliação clínica da presença de epífora, em pacientes equinos, independentemente da presença de úlcera de córnea*

Examinador 1	Examinador 2			Kappa (IC=95%)
	Ausente	Presente	Total	
Ausente	166 (64,78%)	23 (3,46%)	189 (68,24%)	0,487(0,384-0,591) Moderada $p < 0,001$
Presente	10 (16,35%)	121 (15,41%)	131 (31,76%)	
Total	176 (81,13%)	144 (18,87%)	320 (100,0%)	

*Avaliação clínica do olho direito e esquerdo - apenas em um dos olhos a úlcera estava presente ou recém cicatrizada

Não houve diferença ($P > 0,05$) na ocorrência de epífora entre os três grupos de tratamento. Porém a ocorrência de epífora nos olhos debridados foi superior à dos controles negativos ($P < 0,05$). Com exceção dos grupos que receberam PRP autólogo e heterólogo, que apresentaram um cavalo com epífora no olho esquerdo (controle negativo), não houve ocorrência de epífora nos controles negativos (Tab. 7).

Esse achado pode estar relacionado à ausência de reação secundária à aplicação dos tratamentos nesses olhos, demonstrando a segurança na aplicação do PRP em olhos hígidos. Contudo, nenhum estudo citológico foi realizado para se definir a presença de células inflamatórias, seria temeroso afirmar que não há reação por falta de aderência ou ativação das plaquetas, ou se isso se deve à ausência de lesão epitelial.

Assim como foi aqui classificada a epífora, Basile (2011) também determinou a sua ocorrência em seres humanos avaliando-a como ausente ou presente, mas não há referência à concordância entre os examinadores em seu trabalho.

McCornick et al. (2006) tentaram desenvolver um escore para classificar a epífora quanto à intensidade, no pós-operatório de dacriocistorrinostomia. Contudo, concluíram que, devido à alta especificidade e baixa sensibilidade do teste, essa não seria uma forma adequada para avaliar a patência do ducto nasolacrimal.

O blefaroespasmó foi classificado em 0 – Ausente, 1 – Discreto ($45^\circ > \hat{A} < 90^\circ$), 2 – Moderado ($\hat{A} < 45^\circ$) e 3 – Grave (Pálpebras fechadas). Para esse teste, a concordância geral foi moderada (0,662). Na ausência do sinal, a concordância se mostrou forte (0,656), sendo fraca em situações em que era apresentado discretamente (0,368). Isso mostra que foi difícil discernir entre o blefaroespasmó discreto, a ausência de blefaroespasmó e demais classificações. Já em casos de blefaroespasmó moderado e grave a concordância foi moderada a forte (respectivamente, 0,514 e 0,629) (Tab. 9). Esse achado permite concluir que o grau de blefaroespasmó é um sinal subjetivo, que demanda dos examinadores treinamento e experiência, podendo ser ignorado se o paciente apresentá-lo de forma discreta.

Tabela 9: Concordância entre os examinadores 1 e 2, na avaliação clínica da presença de blefaroespasmó, em pacientes equinos, independentemente da presença de úlcera de córnea*

Examinador 1	Examinador 2				Total
	Ausente	Discreto	Moderado	Grave	
Ausente	106(33,13%)	1 (0,31%)	0 (0,00%)	0	107(33,44%)
$45^\circ > \hat{A} < 90^\circ$	48 (15,00%)	53(16,56%)	3 (0,84%)	0	104(32,50%)
$\hat{A} < 45^\circ$	6 (1,87%)	33(10,31%)	45(14,06%)	1 (0,31%)	85 (26,56%)
Pálpebras fechadas	0 (0,00%)	0 (0,00%)	12 (3,75%)	12 (3,75%)	24 (7,50%)
	160(50,00%)	87(27,19%)	60(18,75%)	13 (4,06%)	320(100,00%)
Categoria					Kappa Geral
Kappa	0,656	0,368	0,514	0,629	0,662
	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
IC	0,553 - 0,76	0,259-0,476	0,407-0,621	0,525-0,773	0,558 -0,765

*Avaliação clínica do olho direito e esquerdo - apenas em um dos olhos a úlcera estava presente ou recém cicatrizada. IC - Intervalo de confiança

Lindeboom et al. (1995) desenvolveram um complicado sistema de escore em seres humanos sofrendo de blefarospasmo devido à distonia facial. Nesse sistema de escore os pacientes classificam sua dificuldade em realizar atividades cotidianas (como ler, assistir à televisão e dirigir) de 0 (nenhuma dificuldade) a 4 (impossibilidade em desempenhar a função). Apesar de subjetiva, uma vez que o paciente pode subestimar ou superestimar sua deficiência, o sistema provavelmente produz resultados mais confiáveis do que avaliações como as realizadas neste estudo, que dependem da interpretação do sinal por um expectador, ainda que treinado.

Quanto ao escore de blefaroespasmo, não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre os grupos com úlcera. Mas, os escores encontrados nos grupos de tratamentos foram maiores ($P < 0,05$) quando comparados aos seus controles negativos (Tab. 10). A dor ocular tem o potencial de perpetuar a inflamação ao produzir prurido e compressão do bulbo como respostas ao estímulo doloroso (Ferraro, 2009).

Na avaliação oftalmológica a normalidade

da coloração conjuntival foi um critério de fácil identificação, obtendo concordância moderada entre avaliadores (0,486). Contudo, os registros da ficha oftalmológica pediam a classificação dela como Ausente, Discreta ou Intensa, e essa classificação apresentou dificuldade aos examinadores. A concordância para classificação discreta e intensa foram baixas, respectivamente, 0,31 e 0,37 (Tab. 11).

A concordância entre avaliadores não foi relatada no trabalho de Velpandian et al (1999), que sugeriu uma escala de congestão conjuntival sendo 0 ausente, + discreta, ++ moderada e +++ grave. Por isso, não é possível comparar a facilidade de execução dessa avaliação com o trabalho de referência.

Stewart et al. (2003) e Leal et al. (2004) propuseram escalas menos simplificadas para a hiperemia conjuntival em seres humanos, sendo 0 – ausente, 1- mínima, 2- discreta, 3 moderada e 4 grave (Stewart et al., 2003), entretanto esses trabalhos também não apresentam a análise de concordância entre avaliadores.

Tabela 10: Média \pm Erro padrão e mediana do escore para blefaroespasmo, de acordo com o momento do exame, em equinos com úlcera de córnea induzida e tratados com Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

Tempo	Olho direito			Olho esquerdo (controle negativo)		
	Controle positivo	PRP autólogo	PRP heterólogo	Controle	PRP autólogo	PRP heterólogo
Média \pm EP						
Dia 0	0,00 \pm 0,00 ^C	0,00 \pm 0,00 ^B	0,00 \pm 0,00 ^C	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Dia 1	1,67 \pm 0,21 ^{Aa}	2,33 \pm 0,33 ^{Aa}	2,33 \pm 0,21 ^{ABa}	0,17 \pm 0,17 ^b	0,50 \pm 0,34 ^b	0,17 \pm 0,17 ^b
Dia 2	1,67 \pm 0,21 ^{Aa}	1,83 \pm 0,31 ^{Aa}	1,83 \pm 0,31 ^{ABa}	0,00 \pm 0,00 ^b	0,33 \pm 0,21 ^b	0,17 \pm 0,17 ^b
Dia 3	1,50 \pm 0,22 ^{Aa}	1,67 \pm 0,33 ^{Aa}	2,00 \pm 0,26 ^{ABa}	0,00 \pm 0,00 ^b	0,00 \pm 0,00 ^b	0,17 \pm 0,17 ^b
Dia 4	1,67 \pm 0,21 ^{Aa}	1,67 \pm 0,21 ^{Aa}	2,00 \pm 0,16 ^{ABa}	0,00 \pm 0,00 ^b	0,00 \pm 0,00 ^b	0,17 \pm 0,17 ^b
Dia 5	1,33 \pm 0,21 ^{ABa}	1,33 \pm 0,33 ^{ABa}	1,67 \pm 0,21 ^{ABa}	0,00 \pm 0,00 ^b	0,00 \pm 0,00 ^b	0,17 \pm 0,17 ^b
Dia 6	1,33 \pm 0,33 ^{ABa}	0,67 \pm 0,49 ^{Bab}	1,33 \pm 0,21 ^{Ba}	0,00 \pm 0,00 ^b	0,00 \pm 0,00 ^b	0,00 \pm 0,00 ^b
Dia 7	1,00 \pm 0,37 ^{ABa}	0,67 \pm 0,49 ^{Bab}	1,33 \pm 0,42 ^{ABa}	0,00 \pm 0,00 ^b	0,00 \pm 0,00 ^b	0,00 \pm 0,00 ^b
Dia 8	0,67 \pm 0,21 ^{Ba}	0,67 \pm 0,49 ^{Bab}	1,67 \pm 0,31 ^{Ba}	0,00 \pm 0,00 ^b	0,00 \pm 0,00 ^b	0,00 \pm 0,00 ^b
Mediana						
Dia 0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Dia 1	2,00	2,50	2,00	0,00	0,00	0,00
Dia 2	2,00	2,00	2,00	0,00	0,00	0,00
Dia 3	1,50	1,50	2,00	0,00	0,00	0,00
Dia 4	2,00	2,00	2,00	0,00	0,00	0,00

Dia 5	1,00	1,00	2,00	0,00	0,00	0,00
Dia 6	1,50	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
Dia 7	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
Dia 8	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00

Médias seguidas por letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, diferem ($p < 0,05$).

Dia 0: antes do início da indução da úlcera; Dia 1: 12 horas após a indução e antes do início do tratamento; Dia 2: 24 horas após o início do tratamento, Dia 3: 48 horas após início do tratamento; Dia 4: 72 horas após início do tratamento; Dia 5: 96 horas após início do tratamento; Dia 6: 120 horas após início do tratamento; Dia 7: 144 horas após início do tratamento; Dia 8: 168 horas após início do tratamento. Grupo controle: soro fisiológico; olho direito - úlcera de córnea induzida; olho esquerdo - sem indução de úlcera.

Tabela 11: Concordância entre os examinadores 1 e 2, na avaliação clínica da presença de hiperemia da conjuntiva, em pacientes equinos, independentemente da presença de úlcera de córnea*

Examinador 1	Examinador 2			Total
	Ausente	Discreta	Intensa	
Ausente	55 (17,19%)	59 (18,44%)	0 (0,00%)	114 (35,63%)
Discreta	8 (2,50%)	127 (39,69%)	4 (1,25%)	139 (43,44%)
Intensa	1 (0,31%)	46 (14,38%)	20 (6,25%)	67 (20,94%)
Total	64 (20,00%)	232 (72,50%)	24 (7,50%)	320 (100,00%)
Categoria Kappa	0,486	0,31	0,37	Kappa geral: 0,383
Valor p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	p < 0,001
IC	0,385 - 0,588	0,218 - 0,401	0,277 - 0,463	0,312 - 0,455

*Avaliação clínica do olho direito e esquerdo - apenas em um dos olhos a úlcera estava presente ou recém cicatrizada. IC - Intervalo de confiança

Na avaliação clínica no dia 0, anteriormente à indução da lesão corneana, alguns animais apresentaram hiperemia discreta em um ou ambos os olhos. Como os animais foram escolhidos aleatoriamente, por sorteio, pode-se considerar como acaso um escore mais elevado para os animais que receberiam PRP autólogo. Apesar disso, não foi observada diferença ($P > 0,05$) ao se comparar os grupos no dia 0. Entretanto, após a indução da úlcera, observou-se diferença ($P < 0,05$) entre os grupos com e sem a indução da úlcera, independentemente do tratamento utilizado. No sexto dia de tratamento o grupo com úlcera e tratado com PRP autólogo apresentou a mesma intensidade de hiperemia dos demais grupos onde a úlcera não foi induzida. Nos dias 7 e 8 o grupo controle positivo se igualou ($P > 0,05$) aos demais, exceto com o grupo PRP

heterólogo - controle negativo, onde a hiperemia deixou de ser observada em todos os animais desde o sexto dia de tratamento (Tab. 12).

Observou-se dificuldade na classificação do edema conjuntival, principalmente quando esse se apresentava discreto, sendo considerado pelos avaliadores, muitas vezes, como ausente. A concordância entre avaliadores quanto à ausência de quemose e quemose intensa foram moderadas (respectivamente, 0,456 e 0,597). Enquanto a concordância para quemose discreta foi baixa (0,308) (Tab. 13). A ocorrência de quemose não variou significativamente entre os grupos de tratamento, mas houve diferença na escala para quemose entre os tratamentos e seus controles negativos, havendo escores mais baixos nos últimos (Tab. 14).

Tabela 12: Média \pm Erro padrão e mediana do escore para hiperemia, de acordo com o momento do exame, em equinos com úlcera de córnea induzida e tratados com Plasma Rico

em Plaquetas (PRP)						
Tempo	Olho direito			Olho esquerdo (controle negativo)		
	Controle positivo	PRP autólogo	PRP heterólogo	Controle	PRP autólogo	PRP heterólogo
Média ± EP						
Dia 0	0,17 ± 0,17 ^C	1,00 ± 0,00 ^{AB}	0,17 ± 0,17 ^B	0,17 ± 0,17	0,67 ± 0,21	0,33 ± 0,21
Dia 1	1,33 ± 0,21 ^{ABa}	1,33 ± 0,21 ^{ABa}	1,50 ± 0,22 ^{Aa}	0,17 ± 0,17 ^b	0,50 ± 0,34 ^b	0,33 ± 0,21 ^b
Dia 2	1,50 ± 0,22 ^{Aa}	1,50 ± 0,22 ^{Aa}	1,33 ± 0,21 ^{Aa}	0,33 ± 0,21 ^b	0,33 ± 0,21 ^b	0,17 ± 0,17 ^b
Dia 3	1,33 ± 0,21 ^{ABa}	1,50 ± 0,22 ^{ABa}	1,17 ± 0,17 ^{Aa}	0,17 ± 0,17 ^b	0,33 ± 0,21 ^b	0,50 ± 0,22 ^b
Dia 4	1,00 ± 0,00 ^{ABa}	1,67 ± 0,31 ^{ABa}	1,33 ± 0,21 ^{Aa}	0,17 ± 0,17 ^b	0,33 ± 0,21 ^b	0,33 ± 0,21 ^b
Dia 5	1,00 ± 0,00 ^{ABa}	1,00 ± 0,37 ^{ABa}	1,00 ± 0,26 ^{Aa}	0,17 ± 0,17 ^b	0,17 ± 0,17 ^b	0,17 ± 0,17 ^b
Dia 6	0,83 ± 0,17 ^{ABa}	0,67 ± 0,21 ^{Bab}	0,83 ± 0,17 ^{Aa}	0,17 ± 0,17 ^b	0,17 ± 0,17 ^b	0,00 ± 0,00 ^b
Dia 7	0,67 ± 0,21 ^{BCab}	0,83 ± 0,17 ^{ABa}	1,67 ± 0,17 ^{Aa}	0,17 ± 0,17 ^b	0,50 ± 0,22 ^{ab}	0,00 ± 0,00 ^c
Dia 8	0,67 ± 0,21 ^{BCab}	0,67 ± 0,49 ^{Ba}	1,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,17 ± 0,17 ^{bc}	0,67 ± 0,17 ^{ab}	0,00 ± 0,00 ^c
Mediana						
Dia 0	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
Dia 1	1,00	1,00	1,50	0,00	0,00	0,00
Dia 2	1,50	1,50	1,00	0,00	0,00	0,00
Dia 3	1,00	1,50	1,00	0,50	0,00	0,00
Dia 4	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00
Dia 5	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00
Dia 6	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00
Dia 7	1,00	1,00	1,00	0,00	0,50	0,00
Dia 8	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00

Médias seguidas por letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, diferem (p<0,05).

Dia 0: antes do início da indução da úlcera; Dia 1: 12 horas após a indução e antes do início do tratamento; Dia 2: 24 horas após o início do tratamento, Dia 3: 48 horas após início do tratamento; Dia 4: 72 horas após início do tratamento; Dia 5: 96 horas após início do tratamento; Dia 6: 120 horas após início do tratamento; Dia 7: 144 horas após início do tratamento; Dia 8: 168 horas após início do tratamento. Grupo controle: soro fisiológico; olho direito - úlcera de córnea induzida; olho esquerdo - sem indução de úlcera

Tabela 13: Concordância entre os examinadores 1 e 2, na avaliação clínica da presença de quemose, em pacientes equinos, independentemente da presença de úlcera de córnea*

Examinador 1	Examinador 2			Total
	Ausente	Discreta	Intensa	
Ausente	81 (25,31%)	79 (24,69%)	0 (0,00%)	160 (50,00%)
Discreta	8 (2,50%)	88 (27,50%)	4 (1,25%)	100 (31,25%)
Intensa	0 (0,00%)	29 (9,06%)	31 (9,69%)	60 (18,75%)
Total	89 (27,81%)	196 (61,25%)	35 (10,94%)	320 (100,00%)
Categoria Kappa	0,456	0,308	0,597	Kappa geral: 0,422
Valor p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	p < 0,001
IC	0,358 - 0,554	0,217 - 0,40	0,493 - 0,701	0,35 - 0,494

*Avaliação clínica do olho direito e esquerdo - apenas em um dos olhos a úlcera estava presente ou recém cicatrizada.. IC - Intervalo de confiança

Tabela 14: Média ± Erro padrão e mediana do escore para quemose, de acordo com o momento do exame, em equinos com úlcera de córnea induzida e tratados com Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

	Olho direito	Olho esquerdo (controle negativo)
--	--------------	-----------------------------------

Tempo	Controle positivo	PRP autólogo	PRP heterólogo	Controle	PRP autólogo	PRP heterólogo
Média ± EP						
Dia 0	0,50 ± 0,34 ^B	0,50 ± 0,34	0,33 ± 0,21 ^B	0,67 ± 0,33	0,66 ± 0,42	0,33 ± 0,21
Dia 1	1,67 ± 0,21 ^{Aab}	1,50 ± 0,34 ^{ab}	2,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,50 ± 0,34 ^{bc}	0,33 ± 0,21 ^c	0,50 ± 0,22 ^{bc}
Dia 2	1,50 ± 0,22 ^{Aa}	1,67 ± 0,31 ^{ab}	1,50 ± 0,22 ^{ABa}	0,50 ± 0,34 ^{ab}	0,33 ± 0,21 ^b	0,50 ± 0,22 ^b
Dia 3	1,67 ± 0,17 ^{ABa}	1,67 ± 0,31 ^a	1,67 ± 0,16 ^{Ba}	0,33 ± 0,17 ^{ab}	0,33 ± 0,21 ^b	0,50 ± 0,22 ^b
Dia 4	1,67 ± 0,17 ^{ABa}	0,67 ± 0,33 ^{ab}	1,67 ± 0,16 ^{Ba}	0,33 ± 0,21 ^b	0,50 ± 0,34 ^{ab}	0,67 ± 0,33 ^b
Dia 5	1,00 ± 0,00 ^{ABa}	0,50 ± 0,34 ^{ab}	1,33 ± 0,21 ^{Ba}	0,33 ± 0,21 ^b	0,50 ± 0,34 ^{ab}	0,67 ± 0,33 ^{ab}
Dia 6	1,00 ± 0,00 ^{ABa}	0,50 ± 0,34 ^{ab}	1,17 ± 0,17 ^{Ba}	0,33 ± 0,21 ^{ab}	0,50 ± 0,34 ^b	0,67 ± 0,33 ^{ab}
Dia 7	1,00 ± 0,00 ^{ABa}	0,50 ± 0,34 ^{ab}	1,00 ± 0,00 ^{Ba}	0,33 ± 0,21 ^b	0,50 ± 0,34 ^{ab}	0,50 ± 0,22 ^{ab}
Dia 8	1,00 ± 0,00 ^{ABa}	0,50 ± 0,34 ^{ab}	1,17 ± 0,17 ^B	0,33 ± 0,21 ^b	0,50 ± 0,34 ^{ab}	0,50 ± 0,22 ^{ab}
Mediana						
Dia 0	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00
Dia 1	2,00	2,00	2,00	0,00	0,00	0,50
Dia 2	1,50	1,00	1,50	0,00	0,00	0,50
Dia 3	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,50
Dia 4	1,00	0,50	1,00	0,00	0,00	0,50
Dia 5	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,50
Dia 6	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,50
Dia 7	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,50
Dia 8	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,50

Médias seguidas por letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, diferem ($p < 0,05$).

Dia 0: antes do início da indução da úlcera; Dia 1: 12 horas após a indução e antes do início do tratamento; Dia 2: 24 horas após o início do tratamento, Dia 3: 48 horas após início do tratamento; Dia 4: 72 horas após início do tratamento; Dia 5: 96 horas após início do tratamento; Dia 6: 120 horas após início do tratamento; Dia 7: 144 horas após início do tratamento; Dia 8: 168 horas após início do tratamento. Grupo controle: soro fisiológico; olho direito - úlcera de córnea induzida; olho esquerdo - sem indução de úlcera.

Não foi encontrado trabalho que desenvolvesse ou utilizasse escala de quemose para permitir uma comparação entre o índice de concordância entre avaliadores. O único trabalho encontrado avaliando graus de quemose apenas a descrevia de discreta a severa em seres humanos submetidos à blefaroplastia (Weinfeld et al, 2008).

Para o critério quemose os escores não variaram ($P > 0,05$) quando se comparou os tratamentos nos olhos com a indução da úlcera. No grupo PRP autólogo - olho direito, não ocorreu aumento ($P > 0,05$) do escore para quemose, dentro dos dias, quando comparados com o Dia 0. No grupo tratado com soro fisiológico (controle positivo) apenas no Dia 3 o escore médio se igualou ($P > 0,05$) ao Dia 0, demonstrando um aumento inicial da quemose com resolução progressiva e o mesmo foi constatado no grupo PRP heterólogo - olho direito no segundo dia de tratamento. No olho esquerdo (controle negativo), em todos os três grupos de tratamento não houve diferença ($P > 0,05$) entre os dias.

Esses achados permitem inferir que houve resolução mais rápida da quemose nos animais tratados com PRP. Sendo a quemose resultado do processo inflamatório, esse achado pode se dever aos efeitos antiflogísticos atribuídos ao PRP por El-Sharkawy et al. (2007), que demonstrou haver inibição da proteína quimiotática para macrófagos 1(MPC-1), e consequentemente, ausência de ativação macrófágica; aumento da RANTES que possui função pró e antiinflamatória e supressão da resposta inflamatória através da indução à liberação de LXA₄.

O edema de córnea foi classificado em 0 - Ausente, 1 - Focal, 2 - Difuso. Os avaliadores identificaram com facilidade córneas que não apresentavam edema, obtendo concordância forte (0,742). A identificação de edema focal também não representou dificuldade para os avaliadores, sendo a concordância igualmente forte (0,609). Entretanto, houve dificuldade na classificação como difuso que apresentou concordância moderada (0,415) (Tab. 15).

Tabela 15: Concordância entre os examinadores 1 e 2, na avaliação clínica da presença de edema de córnea, em pacientes equinos, independentemente da presença de úlcera de córnea*

Examinador 1	Examinador 2			Total
	Ausente	Focal	Difuso	
Ausente	202 (63,13%)	32 (10,00%)	4 (1,25%)	238 (74,38%)
Focal	0 (0,00%)	58 (18,13%)	12 (3,75%)	70 (21,86%)
Difuso	0 (0,00%)	4 (1,25%)	8 (2,50%)	12 (3,75%)
Total	202 (63,13%)	94 (29,38%)	24 (7,50%)	320 (100,00%)
Categoria Kappa	0,742	0,609	0,415	Kappa geral: 0,649
Valor p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	p < 0,001
IC	0,636 - 0,848	0,502 - 0,717	0,313 - 0,518	0,559 - 0,74

*Avaliação clínica do olho direito e esquerdo - apenas em um dos olhos a úlcera estava presente ou recém cicatrizada. Nenhum paciente foi classificado com opacidade total. IC - Intervalo de confiança

Esse resultado mostra que o treinamento dos examinadores foi suficiente para que eles identificassem a ocorrência do edema, mas talvez fosse necessária mais experiência para realizar a classificação subjetiva da opacidade.

O edema de córnea variou ($P < 0,05$) dentro dos grupos de tratamento, de acordo com dia, na avaliação do olho direito. No olho esquerdo, não houve diferença ($P > 0,05$) dentro de cada grupo, de acordo com o dia.

Quando se comparou os grupos, dentro dos dias, observou-se uma igualdade no Dia 1 ($P > 0,05$) e, apenas no Dia 5, PRP autólogo, olho direito - houve semelhança ($P > 0,05$) com os tratamentos administrados no olho esquerdo (controle negativo). Nos grupos soro fisiológico e PRP heterólogo - olho direito, esta semelhança com os tratamentos do controle negativo (olho esquerdo) só ocorreu no sexto dia de tratamento (Tab. 16).

Tabela 16: Média \pm Erro padrão e mediana do escore para edema de córnea, de acordo com o momento do exame, em equinos com úlcera de córnea induzida e tratados com Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

Tempo	Olho direito			Olho esquerdo (controle negativo)		
	Controle positivo	PRP autólogo	PRP heterólogo	Controle	PRP autólogo	PRP heterólogo
Média \pm EP						
Dia 0	0,00 \pm 0,00 ^B	0,00 \pm 0,00 ^C	0,00 \pm 0,00 ^C	0,17 \pm 0,17	0,17 \pm 0,17	0,17 \pm 0,17
Dia 1	1,33 \pm 0,33 ^{Aa}	1,83 \pm 0,21 ^{Aa}	1,67 \pm 0,21 ^{Aa}	0,17 \pm 0,17 ^b	0,00 \pm 0,00 ^b	0,00 \pm 0,00 ^b
Dia 2	1,50 \pm 0,22 ^{Aa}	1,33 \pm 0,21 ^{ABa}	1,00 \pm 0,00 ^{Ba}	0,17 \pm 0,17 ^b	0,00 \pm 0,00 ^b	0,00 \pm 0,00 ^b
Dia 3	1,17 \pm 0,17 ^{Aa}	1,00 \pm 0,26 ^{BCa}	1,00 \pm 0,00 ^{Ba}	0,17 \pm 0,17 ^b	0,00 \pm 0,00 ^b	0,00 \pm 0,00 ^b
Dia 4	1,17 \pm 0,17 ^{Aa}	1,00 \pm 0,26 ^{BCa}	1,00 \pm 0,00 ^{Ba}	0,17 \pm 0,17 ^b	0,00 \pm 0,00 ^b	0,00 \pm 0,00 ^b
Dia 5	1,00 \pm 0,00 ^{Aa}	0,50 \pm 0,22 ^{Cab}	1,00 \pm 0,00 ^{Ba}	0,17 \pm 0,17 ^b	0,00 \pm 0,00 ^b	0,00 \pm 0,00 ^b
Dia 6	0,67 \pm 0,33 ^{ABab}	0,50 \pm 0,22 ^{Cab}	0,67 \pm 0,21 ^{Ba}	0,17 \pm 0,17 ^{ab}	0,00 \pm 0,00 ^b	0,00 \pm 0,00 ^b
Dia 7	0,67 \pm 0,33 ^{ABab}	0,50 \pm 0,34 ^{Cab}	0,67 \pm 0,21 ^{Ba}	0,17 \pm 0,17 ^{ab}	0,00 \pm 0,00 ^b	0,00 \pm 0,00 ^b
Dia 8	0,67 \pm 0,33 ^{AB}	0,33 \pm 0,33 ^C	0,50 \pm 0,22 ^{BC}	0,17 \pm 0,17	0,00 \pm 0,00	0,50 \pm 0,22
Mediana						
Dia 0	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00
Dia 1	1,50	2,00	2,00	0,00	0,00	0,00
Dia 2	1,50	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00
Dia 3	1,00	1,00	1,00	0,50	0,00	0,00
Dia 4	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00

Dia 5	1,00	0,50	1,00	0,00	0,00	0,00
Dia 6	0,50	0,50	1,00	0,00	0,00	0,00
Dia 7	0,50	0,00	1,00	0,00	0,50	0,00
Dia 8	0,50	0,00	0,50	0,00	1,00	0,00

Médias seguidas por letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, diferem ($p < 0,05$).

Dia 0: antes do início da indução da úlcera; Dia 1: 12 horas após a indução e antes do início do tratamento; Dia 2: 24 horas após o início do tratamento, Dia 3: 48 horas após início do tratamento; Dia 4: 72 horas após início do tratamento; Dia 5: 96 horas após início do tratamento; Dia 6: 120 horas após início do tratamento; Dia 7: 144 horas após início do tratamento; Dia 8: 168 horas após início do tratamento. Grupo controle: soro fisiológico; olho direito - úlcera de córnea induzida; olho esquerdo - sem indução de úlcera

Apesar da média do escore para edema de córnea ter sido numericamente mais baixa no olho esquerdo, naqueles grupos em se utilizou o PRP, ela foi similar ($P > 0,05$) em todos os dias do experimento. Apesar disto, a gravidade do edema, traduzida pela avaliação em conjunto da média e da mediana foi similar nos grupos com a indução da úlcera (olho direito), com redução da mediana no grupo PRP autólogo a partir do quinto dia de tratamento.

Após a lesão epitelial forma-se um halo de edema produzido pelo aumento de permeabilidade de vasos limbiais e conjuntivais. O edema corneano, pode também se apresentar difuso, azulado-acinzentado, sendo explicado pelas mudanças estruturais no estroma corneano devido à infiltração leucocitária e à perda de função bombeadora do endotélio (Peiffer et al., 1999).

Tabela 17: Concordância entre os examinadores 1 e 2, no teste de fluoresceína, para diagnóstico da úlcera de córnea, em pacientes equinos

Examinador 1	Examinador 2			Kappa (IC=95%)
	Negativo	Positivo	Total	
Negativo	215 (67,61%)	1 (0,31%)	216 (67,92%)	0,993 (0,883-1,00) Quase perfeita $p < 0,001$
Positivo	0 (0,00%)	102 (32,08%)	102 (32,08%)	
Total	215 (67,61%)	103 (32,39%)	318 (100,0%)	

*Avaliação clínica do olho direito e esquerdo - apenas em um dos olhos a úlcera estava presente ou recém cicatrizada

O termograma, realizado por termografia infravermelha demonstrou uma temperatura entre 33,37°C e 34,76°C para o olho equino, na ausência de alterações clínicas. Não foram detectadas variações da temperatura ocular média ($P > 0,05$) obtida independentemente do tratamento utilizado (Tab. 18). Entretanto, observou-se um aumento ($P < 0,05$) na temperatura ocular, após a indução da úlcera, sem retorno à temperatura basal, nos animais tratados com

Na córnea, a inflamação tecidual é fundamentalmente um processo avascular, por isso, estruturas vascularizadas adjacentes a ela, como conjuntiva, esclera e íris, podem participar ativamente em resposta a fatores elaborados pela córnea lesionada (Peiffer et al., 1999).

Os eventos inflamatórios primários também ocorrem na conjuntiva palpebral e bulbar, que se torna hiperêmica, edemaciada e exsudada, com neutrófilos que alcançam o filme lacrimal (Peiffer et al., 1999).

Como o teste de fluoresceína é patognomônico para úlceras de córnea, sua avaliação não representou nenhuma dificuldade para os examinadores. A concordância entre eles foi de 0,993 (Tab. 17). Esse achado confirma ser este teste o *padrão ouro* para o diagnóstico da úlcera de córnea.

PRP autólogo, até o oitavo dia. Nos animais dos tratados com soro fisiológico ou PRP heterólogo, a temperatura ocular no olho direito retornou ao basal após o quarto dia de tratamento ($P > 0,05$). Quando se comparou os tratamentos realizados no olho direito (indução da úlcera) com os do olho esquerdo (controle negativo), observou-se superioridade na temperatura do direito ($P < 0,05$) até o oitavo dia de tratamento.

Tabela 18: Média \pm Erro padrão da temperatura ocular ($^{\circ}\text{C}$) obtida pela termografia por infravermelho, de acordo com o momento do exame, em equinos com úlcera de córnea induzida e tratados com Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

Tempo	Olho direito			Olho esquerdo (controle negativo)		
	Controle positivo	PRP autólogo	PRP heterólogo	Controle	PRP autólogo	PRP heterólogo
Média + Erro padrão						
Dia 0	34,15 \pm 0,58 ^{Ba}	33,37 \pm 0,28 ^{Ba}	34,76 \pm 0,27 ^{Ba}	33,48 \pm 0,37 ^c	33,53 \pm 0,31 ^{bc}	34,48 \pm 0,21 ^b
Dia 1	35,85 \pm 0,37 ^{Aa}	35,85 \pm 0,50 ^{Aa}	36,28 \pm 0,32 ^{Aa}	34,58 \pm 0,26 ^b	34,07 \pm 0,10 ^b	33,63 \pm 0,22 ^b
Dia 2	35,98 \pm 0,21 ^{Aa}	35,83 \pm 0,33 ^{Aa}	35,82 \pm 0,32 ^{Aa}	33,32 \pm 0,47 ^b	33,68 \pm 0,29 ^b	33,37 \pm 0,25 ^b
Dia 3	36,13 \pm 0,29 ^{Aa}	35,65 \pm 0,29 ^{Aa}	36,07 \pm 0,40 ^{Aa}	33,20 \pm 0,42 ^b	33,58 \pm 0,35 ^b	33,88 \pm 0,27 ^b
Dia 4	35,40 \pm 0,32 ^{ABa}	35,70 \pm 0,25 ^{Aa}	34,82 \pm 0,73 ^{ABa}	33,07 \pm 0,33 ^b	33,13 \pm 0,60 ^b	33,05 \pm 0,28 ^b
Dia 5	36,03 \pm 0,32 ^{Aa}	35,37 \pm 0,34 ^{Aa}	35,62 \pm 0,41 ^{Aa}	33,24 \pm 0,57 ^b	33,28 \pm 0,19 ^b	33,42 \pm 0,30 ^b
Dia 6	35,77 \pm 0,59 ^{ABa}	35,53 \pm 0,40 ^{Aa}	35,57 \pm 0,52 ^{ABa}	33,63 \pm 0,58 ^b	33,75 \pm 0,25 ^b	33,28 \pm 0,49 ^b
Dia 7	35,27 \pm 0,42 ^{ABa}	35,20 \pm 0,31 ^{Aa}	35,23 \pm 0,37 ^{Aa}	32,83 \pm 0,44 ^b	33,33 \pm 0,27 ^b	33,45 \pm 0,40 ^b
Dia 8	35,33 \pm 0,48 ^{ABa}	35,25 \pm 0,43 ^{Aa-}	35,47 \pm 0,42 ^{ABa}	32,57 \pm 0,56 ^b	33,35 \pm 0,30 ^b	34,00 \pm 0,41 ^b
Mediana						
Dia 0	34,10	33,55	34,15	33,55	33,65	34,30
Dia 1	35,90	36,15	36,60	34,45	34,05	33,65
Dia 2	35,95	35,95	36,10	33,90	34,00	33,40
Dia 3	35,90	35,90	35,60	32,70	33,45	34,15
Dia 4	35,55	35,45	35,20	33,15	32,95	33,20
Dia 5	36,05	35,50	35,55	32,50	33,20	33,45
Dia 6	36,40	35,75	35,80	34,35	33,95	33,20
Dia 7	35,70	35,55	35,30	32,90	33,45	33,60
Dia 8	32,25	35,80	35,65	32,70	33,45	33,95

Médias seguidas por letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, diferem ($p < 0,05$).

Dia 0: antes do início da indução da úlcera; Dia 1: 12 horas após a indução e antes do início do tratamento; Dia 2: 24 horas após o início do tratamento, Dia 3: 48 horas após início do tratamento; Dia 4: 72 horas após início do tratamento; Dia 5: 96 horas após início do tratamento; Dia 6: 120 horas após início do tratamento; Dia 7: 144 horas após início do tratamento; Dia 8: 168 horas após início do tratamento. Grupo controle: soro fisiológico; olho direito - úlcera de córnea induzida; olho esquerdo - sem indução de úlcera

Apesar da literatura preconizar a mensuração de um ou mais pontos sobre a córnea (Morgan et al., 1995; Tan et al., 2009), analisou-se apenas um ponto central à úlcera. Certamente, esta metodologia não interferiu nos resultados pois foi possível detectar um aumento da temperatura ocular, por infravermelho, nos olhos com úlcera.

A termografia ocular infravermelha demonstrou ser uma técnica de fácil realização, sem a necessidade de contenção química ou manipulação do animal. Como as mensurações são obtidas a uma distância de 0,5 a 1,0 metro de distância, mesmo que o animal apresente algum grau de desconforto ocular, isso não interferirá no exame.

O aumento da temperatura ocular obtida está relacionado com a presença dos sinais de inflamação: calor, dor e rubor. Como

sequela de um processo de reparação cursando com intensa inflamação ou descontrolado, há modificação da estrutura normal da córnea, com formação de neovasos, opacificação, pigmentação e alteração no formato e curvatura da córnea (Andrew e Willis, 2005). Esta reposta inflamatória pode ser verificada por meio do termograma.

4.2.4. Reparação da úlcera de córnea em equinos tratados com PRP autólogo e heterólogo

A área ulcerada nas córneas dos cavalos submetidas ao debridamento foi mensurada por duas técnicas, com auxílio do software Image J, a mensuração da área (método automático) e do eixo XY (método manual). Os valores obtidos foram comparados entre os grupos de tratamento e

determinado o percentual de resolução da lesão em relação ao dia anterior e ao dia 1.

Não foi observada diferença ($P>0,05$) na área de lesão corneana entre os grupos de tratamentos durante todo o experimento,

pela técnica automática de determinação da área. Porém, pela técnica manual, o grupo do PRP autólogo apresentou úlceras com área numericamente maiores nos dias 7 e 8 do experimento (Tab. 19).

Tabela 19: Área pelas técnicas automática (área) e manual (XY) da úlcera de córnea, em equinos tratados com Plasma Rico em Plaquetas (PRP), de acordo com o dia

Dia	Olho direito		
	Controle	PRP homólogo	PRP heterólogo
Área			
Dia 1	1,52 ± 0,33 ^A	1,31 ± 0,24 ^A	1,03 ± 0,21 ^A
Dia 2	0,91 ± 0,16 ^{AB}	0,79 ± 0,19 ^{AB}	0,66 ± 0,11 ^{AB}
Dia 3	0,46 ± 0,09 ^{BC}	0,40 ± 0,14 ^{BC}	0,39 ± 0,14 ^{BC}
Dia 4	0,30 ± 0,11 ^C	0,22 ± 0,10 ^{CD}	0,23 ± 0,10 ^C
Dia 5	0,08 ± 0,05 ^{CD}	0,12 ± 0,08 ^D	0,07 ± 0,03 ^C
Dia 6	0,05 ± 0,04 ^D	0,08 ± 0,08 ^D	0,05 ± 0,03 ^C
Dia 7	0,05 ± 0,03 ^D	0,11 ± 0,11 ^D	0,01 ± 0,004 ^C
Dia 8	0,02 ± 0,01 ^D	0,11	0,00
Distância XY			
Dia 1	2,05 ± 0,42 ^A	1,80 ± 0,34 ^A	1,42 ± 0,28 ^A
Dia 2	1,32 ± 0,21 ^A	0,92 ± 0,17 ^{AB}	0,93 ± 0,13 ^{AB}
Dia 3	0,68 ± 0,15 ^B	0,69 ± 0,24 ^B	0,58 ± 0,21 ^B
Dia 4	0,55 ± 0,19 ^{BC}	0,42 ± 0,19 ^B	0,37 ± 0,14 ^B
Dia 5	0,13 ± 0,07 ^C	0,21 ± 0,14 ^B	0,12 ± 0,06 ^{BC}
Dia 6	0,08 ± 0,05 ^C	0,15 ± 0,14 ^B	0,09 ± 0,06 ^C
Dia 7	0,09 ± 0,04 ^C	0,19 ± 0,19 ^B	0,03 ± 0,01 ^C
Dia 8	0,07 ± 0,05 ^C	0,33	-

Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem ($P<0,05$)

Grupo controle: soro fisiológico. Dia 1: 12 horas após a indução e antes do início do tratamento; Dia2: 24 horas após o início do tratamento, Dia 3: 48 horas após início do tratamento; Dia 4: 72 horas após início do tratamento; Dia 5: 96 horas após início do tratamento; Dia 6: 120 horas após início do tratamento; Dia 7: 144 horas após início do tratamento; Dia 8: 168 horas após início do tratamento.

Ressalta-se que apenas um animal tratado com PRP autólogo e dois animais tratados com soro fisiológico deixaram o experimento sem reparação da úlcera corneana, enquanto todos os animais tratado com PRP heterólogo apresentaram reparação total da lesão até o 8º dia.

Como observado por Dayhaw-Barker (1995), a reparação da lesão encontrada no presente trabalho também foi mais rápida nos dias iniciais, levando à maior redução da úlcera nos primeiros dois a três dias, seguido por reparação mais lenta da lesão. Avaliando o percentual de redução em relação ao dia 1, observa-se que até o dia 4 houve redução de aproximadamente 80% da lesão em todos os grupos de tratamento (Tab. 20).

Dayhaw-Barker (1995) atribui esse padrão

de fechamento ao tipo de lesão por abrasão, produzindo uma úlcera superficial simples, cuja repopulação por migração de células epiteliais é mais rápida, sendo seguida por reparação por mitose mais lenta nos dias seguintes e recobrando a lesão após 72 a 96 horas. Contudo, como a adesão do novo epitélio à MB pode levar de dias até meses, o epitélio neoformado é frágil e suscetível a novas erosões. A ocorrência de novas erosões nesse novo epitélio atrasa o processo de reparação e pode iniciar o processo de indolência. (Dayhaw-Barker, 1995; Brooks, 1999). Essa hipótese é confirmada no presente trabalho, quando animais do grupo controle apresentaram aumento da úlcera (percentual de redução negativo em relação ao dia anterior) (Tab. 17).

Outro fato que afeta a reparação corneana é

o tamanho da lesão. Acredita-se que úlceras pequenas tenham reparação mais lenta comparadas a úlceras maiores, quando o processo de reparação é acelerado devido à maior área denudada (Dayhaw-Barker, 1995). Essa observação não foi confirmada pelos resultados aqui encontrados, pois não houve diferença ($P>0,05$) entre os grupos para o percentual de redução das lesões. Entretanto não houve diferença ($P>0,05$) para o tamanho médio da lesão no dia 0 entre os grupos de tratamento, sendo pouco provável uma interferência individual do tamanho inicial da lesão no tempo médio de reparação dos grupos (Tab. 20 e 21).

As úlceras tratadas com PRP autólogo, entretanto, apresentaram cicatrização mais rápida, inicialmente, como observado na Fig. 16, ainda que não tenha sido encontrada diferença no tamanho final da lesão (Fig. 17), esse achado deve ser considerado na definição do protocolo de tratamento, pois quanto mais rápido ocorrer o fechamento da úlcera, menor a chance dela se tornar infectada (Brooks, 1999; Andrew e Willis, 2005).

O tempo médio de reparação das úlceras foi demonstrado através da estatística descritiva. Quando avaliados os tempos de

cicatrização, em média os cavalos dos grupos tratados com PRP apresentaram fechamento total da lesão antes dos cavalos do grupo controle. E os animais do grupo tratado com PRP autólogo apresentaram em média tempo menor de reparação comparados ao grupo heterólogo (Tab. 21). No grupo controle houve também, maior número de animais que saíram do experimento sem a resolução completa da lesão (Tab. 22). Apenas um animal do grupo tratado com PRP autólogo não apresentou resolução completa da lesão ao final do experimento (Fig. 18). O animal do grupo tratado com PRP autólogo apresentou prurido nos três últimos dias do experimento, o que levou a aumento na área lesionada. Não foi possível determinar se infecções secundárias tiveram efeito aditivo ao prurido, atrasando o processo de reparação pois não foram realizados exames citológicos e culturas microbianas no decorrer do experimento. Entretanto a intensificação dos sinais clínicos oculares e o aumento na área lesionada que ocorreram em algum momento do experimento nos três animais que não apresentaram resolução da úlcera, sugerem a ocorrência de complicações como a infecção da córnea lesionada.

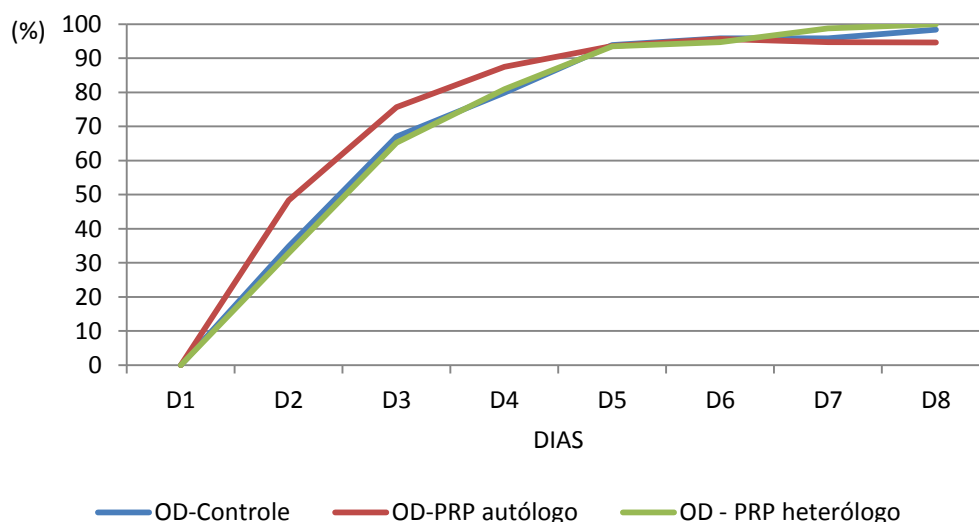


Figura 16: Percentual de reparação da úlcera de córnea induzida, de acordo com o dia e o grupo, em equinos tratados com Plasma Rico em Plaquetas (PRP). Dia 0: antes do início da indução da úlcera; Dia 1: 12 horas após a indução e antes do início do tratamento; Dia 2: 24 horas após o início do tratamento, Dia 3: 48 horas após início do tratamento; Dia 4: 72 horas após início do tratamento; Dia 5: 96 horas após início do tratamento; Dia 6: 120 horas após início do tratamento; Dia 7: 144 horas após início do tratamento; Dia 8: 168 horas após início do tratamento. Grupo controle: soro fisiológico; OD: olho direito - úlcera de córnea induzida.

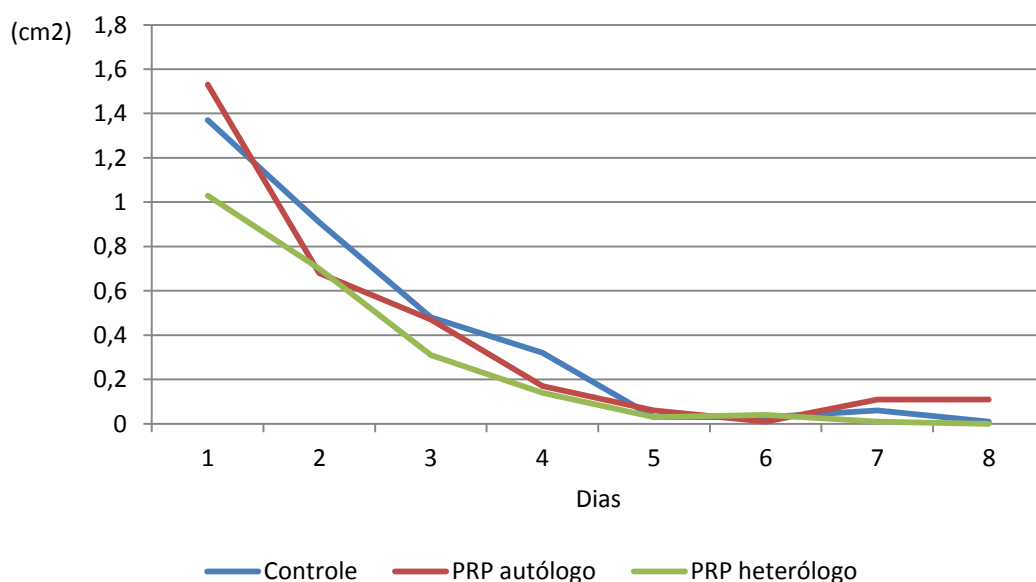


Figura 17: Área (cm²) da úlcera de córnea induzida, de acordo com o dia e o grupo, em equinos tratados com Plasma Rico em Plaquetas (PRP). Dia 0: antes do início da indução da úlcera; Dia 1: 12 horas após a indução e antes do início do tratamento; Dia 2: 24 horas após o início do tratamento, Dia 3: 48 horas após início do tratamento; Dia 4: 72 horas após início do tratamento; Dia 5: 96 horas após início do tratamento; Dia 6: 120 horas após início do tratamento; Dia 7: 144 horas após início do tratamento; Dia 8: 168 horas após início do tratamento. Grupo controle: soro fisiológico; OD: olho direito - úlcera de córnea induzida.

Tabela 20: Percentual de redução pela mensuração automática (cm²) e manual (cm²) da ulcera, em relação ao dia anterior e em relação ao Dia 1, de acordo com o grupo, em equinos com úlcera de córnea

Dia	Olho direito		
	Controle	PRP autólogo	PRP heterólogo
Percentual da área (%) da úlcera em relação ao dia anterior (automática)			
Dia 2	34,84 ± 9,78 ^B	48,32 ± 8,63	32,78 ± 5,81 ^B
Dia 3	48,94 ± 4,89 ^B	44,31 ± 16,97	50,33 ± 15,13 ^{AB}
Dia 4	47,20 ± 16,07 ^B	65,72 ± 11,34	52,83 ± 7,48 ^{AB}
Dia 5	81,95 ± 9,30 ^A	70,57 ± 12,57	73,58 ± 14,81 ^A
Dia 6	58,43 ± 19,24 ^B	72,24 ± 21,94	64,81 ± 20,36 ^A
Dia 7	-21,28 ± 77,70 ^B	57,26 ± 42,74	87,38 ± 2,16 ^A
Dia 8	74,56 ± 19,08 ^B	49,06	100,00
Percentual da área (%) da úlcera em relação ao Dia 1 (automática)			
Dia 2	34,84 ± 9,78 ^C	48,32 ± 8,6 ^B	32,78 ± 5,8 ^B

Dia 3	66,98 ± 5,57 ^B	75,62 ± 6,9 ^A	65,24 ± 11,3 ^B
Dia 4	79,88 ± 6,61 ^{AB}	87,49 ± 5,0 ^A	80,88 ± 6,6 ^A
Dia 5	93,87 ± 3,56 ^A	93,54 ± 3,8 ^A	93,48 ± 3,6 ^A
Dia 6	95,81 ± 2,24 ^A	95,61 ± 4,0 ^A	94,66 ± 3,2 ^A
Dia 7	95,79 ± 1,58 ^A	94,68 ± 5,3 ^A	98,71 ± 0,0 ^A
Dia 8	98,36 ± 1,37 ^A	94,58	100,00
Percentual da área (%) da úlcera em relação ao dia anterior (manual)			
Dia 2	29,53 ± 11,35 ^{Bb}	55,11 ± 2,25 ^a	30,14 ± 5,98 ^{Bb}
Dia 3	49,30 ± 7,37 ^B	24,81 ± 19,96	45,40 ± 17,71 ^{AB}
Dia 4	23,10 ± 15,09 ^B	62,85 ± 11,89	48,17 ± 6,36 ^B
Dia 5	80,08 ± 10,01 ^A	73,22 ± 11,41	70,74 ± 16,39 ^A
Dia 6	63,82 ± 15,02 ^B	71,90 ± 23,01	91,29 ± 4,82 ^A
Dia 7	-32,55 ± 64,66 ^B	57,50 ± 42,50	82,56 ± 1,86 ^A
Dia 8	53,25 ± 32,70 ^B	13,10	100,00
Percentual da área (%) da úlcera em relação ao dia 1 (manual)			
Dia 2	29,53 ± 11,35 ^{Cb}	55,11 ± 2,25 ^{Ba}	30,14 ± 5,98 ^{Ba}
Dia 3	65,63 ± 5,63 ^B	69,79 ± 9,00 ^{AB}	61,42 ± 12,98 ^{AB}
Dia 4	72,03 ± 6,97 ^B	82,90 ± 7,15 ^A	78,26 ± 2,96 ^A
Dia 5	93,15 ± 3,41 ^A	91,88 ± 5,12 ^A	91,29 ± 34,82 ^A
Dia 6	95,64 ± 2,24 ^A	94,14 ± 5,49 ^A	93,89 ± 3,53 ^A
Dia 7	94,21 ± 1,67 ^A	92,85 ± 7,15 ^A	97,87 ± 0,25 ^A
Dia 8	96,25 ± 2,90 ^A	87,57	100,00

Médias seguidas por letras diferentes, maiúscula na coluna e minúscula na linha, diferem (P<0,05)

Grupo controle: soro fisiológico. Dia 1: 12 horas após a indução e antes do início do tratamento; Dia2: 24 horas após o início do tratamento, Dia 3: 48 horas após início do tratamento; Dia 4: 72 horas após início do tratamento; Dia 5: 96 horas após início do tratamento; Dia 6: 120 horas após início do tratamento; Dia 7: 144 horas após início do tratamento; Dia 8: 168 horas após início do tratamento.

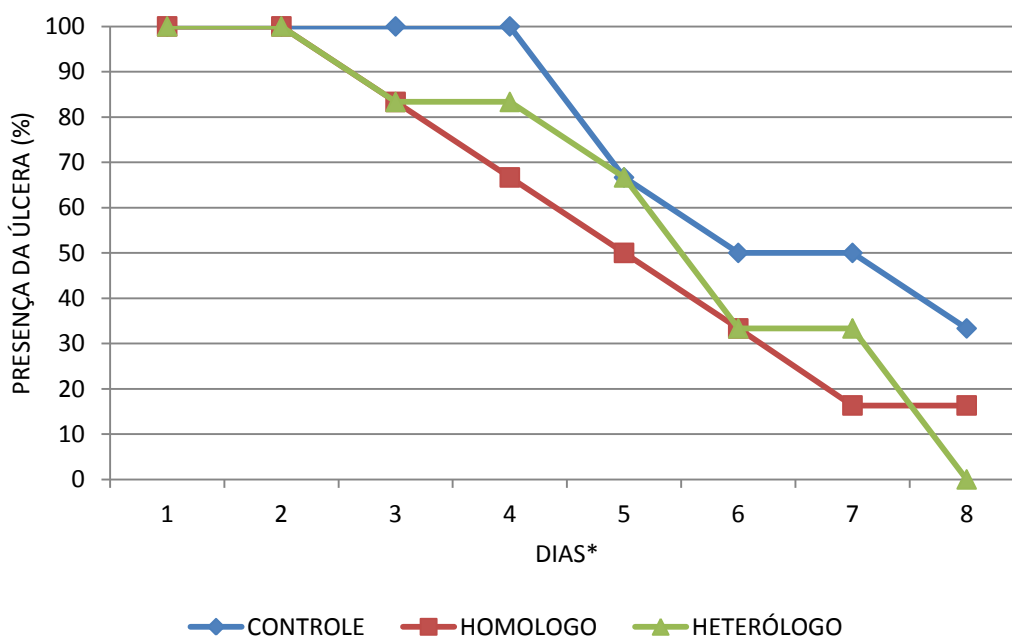


Figura 18: Percentual de equinos apresentando úlcera de córnea, de acordo com o grupo e os dias de tratamento. Dia 1: 12 horas após a indução e antes do início do tratamento; D2: 24 horas após o início do tratamento, D3: 48 horas após início do tratamento; D4: 72 horas após início do tratamento; D5: 96 horas após início do tratamento; D6: 120 horas após início do tratamento; D7: 144 horas após início do tratamento; D8: 168 horas após início do tratamento.

O tempo médio de reparação das úlceras foi demonstrado através da estatística descritiva. Quando avaliados os tempos de cicatrização, em média os cavalos dos grupos tratados com PRP apresentaram fechamento total da lesão antes dos cavalos do grupo controle. E os animais do grupo tratado com PRP autólogo apresentaram em média tempo menor de reparação comparados ao grupo heterólogo (Tab. 21). No grupo controle houve também, maior número de animais que saíram do experimento sem a resolução completa da lesão (Tab. 22). Apenas um animal do grupo tratado com PRP autólogo não apresentou resolução completa da lesão ao final do experimento (Fig. 18). O animal do grupo tratado com PRP autólogo apresentou prurido nos três últimos dias do experimento, o que levou a aumento na área lesionada. Não foi possível determinar se infecções secundárias tiveram efeito aditivo

ao prurido, atrasando o processo de reparação pois não foram realizados exames citológicos e culturas microbianas no decorrer do experimento. Entretanto a intensificação dos sinais clínicos oculares e o aumento na área lesionada que ocorreram em algum momento do experimento nos três animais que não apresentaram resolução da úlcera, sugerem a ocorrência de complicações como a infecção da córnea lesionada.

Apesar de não ter sido encontrada diferença ($P > 0,05$) na proporção de reparação e tamanho da final da lesão entre os grupos de tratamento, o uso do PRP reduziu em 1,92 vezes o tempo de reparação ou a probabilidade de reparação, comparados ao protocolo que não o utilizava (Tab. 23 e 24). Por isso, acredita-se que o uso do PRP acelera a recuperação da lesão, independentemente de ser proveniente do animal tratado ou não.

Tabela 21: Estatística descritiva do tempo de cicatrização (dias) da úlcera de córnea, em equinos tratados com Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

Grupo	Média	Erro Padrão	IC - 95% média	Mediana	IC - 95% mediana
Controle positivo*	6,67	0,56	5,567 a 7,776	7,00	5,00 a 8,00
PRP autólogo	5,50	0,70	4,133 a 6,687	5,50	4,00 a 7,00
PRP heterólogo	6,00	0,71	4,614 a 7,386	6,00	5,00 a 8,00
Total	5,83	0,39	5,070 a 6,597	6,00	5,00 a 8,00

*Soro fisiológico 0,9%.

Tabela 22: Percentual de equinos com úlcera de córnea ao final dos sete dias de tratamento.

Grupo	Com cicatrização da úlcera de córnea		Sem cicatrização da úlcera de córnea		Total
	n	%	n	%	
Controle*	4	66,67	2	33,33	6
PRP autólogo	5	83,33	1	16,67	6
PRP heterólogo	6	100,00	0	0,00	6
Total	15	83,33	3	16,67	18

*Soro fisiológico 0,9%.

Tabela 23: Proporção de cicatrização (PC) da úlcera de córnea, em equinos tratados com Plasma Rico em Plaquetas (PRP), de acordo com o dia de cicatrização

Cicatrização (dias)	Controle		PRP autólogo		PRP heterólogo		Total	
	PC	EP	PC	EP	PC	EP	PC	EP
3	-	-	0,833	0,152	0,833	0,152	0,889	0,074
4	-	-	0,667	0,192	-	-	0,833	0,088
5	0,667	0,192	0,500	0,204	0,667	0,192	0,611	0,115
6	0,500	0,204	0,333	0,192	0,333	0,192	0,389	0,115
7	-	-	0,167	0,152	-	-	0,333	0,111
8	0,333	0,192	-	-	0,000	0,000	0,167	0,088
Cicatrização								
Observada	4,0		5,0		6,0			
Expectativa	6,0		3,9		5,1			
Observada/expectativa	0,6639		1,2747		1,875			

Comparação das curvas de cicatrização (Teste *LogRank* - $p = 0,4698$)

PC = proporção de cicatrização; EP = erro padrão. Dia 3: 48 horas após início do tratamento; Dia 4: 72 horas após início do tratamento; Dia 5: 96 horas após início do tratamento; Dia 6: 120 horas após início do tratamento; Dia 7: 144 horas após início do tratamento; Dia 8: 168 horas após início do tratamento.

Tabela 24: Taxa de risco^a e Intervalo de Confiança (IC) - 95%, para a cicatrização da úlcera de córnea em equinos sob diferentes tratamentos

Grupo	Controle	PRP autólogo	PRP heterólogo
Controle	-	1,9200	1,7886
IC		0,53839 a 6,8478	0,5483 a 5,8343
PRP autólogo	0,5208	-	0,9316
IC	0,146 a 1,8577		0,2491 a 3,4836
PRP heterólogo	0,55191	1,0735	-
IC	0,1714 a 1,838	0,2871 a 4,0143	

^aColuna/linha

Esses resultados corroboram os achados de Alio et al. (2007c) que encontraram melhora dos sinais oculares relacionados à inflamação nos olhos de seres humanos tratados com PRP autólogo. Na aplicação do PRP como terapia auxiliar para úlcera refratária aos tratamentos anteriores em seres humanos, Alio et al. (2007a) obtiveram redução significativa das lesões corneanas, considerando excelente a redução para 0,5mm ou menos em 15 dias de tratamento. Ambos os estudos acima citados foram experimentos clínicos, não apresentando grupo controle, sendo assim, não foi possível comparar os resultados aos do grupo controle no presente trabalho.

Semelhantemente, Ilhan et al. (2012), desenvolveu experimento clínico no qual aplicou o PRP autólogo associado à terapia padrão, após o debridamento de úlceras resistentes ao tratamento, relatando tempo médio de recuperação da lesão de 4,3 + 2,3

semanas. Seus resultados os permitiram concluir que o PRP autólogo foi uma eficiente terapia auxiliar.

Panda et al. (2012), considerando a terapia medicamentosa padrão para o tratamento de queimaduras químicas como “controle”, pôde destacar os efeitos benéficos do PRP autólogo como terapia auxiliar. Nesse trabalho foi obtida resolução completa em todos os olhos, dos grupos controle e PRP, mas a resolução foi mais precoce (aproximadamente 5 dias mais cedo) nos indivíduos tratados com PRP. Mesmo resultado foi encontrado no presente trabalho, o que nos permite corroborar a conclusão de Panda et al. (2012) que o tratamento com PRP é seguro e eficaz, promovendo rápida epitelização da superfície ocular.

Buscando explicar os benefícios na reparação corneana do PRP, Anitua et al.

(2011) avaliaram seus efeitos *in vitro* em culturas de queratócitos e fibroblastos conjuntivais. Seus resultados demonstraram que o PRP é capaz de aumentar significativamente a proliferação e migração dos queratócitos e fibroblastos conjuntivais. Adicionalmente, ele inibiu a diferenciação, induzida por TGF- β 1, dos fibroblastos em miofibroblastos. Dessa forma, esses autores concluíram que o PRP pode reduzir a formação de cicatrizes corneanas, ao passo que estimula a reparação da superfície ocular. Achado semelhante aos resultados de Gimeno et al. (2010), que relataram redução no número de miofibroblastos estromais nos indivíduos tratados com PRP. O presente trabalho corrobora essa hipótese, pois 90 dias após o fim do experimento nenhum animal

apresentou leucoma, ou seja, cicatrizes corneanas. Foi possível observar a ocorrência de opacidades discretas tais como opacidades pontuais denominadas nébulas, observadas com maior frequência em animais do grupo que recebeu PRP heterólogo, opacidades maiores e muitas vezes difusas, denominadas máculas, foram observadas com maior frequência em animais do grupo controle positivo (soro fisiológico) (Fig. 19). Um animal do grupo que recebeu PRP autólogo apresentou mácula, mas este também deixou o experimento sem a resolução completa da lesão, tendo provavelmente ocorrido complicações secundárias à úlcera superficial. Os demais animais do grupo PRP autólogo apresentaram manutenção da transparência normal da córnea (Tab. 25).

Tabela 25. Frequência de opacidades corneanas 90 dias após a resolução da úlcera superficial em animais tratados com PRP autólogo, heterólogo e soro fisiológico.

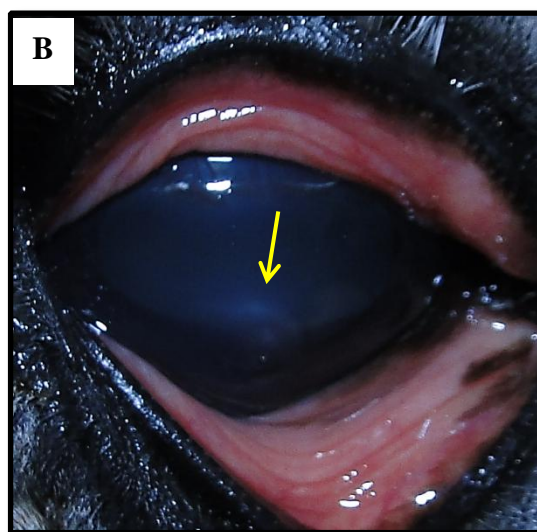
Grupo	Animais avaliados	Ausência de opacidades*	%	Nébola**	%	Mácula****	%
Autólogo	5	4	80	0	0	1	20
Heterólogo	6	1	16,67	5	83,33	0	0
Controle Positivo	6	2	33,33	1	16,67	3	50

*Número de animais que não apresentaram opacidades. ** Número de animais que apresentaram nébola.

*** Número de animais que apresentaram mácula.

Foi determinado um escore para a opacidade corneana observada 90 dias após a reparação da lesão conforme a gravidade dessa sequela. Assim, foi determinado como 0 para a ausência de opacidades, 1

para a apresentação de nébola e 2 para a apresentação de máculas. O escore total e médio por grupo de tratamento foi apresentado na Tab.26.



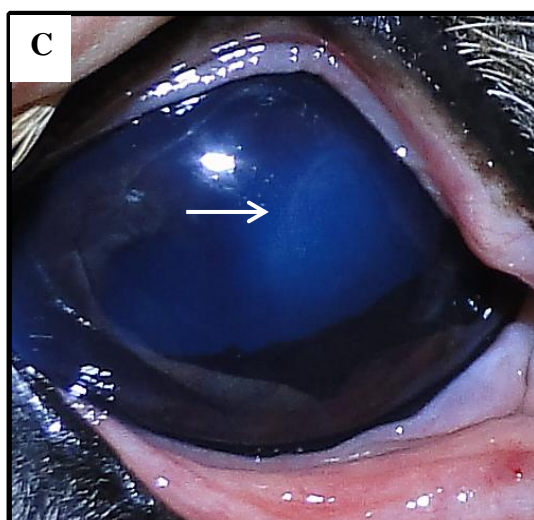


Figura 19. Avaliação da transparência corneana 90 dias após a resolução das úlceras de córnea. A: manutenção da transparência normal. B: nébula. Observar opacidade discreta e focal (seta amarela). C: mácula. Observar opacidade discreta ocupando ampla área da córnea (seta branca).

Tabela 26. Escore* para opacidade corneana observada 90 dias após a reparação da úlcera de córnea superficial em animais tratados com PRP autólogo, heterólogo e soro fisiológico (Controle positivo).

Grupo	Número de animais	Escore total	Média**
Autólogo	5	2	0,4
Heterólogo	6	7	1,166667
Controle Positivo	6	8	1,333333

*Escore 0 para ausência de opacidade, 1 para nébula e 2 para mácula. **Escore total/número de animais.

Apesar de não haver diferença no tamanho das lesões de acordo com o dia de tratamento entre os grupos controle, autólogo e heterólogo, um maior número de animais dos grupos tratados com PRP apresentaram resolução da lesão mais precoce (a partir do dia 3). A ausência de diferença pode ser explicada pelo desenvolvimento de complicações em indivíduos dos grupos de PRP, que atrasaram ou impediram a resolução das lesões, o que tornou a média de redução nas lesões menor nesses grupos.

4.3. Experimento 3: Avaliação termográfica no diagnóstico da úlcera de córnea equina.

À temperatura de corte (*cut off*) de 34,8°C a área sob a curva ROC foi de 0,969, com erro padrão de 0,00903, intervalo de

confiança de 0,943 a 0,985 e $p < 0,001$. Isso significa que animais com temperatura superior à de corte apresentam 96,9% de chance de apresentarem úlcera de córnea ao teste da fluoresceína.

Muitos exames têm valores medidos numa escala numérica e, assim, a sensibilidade e a especificidade dependem de onde se coloca o ponto de corte (*cut off*) entre os resultados positivos e negativos. Uma forma mais eficiente de demonstrar a relação normalmente antagônica entre a sensibilidade e a especificidade dos exames que apresentam resultados contínuos são as Curvas de Características de Operação do Receptor (Curvas ROC- Receiver Operating Characteristic). A Curva ROC é um gráfico de sensibilidade (ou taxa de verdadeiros positivos) versus taxa de falsos positivos (Margotto, 2014) (Fig. 20).

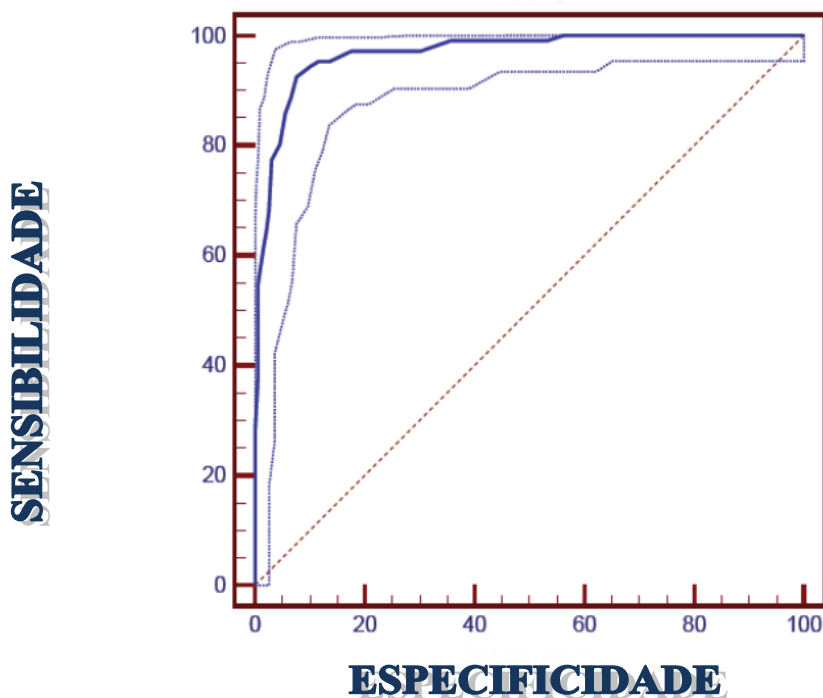


Figura 20: Sensibilidade e especificidade da temperatura ocular mensurada por termografia infravermelha, no diagnóstico da úlcera de córnea em equinos: à temperatura de corte 34°C, 96,9% dos animais com temperatura ocular superior apresentarão teste de fluoresceína positivo.

Aplicando o teste estatístico à termografia, a área sob a curva Roc representaria a probabilidade do resultado da termografia de um animal com úlcera de córnea, escolhido aleatoriamente, em exceder a temperatura ocular de um animal negativo, escolhido aleatoriamente. Esse teste mostrou que a termografia é uma exame eficiente para triagem de lesões corneanas. A termografia é também mais adequada para avaliar grandes populações de animais, como em exposições e eventos esportivos ou ao se avaliar animais indóceis ou pouco cooperativos, quando o uso do teste de impregnação pela fluoresceína não apresenta praticidade deixando de ser executado, apesar de sua fácil aplicação, baixo custo e especificidade.

Utilizando temperaturas de corte mais baixas a sensibilidade do teste seria maior (todos os animais positivos seriam detectados), em contrapartida, a especificidade se tornaria mais baixa, ou seja, vários negativos seriam dados como positivos. Por exemplo, se a temperatura de corte fosse 33,1°C, 10 entre 10 animais positivos apresentariam temperatura ocular

igual ou superior à de corte, entretanto, entre os que tivessem temperatura superior ou igual à de corte haveria quase 7 animais que não apresentariam úlcera.

O LR incorpora a sensibilidade e especificidade do teste e fornece uma estimativa direta do quanto o resultado do teste vai alterar as probabilidades de se encontrar úlcera de córnea. LR negativo indica o quanto diminuem as probabilidades da doença quando o resultado do exame está abaixo da temperatura de corte.

O valor preditivo positivo (VPP) determina a proporção de equinos com úlcera de córnea entre os equinos positivos no exame termográfico. O VPP para a temperatura de corte de 34,8° C é de 86,7, ou seja, entre 10 animais com temperatura igual à de corte, 8,7 teriam úlcera de córnea. O valor preditivo negativo (VPN) representa quantos animais sadios existiram entre os negativos no exame termográfico, que para essa temperatura de corte seria de 95,8, ou seja, entre 10 animais com temperatura inferior à de corte, 9,6 realmente não apresentariam úlcera de córnea (Tab. 27).

Tabela 27: Sensitividade, especificidade, taxa de verossimilhança (LR), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN), de acordo com a temperatura ocular obtida por termografia infravermelha, em equinos, no diagnóstico da úlcera de córnea

°C	Sensitividade (IC)	Especificidade (IC)	LR positivo	LR negativo	VPP	VPN
> 33,1	100,00 (96,6-100)	32,16 (25,7-39,1)	1,47 (1,3 - 1,6)	0,00 -	44,0 (37,6-50,5)	100 (94,4-100)
> 33,6	99,06 (94,9-100)	46,73 (39,6-53,9)	1,86 (1,6 - 2,1)	0,02 (0,003-0,1)	49,8 (42,8-56,7)	98,9 (94,2-100)
> 34,0	99,06 (94,9-100)	64,32 (57,2-71,0)	2,78 (2,2 - 3,3)	0,0015 (0,002-0,1)	59,7 (52,0-67,0)	99,2 (95,7-100)
> 34,5	95,28 (89,3-98,5)	86,43 (80,9-90,9)	7,02 (4,9 - 10,0)	0,055 (0,02-0,1)	78,9 (70,8-85,6)	97,2 (93,5-99,1)
> 34,8	92,45 (85,7-96,7)	92,46 (87,9-95,7)	12,27 (7,5 - 20,0)	0,082 (0,04-0,2)	86,7 (79,0-92,4)	95,8 (92,0-98,2)
> 35,2	85,85 (77,9-91,9)	94,47 (90,3-97,2)	15,53 (8,7 - 27,7)	0,15 (0,09-0,2)	89,2 (81,5-94,5)	92,6 (88,1-95,8)
> 35,5	67,92 (58,2-76,7)	97,49 (94,2-99,2)	27,03 (11,3 -64,9)	0,33 (0,2-0,4)	93,5 (85,4-97,9)	85,1 (79,8-89,4)

IC: intervalo de confiança

A maioria dos pesquisadores determina a temperatura média com a medida de uma ou mais regiões da superfície ocular. Tan et al. (2009 e 2010) acreditam que mais estudos sejam necessários para demonstrar a técnica mais fidedigna de mensuração da temperatura pela termografia da superfície corneana de olhos lesionados. Contudo no presente trabalho, conseguiu-se demonstrar o valor da termografia ocular na predição de lesões oculares com apenas uma imagem com foco no ponto central da córnea.

No campo médico, a termografia já vinha auxiliando a tomada de decisão em cirurgias cardíacas devido ao seu valor preditivo (Ring, 1998; Tan et al., 2009). Também fora utilizada no controle da dor neuropática (Hooshmand et al., 2001) e no diagnóstico de câncer de mama (Ng e Chen, 2006; Ng, 2009), doenças reumáticas (Kalili e Gratt, 1996) e doenças da glândula tireóide (Helmy et al., 2008).

Um estudo preliminar relacionou a diferença entre medidas tomadas no centro de córneas humanas e a média de duas medidas tomadas na região limbal, denominada diferença de temperatura radial (RTD) à ocorrência de ceratoconjuntivite seca, demonstrando valores maiores de RTD para portadores da doença em comparação a valores obtidos de pessoas

normais. Seus autores consideraram a termografia um exame apropriado para o diagnóstico da ceratoconjuntivite seca e para a avaliação das modalidades de tratamento (Morgan et al., 1995). Diferentemente de Morgan et al (1995), os valores obtidos no presente trabalho contaram com uma única medida realizada no ápex corneano e predizeram fidedignamente os achados no teste da fluoresceína.

Em equinos a aplicação da termografia ocular infravermelha estava limitada como índice da temperatura corporal (Johnson et al., 2011), na determinação do estresse a que cavalos eram submetidos durante treinamento e competições (McGreevy et al., 2012; Valera et al, 2012). Os resultados do presente estudo permitiu relacionar, pioneiramente, a temperatura ocular na termografia infravermelha à presença de ceratite ulcerativa em equinos.

5. CONCLUSÕES

Nas condições deste experimento pode-se concluir que o debridamento por *Diamond Burr* é uma técnica válida, segura e eficaz na indução de lesões corneanas exclusivamente epiteliais.

Os sinais como fotofobia, blefaroespasm,

quemose e edema de córnea são fortes indicativos de lesões oculares e dor ocular e não apresentam elevado nível de dificuldade na sua identificação. Esses sinais são relevantes enquanto outros como alopecia e hiperemia apresentaram elevado nível de dificuldade na identificação e não foram bons indicadores de problemas oculares para o clínico sem grande experiência na oftalmologia. O teste de fluoresceína apresentou uma concordância quase perfeita entre os examinadores, demonstrando ser de extrema importância no diagnóstico de úlcera de córnea. A Termografia infravermelha ocular é eficaz na triagem de lesões oculares superficiais em equinos.

O PRP reduziu o tamanho de úlceras de córnea induzidas em equinos, acelerando a resolução da úlcera experimental. A aceleração na resolução das lesões corneanas é clinicamente suficiente para recomendar a terapia com PRP.

O PRP autólogo ou heterólogo resultou na aceleração da reparação corneana de forma similar. Entretanto, considerando-se a manutenção da transparência corneana após 90 dias da resolução clínica o PRP autólogo mostrou-se melhor, evitando o desenvolvimento de opacidades.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi demonstrado por meio do teste de concordância os sinais clínicos oculares de fácil e difícil identificação por clínicos gerais, não especializados em oftalmologia, apontando para os sinais de maior importância na avaliação de equinos com lesões corneanas.

Apesar de ser considerado padrão ouro e ser essencial na avaliação oftalmológica, o teste de fluoresceína pode ser pouco prático para triagem de lesões oculares em competições e exposições envolvendo grande número de animais. Assim, a termografia infravermelha é uma forma de amplificar o diagnóstico dessas lesões ao se avaliar grandes populações. Como é também uma forma de exame remoto, ou seja, que não necessita o contato com o paciente, ela permite a avaliação de animais indóceis ou pouco cooperativos, evitando o risco de

acidentes no decorrer do exame. A termografia ocular é uma prática ainda subutilizada na medicina equina, mas sua confirmada confiabilidade no diagnóstico de problemas oculares deve servir de estímulo para o seu maior aproveitamento.

O presente trabalho foi o primeiro a avaliar o uso do PRP heterólogo no tratamento de úlcera de córnea, em equinos. Apesar da melhor preservação da arquitetura corneana observada no tratamento com PRP autólogo, os resultados demonstraram que o PRP heterólogo também é uma excelente opção de tratamento pois tem o potencial de evitar complicações relacionadas ao atraso na reparação das lesões corneanas e adicionalmente confere praticidade à terapia com PRP, permitindo que outro equino seja fonte desse importante material biológico, evitando os riscos e custos do transporte do animal enfermo à instituições de ensino e pesquisa para a realização do tratamento. Entretanto, mais estudos são necessários, principalmente em outros sistemas, para confirmar a segurança de sua utilização.

Como perspectivas futuras, destaca-se a busca por novas formas de administração do PRP, como formulações em gel, incorporação em outros materiais biológicos sólidos e implantes, que permitam a liberação lenta e gradual dos fatores de crescimento nos tecidos alvo.

Devido à rotina de preparação do PRP, com necessidade de equipamentos especializados, técnicas para a preparação do PRP congelado deveriam ser desenvolvidas, visando um menor deslocamento do animal para centros especializados.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDAVE, A.J.; KAMAL, K.M.; VO, R.C. et al. Epithelial debridement and Bowman's layer polishing for visually significant epithelial irregularity and recurrent corneal erosions. *Cornea*. v. 28, n. 10, p. 1085-1090, 2009.

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

- ALIO, J.L.; COLECHA, J.R.; PASTOR, S. et al. Symptomatic dry eye treatment with autologous platelet-rich plasma. *Ophthalmic Res*, v.39, n.3, p.124-129,2007.b
- ALIO, J.L.; PASTOR, S.; COLECHA, J.R. et al. Treatment of ocular surface syndrome after LASIK surgery with autologous platelet-rich plasma. *J Refract Surg*, v. 23, n. 6, p. 617-619, 2007c.
- ALIO, J.L.; RODRIGUEZ, A.E.; MARTINEZ, L.M. et al. Autologous fibrin membrane combined with solid platelet-rich plasma in the management of perforated corneal ulcers: a pilot study. *JAMA Ophthalmol*, v.31, n.6, p.745-51, 2013.
- ÁLVAREZ, M.E.; LÓPEZA, C.; GIRALDO, C.E. et al. In vitro bactericidal activity of equine platelet concentrates, platelet poor plasma, and plasma against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Arch Med Vet*, v. 43, N. 2, p. 155-161 (2011)
- ANDREW, S.E.; WILLIS, A.M. *Diseases of cornea and sclera: Equine Ophthalmology*. Saint Louis, Ed. Elsevier, p. 157-252, 2005.
- ANITUA, E.; SANCHEZ, M.; MERAYO-LLOVES, J. et al. Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates proliferation and migration of primary keratocytes and conjunctival fibroblasts and inhibits and reverts TGF-beta1-Induced myodifferentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, v.52, n.9, p. 6066-6073,2011.
- BASILE, F.V.A. Correção das retrações palpebrais secundárias à blefaroplastia. *Rev Bras Cir Plast*, v. 26, n. 2, p. 228-242, 2011.
- BOILARD, E.; NIGROVIC, P.A.; LARABEE, K. et al. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science*, v. 327, n. 5965, p. 580-583, 2010.
- BORGES, L.F., SIQUEIRA, L.O. Validação da tecnologia 5 diff do analisador hematológico Symex XS-1000i para laboratório de pequeno/ médio porte. *Rev Bras Hematol Hemoter*, v. 31, n. 4, p. 247-251, 2009.
- BRIGGS, C.; HARRISON, P.; MAC, H. Continuing development with the automated platelet count. *Int J Lab Hem*, v. 29, n. 2, p. 77-91, 2007.
- BROOKS, D.E. *Equine Ophthalmology: Veterinary Ophthalmology*. Baltimore, Ed Lippincott Williams & Wilkins, 3 ed., p. 1053-1116, 1999.
- BROOKS, D. E. Equine eye examination. *The 79th Annual Western Veterinary Conference*, v. 413, 2007.
- BURLING, K., SEGUIN, M.A.; MARSH, P. et al. Effect of topical administration of epidermal growth factor on healing of corneal epithelial defects in horses. *Am J Vet Res*, v. 61, n. 9, p. 1150-1155, 2000.
- BURNS, F.R.; GRAY, R.D. e PATERSON, C.A. Inhibition of alkali-induced corneal ulceration and perforation by a thiol peptide. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, v. 31, n. 1, p. 107-114, 1990.
- BUSSO, V.; HAMILTON, J. et al. Essential role of platelet activation via protease activated receptor in tissue factor-initiated inflammation. *Arthritis Res Ther*, v. 10, n. 2, p.1-8, 2008.
- CARASTRO, S.M. Equine Ocular Anatomy and Ophthalmic Examination. *Vet Clin North Am Equine Pract*, v. 20, n. 2, p. 285- 99, 2004.
- CARLSON, E.C.; SUN, Y.; AULETTAS, J. et al. Regulation of corneal inflammation by neutrophil-dependent clivage of keratin sulfate proteoglycans as a model of the chemokine gradient. *J Leukoc Biol*, v. 88, p. 517-522, 2010.
- CARMONA, J.V.; ARGUELLES, D., CLIMENT, F. Autologous platelet-rich plasma injected intraarticularly diminished synovial effusion and degree of lameness in horses affected with severe joint disease. Anais do 14th Annual Scientific Meeting of the European College of Veterinary Surgeons, 2005.
- CARTER, C.A.; JOLLY, D.G.; WORDEN, C.E. ET AL. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp Mol Pathol*, v. 74, n.3, p. 244-55, 2003.
- CERVELLI, V.; GENTILE, P.; SCIOLI, M.G. et al. Application of platelet-rich

- plasma in plastic surgery: clinical and *in vitro* evaluation. *Tissue Eng Part C Methods*, v. 15, n. 4, p. 625-634, 2009.
- CHUNG, J.H.; KANG, Y.G.; KIM, H.J. et al. Effect of 0,1% dexamethasone on epithelial healing in experimental corneal alkali wounds; morphological changes during the repair process. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* v.7, p. 537-545, 1998.
- CHUNG, J.H.; KIM, H.J.; FAGERHOLMB, P. et al. Effect of topically applied Na-hyaluronan on experimental corneal alkali wound healing. *Korean J Ophthalmol*, v.10, n.2, p. 68-75, 1996.
- COLITZ, C.M.; GILGER, B. C.; DAVIDSON, M. G. Orbital fibroma in a horse. *Vet Ophthalmol*, v. 3, n. 2-3, p.213-16, 2000.
- CONSTABLE, I.J.; OGURI, M.; CHESNEY, C.M. et al. Platelet-induced vitreous membrane formation. *Invest Ophthalmol.*, v. 12, n. 9, p. 681-685, 1973.
- CUTLER, T.J. Corneal Epithelial Disease. *Vet Clin North Am Equine Pract*, v.20, n. 2, p.329-43, 2004.
- DAYHAW-BARKER, P. Corneal wound healing II: the process. *ICLC*, v. 22, n. 5-6, p. 110-116, 1995.
- DEROSSI, R.; COELHO, A.C.A.O.; MELLO, G.S. et al. Efeitos do gel de plasma rico em plaquetas na cicatrização de feridas cirúrgicas na pele de cavalos. *Acta Cir Bras*, v. 24, n. 4, p. 276-281, 2009.
- DORAN, M. *Photophobia: looking for causes and solutions*. Disponível em: <http://www.aao.org/publications/eyenet/200511/neuro-ophthalmology.cfm> Acessado em 01/02/2014.
- DUA, H.S.; LAGNADO, R.; RAJ, D. et al. Alcohol delamination of the corneal epithelium: an alternative in the management of recurrent corneal erosions. *Ophthalmology*, v. 113, n.3, p. 404-411, 2006.
- DWYER, A. E. *Ophthalmology for Equine Road Warriors I*. Disponível em: http://wvc.omnibooksonline.com/data/papers/2005_V458.pdf Acesso em: 24/10/2009.
- Publicado em 2008.
- EL-SHARKAWY, H.; KANTARCI, A.; DEADY, J. et al. Platelet-rich plasma: growth factor and pro- and anti-inflammatory properties. *J Periodontology*, v. 78, n. 4, 2007.
- EREMENKO, A.I. Thermography in the diagnosis of vascular neuritis of the optic nerve. *Oftalmol Zh*, v.4, p.235-239, 1990.
- FADOK, V.A. Overview of the equine pruritus. *Vet Clin Equine*, v. 11, n. 1, p. 1-10, 1995.
- FANTINI, P. Avaliação toracolombar em equídeos de tração: estudo clínico, termográfico e ultrassonográfico. 2010. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2010.
- FARRAG, T.Y.; LEHAR, M.; VERHAEGEN, P. et al. Effect of platelet rich plasma and fibrin sealant on facial nerve regeneration in a rat model. *Laryngoscope*, v. 117, n. 1, p. 157-165, 2007.
- FERRARO, G.L. The equine eye. *The Horse Report*, v. 27, n. 1, p. 2-12, 2009.
- FONTENOT, R.L.; SINK, C.A.; WERE, S.R. et al. Simple tube centrifugation for processing platelet-rich plasma in the horse. *Can Vet J*, v. 53, p. 1266-1272, 2012.
- for breast tumor. *International Journal of Thermal Sciences*, v. 48, p. 849-859, 2008.
- FUFA, D.; SHEALY, B.; JACOBSON, M. et al. Activation of platelet-rich plasma using soluble type I collagen. *J Oral Maxillo Fac Surg*, v. 66, n. 4, p. 684-690, 2008.
- GILGER, B.C. *Equine Ophthalmology: Veterinary Ophthalmology*. Ames, Ed Willey-Blackwell, 5 ed., 2013.
- GIMENO, F.L.; GATTO, S.C.; CROXATTO, J.O. et al. *In vivo* lamellar keratoplasty using platelet-rich plasma as bioadhesive. *Eye*, v. 24, n. 2, p. 368-375, 2010.
- GIMENO, F.L.; GATTOS, S.; FERROJ, J. et al. Preparation of platelet-rich plasma as a tissue adhesive for experimental

- transplantation in rabbits. *Thromb J*, v. 4, n. 18, p. 1-7, 2006.
- GOSLING, A.A.; LABELLE, A.L.; BREAU, C.B. Management of spontaneous chronic corneal epithelial defects (SCCEDs) in dogs with Diamond Burr debridement and placement of a bandage contact lens. *Vet Ophthalmol*, v. 16, n. 2, p. 83-88, 2013.
- GRAZIANI, F.; IVANOVSKI, S.; CEI, S. et al. The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin Oral Implants Res*, v. 17, n.2, p. 212-9, 2006.
- HABER, M., CAO, Z., PANJWANI, N. et al. Effects of growth factors (EGF, PDGF-BB and TGF- β 1) on cultured equine epithelial cells and keratocytes: implications for wound healing. *Vet Ophthalmol*, v.6, n.3, p.211–217, 2003.
- HARMON, K.; HANSON, R.; BOWEN, J. et al. *Guidelines for the use of platelet rich plasma: Presented by The International Cellular Medical Society*. Disponível em: <http://dcareusa.com/UserFiles/228File40774.pdf>. Acessado em 28/01/2014.
- HARRISON, P.; HORTON, A.; GRANT, D. et al. Immunoplatelet counting: a proposed new reference procedure. *Br J Haematol*, v. 108, n. 2, p. 228-235, 2000.
- HARRISON, S.; VAVKEN, P.; JACOBSON, M. et al. Platelet activation by collagen provides sustained release of anabolic cytokines. *Am J Sports Med*, v. 39, n. 4, p. 729-734, 2011.
- HELMY A, HOLDMANN M, RIZKALLA M. Application of thermography for non-invasive diagnosis of thyroid gland disease. *EEE Trans Biomed Eng*, v.55, n. 3, p. 1168-1175, 2008
- HENDRIX, D.V.H. Eye examination techniques in horses. *Clin Tech Equine Pract*, v.4, n. 1, p.2-10, 2005.
- HESS, R.F. e GARNER, L.F. The effect of corneal edema on visual function. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, v. 16, n. 1, p. 5-13, 1977.
- HOOSHMAND, H., HASHMI, M., PHILLIPS, E.M. Infrared Thermal Imaging As A Tool In Pain Management - An 11 Year Study, Part I of II. *Thermology international*, v. 11, p. 119-129, 2001.
- HUANG, A.J.W. e TSENG, S.C. Corneal epithelial wound healing in the absence of limbal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, v. 32, n. 1, p. 96-105, 1991.
- ILHAN, A.; YOLCU, U.; ERDEM, U. *Autologous platelet-rich plasma in resistant corneal ulcers*. Disponível em: <http://www.comtecmed.com/cophy/2012/Uploads/assets/ilhan.pdf> Acessado em: 26/01/2014.
- IRBY, N.L. Neuro-ophthalmology in horses. *Vet Clin Equine*, v. 27, n. 3, p. 455-479, 2011.
- JOHNS, I.C.; BAXTER, K.; BOOLER, H. et al. Conjunctival bacterial and fungal in healthy horses in UK. *Vet Ophthalmol*, v. 14, n. 3, p. 195-199, 2011.
- JOHNSON, S.R.; RAO, S.; HUSSEY, S.B. et al. Thermographic eye temperature as an index to body temperature in ponies. *J Equi Vet Sci*, v. 31, p. 63-66, 2011.
- KALILI TK, GRATT BM. Electronic thermography for the assessment of acute temporomandibular joint pain. *Compend Contin Educ Dent*, v. 17, n. 10, p. 979-183, 1996.
- KELLER, R.L., HENDRIX, D.V.H. Bacterial isolates and antimicrobial susceptibilities in equine bacterial ulcerative keratitis (1993-2004). *Equine Vet J*, v. 37, n. 3, p. 207-2011, 2005.
- KIM, K.M.; SHIN, Y.T. E KIM, H.K. Effect of autologous platelet-rich plasma on persistent corneal epithelial defect after infectious keratitis. *Jpn J Ophthalmol*, v. 6, n. 6, p.544-550,2012.
- KISIDAY, J.D.; MACLLWRAITH, C.W.; RODKEY, W.G. et al. Effects of Platelet-Rich Plasma Composition on Anabolic and Catabolic Activities in Equine Cartilage and Meniscal Explants. *Cartilage*, v. 3, n. 3, p. 245-254, 2012.
- LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, v. 33: 159-174, 1977
- LEAL, B.C.; MEDEIROS, F.A.; MEDEIROS, F.W. et al. Conjunctival

- hyperemia associated with bimatoprost use: a histopathologic study. *Am J Ophthalmol*, v. 138, n. 2, p. 310-313, 2004.
- LEE - *Laboratório de Epidemiologia e Estatística*. Disponível em: <http://www.lee.dante.br/pesquisa/kappa/index.html> Acessado em 01/02/2014.
- LINDEBOOM, R.; DE HAAN, R.; ARAMIDEH, M. et al. The blepharospasm disability scale: na instrument for the assesment of functional health in blepharospasm. *Mov Disord*, v. 10, n. 4, p. 444-449, 1995.
- MAIA, L.; SOUZA, M.V.; ALVES, G.E.S. et al. Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite induzida em eqüinos: avaliação ultra-sonográfica. *Pesq Vet Bras*, v. 29, n. 3, p. 241-245, 2009.
- MAMMOTO, T.; JIANG, A.; JIANG, E. et al. Platelet rich plasma extract promotes angiogenesis through the angiopoietin1-Tie2 pathway. *Microvasc Re*, v. 89, p.15-24,2013.
- MARGOTTO, P.R. *Curva Roc: como fazer e interpretar no SPSS*. Disponível em: http://www.paulomargotto.com.br/documentos/Curva_ROC_SPSS.pdf. Acessado em: 26/01/2014.
- McCORNICK, A.; KARKOS, P.; McCORNICK, M. The sensitivity and specificity of an epiphora score at predicting a blocked sac washout following dacryocystorhinostomy. *Orbit*, v. 25, n. 2, p. 127-128, 2006.
- McGRATH, L.A.; LEE, G.A. Techniques, indications and complications of corneal debridement. *Surv Ophthalmol*, v. 59, n.1, p. 47-63, 2014.
- McGREEVY, P.; WARREN-SMITH, A.; GUISSARD, Y. The effect of double bridles and jaw-clamping crank nosebands on temperature of eyes and facial skin of horses. *J Vet Behavior*, v. 7 p. 142-148, 2012.
- MONTEIRO, S.O.; LEPAGE, O.M.; THEORET, C.L. et al. Effects of platelet-rich plasma on the repair of wounds on distal aspect of the forelimb in horses. *Am J Vet Res*, v. 70, n. 2, p. 277-282, 2009.
- MOORE, C. P.; COLLINS, B. K.; LINTON, L. L. Conjunctival malignant melanoma in a horse. *Vet Ophthalmol*, v. 3, n. 2-3, p. 201-206, 2000.
- MORGAN, P.B.; TULLO, A.B. e EFRON, N. Infrared thermography of the tear film in dry eye. *Eye*, v. 9, pt. 5, p.615-618, 1995.
- NASISSE, M.P. e NELMS, S. Equine ulcerative keratitis. *Vet Clin North Am Equine Pract.*, v. 8, n.3, p.537-55, 1992
- NG, E.Y.K. e CHEN, Y. Segmentation of breast thermogram: improved boundary detection with modified snake algorithm. *Journal of Mechanics in Medicine*, v.6, n.2, p. 123-136, 2006.
- NG., E.Y.K. A review of thermography as promising non-invasive detection modality. *Int J Therm Sci*, v.48, n. 5, p. 849-859, 2009.
- PAES LEME, F.O., WURZINGER, L.J., VASCONCELOS, A.C. et al. Ativação de plaquetas de equinos com laminite induzida e tratados com ketoprofeno, fenilbutazona e flunixin meglumina. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v. 58, n. 2, p. 149-157, 2006.
- PAL-GOSH, S.; PAJOOHESH-GANJI, A.; TADVALKAR, G. et al. Removal of the basement membrane enhances corneal wound healing. *Exp Eye Res*, v. 93, p. 927-936, 2011.
- PANDA , A.; JAIN, M.; VANATHI, M. et al. Topical autologous platelet-rich plasma eyedrops for acute corneal chemical injury. *Cornea*, v. 31, n. 9, p. 989-993, 2012.
- PEIFFER, R.L., WILCOCK, B.P.; DUBIELZIG, R.R. et al. *Fundamentals of veterinary ophthalmic pathology: Veterinary Ophthalmology*. Baltimore, Ed Lippincott Williams & Wilkins, 3 ed. P. 355-426, 1999.
- RING, E.F.J. Progress in the measurement of human body temperature. *IEEE Eng Med Biol*, v. 17, n. 4, p. 19-24, 1998.
- ROBSON, J.M. Experimental corneal ulcer. *Br J Ophthalmol*, v. 28, n.1, p. 148-155, 1944.
- SAIKA, S. TGF beta pathobiology in the eye. *Lab Invest*, v. 86, n.2, p.106-15, 2006.
- SAUER, P. ANDREW, S.E., LASSALINE, M. et al. Changes in antibiotic resistance in

- equine bacterial ulcerative keratitis (1991-2000): 65 horses. *Vet Ophthalmol*, v. 6, n.4, p. 309-313, 2003.
- SCHNABEL, L.V.; MOHAMMED, H.O.; MILLER, B.J. et al. Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res*, v.25, n. 2, p.230-240, 2007.
- SCOTT, D.W. e MILLER, W.H. *Equine dermatology*. Saint Louis, Ed. Elsevier Saunders, 3th ed., 320 p., 2003.
- SILA, G.H.; MORREALE, R.J.; LORIMER, D.W. et al. A retrospective evaluation of the Diamond Burr superficial keratectomy in the treatment of spontaneous chronic corneal epithelial defects in dogs from 2006 to 2008. *Vet Ophthalmol*, v. 12, p. 404, 2009 (Abstract 101).
- SILVA, E.G.; POWELL, C.C.; GIONFRIDDO, J.R. et al. Histologic evaluation of the immediate effect of diamond burr debridement in experimental superficial corneal wounds in dogs. *Vet Ophthalmol*, v. 11, n. 5, p. 285-291, 2011.
- SOONG, H.K.; FARJO, Q.; MEYER, R.F. et al. Diamond burr superficial keratectomy for recurrent corneal lesions. *Br J Ophthalmol*, v. 86, p. 296-298, 2002.
- SRIDHAR, M.S.; RAPUANO, C.J.; COSAR, C.B. et al. Phototherapeutic keratectomy versus diamond burr polishing of Bowman's membrane in the treatment of recurrent corneal erosions associated with anterior basement membrane dystrophy. *Ophthalmology*, v.109, n. 4, p. 674-679, 2002.
- STEELE, C. Corneal wound healing: a review. *Optometry Today*, v. 24, p. 28-32, 1999.
- STEFANIE, P.B. *Thermotopography shows 'enormous promise' for diagnosis and treatment of eye diseases*. In: www.escrs.org/eurotimes/march2003/thermo.asp>2009. Acessado em: 28/01/2014.
- STEWART, W.C.; KOLKER, A.E.; STEWART, J.A. et al. Conjunctival hyperemia in healthy subjects after short-term dosing with latanoprost, bimatoprost e travoprost. *Am J Ophthalmol*, v. 135, n. 3, p. 314-320, 2003.
- STRUBBE, D.T.; BROOKS, D.E.; SCHULTZ, G.S et al. Evaluation of tear film proteinases in horses with ulcerative keratitis. *Vet ophthalmol*, v. 3, n. 2-3, p. 11-119, 2000.
- STUHR, C.M.; ABRAMS, G.; BULLIMORE, M. et al. The normal refractive state of the equine. *Vet Ophthalmol*, v. 2, p. 256, 1999 (Abstract 59).
- TAN, J.H.; NG, E.Y.K.; ACHARYA, et al. Infrared thermography on ocular surface temperature: a review. *Infrared Phys Technol*, v. 52, p.97-108, 2009.
- TAN, J.H.; NG, E.Y.K.; ACHARYA, R. et al. Study of normal ocular thermogram using textural parameters. *Infrared Phys Technol*, v. 53, p.120-126, 2010.
- TAN, J.H.; NG, E.Y.K.; ACHARYA, R. Automated detection of eye and cornea on infrared thermogram using snake and target tracing function coupled with genetic algorithm. *QIRT J*, v. 6, n. 1, p.21-36, 2012.
- TAYLOR, F.G.R., HILLYER, M.H. *Diagnostic Techniques in Equine medicine*. London, Ed. Saunders, 348 p. 1997.
- TEIXEIRA, K. M.; FARINELLI, F.; PALHARES, M. S. Problema ocular: uma emergência inadiável. *TOP 2000 – Pampa – Revista oficial da ABCPPampa*, p. 62-63, 2009.
- TERVO, T.; TERVO K.; VANSETTEN, G.B. et al. Plasminogen activator and inhibitor in the experimental corneal wound. *Exp Eye Res*, v. 48, n. 3, p. 445-449, 1989.
- TEXTOR, J. Autologous biologic treatment for equine musculoskeletal injuries: platelet-rich plasma and IL-1 receptor antagonist protein. *Vet Clin Equine*, v. 27, n. 2, p. 275-298, 2011.
- TOGNOLI, G.K.; OLSSON, D.C.; MARTINS, D.B. Transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea em úlcera de córnea experimental em cães. *Ciência Rural*, v. 39, n. 1, p. 148-155, 2009.
- TORRICELLI, P.; FINI, M.; FILARDO, G. et al. Regenerative medicine for the

treatment of musculoskeletal overuse injuries in competition horses. *Int Orthop*, v. 35, n. 10, p. 1569-1576, 2011.

TUKUOLA, S.; NAKAJIMA, M.; NISHIKAWA, J. et al. Cold response of skin and eye temperature in glaucoma. *Folia Ophthalmologica Japonica.*, v. 41, p. 1159-1165, 1990.

TZELIKIS, P.F.; RAPUANO, C.J.; HAMMERSMITH, K.M. Diamond Burr Treatment of Poor Vision From Anterior Basement Membrane Dystrophy. *Am J Ophthalmol*, v. 140, n. 2, p. 308-310, 2005.

VALERA, M.; BARTOLOMÉ, E.; SANCHEZ, M.J. et al. Changes in the eye temperature and stress assessment in horses during show jumping competitions. *J Equi Vet Sci*, v. 32, p. 827-830, 2012.

VELPANDIAN, T.; GUPTA, S.K.; GUPTA, Y.K. Comparative studies on topical lomefloxacin and ciprofloxacin on ocular kinetic and experimental corneal ulcer. *J Ocul Pharmacol Ther*, v. 15, n. 6, p. 505-511, 1999.

VENDRUSCOLO, C.P.; CARVALHO, A.M.; MORAES, L.F. et al. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do Plasma Rico em Plaquetas para uso em Medicina Equina. *Pes. Ve. Bra.*, v.32, n.2, p. 106-110, 2012.

VIANA, F.A.B. *Fundamentos de Oftalmologia Clínica*. Belo Horizonte, Ed. FEPMVZ, 1 ed, v.1, 132 p., 2002.

WEINFELD, A.B.; BURKE, R.; CODNER, M.A. The comprehensive management of chemosis following cosmetic lower blepharoplasty. *Plast and Reconstr Surg*, v. 122, n. 2, p. 579-586, 2008.

WILLIAMS, L.B. e PINARD, C.L. Corneal ulcers in horses. *Compend: Contin Edu Vet*, v. 35, n.1, p. E1-E8, 2013.

WROBLEWSKI, B.S.; MEJIA, H.A.; WRIGHT, V.J. Application of platelet-rich plasma to enhance tissue repair. *Oper Tech Orthop*, v. 20, p. 98-105, 2010.

YAMADA, A.L.M.; CARVALHO, A.M.; OLIVEIRA, P.G.G. et al. Plasma rico em plaquetas no tratamento de lesões condrais articulares produzidas experimentalmente

em equinos: avaliação clínica, macroscópica, histológica e histoquímica. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v. 64, n. 2, p. 318-322, 2012.

YTTEBORG, J. e DOHLMAN, C.H. Corneal edema and intraocular pressure. *Arch Ophthalmol*, v. 74, n. 4, p. 477-484, 1965.