

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



UTILIZAÇÃO DE PLASMA AUTÓLOGO NO TRATAMENTO DE ÚLCERAS DA CÓRNEA NO  
CÃO: ESTUDO RETROSPECTIVO DE 30 CASOS

LEONOR AMARELO FERREIRA

ORIENTADORA:  
Doutora Esmeralda Sofia Costa Delgado

TUTOR:  
Dr. Luís Miguel Fonte Montenegro

2022

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



UTILIZAÇÃO DE PLASMA AUTÓLOGO NO TRATAMENTO DE ÚLCERAS DA CÓRNEA NO  
CÃO: ESTUDO RETROSPECTIVO DE 30 CASOS

LEONOR AMARELO FERREIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutora Maria Luísa Mendes Jorge

ORIENTADORA:

Doutora Esmeralda Sofia Costa Delgado

VOGAIS:

Doutora Solange Judite Roque Coelho

Alves Gil Neves

Doutora Esmeralda Sofia Costa Delgado

TUTOR:

Dr. Luís Miguel Fonte Montenegro

2022

## DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA TESE OU DISSERTAÇÃO

Nome: Leonor Amarelo Ferreira

Título da Tese ou Dissertação: Utilização de plasma autólogo no tratamento de úlceras da córnea no cão: estudo retrospectivo de 30 casos

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2022

Designação do curso de Mestrado ou de Doutoramento: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- Clínica                       Produção Animal e Segurança Alimentar  
 Morfologia e Função         Sanidade Animal

Declaro sob compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de  6 meses,  12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial\*;

\* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 27 de janeiro de 2022

Assinatura: Leonor Amarelo Ferreira

## **Agradecimentos**

O meu agradecimento vai, primeiramente, para os meus pais, Adriana e José, por me terem dado a oportunidade de seguir os meus sonhos sem nunca deixarem de me apoiar e de acreditar em mim, mesmo quando eu não o fiz. Aproveito para me desculpar por todas as choraminguices pós exames. Afinal vocês tinham razão: correu tudo bem.

À minha maninha, Matilde, um obrigado enorme por aturar as minhas maluquices que se agravaram neste período mais complicado.

Aos meus restantes familiares, avós, tios e primos, que não só nestes últimos anos, mas que ao longo da minha vida sempre me apoiaram incondicionalmente.

À Professora Doutora Esmeralda Delgado, minha orientadora, que despertou em mim o interesse pela área de oftalmologia. Obrigada pela simpatia, disponibilidade constante, toda a ajuda prestada e conhecimento partilhado.

Ao Professor Telmo Nunes pelo apoio na redação da componente estatística deste trabalho.

Ao meu tutor, Dr. Luís Montenegro, não só por me ter dado a oportunidade de realizar o estágio curricular no seu hospital, como também pelo fantástico acompanhamento e transmissão de conhecimentos ao longo destes meses.

À restante equipa do Hospital Referência Veterinária Montenegro, pelo excelente ambiente de trabalho que me proporcionaram, pela passagem constante de conhecimentos e todas as oportunidades de aprendizagem facultadas.

Aos meus colegas estagiários, pela simpatia, carinho e companheirismo. Foi um prazer estagiar com vocês.

A todo o corpo docente da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa e da Universidade dos Açores - Polo de Angra do Heroísmo. Obrigada por todos os ensinamentos ao longo destes anos.

Às minhas amigas de sempre, Carol, Isa, Ju e Leti, que mesmo estando longe, nunca deixaram de me fazer sentir o seu carinho.

Aos grandes amigos que fiz neste curso, André, Cati, Dani, Inês, Lula e Su. Guardarei para sempre os bons (e menos bons) momentos que vivemos juntos. São o melhor que levo da vida académica.

Um agradecimento muito especial à minha Suzy, por ter feito esta caminhada ao meu lado (a maior parte do tempo, literalmente), pelas inúmeras gargalhadas partilhadas e pelo apoio nos momentos de desespero. Obrigada por teres cuidado tão bem de mim ao longo destes 6 anos.

À outra metade da dupla maravilha, Ânís Pimenta, com quem vivi uma das melhores fases da minha vida. Obrigada por teres sido o meu pilar nos tempos de estágio e na elaboração desta tese. Podemos trabalhar para sempre juntas?

Ao meu compincha, André, por toda a paciência e apoio e pelo ombro amigo que teve sempre disponível.

À minha pequena grande amiga de quatro patas, Safi, que tantas vezes foi a minha única companhia.

A todos aqueles que de alguma forma cruzaram o meu caminho nestes últimos anos, um enorme obrigada! Nem sempre foi fácil, mas vocês tornaram tudo melhor.

## Resumo

### Utilização de plasma autólogo no tratamento de úlceras da córnea no cão: estudo retrospectivo de 30 casos

O plasma sanguíneo apresenta características semelhantes às da película lacrimal. Contém componentes que, quando aplicados topicamente, promovem a regeneração do tecido corneal e asseguram a sua integridade e viabilidade. Colírios formulados a partir de sangue do paciente são relativamente fáceis de obter e normalmente bem tolerados, sendo usados no tratamento de diversas doenças oculares. Em úlceras de córnea complicadas, para além de potenciar a cura, diminui ainda a atividade das colagenases envolvidas no processo.

O presente estudo teve como objetivo realizar uma avaliação retrospectiva sobre a utilização de plasma autólogo no tratamento de úlceras da córnea em cães. Para isso, foram avaliados pacientes diagnosticados com úlceras corneais no HRVM num período de seis meses. Foi feita a caracterização da amostra, da doença e do tratamento. Para determinar a eficácia da plasmaterapia, foram comparados os tempos medianos de cicatrização das lesões superficiais tratadas com e sem plasma. Para defeitos graves (indolentes e profundos), estes tempos foram correlacionados de acordo com a frequência da administração. Recorreu-se a uma análise de sobrevivência para tratamento estatístico destes dados.

A amostra incluiu 30 cães de 14 raças distintas, maioritariamente braquicéfalas (70%). A idade média foi de  $6.69 \pm 4.03$  anos (compreendida entre 0.17-14 anos). 43.33% (n=13) das lesões eram estromais e 56.67% (n=17) afetaram apenas o epitélio. Destas, 40% (n=12) responderam ao tratamento e 16.67% (n=5) tiveram um comportamento indolente. A maioria das úlceras superficiais não era extensa (n=6; 50%) e as profundas eram predominantemente vastas e malácicas (n=4; 30.77%). O tratamento variou, tendo sido aplicado plasma autólogo em 5 das 12 lesões superficiais e em todas as graves (n=18). Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os tempos medianos de recuperação das lesões superficiais tratadas com e sem plasma (*Kaplan Meier*,  $p=0.9$ ), nem entre os tempos de cura dos defeitos graves de acordo com a frequência de administração (*Kaplan Meier*,  $p=0.9$ ).

No presente estudo não foram observados efeitos adversos decorrentes da utilização de colírios de plasma autólogo, tendo sido demonstrado ser um produto bem tolerado pelos pacientes. Não foi possível obter resultados estatisticamente significativos que comprovem a sua eficácia, devido à heterogeneidade da amostra, diferenças nos protocolos terapêuticos adotados e ausência de grupos controlo. Estudos adicionais poderão contribuir para evidenciar os seus benefícios terapêuticos.

**Palavras-chave:** Úlcera da córnea; plasma autólogo; cão.

## **Abstract**

### **Use of autologous plasma in the treatment of corneal ulcers in the dog: a retrospective study of 30 cases**

Blood plasma presents characteristics similar to those of the tear film. It contains components that, when applied topically, promote corneal tissue regeneration and ensure its integrity and viability. Eye drops formulated from the patient's blood are relatively easy to obtain and usually well tolerated, and are used in the treatment of various ocular diseases. In complicated corneal ulcers, not only enhances healing but also decreases the activity of the collagenases involved in the process.

The present study aimed to perform a retrospective evaluation on the use of autologous plasma in the treatment of corneal ulcers in dogs. Patients diagnosed with corneal ulcers at the HRVM were evaluated over a six-month period. Characterization of the sample, disease and treatment was performed. To determine the efficacy of plasmatherapy, median healing times of superficial lesions treated with and without autologous plasma were compared. For severe defects (indolent and deep) these times were correlated according to the administration frequency. Survival analysis was used for statistical treatment of these data.

The sample included 30 dogs of 14 different breeds, mostly brachycephalic (70%). The mean age was  $6.69 \pm 4.03$  years (range 0.17-14 years). 43.33% (n=13) of the lesions were stromal and 56.67% (n=17) affected the epithelium only. From these, 40% (n=12) responded to treatment and 16.67% (n=5) had an indolent behavior. The majority of the superficial ulcers were not extense (n=6; 50%) and the deep ones were predominantly wide and melting (n=4; 30.77%). The treatment varied, with plasma being applied to 5 of the 12 superficial lesions and in all (n=18) severe ulcers. Median recovery times for superficial lesions treated with or without plasma were compared (Kaplan Meier; p=0.9) as well as healing times in severe defects according to the frequency of administration (Kaplan Meier; p=0.9). No significant statistical differences were found.

In the present study, no adverse effects from the use of autologous plasma eye drops were observed, having been shown to be a product well tolerated by patients. It was not possible to obtain statistically significant results that prove its efficacy, due to the heterogeneity of the sample, differences in the therapeutic protocols adopted and the absence of control groups. Further studies may contribute to evidence its therapeutic benefits.

**Keywords:** corneal ulcer; autologous plasma; dog.

## Índice geral

Agradecimentos .....	iii
Resumo .....	v
Abstract .....	vi
Índice de figuras .....	xi
Índice de gráficos .....	xii
Índice de tabelas.....	xiv
Lista de abreviaturas, símbolos e siglas .....	xv
Comunicações científicas.....	xvii
Introdução.....	1
CAPÍTULO I – Breve relatório de estágio no Hospital Referência Veterinário Montenegro .....	2
1. Internamento .....	2
2. Consultas .....	3
3. Cirurgia.....	3
4. Imagiologia .....	4
5. Clínica Veterinária Montenegro (CVM) .....	4
CAPÍTULO II – Revisão bibliográfica .....	5
1. Anatomia e fisiologia da córnea canina.....	5
1.1. Posicionamento e anatomia.....	5
1.2. Histologia .....	5
1.2.1. Epitélio e lâmina basal .....	5
1.2.2. Estroma ou substância própria .....	6
1.2.3. Membrana de Descemet.....	7
1.2.4. Endotélio .....	7
1.3. Fisiologia .....	8
1.3.1. Transparência .....	8
1.3.2. Sensibilidade.....	8
1.3.3. Metabolismo.....	8
1.3.4. Farmacologia .....	9
1.3.5. Imunologia .....	10
1.3.6. Cicatrização corneal .....	11
1.3.6.1. Vascularização .....	13
2. Ulceração corneal .....	14
2.1. Classificação .....	14
2.1.1. Classificação das úlceras quanto à profundidade .....	14
2.1.2. Classificação das úlceras quanto à etiologia .....	15

2.1.2.1.	Por traumatismos exógenos .....	15
2.1.2.2.	Por alterações das pálpebras .....	15
2.1.2.3.	Por alterações da película lacrimal .....	15
2.1.2.4.	Infeciosas .....	15
2.1.2.5.	Por défices no ramo oftálmico do nervo trigémeo .....	16
2.1.2.6.	Secundárias a outras doenças .....	16
2.1.3.	Classificação das úlceras quanto à sua duração.....	16
2.1.4.	Defeitos Epiteliais Corneais Crónicos Espontâneos (DECCE).....	16
2.1.5.	Colagenólise ou “Melting cornea” .....	17
2.2.	Sinais clínicos .....	17
2.3.	Diagnóstico .....	18
2.3.1.	Corantes Oftálmicos .....	19
2.3.1.1.	Fluoresceína .....	19
2.3.1.2.	Rosa Bengala .....	20
2.3.2.	Análise laboratorial .....	21
2.4.	Tratamento .....	22
2.4.1.	Opções terapêuticas médicas gerais .....	23
2.4.1.1.	Antibioterapia tópica .....	23
2.4.1.2.	Antifúngicos .....	24
2.4.1.3.	Antivirais .....	24
2.4.1.4.	Agentes midriáticos cicloplégicos .....	24
2.4.1.5.	Anti-inflamatórios .....	25
2.4.1.6.	Analgésicos .....	25
2.4.1.7.	Agentes anticolagenases.....	26
2.4.1.8.	Substitutos lacrimais .....	27
2.4.1.9.	Vitaminas .....	27
2.4.2.	Úlceras superficiais.....	27
2.4.3.	Úlceras complicadas.....	28
2.4.4.	Descemetocelo e Perfuração.....	30
2.4.5.	DECCE .....	31
3.	Plasma autólogo.....	32
3.1.	Composição e atuação enquanto substituto lacrimal.....	33
3.2.	Aplicação em doenças oftalmológicas .....	34
3.3.	Preparação.....	34
3.4.	Efeitos adversos e riscos associados .....	35
CAPÍTULO III – Utilização de plasma no tratamento de úlceras da córnea no cão: estudo retrospectivo de 30 casos .....		36

1.	Objetivos .....	36
2.	Material e métodos .....	37
2.1.	Tipo de estudo e recolha de dados .....	37
2.2.	Critérios de seleção e exclusão da amostra .....	37
2.3.	Obtenção de plasma autólogo no HRVM.....	38
2.4.	Processamento dos dados e análise estatística .....	39
3.	Resultados obtidos .....	40
3.1.	Caracterização da amostra em estudo .....	40
3.1.1.	Distribuição racial.....	40
3.1.2.	Distribuição de género .....	41
3.1.3.	Distribuição etária .....	41
3.2.	Caracterização clínica da doença ulcerativa.....	42
3.2.1.	Classificação.....	42
3.2.2.	Extensão .....	43
3.3.	Tratamento instituído no HRVM.....	44
3.3.1.	Úlceras superficiais responsivas ao tratamento .....	44
3.3.1.1.	Antibiótico tópico.....	44
3.3.1.2.	Agente midriático cicloplégico .....	45
3.3.1.3.	AINEs.....	45
3.3.1.4.	Plasma autólogo .....	46
3.3.1.5.	Outras terapêuticas médicas .....	46
3.3.2.	Úlceras superficiais indolentes .....	47
3.3.2.1.	Cirurgia .....	47
3.3.2.2.	Antibiótico tópico.....	48
3.3.2.3.	Agente midriático cicloplégico .....	48
3.3.2.4.	AINEs.....	48
3.3.2.5.	Plasma autólogo .....	49
3.3.2.6.	Outras terapêuticas médicas .....	49
3.3.3.	Úlceras profundas.....	50
3.3.3.1.	Cirurgia .....	50
3.3.3.2.	Antibiótico tópico.....	51
3.3.3.3.	Agente midriático cicloplégico .....	51
3.3.3.4.	AINEs.....	52
3.3.3.5.	Plasma autólogo .....	52
3.3.3.6.	Outras terapêuticas médicas .....	53
3.4.	Evolução e recuperação .....	53
3.4.1.	Úlceras superficiais.....	53

3.4.1.1.	Úlceras superficiais em que não foi administrado plasma autólogo.....	53
3.4.1.2.	Úlceras superficiais em que foi administrado plasma autólogo.....	54
3.4.1.3.	Comparação do tempo decorrente até à recuperação de lesões superficiais nos casos tratados e não tratados com plasma autólogo .....	55
3.4.2.	Úlceras graves (indolentes e profundas) .....	56
3.4.2.1.	Úlceras indolentes .....	56
3.4.2.2.	Úlceras profundas.....	57
3.4.2.3.	Comparação do tempo decorrente até à recuperação de lesões graves (indolentes e profundas) consoante a frequência de administração do plasma.....	58
4.	Discussão.....	59
4.1.	Caracterização da amostra em estudo .....	59
4.2.	Caracterização clínica da doença ulcerativa.....	61
4.3.	Tratamento instituído no HRVM e evolução clínica .....	62
5.	Conclusões, limitações do estudo e perspetivas futuras .....	74
Anexos	.....	86
	<i>Abstract</i> apresentado no Congresso Virtual da Sociedade Europeia de Oftalmologia Veterinária (ESVO – <i>European Society of Veterinary Ophthalmology</i> ).....	86

## **Índice de figuras**

<b>Figura 1:</b> Tubo Eppendorf contendo plasma autólogo. ....	38
<b>Figura 2:</b> Olho esquerdo de um cão da raça Buldogue Francês. Aspeto lesional de uma úlcera indolente superficial dorsal de dimensão 4x4 mm. Padrão de coloração após aplicação do corante fluoresceína com infiltração perilesional, epífora, quemose e congestão conjuntival moderadas associadas (Fotografia gentilmente cedida pela Professora Doutora Esmeralda Delgado).....	47
<b>Figura 3:</b> Olho direito de cão da raça Buldogue Francês. Aspeto lesional de uma úlcera estromal profunda central com presença de descemetocelo central. De notar o edema da córnea generalizado impedindo a visualização da câmara anterior. Anel de neovascularização perilimbo em 360 ° a cerca de 3-4 mm do limbo esclerocórneo, pressupondo alguma cronicidade do processo (Fotografia gentilmente cedida pela Professora Doutora Esmeralda Delgado).....	50

## Índice de gráficos

<b>Gráfico 1:</b> Frequências absolutas e relativas das diferentes raças que compõem a amostra em estudo.....	41
<b>Gráfico 2:</b> Distribuição dos animais avaliados pelas diferentes faixas etárias consideradas.....	42
<b>Gráfico 3:</b> Percentagem e frequência relativa dos diferentes tipos de lesão corneal.....	42
<b>Gráfico 4:</b> Frequências absolutas e relativas das dimensões da lesão nos diferentes tipos de doença ulcerativa considerada (superficial e profunda).....	43
<b>Gráfico 5:</b> Frequência absoluta e relativa da antibioterapia tópica administrada no grupo de animais com úlceras superficiais responsivas ao tratamento médico.....	45
<b>Gráfico 6:</b> Distribuição da administração de agente midriático cicloplégico no grupo de animais com úlceras superficiais responsivas ao tratamento médico.....	45
<b>Gráfico 7:</b> Distribuição da utilização de AINES no grupo de animais com úlceras superficiais responsivas ao tratamento médico.....	46
<b>Gráfico 8:</b> Distribuição da frequência de administração de plasma autólogo nos animais com úlceras superficiais aos quais foi receitado.....	46
<b>Gráfico 9:</b> Distribuição da aplicação de plasma autólogo no grupo de animais com úlceras superficiais responsivas ao tratamento médico.....	46
<b>Gráfico 10:</b> Distribuição do número de desbrides realizados no grupo de animais com úlceras indolentes.....	47
<b>Gráfico 11:</b> Frequência absoluta e relativa da antibioterapia tópica administrada no grupo de animais com úlceras indolentes.....	48
<b>Gráfico 12:</b> Distribuição da utilização de AINES no grupo de animais com úlceras indolentes.....	49
<b>Gráfico 13:</b> Distribuição da frequência de administração de plasma autólogo no grupo de animais com úlceras indolentes.....	49
<b>Gráfico 14:</b> Distribuição da realização de cirurgias no grupo de animais com úlceras profundas.....	50
<b>Gráfico 15:</b> Frequência absoluta e relativa da antibioterapia tópica administrada no grupo de animais com úlceras profundas.....	51
<b>Gráfico 16:</b> Distribuição da utilização de agente midriático cicloplégico no grupo de animais com úlceras profundas.....	52
<b>Gráfico 17:</b> Distribuição da utilização de AINES no grupo de animais com úlceras profundas.....	52
<b>Gráfico 18:</b> Distribuição da frequência de administração de plasma autólogo no grupo de animais com úlceras profundas.....	53

**Gráfico 19:** Curva de *Kaplan Meier* para as lesões superficiais tratadas e não tratadas com plasma autólogo..... 55

**Gráfico 20:** Curva de *Kaplan Meier* para as lesões graves tratadas com mais de 4 administrações diárias de plasma autólogo e com menos de 3 administrações diárias..... 58

## **Índice de tabelas**

<b>Tabela 1:</b> Agentes anticolagenases, concentração em que são usados, ação e mecanismo de ação.....	26
<b>Tabela 2:</b> Número de dias mínimos e máximos, médias e desvios padrões do tempo decorrido entre o diagnóstico e as várias consultas de controlo realizadas nos casos de ulceração superficial em que não foi administrado plasma autólogo e frequências absolutas e relativas dos animais presentes em cada.....	54
<b>Tabela 3:</b> Número de dias mínimos e máximos, médias e desvios padrões do tempo decorrido entre o diagnóstico e as várias consultas de controlo realizadas nos casos de ulceração superficial em que foi administrado plasma autólogo e frequências absolutas e relativas dos animais presentes em cada.....	54
<b>Tabela 4:</b> Número de dias mínimos e máximos, médias e desvios padrões do tempo decorrido entre o diagnóstico e as várias consultas de controlo realizadas nos casos de ulceração indolente e frequências absolutas e relativas dos animais presentes em cada consulta.....	56
<b>Tabela 5:</b> Número de dias mínimos e máximos, médias e desvios padrões do tempo decorrido entre o diagnóstico e as várias consultas de controlo realizadas nos casos de ulceração indolente e frequências absolutas e relativas dos animais presentes em cada consulta.....	57

## Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

adm/dia - administrações por dia

AINES - anti-inflamatórios não esteroides

ATP - adenosine triphosphate (adenosina trifosfato)

ATPase - adenosine triphosphatase (adenosina trifosfatase)

BID - *bis in die* (duas vezes ao dia)

Ca<sup>2+</sup> - íão cálcio

CIM - Centro de Imagem Montenegro

Cl<sup>-</sup> - íão cloro

CVM - Clínica Veterinária Montenegro

DECCE - defeitos epiteliais corneais crónicos espontâneos

Dr. - doutor

EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)

EGF - epitelial growth factor (fator de crescimento epitelial)

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay (ensaio enzima-ligado da imunoabsorção)

FMV-ULisboa - Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

GAGs - glicosaminoglicanos

HRVM - Hospital Referência Veterinária Montenegro

IC - intervalo de confiança

IFA - indirect immunofluorescence assay (ensaio imunofluorescente indireto)

IgA - imunoglobulina A

IgG - imunoglobulina G

IgM - imunoglobulina M

IL-1 - interleucina um

IL-1RA - recetor antagonista da interleucina um

K<sup>+</sup> - íão potássio

mg/Kg - miligramas por quilograma

MIMV - Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

mm - milímetro

mm<sup>2</sup> - milímetro quadrado

MMPs - matrix metalloproteinases (metaloproteinases da matriz)

n - tamanho da amostra

Na<sup>+</sup> - íão sódio

nm - nanómetro

P - probabilidade

PAAF - punção aspirativa com agulha fina

PCR - polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)  
PDGF - platelet-derived growth factor (fator de crescimento derivado das plaquetas)  
PIO - pressão intraocular  
QID - *quater in die* (quatro vezes ao dia)  
SID - *semel in die* (uma vez ao dia)  
spp. - espécies  
TGF $\beta$  - transforming growth factor beta (fator de crescimento transformador beta)  
TID - *ter in die* (três vezes ao dia)  
TSA - teste de sensibilidade a antibióticos  
Zn<sup>2+</sup> - íão zinco  
 $\mu\text{m}$  - micrómetro  
*g* - unidade de aceleração  
 $\frac{1}{5}$  - um quinto  
 $\frac{1}{3}$  - um terço  
% - por cento  
° - grau(s)  
°C - grau(s) Celsius  
-°C - grau(s) Celsius negativos  
< - menor que  
 $\leq$  - menor ou igual  
 $\geq$  - maior ou igual  
® - marca registrada

## **Comunicações científicas**

Os resultados deste estudo foram apresentados, sob a forma de comunicação em painel, no Congresso Virtual da Sociedade Europeia de Oftalmologia Veterinária (ESVO – *European Society of Veterinary Ophthalmology*), que se realizou entre 2 e 3 de outubro de 2021 em Berlim, Alemanha.

O respetivo *abstract* em anexo (página 81) foi publicado na versão online do Book of Abstracts, disponível em: <https://esvomeeting2021.org/files/200000331-9c7339c735/esvo-2021-book-of-abstracts.pdf> e na revista *Veterinary Ophthalmology: Abstracts: Annual Virtual Scientific Meeting of the European Society of Veterinary Ophthalmologists*, Oct 2–3, 2021. First published: 16 November 2021 <https://doi.org/10.1111/vop.12946>

## **Introdução**

A presente dissertação foi elaborada na sequência do estágio curricular da autora, realizado no Hospital Referência Veterinária Montenegro (HRVM), como componente do plano de estudos do Mestrado Integrado da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-ULisboa).

A autora apresenta um particular interesse pela especialidade de oftalmologia, o que motivou a que, desde o começo do estágio, procurasse acompanhar mais de perto os casos de doenças oculares que surgiram no HRVM. A perceção da elevada casuística de doença ulcerativa da córnea em cães e a constatação de que, em grande parte destes doentes, eram aplicadas gotas de plasma obtido a partir do sangue do paciente (plasma autólogo) como componente do tratamento médico, associada à carência de estudos e documentação acerca do seu uso em medicina veterinária, levou à escolha de “Utilização de plasma autólogo no tratamento de úlceras da córnea no cão: estudo retrospectivo de 30 casos” como tema a desenvolver nesta dissertação. Os resultados obtidos após o estudo foram posteriormente comparados com dados recolhidos de publicações científicas referentes a esta temática. Deste modo, com esta análise, pretende contribuir-se para um maior conhecimento da aplicação do plasma autólogo enquanto opção terapêutica em situações de ulceração da córnea em animais de companhia.

## **CAPÍTULO I – Breve relatório de estágio no Hospital Referência Veterinário Montenegro**

A presente dissertação teve como base para a sua elaboração o estágio curricular da autora, que constitui um dos componentes do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária (MIMV) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-ULisboa).

O referido estágio foi realizado no Hospital Referência Veterinário Montenegro (HRVM), na área de clínica de animais de companhia (cão e gato), sob orientação da Professora Doutora Esmeralda Sofia Costa Delgado e coorientação do Dr. Luís Miguel Fonte Montenegro, e decorreu entre 1 de setembro de 2020 e 28 de fevereiro de 2021, perfazendo um total de seis meses.

O HRVM localiza-se no Porto e está permanentemente aberto, prestando vários serviços (de internamento, consultas, cirurgia e imagiologia) por marcação ou em regime de urgência. O serviço de assistência domiciliária, ao qual a autora teve oportunidade de assistir quando possível, é um complemento a qualquer um destes serviços.

A esta infraestrutura estão ainda associadas outras duas: a Clínica Veterinária Montenegro (CVM), situada numa outra zona da cidade do Porto; e o Centro de Imagem Montenegro (CIM), anexado ao hospital.

De modo a possibilitar a todos os estagiários o seguimento das várias vertentes de trabalho praticadas no hospital, o horário estipulado para cada um permutava diariamente e podia decorrer das 8 às 16 horas, destinado à assistência em consultas, das 10 às 18 horas e das 14 às 22 horas, em regime livre, e das 17 às 9 horas, para realização do turno da noite. Quinzenalmente, os alunos visitavam a CVM para acompanhamento da rotina de trabalho do corpo clínico, entre as 9 e as 17 horas.

Sempre que o horário diário o permitia, a autora assistia à reunião matinal com os médicos, enfermeiros e auxiliares, iniciada às 9 horas, onde eram discutidos os planos de diagnóstico e de tratamento dos animais internados e a sua evolução clínica.

### **1. Internamento**

O internamento do HRVM compreende três divisões distintas: o de cães, o de gatos e o de pacientes com doenças infetocontagiosas. Em todos eles as práticas realizadas são semelhantes, no entanto, no último, é necessário um cumprimento mais restrito de medidas de biossegurança.

Foram várias as atividades efetuadas pela autora nas diversas salas de internamento: criação de fichas de internamento, alimentações e passeios dos doentes, manutenção das condições de higiene tanto do espaço, como dos animais, monitorizações clínicas regulares (exame físico, medição de glicémias e pressão arterial e realização de eletrocardiogramas),

aplicação de cateteres endovenosos e de sistemas de fluidoterapia, cálculo de doses de fármacos e fluidos, preparação e administração de medicações (subcutânea, endovenosa, intramuscular e oral) e fluidoterapia (endovenosa e subcutânea), colheita de material biológico (sangue, urina, fezes, amostras cutâneas, vaginais e auriculares), limpeza de feridas e realização de pensos, auxílio em algalias, esvaziamentos vesicais e enemas e assistência em situações de emergência variadas.

## **2. Consultas**

As consultas no HRVM funcionam por marcação ou podem ser de urgência.

As consultas marcadas podem ser divididas em duas categorias principais: de prevenção (vacinação, desparasitação, colocação de microchip, comunicação com os tutores e consciencialização para as mais diversas temáticas); e terapêuticas (de primeira opinião, de segunda opinião, de referência, pré cirúrgica ou para seguimento da evolução clínica do paciente). Como consultas de referência destacam-se as das áreas de oftalmologia, dermatologia, reprodução, ortopedia e neurologia. A autora teve oportunidade de assistir a várias, onde participou na contenção do animal, execução de exames físicos, administração de medicações, fluidos, vacinas e desparasitantes, eutanásias, limpeza de feridas e elaboração de pensos, realização de protocolos quimioterápicos, sessões de hidroterapia, colheita de material de derrames cavitários, sangue, urina, amostras cutâneas, oculares, vaginais e de órgãos internos por punção aspirativa com agulha fina (PAAF), realização de exames complementares de diagnóstico (hemograma, análise bioquímica, ionograma, urianálise, ecografia, radiografia, avaliação citológica), acondicionamento das amostras obtidas e preenchimento de fichas de requisição laboratorial.

As consultas de urgências decorrem sobretudo durante a noite. Como cada estagiário realizava o turno noturno duas vezes no mês, foi possível participar na receção dos animais e auxiliar no manejo da sua condição.

## **3. Cirurgia**

Em cirurgia, o cargo desempenhado pela autora foi, maioritariamente, de ajudante de cirurgião. No entanto, teve oportunidade de executar outras funções enquanto instrumentista e anestesista (colheita de sangue e realização de hemograma e análises bioquímicas pré cirúrgicas, colocação de cateter, preparação e administração de medicação antes e após a cirurgia, tricotomia e assepsia da zona a intervir e monitorização anestésica). Sempre que participava numa cirurgia, independentemente do seu papel, a autora estava encarregue de acompanhar a recuperação pós operatória do paciente.

Foram várias as cirurgias assistidas no decorrer do estágio, inseridas em diferentes áreas, tais como oftalmologia, neurologia, reprodução, ortopedia, odontologia e gastroenterologia.

#### **4. Imagiologia**

Os serviços de imagiologia oferecidos pelo HRVM encontram-se segmentados pelos dois pisos que o compõe. No piso superior são realizadas ecografias, radiografias e endoscopias e, no piso inferior, está situado o CIM, onde se efetuam ressonâncias magnéticas e tomografias computadorizadas.

De uma forma geral, quando nesta área, a autora colaborou na contenção e posicionamento adequado dos animais. Teve oportunidade de assistir e ajudar em procedimentos como PAAF, cistocenteses, toracocentese e abdominocentese ecoguiadas e colheita de amostras através de biópsias auxiliadas por endoscopia. Especificamente em radiologia, fazia ainda parte das funções da autora a seleção das constantes radiográficas, revelação das cassetes e edição da imagem obtida.

#### **5. Clínica Veterinária Montenegro (CVM)**

Os serviços prestados pela clínica são idênticos aos do hospital. No entanto, tratando-se de uma estrutura mais pequena, a casuística é inferior e as cirurgias realizadas são de menor complexidade, consistindo maioritariamente em ovariohisterectomias e orquiectomias. Também as atividades da autora foram semelhantes às já descritas para o HRVM.

Foram várias as funções desempenhadas pela autora entre o internamento, as salas de consultas, cirurgia e imagiologia, o CIM e a CVM. Sempre que solicitado pelo clínico e sob supervisão do mesmo, esta teve oportunidade de realizar algumas destas tarefas de forma independente, sendo a complexidade dos encargos crescente com o avançar do estágio. Ao longo de todas as atividades, quando possível, o seu raciocínio crítico foi testado, mediante a discussão dos resultados obtidos em cada caso e, perante estes, dos possíveis diagnósticos, da determinação do mais provável e das terapêuticas adequadas a instituir.

As 1040 horas que o estágio curricular compreendeu foram cruciais não só para a elaboração desta dissertação, como também para a consolidação dos conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do curso e a sua aplicação prática, possibilitando uma melhoria na capacidade de comunicação com os tutores e desenvolvimento de um espírito de equipa, essenciais para o sucesso da vida profissional futura.

## **CAPÍTULO II – Revisão bibliográfica**

### **1. Anatomia e fisiologia da córnea canina**

#### **1.1. Posicionamento e anatomia**

A córnea situa-se na extremidade do segmento anterior do globo ocular, formando o  $\frac{1}{5}$  frontal da túnica ocular externa ou fibrosa (Sanchez 2014).

Tem forma elíptica, com um diâmetro horizontal superior ao vertical. No entanto, essa diferença é mínima, dando-lhe uma aparência quase circular (Meekins *et al.* 2021). O diâmetro médio da córnea no cão varia entre 14 a 16 mm (Plummer 2015).

Segundo Turner (2008), a espessura da córnea canina aproxima-se dos 0.45-0.55 mm e não é uma característica uniforme: é mais fina na periferia e a raça, sexo e idade do animal têm influência neste parâmetro, sendo que, de uma maneira geral, cães maiores, machos e mais velhos apresentam córneas mais espessas (Samuelson 2014; Sanchez 2014).

É transparente e avascular, dependendo da película lacrimal, do humor aquoso e dos capilares do limbo esclerocórneo para suprimento das suas necessidades metabólicas (Samuelson 2014; Meekins *et al.* 2021) e das pálpebras e membrana nictitante para proteção (Meekins *et al.* 2021).

#### **1.2. Histologia**

Em corte transversal, distinguem-se quatro regiões na córnea canina: epitélio (lâmina anterior), com a sua fina membrana basal; estroma ou substância própria; membrana de Descemet; e endotélio (lâmina posterior) (Junqueira e Carneiro 2013).

##### **1.2.1. Epitélio e lâmina basal**

O epitélio é composto externamente por duas ou três camadas de células epiteliais escamosas não queratinizadas, duas ou três camadas intermédias de células poliédricas e uma camada interna única de células basais colunares, grandes e altas, que produzem a membrana basal, situada abaixo dos estratos celulares. A sua espessura é de cerca de 25 a 40  $\mu\text{m}$  (Samuelson 2014).

Na superfície das células epiteliais, especialmente nas centrais, encontram-se inúmeras microplacas e microvilosidades. Estas segregam o glicocálice, que contacta com as mucinas da película lacrimal promovendo a sua adesão ao epitélio, onde participa na proteção e lubrificação do olho (Sanchez 2014). Para além disso, foi proposto que estas proliferações aumentam a superfície de absorção das células, através do qual se dá o movimento de

oxigênio, nutrientes e produtos metabólicos (Collin *and* Collin 2006, citados por Meekins *et al.* 2021). No entanto, segundo os autores, é pouco provável que estas expansões facilitem este processo (Meekins *et al.* 2021).

O epitélio está em permanente renovação. As células da camada basal dividem-se, formando células filhas que, à medida que são forçadas a deslocar-se até à superfície, vão gradualmente tornando-se achatadas e perdendo muitas das suas organelas. Já as células basais são substituídas por células-tronco límbicas, que sofrem mitoses constantes e migram centrípeta (Maggs 2008). São necessários aproximadamente 7 dias para que ocorra renovação da totalidade das células epiteliais da córnea (Stades *et al.* 2007).

O epitélio adere ao estroma por intermédio de hemidesmossomas, fibras de colagénio e uma lâmina glicoproteica que unem as células basais à membrana basal, que, por sua vez, adere ao estroma (Samuelson 2014).

### **1.2.2. Estroma ou substância própria**

Cerca de 90% da córnea é estroma, uma camada transparente, constituída essencialmente por água (aproximadamente 75-80%). Ainda assim, comparativamente com outros tecidos do organismo, é relativamente desidratado (Samuelson 2014).

O estroma é composto por várias camadas de fibras de colagénio pequenas e de tamanho uniforme, dispostas ordenadamente ao longo de toda a longitude da córnea, de limbo a limbo (Petersen-Jones *and* Crisrin 1999; Junqueira e Carneiro 2013). Em cada estrato, as fibras colagénicas apresentam diferentes direções, formando vários ângulos. Por vezes, fibras de uma camada atravessam outra adjacente, promovendo a coesão do tecido (Junqueira e Carneiro 2013). Entre os feixes encontram-se a substância fundamental gelatinosa e umas células com um núcleo pequeno e uma membrana celular fina, os fibroblastos, que nesta localização são denominados queratócitos (Samuelson 2014). Estas células têm múltiplas funções: possuem cristalinhas na sua composição, que se pensa promoverem a transparência da córnea (Jester 2008, citado por Meekins *et al.* 2021); têm a particularidade de, na eventualidade de ocorrer uma lesão corneal, se transformarem em miofibroblastos e auxiliarem no processo de cicatrização; e sintetizam tanto as fibras de colagénio, como a substância fundamental (Meekins *et al.* 2021).

A substância fundamental é constituída por um complexo metacromático de glicosaminoglicanos (GAGs) e glicoproteínas (Junqueira e Carneiro 2013). Dos GAGs que a compõem, destacam-se o sulfato de condroitina, o sulfato de queratina e o sulfato de dermatina (Ledbetter *and* Gilger 2014), que desempenham um papel muito importante na manutenção do normal funcionamento da córnea. Estão situados em redor das fibras

colagénicas, mantendo-as na posição adequada. Para além disso, retêm água, numa quantidade que varia de acordo com o seu tipo (Meekins *et al.* 2021).

No estroma profundo, em relação ao superficial, a densidade em células diminui e os seus núcleos aumentam de tamanho e as fibras de colagénio apresentam-se mais organizadas (Meekins *et al.* 2021).

### 1.2.3. Membrana de Descemet

Posteriormente ao estroma, encontra-se a membrana de Descemet, uma estrutura PAS positiva, homogénea, acelular e avascular, que termina no ápice da malha trabecular do limbo (Samuelson 2014; Meekins *et al.* 2021). É uma estrutura elástica, ainda que formada por finas fibrilhas de colagénio (Meekins *et al.* 2021). Da sua constituição fazem parte diversos tipos de colagénio, incluindo o tipo VIII, que na córnea apenas está presente nesta membrana e no limbo (Sanchez 2014). A sua espessura aumenta à medida que o animal envelhece, uma vez que é continuamente sintetizada pelo endotélio (Samuelson 2014).

### 1.2.4. Endotélio

Na posição mais interna da córnea localiza-se o endotélio, constituído por uma camada única de células hexagonais. Estas apresentam pequenos poros e vilosidades marginais, que se interdigitam às das células adjacentes, e *tight junctions*, que contribuem para a adesão das células umas às outras (Samuelson 2014).

O endotélio tem como função principal regular a passagem de humor aquoso através da córnea. Os sólidos presentes no estroma elevam a sua pressão hidrostática e, conseqüentemente, dá-se a passagem de água do humor aquoso armazenado na câmara anterior para o seu interior. Se esta tendência se mantivesse, a córnea não conseguiria atingir um estado de relativa desidratação, o que resultaria na perda da sua transparência. No entanto, as células endoteliais têm na sua porção lateral bombas de sódio/potássio/adenosina trifosfatase ( $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ ), através das quais se dá a passagem de iões sódio ( $\text{Na}^+$ ) e cloro ( $\text{Cl}^-$ ) para a câmara anterior e, conseqüentemente, de água. Também no epitélio estas bombas estão presentes, mas em número muito inferior às do endotélio (Sanchez 2014).

Adicionalmente, as *tight junctions* funcionam como uma barreira física que impede a passagem de fluido para a córnea (Sanchez 2014).

Ao contrário do epitélio, a capacidade de regeneração do endotélio é quase nula. Com o tempo, para compensar a perda de células, há um aumento do número de bombas em cada. Ainda assim, quando a densidade celular cai para valores próximos dos 500-800 células/ $\text{mm}^2$ , atinge-se a chamada "descompensação corneal", em que nem as bombas em elevado número conseguem impedir a formação de edema da córnea (Sanchez 2014).

### **1.3. Fisiologia**

A córnea tem várias funções. Tal como o cristalino, é responsável pela transmissão e refração da luz (Meekins *et al.* 2021). Ao atravessar a córnea, a luz transita de um meio gasoso para um meio líquido, e, por essa razão, o seu poder de refração é superior ao do cristalino (Turner 2008). Juntamente com a esclera, mantém a forma do globo ocular e protege as estruturas intraoculares (Crispin 2005).

#### **1.3.1. Transparência**

Sendo o elemento com mais poder refrativo do olho, a córnea tem que se manter transparente. Tal é garantido pelas suas propriedades estruturais e bioquímicas: uniformidade da superfície (assegurada pela ação da lágrima e renovação epitelial), tamanho reduzido das fibras de colagénio estromais (cerca de 25 nm) e sua distribuição particular, baixa densidade celular no estroma, ausência de queratina nas células epiteliais, estado de desidratação relativa e ausência de pigmento e vasos (Ledbetter *and* Gilger 2014; Labelle 2017; Meekins *et al.* 2021).

#### **1.3.2. Sensibilidade**

O rápido pestanejar com retração do globo ocular e prolapso da membrana nictitante são reflexos fundamentais para a proteção da córnea quando tocada ou irritada (Gum *and* MacKay 2014).

A córnea é altamente inervada pelos longos nervos ciliares sensitivos, provenientes da divisão oftálmica do nervo trigêmeo (Petersen-Jones *and* Crisrin 1999). Estes nervos partem do limbo esclerocórneo, entram na região estromal média e dispersam-se radialmente pela córnea, formando os plexos nervosos anterior e posterior no estroma anterior. A partir daí estendem-se no estrato basal e terminam na camada de células poliédricas epiteliais, formando o plexo subepitelial (Ledbetter *and* Gilger 2014). As camadas mais superficiais são essencialmente inervadas por recetores de dor, enquanto que no estroma mais profundo se encontram maioritariamente recetores de pressão. Por esta razão, uma lesão superficial é frequentemente mais dolorosa que uma profunda (Samuelson 2014; Meekins *et al.* 2021).

A sensibilidade corneal varia com a localização (maior no centro) e o tipo de crânio do animal (superior nos dolicocefalos). Cães com Diabetes *mellitus* apresentam sensibilidade corneal diminuída (Ledbetter *and* Gilger 2014).

#### **1.3.3. Metabolismo**

A córnea é uma estrutura avascular, sendo as suas necessidades metabólicas asseguradas pela difusão de nutrientes e oxigénio a partir do humor aquoso, da película

lacrimal e dos capilares do limbo esclerocórneo (Junqueira e Carneiro 2013; Gum *and* MacKay 2014).

A córnea requer energia sob a forma de ATP para garantir o funcionamento da bomba endotelial e manter o estado de relativa desidratação. Este ATP é gerado pela quebra de glucose, essencialmente fornecida pelo humor aquoso, mas também pela película lacrimal e capilares límbicos. Parte desta glucose é armazenada no epitélio sob a forma de glicogénio que, em situações de *stress* (traumatismos e cirurgias), é usado como fonte energética, possibilitando a locomoção celular e a regeneração estrutural (Gum *and* MacKay 2014).

O oxigénio necessário para a glicólise aeróbia chega ao epitélio transportado pela lágrima, ao passo que o estroma e o endotélio o obtêm a partir do humor aquoso. Na ausência de chegada de oxigénio ao epitélio, como acontece quando o olho está encerrado, a energia é gerada por glicólise anaeróbia, resultando na formação de ácido láctico. Quando este é produzido em excesso, ocorre hidratação corneal com perda da sua transparência (Gum *and* MacKay 2014).

O endotélio tem elevadas necessidades em energia (cerca de 5 vezes mais que o epitélio), que obtêm essencialmente pela via anaeróbia (Gum *and* MacKay 2014).

#### **1.3.4. Farmacologia**

Em oftalmologia, a administração de medicação pode ser feita por via sistémica, tópica ou por injeção nos tecidos subconjuntivais, intraoculares ou orbitais (Grahm *and* Wolfer 2009).

A chegada de fármacos ministrados por via intravenosa até à córnea depende da sua difusão a partir dos vasos perilímbicos, da secreção de agentes na lágrima ou da sua passagem pelas barreiras hemato-oculares, entrando na câmara anterior e, posteriormente, no endotélio corneal. Assim sendo, é preferível em caso de doença do segmento anterior do globo ocular, usar-se medicação tópica ou subconjuntival (Grahm *and* Wolfer 2009).

A distribuição da medicação colocada na superfície ocular ocorre de três formas: penetração pela córnea e vias não corneanas (conjuntiva e esclera), drenagem pelo aparelho nasolacrimal e absorção sistémica pelos vasos conjuntivais e nasofaríngeos (Regnier *et al.* 2014).

A córnea íntegra é composta por uma camada média aquosa (estroma), envolvida por duas lipídicas (epitélio e endotélio) (Regnier *et al.* 2014).

No epitélio, a passagem de substâncias pode dar-se através das células (transcelular), sendo necessário, para isso, que esta tenha capacidade de atravessar a sua membrana lipídica ou entre estas (paracelular). No espaço entre células encontram-se *tight junctions*, que formam pequenos poros aquosos que apenas moléculas de pequenas dimensões conseguem

atravessar. Assim, a absorção transcelular é reservada para substâncias lipofílicas, enquanto que a paracelular se dá apenas em compostos hidrofílicos polares (Regnier *et al.* 2014).

O estroma, essencialmente composto por água, é facilmente atravessado por substâncias de elevada solubilidade aquosa, ao passo que o endotélio não oferece resistências significativas nem a moléculas hidrofílicas, nem a lipofílicas (Regnier *et al.* 2014).

Deste modo, para um fármaco conseguir atravessar a córnea, tem que ser moderadamente solúvel em água e em gordura (Regnier *et al.* 2014).

Uma fração do medicamento administrado topicamente liga-se às proteínas da película lacrimal, deixando de estar disponível para absorção. Em situações de inflamação ocular, o teor em proteínas está elevado, exacerbando esta perda. Ainda assim, um epitélio lesado e inflamado é mais facilmente atravessado por substâncias hidrofílicas e, apesar dos extravios do fármaco, a sua concentração intracorneal é superior às que seriam atingidas se a superfície estivesse intacta (Regnier *et al.* 2014).

A solubilidade é a propriedade mais importante de um fármaco aplicado topicamente. No entanto, outros fatores que influenciam a sua absorção devem ser tidos em consideração: concentração, pH, capacidade de reduzir a tensão superficial, tamanho das partículas e tempo de contacto com a superfície ocular (Gum *and* MacKay 2014).

### **1.3.5. Imunologia**

A superfície ocular, ao estar exposta, é um alvo constante de vários tipos de lesões. Ainda assim, a córnea apresenta um estado de relativa quiescência imunológica, devido à ação protetora de mecanismos de imunidade inatos e adaptativos (Sanchez 2014).

A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa ocular. Esta é composta pelas pálpebras inferior e superior, terceira pálpebra, *tight junctions* entre as células epiteliais e película lacrimal (Sanchez 2014). A lágrima contém vários componentes antimicrobianos inespecíficos (lisozima, lactoferrina,  $\alpha$ -lisina, complemento) e específicos (IgA, IgG, IgM) para o agente invasor (Gum *and* MacKay 2014). A própria microflora corneal inibe o desenvolvimento de bactérias potencialmente patogénicas, através da secreção de substâncias semelhantes a antibióticos, depleção de nutrientes (Kern 1990) e, segundo estudos mais recentes, por estimulação de células imunes e controlo da síntese de mucina que compõem a lágrima (Miller *and* Lovieno 2009, citados por Dall'Ara *and* Turin 2019). A constante reepitelização da superfície corneal também funciona como um mecanismo de defesa inato (Maggs 2008).

A segunda linha de defesa corneal é o tecido linfóide associado ao olho, presente nas glândulas lacrimais e conjuntiva, que constitui a imunidade adaptativa ocular. O seu funcionamento depende de células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células

de Langerhans, e dos recetores por elas expressos, denominados recetores *Toll-like*. As células apresentadoras de antígenos são escassas na superfície corneal, sendo transportadas até essa zona pela conjuntiva e lágrima quando necessárias. Já os recetores *Toll-like* apenas se encontram na profundidade do epitélio. A escassez destes elementos na superfície corneal cria nesta um estado de “ignorância imunitária”, o que reduz a sua reatividade, impedindo que a microflora ocular normal desencadeie uma reação inflamatória e que, aquando invasão microbiana, a resposta gerada seja exuberante (Sanchez 2014).

### 1.3.6. Cicatrização corneal

Quando o tecido corneal sofre uma lesão, quer seja por trauma, intervenção cirúrgica ou de origem infecciosa, a sua regeneração depende de fatores inerentes à lesão (gravidade e duração), da extensão do defeito (tipo de camadas afetadas) e de aspetos referentes ao animal (idade e estado de saúde e nutricional). De uma maneira geral, quanto mais profunda for a lesão, menor a capacidade de recuperação tecidual pois o epitélio tem uma grande capacidade de regenerar, ao passo que o endotélio tem muito pouca (Sanchez 2014).

As células tronco pluripotentes situadas na camada basal do limbo esclerocórneo desempenham um papel vital na regeneração tecidual, pois funcionam como um reservatório celular, partindo do limbo até à córnea (Reid 1994).

Os danos superficiais são acompanhados por dor intensa e edema ligeiro (Stades *et al.* 2007).

A regeneração epitelial divide-se em três etapas: alongamento celular e migração, proliferação e diferenciação (Sanchez 2014).

Cerca de uma hora após a ocorrência do trauma, as células epiteliais mais próximas da lesão tornam-se achatadas e migram sobre o defeito, usando a fibronectina como suporte. Após 8 a 10 horas, formam uma camada que cobre a ferida, impedindo a penetração de agentes patogénicos (Turner 2008; Stades *et al.* 2007). A dor e o edema desaparecem. Posteriormente, estas células sofrem proliferação e diferenciação a partir das células da camada basal e, ao fim de algum tempo, a espessura do epitélio regressa ao normal, sem formação de cicatriz (Stades *et al.* 2007).

A reparação do epitélio é relativamente rápida. Se todo o epitélio for removido, a sua substituição ocorre em 48 a 72 horas, embora permaneça mais fino por várias semanas (Turner 2008).

Se a lesão se estender a cerca de  $\frac{1}{3}$  da profundidade da córnea, o processo de cicatrização é semelhante mas a camada de células basais já será afetada e da sua recuperação resulta uma cicatriz microscópica (Stades *et al.* 2007).

As lesões profundas, que envolvem o estroma, são acompanhadas por dor ligeira e edema marcado (Stades *et al.* 2007). Estão associadas a uma recuperação mais prolongada, que resulta numa cicatriz cuja extensão depende da gravidade da situação (Sanchez 2014).

A reparação estromal compreende várias fases: apoptose, eliminação da matriz extracelular danificada, formação de tecido cicatricial e remodelação do estroma (Sanchez 2014).

Inicialmente, as células do epitélio lesado (e do endotélio, caso esteja afetado) libertam Interleucinas (IL-1), que atravessam o estroma e se unem aos seus recetores presentes nos queratócitos. Ao fim de alguns minutos, os queratócitos adjacentes à lesão sofrem apoptose, enquanto que os que se encontram mais afastados do foco sobrevivem, pois não recebem IL-1 em quantidade suficiente. Ainda assim, a IL-1 tem efeito nos queratócitos remanescentes, estimulando-os a produzir quimiocinas que, em conjunto com a ação da própria IL-1 e outras citocinas, atraem para o local células de defesa (neutrófilos, macrófagos) (Wilson 2020).

Segundo Wilson (2020), a apoptose dos queratócitos e ação das células de defesa medular, consistem num mecanismo protetor que, em caso de infeção viral do epitélio, impede o alastramento da afeção para os queratócitos e células endoteliais, para todo o olho e mesmo para o cérebro. Falamos, por exemplo, do Herpesvirus simples e do Vírus da varíola.

Os vasos sanguíneos que se formam numa fase inicial a partir da região do limbo transportam neutrófilos até ao olho que, através da película lacrimal, atingem a zona lesada. Estes neutrófilos secretam metaloproteinasas da matriz (MMPs - matrix metalloproteinases), que, em conjunto com as metaloproteinasas produzidas pelos queratócitos e células epiteliais, degradam a matriz extracelular danificada, preparando o estroma para a síntese de nova matriz (Stades *et al.* 2007; Sanchez 2014).

Simultaneamente à libertação de IL-1 e estimulado por esta, são também sintetizados, ativados e libertados os fatores de crescimento transformadores  $\beta$  (TGF $\beta$  - transforming growth factor beta) e o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF - platelet-derived growth factor), essencialmente pelas células epiteliais e endoteliais. Estes fatores entram no estroma através da porção da membrana basal ou de Descemet adjacente à lesão. No seu interior, convertem os queratócitos em fibroblastos e estes em miofibroblastos. A passagem destes fatores através da membrana é regulada por componentes da mesma. Estes fatores são também produzidos pela película lacrimal, humor aquoso e células estromais. Contudo, esta produção é baixa e, ao fim de alguns dias, deixa de ser suficiente para assegurar a formação dos miofibroblastos. Deste modo, para que se atinjam níveis de TGF  $\beta$  altos o suficiente, a membrana basal ou de Descemet têm que estar afetadas (Wilson 2020).

Os fibroblastos segregam GAGs e glicogénio para preencher a lesão. Como consequência, há uma alteração da estrutura do estroma e formação de uma cicatriz esbranquiçada (Turner 2008; Sanchez 2014).

A destruição dos miofibroblastos é mediada pela interação entre a IL-1 e os TGF $\beta$ . A síntese dos TGF $\beta$  é estimulada pela IL-1, mas esta também é sintetizada pelos miofibroblastos. No entanto, há uma predominância do efeito dos TGF $\beta$ , uma vez que as células epiteliais e estromais também produzem um recetor antagonista da IL-1 (IL-1 RA), bloqueando os seus efeitos. Assim, e apenas quando há regeneração da membrana basal, verifica-se um decréscimo dos níveis de TGF $\beta$  e PDGF e predominância do efeito apoptótico da IL-1, o que conduz à redução do número de miofibroblastos restabelecendo-se, assim, a conformação normal do estroma com atenuação da cicatriz fibrosa (Sanchez 2014; Wilson 2020). Ainda assim, se o trauma for recorrente, a membrana basal não se restabelece e as citocinas e fatores de crescimento continuam a penetrar o estroma, perpetuando a formação de tecido fibroso (Wilson 2020).

Uma lesão inicial muito profunda ou progressiva, pode levar à exposição da membrana de Descemet. Se esta se tornar muito fina ou a pressão ocular aumentar, origina-se uma hérnia que se projeta anteriormente, denominada descemetocelo, que pode culminar em perfuração corneal (Stades *et al.* 2007).

Quando ocorre perfuração ocular, o humor aquoso entra na córnea e coagula, fechando a abertura. Se esta for muito grande, a íris auxilia no encerramento. Mais tarde, esta íris fica coberta de exsudado e epitélio, formando uma sinéquia anterior (Stades *et al.* 2007).

#### **1.3.6.1. Vascularização**

A córnea é uma estrutura naturalmente avascular. Quando há lesão corneal, os queratócitos libertam mediadores inflamatórios, formando neovasos (Sanchez 2014).

A vascularização pode ser superficial e/ou profunda. Os vasos superficiais, localizados nas regiões subepiteliais e estromais anteriores, surgem de vasos conjuntivais e estão tipicamente associados a uma lesão na superfície ocular ou doença superficial da córnea. Os vasos da córnea profunda surgem de vasos ciliares anteriores e estão localizados no estroma posterior. Estes sugerem defeitos na córnea profunda ou doença intra-ocular (Ledbetter *and* Gilger 2014).

Embora transportem leucócitos e fatores de crescimento até à área danificada, também podem predispor a inflamação excessiva (Turner 2008); gerar hemorragias na córnea, fenómeno mais frequente em cães mais velhos; e agravar o edema por perda de líquido vascular (Sanchez 2014).

Quando a córnea cicatriza, os vasos sanguíneos deixam de ser perfundidos. A sua parede permanece e continuam a poder ser vistos com lâmpada de fenda, recebendo a designação de “vasos fantasma” (Maggs 2008).

## **2. Ulceração corneal**

Úlceras da córnea são queratopatias acompanhadas por perdas de epitélio mais ou menos extensas, que vão desde uma erosão epitelial superficial até à perfuração da córnea (Maggs 2008; Marrion 2008). De uma maneira geral, estas ocorrem quando há falha dos mecanismos protetores da córnea e consequente perda de porções de tecido (Maggs 2008).

São doenças frequentes em clínica de pequenos animais (Maggs 2008, citado por Sharma *et al.* 2019), sendo os cães de raças braquicéfalas, pelas suas características anatomofisiológicas, os mais propícios a desenvolvê-las. Estes animais apresentam olhos mais proeminentes, o que torna a sua superfície mais suscetível a agressões externas. A esta exoftalmia está frequentemente associada uma incapacidade de encerramento palpebral completo (lagofthalmia), que impossibilita a dispersão uniforme da película lacrimal sobre a superfície ocular, originando secura do olho (queratoconjuntivite seca) e erosão secundária (Bedford *and* Jones 2001, citados por Packer *et al.* 2015; Costa, Steinmetz *et al.* 2021). Além disso, alguns cães destas raças apresentam défices congénitos do ramo oftálmico do nervo trigémeo (Dubielzig *et al.* 2010) e outras alterações oftálmicas como entrópion medial, ectrópion e distúrbios dos cílios, como distiquíase, triquíase e cílios ectópicos (Ledbetter *and* Gilger 2014; Costa, Steinmetz *et al.* 2021).

### **2.1. Classificação**

As queratopatias ulcerativas podem ser classificadas de acordo com a sua profundidade, etiologia e duração (Ledbetter *and* Gilger 2014).

#### **2.1.1. Classificação das úlceras quanto à profundidade**

As lesões superficiais, denominadas erosões ou abrasões, normalmente cicatrizam facilmente, por vezes espontaneamente. Da sua regeneração resultam cicatrizes mínimas (Miller 2001; Ledbetter *and* Gilger 2014).

As úlceras estromais, podem ou não ser progressivas (Miller 2001). Podem dever-se a traumas extensos ou constituírem um agravamento de lesões superficiais que, por ação excessiva de enzimas ou devido à presença de fatores de exacerbação, aumentam de gravidade. Desta forma, uma erosão inicial que evolui em profundidade, deve ser sempre alvo de reavaliação (Ledbetter *and* Gilger 2014). Nestes casos, a formação de tecido cicatricial é mais exuberante (Ledbetter *and* Gilger 2014).

## **2.1.2. Classificação das úlceras quanto à etiologia**

### **2.1.2.1. Por traumatismos exógenos**

São causadas por fatores externos ao olho que provocam irritação ou lesão, como corpos estranhos e arranhões de gato (Marrion 2008), compostos ácidos ou alcalinos e radiação ultravioleta (Ledbetter *and* Gilger 2014).

### **2.1.2.2. Por alterações das pálpebras**

Referentes à ausência total ou parcial das pálpebras, entrópion, distiquíase, triquíase, cílios ectópicos, blefarite, neoplasias, lesões das margens palpebrais e lagofthalmia (Petersen-Jones *and* Crisrin 1999; Marrion 2008; Costa, Steinmetz *et al.* 2021). São várias as condições que impossibilitam o encerramento palpebral completo, prejudicando a dispersão da película lacrimal na superfície ocular, como buftalmia, exoftalmia, presença de fissura macropalpebral, diminuição da frequência de pestanejar ou incapacidade de piscar os olhos por paralisia do nervo facial (Marrion 2008; Costa, Steinmetz *et al.* 2021)

### **2.1.2.3. Por alterações da película lacrimal**

Incluem inflamação crônica da glândula nictitante ou lacrimal, atrofia destas glândulas ou obstrução dos seus ductos, fibrose ou xerose da conjuntiva, queratoconjuntivite seca, alterações nas glândulas de Meibomius ou doenças do foro neurológico (Marrion 2008; Dubielzig *et al.* 2010). A carência em vitamina A pode causar metaplasia escamosa com queratinização do epitélio secretor de muco, levando a um decréscimo na produção lacrimal (Dubielzig *et al.* 2010).

### **2.1.2.4. Infeciosas**

As bactérias são os agentes mais frequentemente envolvidos em infeções oculares (Ledbetter *and* Gilger 2014). Úlceras da córnea que tenham como causa primária infeções bacterianas podem ocorrer, mas não são comuns. Uma córnea intacta é altamente resistente à penetração de microrganismos pois muitos destes são incapazes de aderir à membrana das células epiteliais e originar lesão por si só (Kern 1990; Labelle 2017). Na grande maioria das situações, após a ocorrência de uma lesão epitelial, as bactérias aderem à superfície e entram no estroma, desencadeando uma reação inflamatória com produção de enzimas (Ledbetter *and* Gilger 2014).

Em 2020, Hewitt *et al.* avaliaram a prevalência dos agentes bacterianos envolvidos em queratopatias ulcerativas e verificaram como mais comuns o *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., ambas Gram positivas, seguidos da *Pseudomonas* spp, Gram negativa.

As queratites fúngicas são muito raras e normalmente estão associadas a terapêuticas prolongadas com corticosteroides, imunossupressores e antibióticos. O agente mais frequentemente isolado nestes casos é o *Aspergillus* spp. (Ledbetter and Gilger 2014).

Os vírus são causas de ulceração pouco frequentes. O Herpesvírus-1 canino infeta o animal e fica latente no seu organismo, causando doença quando este se encontra imunodeprimido. Nestas situações, pode levar ao aparecimento de úlceras na córnea (Ledbetter and Gilger 2014).

#### **2.1.2.5. Por défices no ramo oftálmico do nervo trigémeo**

Os défices no ramo oftálmico do nervo trigémeo podem ser congénitos, como acontece em alguns braquicéfalos, ou originados por traumas. A reduzida sensibilidade corneal leva a falhas no desencadear dos seus mecanismos protetores, como pestanejar e lacrimejar, causando perdas de tecido corneal (Dubielzig *et al.* 2010; Costa, Steinmetz *et al.* 2021).

#### **2.1.2.6. Secundárias a outras doenças**

Infiltração de cálcio, edema e anomalias da membrana basal do epitélio são algumas das doenças da córnea associadas à formação de úlceras (Marrion 2008).

#### **2.1.3. Classificação das úlceras quanto à sua duração**

As úlceras são classificadas como agudas ou crónicas, consoante a duração da afeção. As lesões agudas resolvem-se num máximo de 7 dias, por vezes espontaneamente, são relativamente simples e compreendem apenas o epitélio. Úlceras cujo tempo de cicatrização excede os 7 dias são denominadas crónicas (Maggs 2008; Ledbetter and Gilger 2014).

#### **2.1.4. Defeitos Epiteliais Corneais Crónicos Espontâneos (DECCE)**

Quando uma úlcera não cicatriza após a instituição do tratamento adequado, podemos pensar em várias situações. Pode ter ocorrido uma falha no estabelecimento do diagnóstico ou na correção da causa ou a situação pode ter-se agravado (Maggs 2008). Assim, é importante reavaliar úlceras não responsivas (Miller 2001).

Depois de descartadas todas as hipóteses referidas anteriormente, podemos pensar que se trata de um defeito epitelial corneal crónico espontâneo. Estas lesões têm muitas outras designações, como úlceras refratárias, persistentes ou indolentes ou úlceras do Boxer (Maggs 2008; Labelle 2017). Embora sejam denominadas de úlceras do Boxer, podem afetar qualquer raça de cães, sendo mais frequente nos mais velhos. No entanto, há, de facto, uma maior propensão para o seu surgimento nos Boxer (Maggs 2008).

Tipicamente, são úlceras superficiais e crônicas, associadas a dor ligeira, se existir, visualizadas sob a forma de um *flap* de epitélio, que se desbrida com facilidade (Maggs 2008).

A etiologia destas úlceras permanece desconhecida. No entanto, sabe-se que está relacionada com um defeito na membrana basal ou na superfície do estroma anterior, que impossibilita a adesão destas camadas da córnea (Maggs 2008; Labelle 2017).

Histologicamente, verifica-se a presença de alterações estruturais. O epitélio encontra-se espessado, com menos células basais e com as margens arredondadas na zona afetada. A membrana basal está ausente ou lesionada, assim como os hemidesmossomas. O estroma anterior apresenta-se hialinizado e acelular, com perda da sua estrutura definida e a sua superfície encontra-se coberta por fibronectina. Na zona lesada, os fatores associados à reepitelização estão diminuídos (Miller 2001; Ledbetter *and* Gilger 2014; Labelle 2017).

Alterações da camada endotelial podem estar na origem destes defeitos na medida em que, ao causarem edema estromal, afetam também o epitélio (Marrion 2008).

Foi também proposto que a fibronectina que se encontra na superfície estromal funciona como uma barreira que impede a adesão da camada epitelial (Miller 2001). Análises realizadas à lágrima destes animais revelaram, na grande maioria, níveis aumentados de proteinases séricas. Um desequilíbrio quantitativo destas proteinases pode conduzir à alteração da membrana basal e da fibronectina, prejudicando a cicatrização (Miller 2001).

### **2.1.5. Colagenólise ou “Melting cornea”**

Colagenólise ou “Melting Cornea” corresponde à degradação (queratomalácia) enzimática da córnea (Marrion 2008). Ocorre quando há infeção, mas não é sinónimo desta (Ledbetter *and* Gilger 2014). A cicatrização corneal compreende uma fase de ação enzimática, em que proteinases atuam de forma a eliminar os detritos celulares (Sanchez 2014). Se ocorrer irritação corneal crónica, dá-se o recrutamento de células inflamatórias para o local, que exacerbam esta destruição, levando à necrose do tecido corneal, com perda da estrutura normal do estroma, que adquire um aspeto gelatinoso ou “melting” (Ledbetter *and* Gilger 2014; Sanchez 2014). O mesmo se sucede quando se dá invasão bacteriana, em que, para além da ação das células inflamatórias, há libertação de enzimas colagenolíticas pelo agente (Sanchez 2014). Um estudo recente da autoria de Tsvetanovo *et al.* (2021) revelou que os agentes mais frequentemente isolados na presença de queratomalácia são as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e o *Streptococcus* β-hemolítico.

## **2.2. Sinais clínicos**

Parte dos sinais clínicos associados à presença de úlceras na córnea estão relacionados com a causa subjacente. Comuns à generalidade dos casos estão a produção

de lágrima em excesso, fotofobia, sinais de dor, como blefarospasmo, epífora, hiperemia conjuntival e edema da córnea (Ledbetter *and* Gilger 2014), mais ou menos marcados consoante a localização e gravidade da situação. Na eventualidade de o estroma estar envolvido, para além de todos os referidos anteriormente, há alteração estrutural visível, presença de vascularização periférica e edema de intensidade variável (Marrion 2008).

Se ocorrer infeção associada à queratopatia, esta é acompanhada por dor marcada, edema de grau variável e hiperémia. O estroma perde a sua estrutura bem definida e adquire um aspeto gelatinoso, com retenção de um infiltrado composto por bactérias e neutrófilos, de cor esbranquiçada (Marrion 2008) ou verde-amarelada (Maggs 2008).

### **2.3. Diagnóstico**

A abordagem diagnóstica inicia-se com um exame oftálmico completo realizado de forma sistemática (Rosolen *et al.* 2009). A córnea interage direta ou indiretamente com outros componentes oculares, como as pálpebras, conjuntiva, película lacrimal, humor aquoso, íris e cristalino, que influenciam o seu estado de saúde (Sanchez 2014). Assim, o resultado desta avaliação permite ao clínico não só diagnosticar úlceras da córnea, mas também determinar possíveis causas da mesma ou complicações a ela associadas (Rosolen *et al.* 2009).

O primeiro passo do exame oftálmico consiste na recolha da história clínica e simultânea observação do animal à distância, para ver se este apresenta sinais de desconforto ocular, como blefarospasmo, hiperémia conjuntival, lacrimejamento ou corrimento mucopurulento ou purulento. Se o animal apresenta esta sintomatologia, devem ser feitos testes adicionais para investigar a presença de ulceração na córnea (Rosolen *et al.* 2009).

De seguida, observam-se os olhos e as estruturas envolventes ao perto, de forma a avaliar a conformação ocular, anomalias das pálpebras e pestanas (Rosolen *et al.* 2009).

Seguidamente, passa-se ao exame neurooftálmico, que inclui a avaliação da resposta de ameaça e dos reflexos palpebral, corneano, pupilar direto e consensual. O reflexo corneal é testado tocando com a ponta de um cotonete estéril no olho, que deve causar a retração do globo ocular e encerramento das pálpebras. Se isto não se verificar, o animal pode sofrer de paralisia do ramo oftálmico do nervo trigémeo, do facial ou do abducente. Para avaliar o reflexo palpebral, toca-se no canto medial ou lateral do olho. A resposta normal é o encerramento das pálpebras. A ausência desta indica dano no nervo facial ou ramo oftálmico do trigémeo (Featherstone *et al.* 2014).

Os animais com doença ocular devem ser submetidos ao Teste de Schirmer antes de qualquer manipulação, para medir a taxa de produção de lágrima. A queratoconjuntivite seca é uma causa de ulceração corneal que deve ser descartada (Turner 2008).

Posteriormente, realiza-se um exame com iluminação focal com ou sem ampliação, usando um transiluminador de Finoff com ou sem lupa ou um biomicroscópio com lâmpada de fenda, para observar a superfície ocular, segmento anterior e anexos (Heinrich 2014). O biomicroscópio com lâmpada de fenda é um dispositivo sofisticado, que permite uma observação em três dimensões, mais definida e ampliada dos anexos, córnea, câmara anterior, cristalino e vítreo anterior. O feixe de luz é regulado, podendo ser difuso, em ponto ou em fenda e apresentar várias cores, consoante o filtro escolhido (Rosolen *et al.* 2009).

Segue-se a aplicação de um colírio anestésico e a medição da pressão intraocular (PIO), por tonometria, sendo que, atualmente a mais utilizada é a de ressaltado (Tono-Vet) (E. Delgado, comunicação pessoal, julho 21, 2021).

Por último, é aplicado um colírio midriático e observado o fundo do olho. Para isso, são usados instrumentos como o oftalmoscópio direto ou indireto (Rosolen *et al.* 2009).

### **2.3.1. Corantes Oftálmicos**

Uma córnea saudável é transparente, avascular e convexa. Se apresentar opacidades, irregularidades, vascularização e/ou pigmentação, devem ser realizados mais testes, nomeadamente aplicação de um corante oftálmico nos dois olhos, embora seja possível observar a lesão mesmo a olho nu (Turner 2008; Heinrich 2014). Os corantes mais frequentemente utilizados em oftalmologia são a fluoresceína e o Rosa bengala (Maggs 2008).

Se o animal apresentar blefarospasmo intenso, é preferível usar-se um anestésico local ao realizar estes testes (Rosolen *et al.* 2009).

#### **2.3.1.1. Fluoresceína**

A fluoresceína consiste num corante amarelo alaranjado solúvel em água, que penetra no estroma hidrofílico, mas não no epitélio hidrofóbico (Turner 2008; Rosolen *et al.* 2009). Na presença de uma úlcera com exposição estromal, este adquire uma coloração verde fluorescente (Maggs 2008).

Existem diversas preparações deste corante, nomeadamente colírios de múltipla aplicação, soluções monodose ou no formato de papel impregnado (Turner 2008). Deve dar-se preferência às duas últimas pois os primeiros podem ser facilmente colonizados por microrganismos, nomeadamente *Pseudomonas aeruginosa* e Calicivírus felino (Featherstone *et al.* 2014).

O corante nunca é aplicado diretamente na córnea, pois pode levar a resultados erradamente positivos. Administra-se na conjuntiva superior ou deixando cair uma gota no olho (Turner 2008). O animal pestaneja, espalhando a fluoresceína e, de seguida, enxagua-

se com soro fisiológico estéril ou solução de limpeza para remover o excesso (Maggs 2008; Featherstone *et al.* 2014). Segue-se a observação do olho, com um transiluminador de Finoff, oftalmoscópio direto ou indireto ou biomicroscópio com lâmpada de fenda, usando filtro azul cobalto ou uma lâmpada de Wood (Maggs 2008).

Úlceras distintas coram de maneira diferente. Numa úlcera superficial, a fluoresceína adere à base e os contornos estão bem definidos; numa profunda, a base cora, mas como o corante se dispersa um pouco pelas margens, o contorno é mal definido; nas indolentes, a base está pigmentada e o halo que a rodeia é pouco corado, pois o líquido escorre pelas margens do *flap* epitelial; em situações de descemetocelo, é visualizado um centro preto (correspondente à membrana de Descemet exposta, que não retém fluoresceína) envolvido por um halo fluorescente; quando se dá o fenómeno de “*Melting cornea*”, surgem extensas área de estroma pigmentado; em casos de perfuração, para além do estroma exposto, cora também o humor aquoso que sai da câmara anterior e dilui o corante, apresentando-se sob a forma de pequenos veios de fluido a flutuar na córnea (Maggs 2008; Heinrich 2014).

O teste de Seidel é uma avaliação realizada para determinar se existe perfuração corneal. Para o realizar, aplica-se fluoresceína sobre a córnea e observa-se se esta penetra para o interior da camara anterior, surgindo veios de corante no humor aquoso (Heinrich 2014).

Queratopatias não ulcerativas também coram com fluoresceína. É importante saber reconhecê-las para poder diferenciá-las de uma verdadeira ulceração. Uma lesão corneal vascularizada, devido à tensão superficial, cora de forma difusa; o tecido de granulação, como é hidrofílico, retém fluoresceína; e um defeito estromal epitelizado, denominado faceta, também pigmenta. Neste último caso, se o olho for lavado com soro fisiológico, o corante é eliminado (Maggs 2008).

A fluoresceína é também usada na realização de exames de diagnóstico de outras doenças oculares, que podem estar associadas ao desenvolvimento de úlceras: avaliação da permeabilidade das vias lacrimais (teste de Jones) e da integridade do filme lacrimal (teste do Tempo de Rótura do Filme Lacrimal) (Maggs 2008).

### **2.3.1.2. Rosa Bengala**

Tal como a fluoresceína, existe em soluções e em tiras impregnadas e também para este corante, é preferível usar formulações descartáveis (Rosolen *et al.* 2009).

O Rosa Bengala cora de magenta células mortas ou desvitalizadas. Assim, em erosões da superfície da córnea, em que o estroma não é exposto, as células epiteliais ficam pigmentadas. Essencialmente, é utilizado no diagnóstico de úlceras da córnea associadas a

infecção por Herpesvírus, em que apenas se verifica uma descamação dendrítica epitelial (Maggs 2008; Turner 2008).

Como cora células superficiais quando o revestimento de mucina ou albumina está ausente, é usado para descartar alterações da película lacrimal (Featherstone *et al.* 2014).

As células neoplásicas também retêm Rosa Bengala, sendo, por isso, este corante utilizado para avaliar a extensão de uma neoplasia corneal ou conjuntival (Rosolen *et al.* 2009).

A fluoresceína é um corante muito seguro, que pode ser aplicado mesmo quando há perfuração ou rutura da úlcera, não prejudicando os restantes componentes do olho (Turner 2008). Já o Rosa Bengala, dependendo da dose, é tóxico para as células epiteliais normais, sendo que essa dose de toxicidade inclui a que normalmente se usa. Para além disso, em relação à fluoresceína, permanece mais tempo no olho após administração, causando desconforto (Rosolen *et al.* 2009). Por ser mais irritante, o Rosa Bengala é menos utilizado. Ainda assim, se tiver que se usar, deve optar-se por preparações de concentração igual ou inferior a 0.5% e enxaguar bem o olho no final da avaliação (Featherstone *et al.* 2014).

### **2.3.2. Análise laboratorial**

A colheita e análise de amostras do tecido corneal, regra geral, não são feitas em casos de ulceração simples. Reservam-se para situações mais graves como ulceração crónica, profunda ou não responsiva, queratomalácia, presença de corrimento ocular purulento, blefarite grave e/ou dermatite periocular (Maggs 2008).

A amostra obtida pode ser sujeita a várias análises laboratoriais: avaliação citológica, associada ou não a coloração (*Diff-quick* e Gram para bactérias e Ácido Periódico-*Schiff* para fungos); isolamento viral ou, mais utilizado recentemente, reação em cadeia da polimerase (PCR – polimerase chain reaction); análise serológica, como ensaio imunofluorescente (IFA - indirect immunofluorescence assay) e ensaio imunoenzimático (ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay); e cultura, que pode ser associada a testes de sensibilidade a antibióticos (TSA) (Dewhurst *et al.* 2014).

A colheita de amostras é feita na zona da córnea mais afetada, delicadamente, de forma a não roturar a úlcera. Se for para cultura, tem que se manter a assepsia durante todo o procedimento, usar material esterilizado e ter cuidado para não tocar em pelos, margens oculares e outros locais do globo (Rosolen *et al.* 2009). Pode ser necessário aplicar um colírio anestésico para realizar o procedimento, se o animal for agressivo ou irrequieto ou se forem efetuadas raspagens. Embora estes tenham conservantes que podem alterar os resultados das análises laboratoriais, especialmente das culturas, foi comprovado que é pouco provável que o façam (Maggs 2008; Turner 2008; Rosolen *et al.* 2009).

Para colheita das amostras podem utilizar-se materiais como cotonete, espátula de Kimura, escova de citologia ou extremidade de um cabo de bisturi. Este último é o mais frequente usado, por ser mais económico. Se se pretender investigar uma doença superficial, pode fazer-se uma “impressão citológica”, colocando uma lamela ou uma tira de celulose na superfície ocular (Turner 2008; Rosolen *et al.* 2009; Featherstone *et al.* 2014).

O diagnóstico de infeção bacteriana passa pela realização de uma avaliação citológica e cultura microbiológica. A determinação do envolvimento de fungos é feita por isolamento viral ou PCR. Se se quiser verificar a presença de fungos, podem colher-se amostras por queratectomia e realizar um exame histopatológico (Featherstone *et al.* 2014).

Podem ainda realizar-se outros exames complementares de diagnóstico com a finalidade de determinar a presença de potenciais causas ou fatores de exacerbação da ulceração. Tonometria, queratoscopia, microscopia especular, ultrassonografia, radiografia, tomografia computadorizada, ressonância magnética e ainda análise laboratorial de amostras de outros tecidos são alguns exemplos.

## **2.4. Tratamento**

Os objetivos do tratamento em caso de ulceração são controlar a inflamação, reduzir ao máximo a cicatriz que se origina, assegurar a integridade ocular e manter a capacidade visual do animal (Jaksz *et al.* 2020).

Independentemente do tipo de úlcera, o tratamento compreende sempre a remoção da causa e a eliminação ou prevenção de fatores de agravamento da lesão. Se o problema primário não for diagnosticado e eliminado ou controlado, o tratamento não produz efeito, e a úlcera pode não melhorar, progredir, ou na melhor das hipóteses, curar e reaparecer algum tempo depois (Miller 2001). Em todos os casos é necessário colocar um colar isabelino ao animal para prevenir auto traumatismos e evitar, assim, a exacerbação da ulceração. Isto é especialmente importante nas úlceras indolentes, em que o epitélio não aderente se remove com facilidade (Maggs 2008). Embora muitas vezes negligenciada, a limpeza da superfície ocular e do saco conjuntival com soluções de irrigação é também essencial para o sucesso da antibioterapia (Startup 1984). Comumente, usam-se para este efeito soro fisiológico estéril a 0.9% ou uma solução salina balanceada (Oliver *and* Smith 2014).

Dependendo da causa, da localização, do tamanho, da profundidade e da cronicidade da úlcera, se é ou não acompanhada por infeção ou queratomalácia, da tolerância do animal e da *compliance* do dono, de entre as opções terapêuticas médicas e cirúrgicas existentes selecionam-se as mais adequadas (Jaksz *et al.* 2020).

## 2.4.1. Opções terapêuticas médicas gerais

### 2.4.1.1. Antibioterapia tópica

Mesmo para casos de ulceração simples, em que não estão presentes sinais de infecção associados à lesão, é indicada a administração profilática de fármacos bactericidas de largo espectro topicamente, uma vez que a fragilidade do epitélio da córnea predispõe à penetração de agentes bacterianos (Maggs 2008; Marrion 2008). Na altura do diagnóstico geralmente já se deu colonização do estroma pelos agentes, pelo que, embora raramente empregue, é recomendada a realização de uma avaliação microbiológica mesmo nestas situações (La Croix 2018).

A preparação oftálmica polimixina B, neomicina e bacitracina atua contra um amplo espectro de agentes patogénicos, incluindo *Pseudomonas* spp., sensível à polimixina B, sendo, por isso, uma frequente escolha de primeira linha (Maggs 2008). A oxitetraciclina e a eritromicina constituem também boas opções (Ledbetter *and* Gilger 2014; Belknap 2015). O ácido fusídico, embora pouco eficaz contra bactérias Gram negativas, pode ser aplicado enquanto antibiótico profilático (Sanchez 2014). O mesmo acontece com o cloranfenicol que, apesar de não ser bactericida mas sim bacteriostático, apresenta um largo espectro de atuação e uma toxicidade mínima sobre o epitélio ocular (Sanchez 2014). Outras possibilidades são a gentamicina (Sanchez 2014), embora não ideal pela sua atividade citotóxica e antiproliferativa dos queratócitos (Regnier *et al.* 2014).

Uma úlcera que envolva o estroma, seja rapidamente progressiva ou apresente sinais de infecção (perda de estroma exuberante, infiltração de neutrófilos, queratomalácia, corrimento purulento), é considerada complicada e deve ser sempre alvo de uma avaliação citológica, cultura bacteriana e fúngica e TSA. Nestes casos, a seleção do antibiótico tópico deve ser feita com base no resultado do TSA, de forma a assegurar que o fármaco aplicado é o adequado e, assim, reduzir o desenvolvimento de resistências bacterianas. Ainda assim, é indicado iniciar-se antibioterapia empírica agressiva antes deste chegar (Maggs 2008).

Reservam-se para estas situações a administração de combinações de fluoroquinolonas de gerações iniciais (ciprofloxacina e ofloxacina), junções de um aminoglicosídeo (tobramicina) com uma cefalosporina de primeira geração (cefazolina) e aplicação isolada de fluoroquinolonas de últimas gerações (moxifloxacina) (Ledbetter *and* Gilger 2014).

As fluoroquinolonas atingem concentrações iniciais elevadas na córnea, apresentam um amplo espectro de atuação e reduzida toxicidade (Miller 2013).

Relativamente às fluoroquinolonas de primeiras gerações, a sua eficácia contra alguns *Streptococcus* spp. é baixa (Sanchez 2014), para além de que estão associadas a atrasos na regeneração epitelial e estromal (Mallari *et al.* 2001, citados por Sanchez 2014).

Num estudo recente, desenvolvido por Sharma *et al.*, publicado em 2019, a aplicação de gatifloxacina e moxifloxacina mostrou-se eficiente no tratamento da doença ulcerativa corneal, ao impedir o crescimento de bactérias Gram positivas e Gram negativas resistente às de segunda e terceira geração.

Quando a úlcera é profunda, podem ser dispensadas solução antibióticas fortificadas, que atingem altas concentrações no tecido corneal. A gentamicina e a tobramicina são exemplos de substâncias frequentemente empregues na elaboração destes produtos (Miller 2013). No entanto um estudo desenvolvido por Lin e Boehnke (2000) revelou que estas soluções podem ter um impacto negativo na cicatrização tecidual.

#### **2.4.1.2. Antifúngicos**

Para tratamento de infeções fúngicas, as preparações tópicas de polienos (natamicina, nistatina e anfotericina) são geralmente bem toleradas. A natamicina está comercialmente disponível como antifúngico de largo espetro, eficaz contra *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp.. Do grupo do azóis, destacam-se o fluconazol, o itraconazol, o quetoconazol e o variconazol (Miller 2013). O miconazol intravenoso pode ser aplicado topicamente (Marrion 2008). Frequentemente, é necessário realizar queratectomia acompanhada por um enxerto conjuntival, para eliminar a infeção e promover a regeneração (Ledbetter *and* Gilger 2014).

#### **2.4.1.3. Antivirais**

Como antivirais, normalmente usa-se a combinação idoxuridina, trifluridina e cidofovir (Ledbetter *and* Gilger 2014). Outras substâncias como o aciclovir, o valaciclovir e o ganciclovir também podem ser aplicadas (Miller 2013).

#### **2.4.1.4. Agentes midriáticos cicloplégicos**

Quando ocorre lesão do epitélio corneal, há estimulação dos nervos sensitivos aí presentes, o que desencadeia um reflexo neurogénico originando uma uveíte reflexa, associada a miose da pupila, hiperémia da íris, desconforto e dor (Ledbetter *and* Gilger 2014; Belknap 2015). A tropicamida a 1% e o sulfato de atropina a 1% são agentes midriáticos e cicloplégicos que paralisam os músculos ciliares, proporcionado mais conforto ao animal (Miller 2001; Ledbetter *and* Gilger 2014). Existem sob a forma de colírio ou pomada e a sua administração é feita até se observar o efeito desejado (Maggs 2008; Marrion 2008). Ainda assim, não devem ser ultrapassadas quatro administrações diárias, pois a sua absorção

sistêmica pode gerar efeitos adversos (Sanchez 2014). Por estar relacionado com um decréscimo da produção lacrimal, a atropina deve ser usada com cautela, especialmente em animais cujas úlceras estão associadas a queratoconjuntivite seca (Maggs 2008).

#### **2.4.1.5. Anti-inflamatórios**

Corticosteroides tópicos são contraindicados por limitarem as defesas imunitárias corneanas, aumentando o risco de infecção, atrasarem a regeneração epitelial e exacerbarem a destruição enzimática dos tecidos da córnea, ao estimularem a libertação de colagenases pelos neutrófilos (Maggs 2008; Oliver *and* Smith 2014).

A aplicação de anti-inflamatórios não esteroides (AINES) nestes casos é um tema controverso. Embora indicada para reduzir a inflamação ocular e aumentar o conforto do paciente, estudos em humanos relacionam a aplicação tópica destas substâncias à progressão de úlceras infetadas e até rutura do globo ocular por malácia exuberante (Belknap 2015). Segundo Rigas *et al.* (2019), este severo efeito adverso dos AINES tópicos está associado a fatores inerentes ao paciente como doenças imunomediadas, diabetes e comprometimento do tecido ocular, pelo que não devem ser administrados em situações de ulceração corneal. Ainda assim, é feito, sendo os mais frequentemente ministrados o diclofenaco, o flurbiprofeno e o cetorolaco de trometamina, numa frequência de uma (SID) a duas (BID) vezes ao dia (Belknap 2015).

Se o paciente se apresentar muito desconfortável, é aconselhada a administração oral de AINES (Maggs 2008; Marrion 2008), tais como carprofeno, ácido acetilsalicílico e flunixina meglumina (Oliver *and* Smith 2014). Ainda assim, o uso prolongado de AINES orais está associado a um atraso no desenvolvimento vascular, essencial na cicatrização de úlceras (Maggs 2008). Por isso, embora possam ser usados, devem sê-lo com muito cuidado.

#### **2.4.1.6. Analgésicos**

Se o animal apresentar dor intensa, recomenda-se a administração de um analgésico sistémico nas primeiras 24 horas (Belknap 2015), nomeadamente um opióide (Sanchez 2014), embora segundo Clark *et al.* (2011) estes sejam insuficientes no controlo da mesma. Os anestésicos tópicos nunca são incluídos no plano terapêutico pois são epiteliotóxicos e demonstraram estar associados a queratopatia neutrófica (Heigle *and* Pflugfeldr 1996, citados por Sanchez 2014).

De acordo com um estudo de Lelescu *et al.* (2020), a administração tópica ocular de tramadol mostrou bons efeitos anestésicos.

### 2.4.1.7. Agentes anticolagenases

Na doença ulcerativa corneal, a ação das colagenases oculares (MMPs e proteases séricas) encontra-se aumentada. Este fenómeno é particularmente exuberante na presença de colagenólise. Por esse motivo, é recomendada a administração de inibidores destas enzimas, de forma a normalizar a sua atividade proteolítica e reduzir a progressão da lesão, acelerar a regeneração tecidual e minimizar a cicatriz gerada (Ledbetter *and* Gilger 2014).

Os vários agentes com ação antiproteolítica encontram-se descritos na tabela 1 (elaborada com base em Ledbetter *and* Gilger 2014 e Oliver *and* Smith 2014). Alguns deles apresentam mecanismos de atuação diferentes e, por isso, podem ser combinados para ação sinérgica (Oliver *and* Smith 2014). De entre todos, o soro sanguíneo é o produto de eleição, uma vez que apresenta simultaneamente atividade contra MMPs e proteinases e tem efeito epiteliotrópico (Maggs 2008; Oliver *and* Smith 2014).

**Tabela 1:** Agentes anticolagenases, concentração em que são usados, ação e mecanismo de ação.

	<b>Concentração</b>	<b>Ação</b>	<b>Mecanismo de ação</b>
<b>Soro sanguíneo (<math>\alpha</math>2-macroglobulina e <math>\alpha</math>1-antitripsina)</b>	normalmente 20%	Inibidor de MMPs e proteinases séricas	Vários
<b>Tetraciclina (doxiciclina e oxitetraciclina)</b>	0.1%*	Inibidor de MMPs	Quelação de catiões ( $\text{Ca}^{2+}$ e $\text{Zn}^{2+}$ ) Inibição da expressão génica Inibição da degradação da $\alpha$ 1-antitripsina Inibição da leucotaxia (Herring 2007)
<b>N-acetilcisteína</b>	5-10%**	Inibidor de MMPs	Quelação de catiões ( $\text{Ca}^{2+}$ e $\text{Zn}^{2+}$ )
<b>Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)</b>	0.2%	Inibidor de MMPs	Quelação de catiões ( $\text{Ca}^{2+}$ e $\text{Zn}^{2+}$ )
<b>Ilomostato</b>	0.1%	Inibidor de MMPs	Quelação de catiões ( $\text{Ca}^{2+}$ e $\text{Zn}^{2+}$ )

<b><math>\alpha</math>1-antitripsina</b>	0.1%	Inibidor de proteínase sérica	Aprisionamento da proteínase
--	------	----------------------------------	---------------------------------

\* A doxiciclina pode também ser administrada oralmente (10 mg/Kg, SID).

\*\* Concentrações acima dos 20% estão associadas a necrose do epitélio.

#### **2.4.1.8. Substitutos lacrimais**

As lágrimas artificiais são largamente utilizadas não só no manejo de alterações quantitativas e qualitativas da película lacrimal, como também em situações de ulceração corneal (Maggs 2008), por funcionarem como lubrificante e proporcionarem mais conforto ao paciente, auxiliarem na eliminação de resíduos superficiais e permitirem ao epitélio desempenhar a sua função de barreira (Oliver *and* Smith 2014). Existem vários tipos de miméticos lacrimais: substitutos lacrimais aquosos, substitutos lacrimais à base de lípidos, mucinomiméticos e viscoelastina. A presença de conservantes nas soluções ou pomadas dos substitutos lacrimais convencionais impede o crescimento microbiano. No entanto, são epiteliotóxicos, interferem na estabilidade da película lacrimal e podem desencadear reações de hipersensibilidade (Oliver *and* Smith 2014).

#### **2.4.1.9. Vitaminas**

O uso de vitaminas é recomendado quando há conhecimento de carências vitamínicas específicas associada à doença (por exemplo, vitamina A). Caso contrário, a sua aplicação não produz efeitos consideráveis (Maggs 2008).

### **2.4.2. Úlceras superficiais**

Após remoção da causa e eliminação ou prevenção de fatores de agravamento, as lesões superficiais devem cicatrizar com facilidade e relativa rapidez (Sanchez 2014). O tratamento instituído nestes casos é de caráter médico e consiste na aplicação de antibiótico tópico e, normalmente, de colírio midriático cicloplégico (Ledbetter *and* Gilger 2014).

A frequência de administração do antibiótico varia consoante a gravidade da situação, mas geralmente é três (TID) ou quatro (QID) vezes ao dia. Já o agente midriático cicloplégico é administrado normalmente BID ou TID (Ledbetter *and* Gilger 2014).

A monitorização destes animais é realizada uma semana após o início do tratamento, altura na qual as suas lesões já devem ter cicatrizado. Caso não se verifiquem melhorias, devemos considerar que se trata de uma úlcera complicada devido à persistência da causa subjacente, a agravamento por infeção secundária ou por tratar-se de um DECCE. O próximo passo consiste em reexaminar o animal, fazer citologia, cultura e TSA e confirmar a suspeita, ao invés de alterar a antibioterapia, como muitas vezes se faz (Maggs 2008).

### 2.4.3. Úlceras complicadas

Se a lesão inicial envolver o estroma, mas não progredir, deve ser abordada de uma forma semelhante às superficiais e acompanhada de monitorizações frequentes (Miller 2001). Se a úlcera for progressiva, o tratamento instituído tem que ser mais agressivo, para travar a evolução da situação e não comprometer a capacidade visual do doente (Miller 2001). Assim, nestes casos, para além do antibiótico e do agente midriático cicloplégico, é essencial administrarem-se inibidores das colagenases (Ledbetter and Gilger 2014). Se se verificar o envolvimento de agentes fúngicos ou virais, administra-se também um antifúngico ou viral (Ledbetter *and* Gilger 2014).

Frequentemente, nas primeiras 48 horas, os antibióticos tópicos são administrados a cada 2 a 4 horas para atingir concentrações terapêuticas na córnea. De seguida, a frequência passa a cada 6 horas (Belknap 2015). Na presença de colagenólise, a antibioterapia é feita a cada hora nos primeiros 2 dias (Ledbetter *and* Gilger 2014).

Em casos de infeções, devem evitar-se antibióticos em pomada e optar-se por colírios, pois na eventualidade de ocorrer perfuração, podem causar uveíte granulomatosa (Maggs 2008). Há animais que podem beneficiar do uso de antibiótico subconjuntival (amicacina, ampicilina, cefazolina, gentamicina), como adjuvante do tratamento tópico (Marrion 2008).

Relativamente aos agentes anticolagenases, a frequência de administração varia consoante a lesão. Se esta progredir rapidamente, pode iniciar-se o tratamento com aplicações a cada 30-60 minutos e, à medida que o animal vai melhorando, aumenta-se progressivamente o intervalo entre administrações até 6 horas (Maggs 2008; Belknap 2015).

Uma úlcera profunda tem indicação cirúrgica quando mais de metade da córnea está afetada ou quando não responde ao tratamento médico e persiste ou progride (Belknap 2015; Jaksz *et al.* 2020).

O tratamento cirúrgico inicia-se com o desbridamento do estroma afetado (queratectomia), seguido da realização de um procedimento de reconstrução ou suporte (Sanchez 2014). São várias as técnicas que podem ser feitas: *flap* ou enxerto conjuntival, *flap* da terceira pálpebra, tarsorrafia lateral temporária ou queratoplastia (Jaksz *et al.* 2020).

A seleção da técnica depende da localização e profundidade da úlcera, da presença/ausência de doenças concomitantes e da experiência e conhecimentos do cirurgião (Jaksz *et al.* 2020).

De entre todas as opções, o *flap* ou enxerto conjuntival de pedículo rotacional é a escolha mais frequente (Ledbetter *and* Gilger 2014). Para além do suporte físico que conferem à córnea fragilizada, asseguram a sua vascularização, permitindo a chegada de fatores de crescimento, fibroblastos, proteinases inibidoras, nutrientes, componentes imunitários e antibióticos sistémicos à zona lesada (Miller 2001; Maggs 2008; Ledbetter *and* Gilger 2014).

Apesar destes retalhos cobrirem uma parte da superfície corneal, esta é parcial e não impede ao clínico e tutor avaliarem a progressão da situação (Ledbetter *and* Gilger 2014).

Existem ainda outros tipos de enxertos conjuntivais: os livres ou em ilha, que têm a desvantagem de não serem vascularizados; os totais, completos ou de 360°, que têm a inconveniência de retraírem precocemente mas que podem ser necessários em lesões grandes e centrais; os de ponte ou bipediculados, normalmente realizados em úlceras centrais, em que o suprimento sanguíneo é crítico, ou lacerações lineares; e os de avanço simples, de capuz ou de 180°, que são aplicados em úlceras periféricas, como as dorsais ou do limbo (Maggs 2008; Ledbetter *and* Gilger 2014).

O *flap* da terceira pálpebra é uma técnica pouco usada atualmente pois embora funcionem como um "penso" que reduz a dessecação e fricção corneal, apresentam alguns efeitos potencialmente deletérios (a penetração da medicação fica comprometida e não é possível monitorizar a progressão da ferida). Em comparação, a tarsorrafia lateral temporária é uma técnica mais fácil de executar que, para além de proteger a córnea, permite a chegada de fármaco à lesão e o acompanhamento do estado do olho (Maggs 2008).

Queratoplastias consistem no transporte de enxertos de tecido corneal para a zona lesada. São classificadas de acordo com a origem do enxerto em autólogas (provenientes de tecido saudável do animal), homólogas (obtidos a partir de dadores) ou heterólogas (formulados a partir de biomateriais como membrana amniótica, submucosa intestinal do suíno, pericárdio, cápsula renal e bexiga) e, segundo a profundidade, como lamelar ou penetrante (Jaksz *et al.* 2020).

A técnica de transposição corneoescleral ou corneoconjuntival assegura a vascularização da córnea no início do processo de cicatrização (Jaksz *et al.* 2020) e, como faz uso de tecido do próprio animal, a possibilidade de rejeição é mínima (Ledbetter *and* Gilger 2014). Apresenta algumas vantagens em relação ao *flap* conjuntival, nomeadamente promover uma maior transparência ocular, sendo mais apropriado para lesões que afetam o eixo visual (Sanchez 2014). Ainda assim, algumas limitações estão associadas a este procedimento. Uma vez que requer a existência de uma determinada quantidade de córnea saudável no olho afetado, é reservada apenas para defeitos de dimensões pequenas ou médias (Andrew *et al.* 2001, citados por Jaksz *et al.* 2020).

Uma outra técnica que faz uso de um enxerto do tipo autólogo é a transposição de tecido corneal periférico saudável obtido a partir do olho ipsilateral. Este procedimento assegura a manutenção da transparência ocular e a integridade do globo. O tecido dador utilizado encontra-se sempre disponível e é muito bem tolerado pelo animal. Apesar das vantagens que lhes estão associadas, é cada vez menos utilizada (Jaksz *et al.* 2020).

A membrana amniótica apresenta propriedades antifibróticas, antiangiogénicas, antiproteinases e anti-inflamatórias, que aceleram o processo de reconstrução superficial (Ledbetter *and* Gilger 2014). Num estudo desenvolvido por Vongsakul *et al.* (2009), a combinação da colocação de um enxerto de membrana amniótica à técnica de *flap* conjuntival, comparativamente ao uso isolado desta última, permitiu uma redução do tempo de cicatrização lesional.

Em úlceras estromais de diâmetro inferior a 2 ou 3 mm ou lacerações refratárias, pode optar-se por, em substituição à cirurgia, realizar-se encerramento primário usando adesivos de cianoacrilato (“cola”), que apenas exige anestesia tópica (Maggs 2008). É contraindicada a realização deste procedimento quando o estroma que envolve a úlcera não está normal (por exemplo, em situações de colagenólise) (Maggs 2008).

Apesar de os adesivos não proporcionarem ao defeito as vantagens biológicas que os *flaps* conjuntivais dão, estimulam o crescimento de vasos sanguíneos, são antimicrobianos e funcionam como um bom suporte estrutural (Maggs 2008).

#### **2.4.4. Descemetocelo e Perfuração**

A formação de descemetocelo deve ser considerada uma emergência médica, pois pode levar a perfuração ocular, com graves consequências para o doente (Belknap 2015).

São várias as cirurgias que podem ser realizadas nestes casos. O uso exclusivo de *flap* conjuntival de pedículo rotacional deve ser realizado apenas se o diâmetro do defeito for inferior a 5 mm. Se a lesão for muito larga, o *flap* encerra-a, mas não consegue sustentá-la e dá-se a saída de humor aquoso, a formação de sinéquia anterior, uma exuberante reação inflamatória e a criação de uma cicatriz extensa (Ledbetter *and* Gilger 2014; Belknap 2015). Quando o tamanho da úlcera ultrapassa os 5 mm de diâmetro, tem que se associar um enxerto ao retalho conjuntival (Miller 2001). Segundo Belknap (2015), se a córnea envolvente estiver normal, o melhor é realizar enxertos de transposição corneconjuntivais.

É completamente desaconselhada a colocação de adesivos, não só pelo risco de toxicidade associado, mas também pelos efeitos deletérios que a elevação da temperatura aquando a polimerização da cola podem causar (Ledbetter *and* Gilger 2014; Belknap 2015).

Do foro médico, está indicada prescrição de antibioterapia tópica, administração de um agente midriático cicloplégico, de modo a reduzir a possibilidade de formação de sinéquias anteriores (se a íris prolapsar este é contraindicado) e ainda o uso de um antibiótico sistémico que atinja uma boa concentração ocular, normalmente amoxicilina e ácido clavulânico ou uma cefalosporina (Marrion 2008; Belknap 2015).

Se a úlcera for pequena (diâmetro inferior a 1 ou 2 mm), a câmara anterior não estiver afetada e a íris não prolapsar, a abordagem pode passar apenas por tratamento médico associado a repouso absoluto (Belknap 2015).

#### **2.4.5. DECCE**

Nos DECCE, a membrana basal e a porção anterior do estroma apresentam-se alterados, impedindo a adesão do epitélio. Desta forma, nestes casos, a prescrição isolada de fármacos raramente é suficiente para resolver a lesão (Sanchez 2014).

Após estabelecimento do diagnóstico de DECCE, os tutores devem ser informados da necessidade de realizar tratamento frequente e que é possível a recorrência no mesmo olho ou no contralateral (Ledbetter *and* Gilger 2014).

Também para estes casos existem múltiplas terapêuticas. Como primeira abordagem, pode realizar-se o desbride do epitélio solto com ponta de algodão, ponta de diamante, extremidade de um bisturi, espátula Kimura, espátula de íris ou pinça de dentes finos, sob anestesia ou sedação (Ledbetter *and* Gilger 2014). Neste procedimento, remove-se todo o epitélio lesado, de forma a estimular a proliferação do epitélio adjacente saudável e promover a sua adesão (Moore 2003). Esta técnica pode ser repetida ao fim de cada 7 a 14 dias (Ledbetter *and* Gilger 2014).

De seguida, inicia-se o tratamento médico profilático, com antibiótico tópico BID, TID ou QID (Maggs 2008; Marrion 2008). Na escolha do antibiótico a aplicar, deve ter-se em consideração que a gentamicina apresenta ação epiteliotóxica e que, pelo contrário, a oxitetraciclina demonstrou acelerar a cicatrização epitelial. Deste modo, deve excluir-se do plano terapêutico destes animais o primeiro fármaco e priorizar-se o uso do segundo (Moore 2003; Chandler *et al.* 2010).

Para além do antibiótico, faz parte do tratamento médico um colírio midriático cicloplégico para ajudar a controlar a uveíte reflexa (Maggs 2008; Marrion 2008).

Em casos refratários, que não se resolvem após 2 a 3 desbridamentos, pode associar-se uma queratectomia superficial com queratotomia em grelha ou punctiforme (Ledbetter *and* Gilger 2014).

Quando isolado, o desbridamento com cotonete estéril não apresenta uma taxa de eficácia muito elevada. Num estudo retrospectivo de Stanley *et al.* (1998), em 63% dos avaliados o defeito resolveu-se com a realização de apenas um desbridamento, ao passo que em 21% esta técnica teve que ser repetida. Se associada a queratectomia, o êxito da terapêutica aumenta para os 100%. No entanto, esta última implica anestesia geral do paciente, é dispendiosa, requer profissionais especializados e instrumentação especial e, se mal executada, a cicatriz gerada pode ser exuberante (Stanley *et al.* 1998).

O desbridamento com ponta de diamante apresenta várias vantagens quando comparada com a queratectomia: é relativamente barato e simples de efetuar, não sendo necessário equipamento refinado e técnicos especializados; dispensa a administração de anestésico geral se o animal puder ser devidamente contido; a cicatriz formada é mínima; a taxa de recorrência da lesão é baixa, e mesmo que esta se verifique, facilmente se repete o procedimento sem exacerbar a cicatriz (Gosling *et al.* 2013).

Por apresentar elevadas taxas de sucesso, ser segura e minimamente invasiva, este procedimento é atualmente o de eleição para estes casos (Dawson *et al.* 2015).

Como terapêuticas auxiliares cirúrgicas, para proteger a superfície corneal e aumentar o conforto do animal, podem ser realizados *flap* da terceira pálpebra, colocados enxertos de membrana amniótica, aplicados adesivos de cianoacrilato ou empregues lentes de contacto (Ledbetter *and* Gilger 2014). Relativamente às lentes de contacto, para além de protegerem a córnea, devido ao seu efeito de sucção, elevam a tensão superficial e promovem a adesão do epitélio (Maggs 2008; Belknap 2015).

Do foro médico, é ainda possível recorrer à administração de pomadas ou soluções oftálmicas hipertónicas, como cloreto de sódio a 5% (para reduzir o edema se presente), termoqueratoplastia (se o edema persistir) (Miller 2001; Maggs 2008; Marrion 2008) e substâncias ou compostos que demonstraram facilitar o processo de regeneração epitelial, como glicosaminoglicanos polifosfatos, aprotinina, fator de crescimento epidermal, substância P ou substância P combinada com fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1, sulfato de condroitina associado a antibiótico, fibronectina, doxiciclina ou tetraciclina e ainda soro autólogo (Ledbetter *and* Gilger 2014).

### **3. Plasma autólogo**

Já há algumas décadas que foi proposta a utilização de produtos derivados do sangue em formato de colírio no tratamento de doenças da superfície ocular. Desde então, a crescente investigação do uso de fluídos biológicos tem vindo a provar que, de facto, estes influenciam positivamente a recuperação dos tecidos oculares (Giannaccare *et al.* 2017).

Os produtos derivados sanguíneos podem ser obtidos do próprio paciente (autólogos), de dadores da mesma espécie (homólogos) ou de espécies diferentes (heterólogos) (Giannaccare *et al.* 2017; Bernabei *et al.* 2019). Os preparados de sangue autólogos incluem o soro e o plasma autólogo. Das fontes homólogas fazem parte o soro alogénico de sangue periférico de um animal saudável ou o soro proveniente do cordão umbilical coletado no momento do parto (Giannaccare *et al.* 2017), e das heterólogas, o soro fetal bovino (Wu, Stachon *et al.* 2017). De entre os referidos anteriormente, o soro autólogo é o produto mais comumente utilizado, sendo substituído por produtos proveniente de outros animais quando

contraindicado (Giannaccare *et al.* 2017). Em paciente com doenças sistêmicas como anemia, doenças imunomediadas e infecciosas, está desaconselhado o uso de produtos elaborados a partir do seu sangue (Chiang *et al.* 2009, citados por Marchand *et al.* 2018).

Para obter soro sanguíneo, após a colheita de sangue venoso do paciente, este é colocado num tubo sem anticoagulante e deixado à temperatura ambiente. Depois de ocorrer a coagulação, o tubo é centrifugado e o coágulo removido. O líquido remanescente é o soro (Liu, Hartwig, Harloff, Herminghaus, Wedel, Geerling 2005; Latham 2021).

De forma a separar o plasma do sangue total, após a sua colheita, este é transferido para um tubo com anticoagulante e, posteriormente, centrifugado (Latham 2021). Finalizada a centrifugação, os componentes do sangue distribuem-se por 3 frações no tubo: no fundo depositam-se os eritrócitos (cerca de 45% do volume total), à superfície encontra-se o plasma (aproximadamente 55%) e, entre estes, está o *buffy coat* composto por leucócitos e plaquetas (menos de 1%) (Kuruc *et al.* 2020).

O soro é um dos constituintes do plasma sanguíneo. Estes têm uma composição idêntica, excetuando os fatores de coagulação, de onde se detaca o fibrinogénio, que estão presentes somente no plasma (Kuruc *et al.* 2020; Latham 2021).

### **3.1. Composição e atuação enquanto substituto lacrimal**

A película lacrimal, para além de lubrificar a superfície ocular, é responsável pela manutenção da integridade e viabilidade do epitélio corneal (Poon *et al.* 2001). Tem na sua composição fatores de crescimento, fibronectina, neuropéptidos, vitaminas, nutrientes e fatores antibacterianos e apresenta propriedades óticas e mecânicas que asseguram a manutenção da estrutura da córnea e o seu normal funcionamento (Geerling 2004).

O soro sanguíneo tem uma constituição semelhante. É rico em fatores de crescimento, como o fator de crescimento epitelial (EGF), o TGF  $\beta$  e o PDGF e fibronectina, que promovem a viabilidade, proliferação, migração e diferenciação das células do epitélio corneal (Tsubota *et al.* 1999; Poon *et al.* 2001; Geerling 2004); vitaminas, como a vitamina A, que previne a metaplasia escamosa das células epiteliais (Tsubota *et al.* 1999); albumina, com função antipoptótica e promotora da viabilidade celular (Shimmura 2003); fatores antibacterianos como a IgG e a lisozima, que reduzem a possibilidade de infeção do epitélio comprometido (Associação Portuguesa de Farmacêuticos Hospitalares 2008); fatores proneurais, como a substância P (neuropéptido), fator de crescimento semelhante à insulina e fator de crescimento nervoso, que auxiliam na regeneração dos nervos e no restabelecimento da topografia da inervação (Goyal *and* Hamrah 2016, citados por Marchand *et al.* 2018) e ainda  $\alpha$ 2-macroglobulina e a  $\alpha$ 1-tripsina, inibidoras de proteinases (Brooks *and* Ollivier 2004). A  $\alpha$ 1-tripsina atua especificamente contra proteinases séricas. Ao passo que a  $\alpha$ 2-macroglobulina,

presente em grande concentração no soro sanguíneo, tem capacidade de interferir tanto na ação das proteinases séricas como das MMPs. Adicionalmente, a sua conformação permite-lhe aprisionar simultaneamente duas proteinases, eliminando-as ao mesmo tempo (Hibbetts *et al.* 1999, citados por Brooks *and* Ollivier 2004).

### **3.2. Aplicação em doenças oftalmológicas**

A aplicação de soro autólogo é mais vantajosa do que a administração de substitutos lacrimais quando a película lacrimal se apresenta anormal uma vez que a composição do soro sanguíneo é muito mais complexa que a da lágrima artificial (Poon *et al.* 2001).

Para além disso, os produtos derivados do sangue do animal são isentos de conservantes e outros aditivos (Tsubota *et al.* 1999) e, uma vez que provêm do próprio paciente, são antialérgicos (Geerling 2004).

Atualmente, a soroterapia autóloga é utilizado em oftalmologia humana no tratamento de várias doenças como *secura* grave dos olhos, queratoconjuntivite seca, defeitos epiteliais persistentes, queratopatia neurotrófica e como adjuvante na reconstituição da superfície ocular (Geerling 2004; Shtein *et al.* 2019). Já em veterinária, é mais frequentemente aplicada enquanto agente anticolagenase no maneio de úlceras profundas (Brooks *and* Ollivier 2004; Maggs 2008; Turner 2008; Ledbetter *and* Gilger 2014; Sanchez 2014; Belknap 2015).

Em relação ao tratamento de lesões corneanas, o soro autólogo mostrou ser eficaz, ao fornecer fatores de crescimento que se apresentam diminuídos quando ocorrem defeitos do olho (Quinto *et al.* 2008; Yamada *et al.* 2008; Cho *et al.* 2012; Lekhanont *et al.* 2013; Semeraro *et al.* 2014) e por conter inibidores de colagenases séricas que impedem a ocorrência do fenómeno de degradação enzimática (Brooks *and* Ollivier 2004; Conway 2015).

O uso do plasma autólogo no maneio de doenças oculares está muito pouco documentado. A partir do plasma podem obter-se preparações com elevados níveis de fatores de crescimento (plasma rico em plaquetas, plasma rico em fatores de crescimento e lisado plaquetário) que demonstraram suportar a proliferação de células epiteliais corneais a um nível elevado (Del Cid *and* Escoriaza 2009; Fea *et al.* 2016; Yazawa *et al.* 2003; Alio, Abad *et al.* 2007; Alio, Pastor *et al.* 2007; Ortuno-Prados *and* Alio 2011; Alio, Arnalich-Montiel *et al.* 2012; Javaloy *et al.* 2013; Alio, Rodriguez *and* WróbelDudzińska 2015, citados por Alio, Rodriguez, Abdelghany *et al.* 2017).

### **3.3. Preparação**

Não existem até à data protocolos universais que estabeleçam normas para a preparação, armazenamento e administração de produtos derivados do sangue (Giannaccare *et al.* 2017).

Tanto em termos qualitativos como quantitativos, a composição do soro autólogo entre os dias 7 e 42 de armazenamento em refrigeração variou consideravelmente entre grupos (Tsubota *et al.* 1999; Bradley *et al.* 2009; Fischer *et al.* 2012). Segundo Marchand *et al.* (2018), para assegurar a sua viabilidade e esterilidade, este deve ser guardado a 4-8°C por períodos inferiores a 7 dias ou congelado a -20°C se mantido durante mais tempo.

A percentagem de soro em solução em medicina humana é, normalmente, 20% (Giannaccare *et al.* 2017). Esta diluição é realizada de forma a diminuir os níveis dos seus componentes para valores compatíveis com o fisiológico (Giannaccare *et al.* 2017). Para além disso, com esta diluição pretende-se também evitar a irritação ocular provocada pelas preparações concentradas mais viscosas e ainda reduzir-se o número de colheitas necessárias (Koffler 2006, citado por Quinto *et al.* 2008). No entanto, ensaios realizados com concentrações na ordem dos 50% (Jeng *and* Dupps 2009) e 100% (Lekhanont *et al.* 2013) apresentaram bons resultados.

### **3.4. Efeitos adversos e riscos associados**

Sendo o plasma um fluido corporal biológico isento de conservantes, a transmissão de doenças infecciosas é um risco associado ao seu uso. Esta pode ocorrer por contaminação do produto aquando a sua preparação ou manuseamento (Giannaccare *et al.* 2017). Por essa razão, é necessário ter o cuidado de manter a assepsia durante a elaboração do produto e dar instruções aos donos sobre a sua correta administração e armazenamento (Geerling 2004; Marchand *et al.* 2018; Shtein *et al.* 2019).

Apesar de os doentes com infeções sistémicas poderem ter acesso a este tratamento, a aplicação de derivados sanguíneos infetados não deve ser realizada, pois há risco de aplicar erradamente um produto autólogo a um outro animal (Marchand *et al.* 2018).

Estudos clínicos em Medicina humana destacam a segurança e eficácia da aplicação de produtos derivados do sangue (Giannaccare *et al.* 2017).

Para a maioria dos animais, o tratamento com soro autólogo é bem tolerado e está associado a uma melhoria dos sinais de desconforto ocular (Quinto *et al.* 2008). Embora raros, foram já descritos efeitos adversos decorrentes da sua utilização como aumento do desconforto, epiteliopatia ligeira, conjuntivite bacteriana e eczema das pálpebras (López-García *et al.* 2008, citados por Quinto *et al.* 2008). McDonnell *et al.* (1988) verificaram a ocorrência de deposição de imunoglobulinas na córnea quando utilizado soro a 100%.

### **CAPÍTULO III – Utilização de plasma no tratamento de úlceras da córnea no cão: estudo retrospectivo de 30 casos**

O estudo da aplicação de colírios derivados do sangue em oftalmologia foi iniciado já há algumas décadas e tem vindo a demonstrar o seu potencial acelerador da cicatrização tecidual.

De entre estes, o soro obtido a partir do sangue do próprio paciente é o produto mais commumente utilizado sendo, por isso, largamente estudado. Em medicina humana o uso de colírios de soro autólogo no tratamento de doenças do foro ocular está associado a uma maior estabilidade da película lacrimal, uma mais rápida cicatrização epitelial e transparência corneal, sem aumento da vascularização ou fibrose (De Pascale *et al.* 2015).

O plasma e o soro sanguíneo apresentam uma constituição muito semelhante. A diferença entre estes é que o primeiro contém fatores de coagulação, dos quais se destaca o fibrinogénio, ao passo que o segundo não (Kuruc *et al.* 2020; Latham 2021). Para efeitos do presente estudo, assume-se como idêntica a composição e, por isso, também a ação, destas substâncias, uma vez que a bibliografia referente ao uso de plasma quer em Medicina Humana, quer em Medicina Veterinária, é muito escassa.

A realização de estudos retrospectivos acerca da aplicação de fármacos ou produtos no tratamento de várias doenças é útil, na medida em que permite conhecer novos dados acerca destes e das doenças consideradas.

Com este trabalho procuramos contribuir para o aumento do conhecimento das vantagens associadas à utilização de plasma autólogo no tratamento de úlceras da córnea em cães.

#### **1. Objetivos**

Os principais objetivos do estudo realizado foram:

- Caracterizar a amostra em estudo;
- Caracterizar as úlceras da córnea em relação à sua apresentação clínica;
- Analisar os tratamentos adotados consoante o quadro clínico;
- Registrar a ocorrência de efeitos adversos decorrentes da utilização de plasma autólogo;
- Avaliar a eficácia da utilização de plasma autólogo, comparando o tempo de cicatrização nas situações de ulceração superficial quando este foi ou não aplicado e de acordo com a frequência de aplicação em lesões graves (indolentes e profundas).

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Tipo de estudo e recolha de dados**

Da amostra utilizada na análise estatística fazem parte cães (n=30) diagnosticados com doença ulcerativa da córnea no período compreendido entre 1 de setembro de 2020 e 28 de fevereiro de 2021 no HRVM, de diferentes raças, sexos e idades.

A recolha dos dados necessários foi feita por consulta das fichas clínicas dos pacientes, registadas no programa informático *WinVet®*, com consentimento do Dr. Luís Miguel Fonte Montenegro, diretor clínico do HRVM. Por essa razão, este estudo é classificado como retrospectivo. Ainda assim, foi possível assistir presencialmente a determinadas consultas de reavaliação de alguns dos indivíduos incluídos no estudo.

Dos animais selecionados foram recolhidas informações gerais, como nome, raça, sexo e idade e ainda todos os dados clínicos considerados relevantes para o estudo, nomeadamente o tipo de úlcera, a dimensão, o plano terapêutico instituído, a evolução clínica e o tempo decorrido até à recuperação.

Admitiu-se como unidade experimental a ocorrência de um episódio de ulceração corneal num animal. Deste modo, pacientes que apresentaram episódios de recidivas durante o decorrer do estudo, foram considerados mais do que uma vez.

### **2.2. Critérios de seleção e exclusão da amostra**

Todos os animais selecionados foram sujeitos a um exame oftalmológico completo em ambos os olhos, que compreendeu, pela ordem descrita, as seguintes etapas:

1. Observação do olho e estruturas perioculares externas;
2. Avaliação da produção lacrimal mediante a realização do teste de Schirmer (I-DEW tearstrips®; Kunze Indopharm B.V.; Den Haag, Países Baixos);
3. Exame neuro-oftálmico, que inclui a avaliação da resposta de ameaça e dos reflexos palpebral, corneano, pupilar direto e consensual;
4. Biomicroscopia com lâmpada de fenda (Kowa Product SL15®; Kowa Ophthalmic Diagnostic Products; Tóquio, Japão) em sala escura, para avaliação dos componentes oculares anteriores;
5. Oftalmoscopia direta (767s®; WelchAllyn; Nova Iorque, Estados Unidos da América) em sala escura, para observação do fundo do olho;
6. Medição da PIO por tonometria por aplanção (Tono-Pen® XL; Medtronic Solan; Jacksonville, Florida, Estados Unidos da América);
7. Aplicação de corante fluoresceína (Fluotest® Multidose; Alcon; Genebra, Suíça) para confirmar a presença/ausência de lesão na córnea.

Primeiramente, foram selecionados os animais com diagnóstico confirmado de ulceração corneana, ou seja, com resultado positivo no teste de coloração com fluoresceína, independentemente dos resultados das restantes avaliações. Posteriormente, aquando da avaliação dos diferentes casos, constatou-se que apenas ocorreram úlceras desceméticas em 2 animais e que a lesão corneal culminou em perfuração ocular apenas num indivíduo.

Uma vez que estes casos são insuficientes para serem considerados representativos da população que integram, foram excluídos do presente estudo. Também os animais cujas fichas clínicas correspondentes não continham informações mínimas necessárias, nem relativas à evolução da doença, foram eliminados.

### **2.3. Obtenção de plasma autólogo no HRVM**

A preparação de colírios de plasma autólogo no HRVM compreende as seguintes etapas, ordenadamente:

- 1- Colheita de sangue venoso do animal;
- 2- Colocação do fluido num tubo EDTA e centrifugação do mesmo (3000 g por 15 minutos);
- 3- Transferência do plasma para tubos Eppendorf esterilizados;
- 4- Colocação dos tubos em refrigeração (cerca de 4°C).

No HRVM o plasma autólogo foi usado numa concentração de 100%, tendo existido o cuidado de informar os donos quanto à possibilidade de o animal demonstrar sinais de desconforto ocular e que se verificados, tal deveria ser comunicado ao clínico.



**Figura 1:** Tubo Eppendorf contendo plasma autólogo.

## 2.4. Processamento dos dados e análise estatística

Inicialmente, todas as informações obtidas por consulta das fichas clínicas dos cães diagnosticados com ulceração da córnea foram compiladas em tabelas no programa informático Microsoft Office Excel 2019®, que serviu de suporte à construção de alguns gráficos e realização da análise estatística descritiva, com a determinação das frequências relativas e absolutas e valores médios, medianos e desvios padrão.

Relativamente à caracterização da amostra em estudo, foram consideradas as variáveis “raça”, “idade” e “sexo”. Para todas elas, foram calculadas as frequências absolutas e relativas. Exclusivamente para a variável quantitativa “idade”, foram determinados os valores mínimo e máximo, a média e o desvio padrão.

Para caracterização clínica da ulceração, foram estabelecidas as frequências absolutas e percentagens dos vários tipos de úlceras (superficiais responsivas ao tratamento, indolentes e profundas) bem como da extensão das afeções.

Quanto ao estudo do tratamento aplicado no HRVM, foram analisadas as frequências de utilização das várias opções terapêuticas (cirurgias, antibióticos, agentes midriáticos cicloplégicos, AINES, plasma autólogo e outras terapêuticas de carácter médico) consoante o tipo de lesão (superficiais responsivas ao tratamento, indolentes e profundas). Exclusivamente para o plasma autólogo, foram determinados os intervalos de tempo entre administrações adotados e aferida a frequência de aplicação de cada um.

Para 4 grupos de lesões (superficiais em que não foi administrado plasma autólogo, superficiais em que foi administrado plasma autólogo, indolentes e profundas), foi determinado o período de tempo médio decorrido entre o estabelecimento do diagnóstico e as várias monitorizações realizadas, o valor máximo e o mínimo e o desvio padrão desses tempos e ainda o número médio de monitorizações necessárias. Foram também calculadas as frequências absolutas e relativas de animais em cada uma delas.

Posteriormente, para cada tipo de úlceras, foi determinada a média do tempo decorrido até à resolução completa da patologia e o respetivo desvio-padrão, valor máximo e mínimo.

De modo a determinar se a aplicação de plasma autólogo acelera o processo de cicatrização epitelial de uma forma estatisticamente significativa, foram avaliados os tempos decorridos até à recuperação clínica, recorrendo-se, para isso, a uma análise de sobrevivência com curvas de *Kaplan Meier* e ao teste de *log-rank*, para estabelecer uma comparação entre as curvas obtidas (Bewick *et al.* 2004).

As comparações destes tempos foram realizadas separadamente. Para as lesões superficiais, foram comparados os tempos medianos de recuperação para os casos tratados e não tratados com plasma autólogo. Ao passo que, nas situações mais graves (ulcerações indolentes e profundas), em que a aplicação de plasma autólogo foi transversal a todos os

pacientes, foram relacionadas as medianas dos tempos de resolução consoante a frequência de administração do produto (3 ou menos aplicações por dia e 4 ou mais ministrações diárias).

Foi considerado para este estudo um intervalo de confiança (IC) de 95%, ou seja, assumiram-se como estatisticamente significativas associações com  $p < 0,05$ .

Para efetuar a componente estatística inferencial do estudo, recorreu-se ao *software* R x64 versão 4.1.0®.

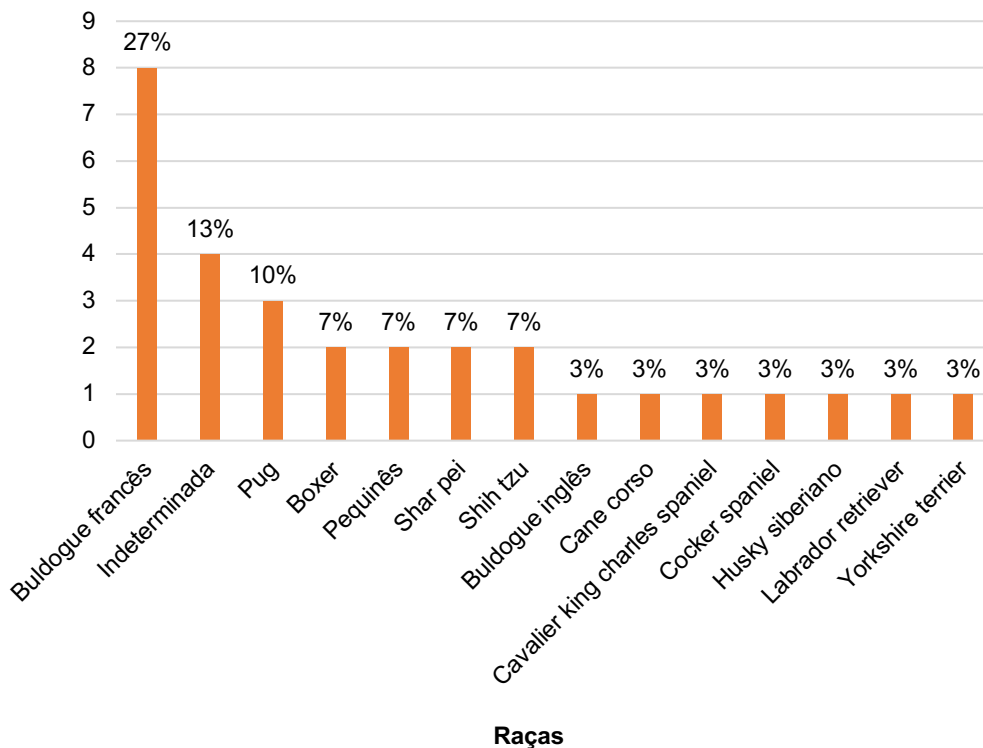
### **3. Resultados obtidos**

#### **3.1. Caracterização da amostra em estudo**

##### **3.1.1. Distribuição racial**

A amostra usada neste estudo compreende 30 cães de 14 raças distintas. A maior parte dos casos de ulceração corneal ( $n=8$ ; 27%) ocorreu em Buldogues Franceses, seguido de indivíduos sem raça determinada e Pug, numa prevalência de 13% ( $n=4$ ) e 10% ( $n=3$ ), respetivamente. Verificaram-se menos casos em cães das raças Boxer, Pequinês, Shar Pei e Shih Tzu, correspondendo cada um a 7% ( $n=2$ ) da totalidade da amostra. Buldogue Inglês, Cane Corso, Cavalier King Charles Spaniel, Cocker Spaniel, Husky Siberiano, Labrador Retriever e Yorkshire Terrier surgem com menos frequência ( $n=1$ ; 3% cada) (gráfico 1).

**Gráfico 1:** Frequências absolutas e relativas das diferentes raças que compõem a amostra em estudo.



### 3.1.2. Distribuição de género

Na amostra estudada, 18 dos casos (60%) ocorreram em indivíduos do género feminino e 12 (40%) em cães do sexo masculino. Assim, verificou-se uma frequência de doença ulcerativa corneal superior nas fêmeas comparativamente com os machos.

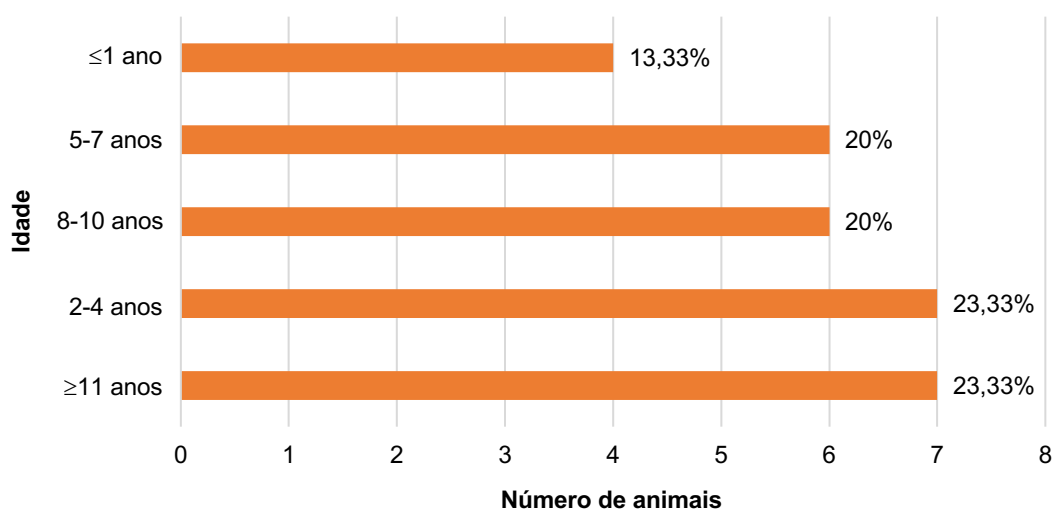
### 3.1.3. Distribuição etária

A idade dos animais avaliados está compreendida entre os 2 meses (0,17 anos) e os 14 anos. A média destes valores é de  $6,69 \pm 4,03$  anos. A idade mediana corresponde a 7 anos.

Especificamente para os cães com DECCE, a idade média aquando do diagnóstico neste estudo foi de  $8 \pm 2,55$  anos (entre 6 e 12 anos). A mediana das idades destes pacientes foi de 7 anos.

Para facilitar a análise, as idades dos 30 cães foram distribuídas por cinco categorias: inferior a 1 ano ( $\leq 1$  ano), entre 2 a 4 anos (2-4 anos), entre 5 a 7 anos (5-7 anos), entre 8 a 10 anos (8-10 anos) e superior a 11 anos ( $\geq 11$  anos). Respetivamente, nestes grupos, estão integrados 4 (13,33%), 7 (23,33%), 6 (20%), 6 (20%) e 7 (23,33%) indivíduos (gráfico 2).

**Gráfico 2:** Distribuição dos animais avaliados pelas diferentes faixas etárias consideradas.

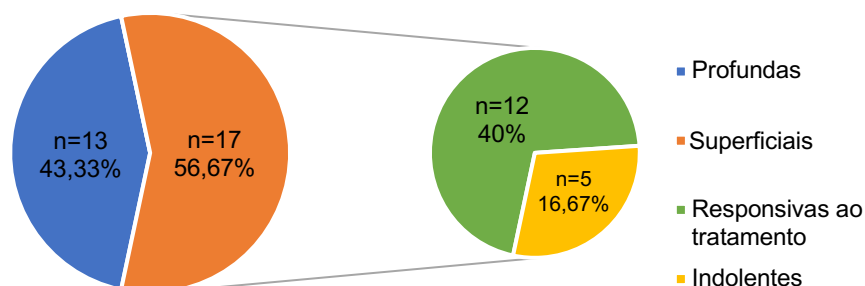


### 3.2. Caracterização clínica da doença ulcerativa

#### 3.2.1. Classificação

Das lesões avaliadas, 17 (56,67%) eram superficiais. 12 destas (40%), responderam ao tratamento médico instituído e as restantes 5 (16,67%) mostraram um comportamento indolente. As restantes afeções foram profundas (n=13; 43,33%) (gráfico 3).

**Gráfico 3:** Percentagem e frequência relativa dos diferentes tipos de lesão corneal.



### 3.2.2. Extensão

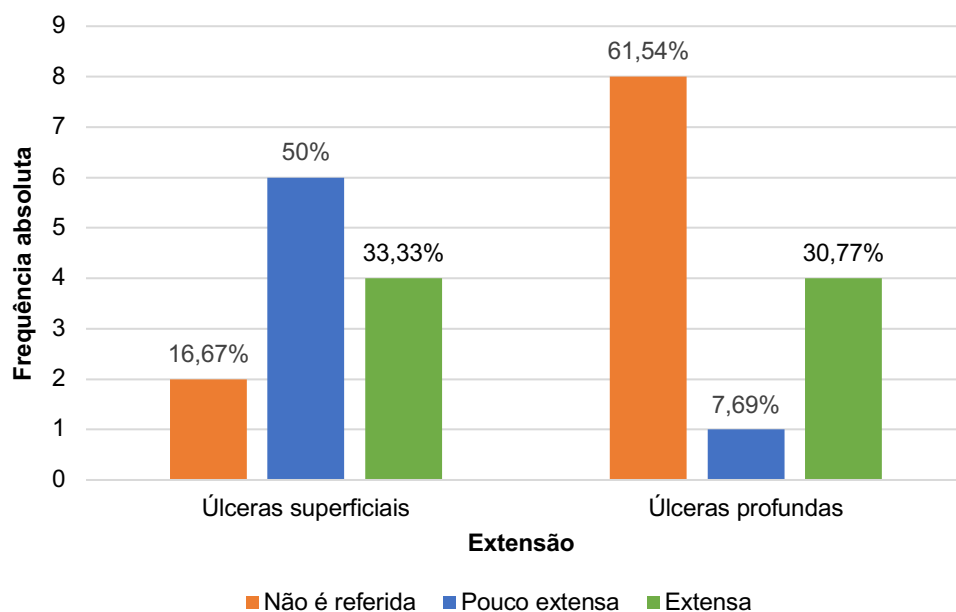
A análise estatística da extensão dos vários casos de ulceração, é realizada separadamente. Para os 5 defeitos indolentes (16,67%), não constam nas fichas clínicas quaisquer informações relativas à sua dimensão inicial.

Para esta avaliação, assumem-se como “pouco extensas” úlceras de diâmetro compreendido entre 1 a 5 mm e lineares, ao passo que lesões que ultrapassem esta dimensão, são considerados “extensas”.

Em relação aos defeitos superficiais, para 2 (16,67%) não estão descritos quaisquer dados acerca da sua dimensão, 6 (50%) apresentam-se como pouco vastos e apenas 4 (33,33%) foram classificados como extensos (gráfico 4).

Para mais de metade (n=8; 61,54%) dos casos de lesão profunda, não existem informações relativas à sua extensão. Os defeitos vastos foram acompanhados de queratomalácia e ocorreram em 4 indivíduos (30,77%). Menos frequentemente (n=1; 7,69%) surgem lesões de dimensões reduzidas (gráfico 4).

**Gráfico 4:** Frequências absolutas e relativas das dimensões da lesão nos diferentes tipos de doença ulcerativa considerada (superficial e profunda).



### **3.3. Tratamento instituído no HRVM**

O plano de tratamento instituído para cada animal variou consoante o tipo de lesão que este apresentava.

Em nenhum dos animais (100%) aos quais foram aplicadas topicamente gotas de plasma autólogo se verificou a ocorrência de reações adversas ao produto ou desenvolvimento de infeções.

A taxa de sucesso do tratamento instituído foi também de 100%, ou seja, em todos os pacientes avaliados ocorreu cicatrização completa do defeito corneano.

#### **3.3.1. Úlceras superficiais responsivas ao tratamento**

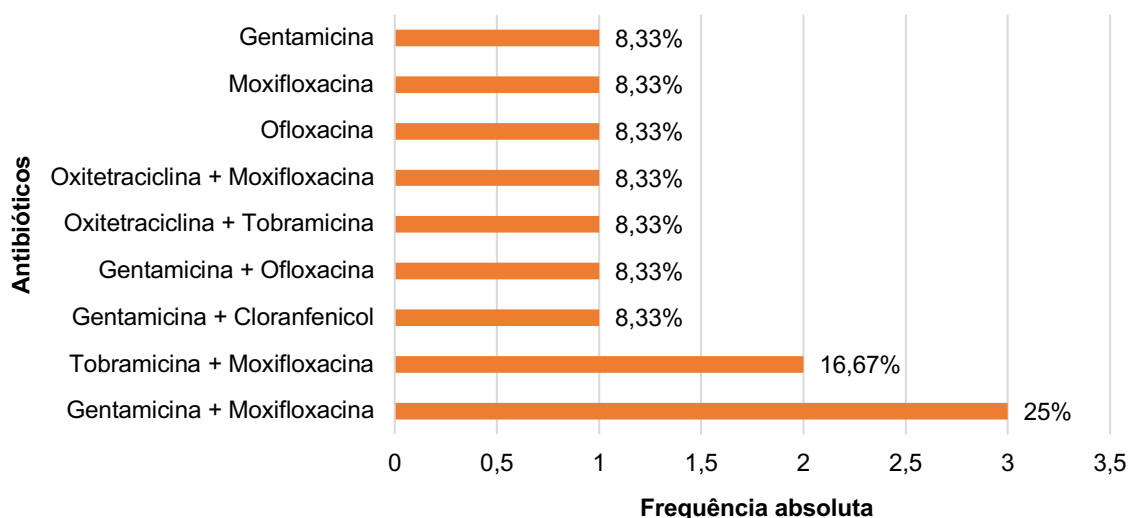
Dos 30 animais diagnosticados com ulceração corneal, 12 (40%) apresentavam lesões superficiais que cicatrizaram com o tratamento médico instituído.

##### **3.3.1.1. Antibiótico tópico**

A administração de antibiótico tópico fez parte do protocolo terapêutico de todos os 12 cães avaliados. Em 9 destes indivíduos (75%) foram prescritos fármacos em associação, nomeadamente gentamicina e moxifloxacina (n=3; 25%), tobramicina e moxifloxacina (n=2; 16,67%), gentamicina e cloranfenicol (n=1; 8,33%), gentamicina e ofloxacina (n=1; 8,33%), oxitetraciclina e tobramicina (n=1; 8,33%) e oxitetraciclina e moxifloxacina (n=1; 8,33%). Aos restantes 3 animais foram receitados exclusivamente gentamicina, moxifloxacina e ofloxacina, o que correspondeu a uma percentagem de utilização de 8,33% (n=1) para cada um destes antibióticos (gráfico 5).

Assim, as substâncias ativas mais utilizadas foram a moxifloxacina e a gentamicina, aplicadas em 7 (58,33%) e 6 (50%) pacientes, respetivamente, seguidas da tobramicina, usada em 3 animais (25%) e da ofloxacina e oxitetraciclina, ministradas em 2 casos (16,67%) cada. Apenas num paciente (8,33%) foi prescrito cloranfenicol.

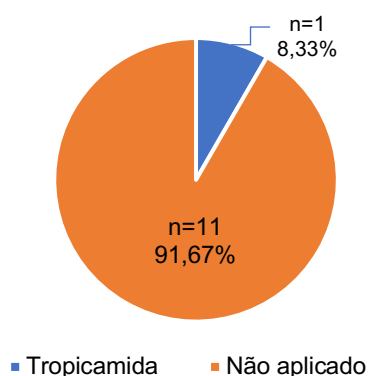
**Gráfico 5:** Frequência absoluta e relativa da antibioterapia tópica administrada no grupo de animais com úlceras superficiais responsivas ao tratamento médico.



### 3.3.1.2. Agente midriático ciclopérgico

Na única situação em que foi administrada uma substância midriática ciclopérgica, optou-se pela utilização de tropicamida (8,33%). Nos restantes 11 casos (91,67%) não foi aplicado qualquer agente deste tipo (gráfico 6).

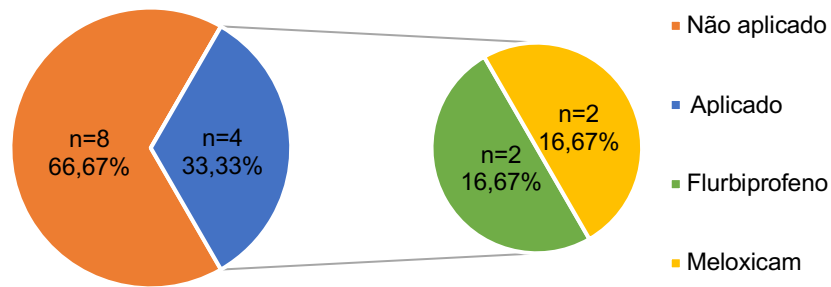
**Gráfico 6:** Distribuição da administração de agente midriático ciclopérgico no grupo de animais com úlceras superficiais responsivas ao tratamento médico.



### 3.3.1.3. AINEs

Na grande maioria dos doentes (n=8; 66,67%) não foram usados AINES. Em 2 (16,67%) dos restantes animais foi aplicado flurbiprofeno topicamente, e em outros 2 (16,67%) optou-se pela administração oral de meloxicam (gráfico 7).

**Gráfico 7:** Distribuição da utilização de AINES no grupo de animais com úlceras superficiais responsivas ao tratamento médico.

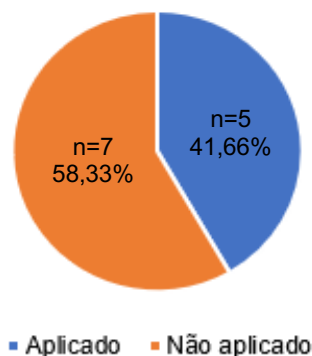


#### 3.3.1.4. Plasma autólogo

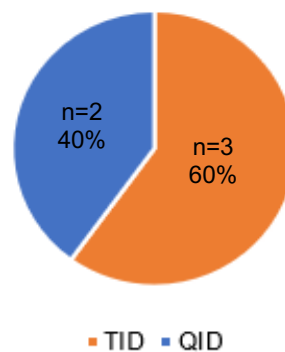
A prescrição de plasma autólogo foi feita em 5 animais (41,66%). Nos remanescentes 7 indivíduos (58,33%) este não foi incluído no plano terapêutico (gráfico 8).

A sua frequência de administração variou entre TID (n=3; 60%) e QID (n=2; 40%) (gráfico 9).

**Gráfico 9:** Distribuição da aplicação de plasma autólogo no grupo de animais com úlceras superficiais responsivas ao tratamento médico.



**Gráfico 8:** Distribuição da frequência de administração de plasma autólogo nos animais com úlceras superficiais aos quais foi receitado.



#### 3.3.1.5. Outras terapêuticas médicas

A aplicação de substituto lacrimal foi transversal a todos os casos observados (n=12; 100%).

### 3.3.2. Úlceras superficiais indolentes

Nos 5 indivíduos com ulceração indolente (16,67%), a abordagem terapêutica passou pela realização de um procedimento cirúrgico, seguido da instituição de tratamento médico.

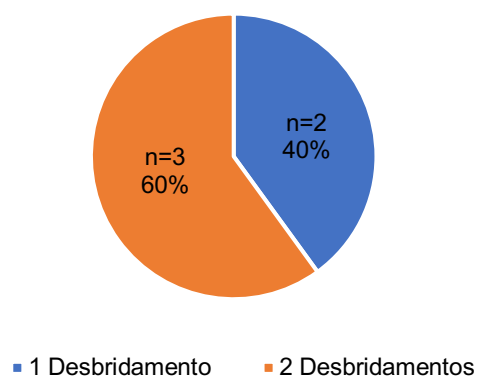


**Figura 2:** Olho esquerdo de um cão da raça Buldogue Francês. Aspeto lesional de uma úlcera indolente superficial dorsal de dimensão 4x4 mm. Padrão de coloração após aplicação do corante fluoresceína com infiltração perilesional, epífora, quemose e congestão conjuntival moderadas associadas (Fotografia gentilmente cedida pela Professora Doutora Esmeralda Delgado).

#### 3.3.2.1. Cirurgia

A técnica cirúrgica de eleição, realizada em todos os doentes (n=5; 100%), foi o desbridamento com cotonete estéril. Em 2 deles (40%), apenas foi necessário realizar este procedimento uma vez. Nos restantes 3 (60%), o procedimento teve que ser repetido (gráfico 10).

**Gráfico 10:** Distribuição do número de desbrides realizados no grupo de animais com úlceras indolentes.

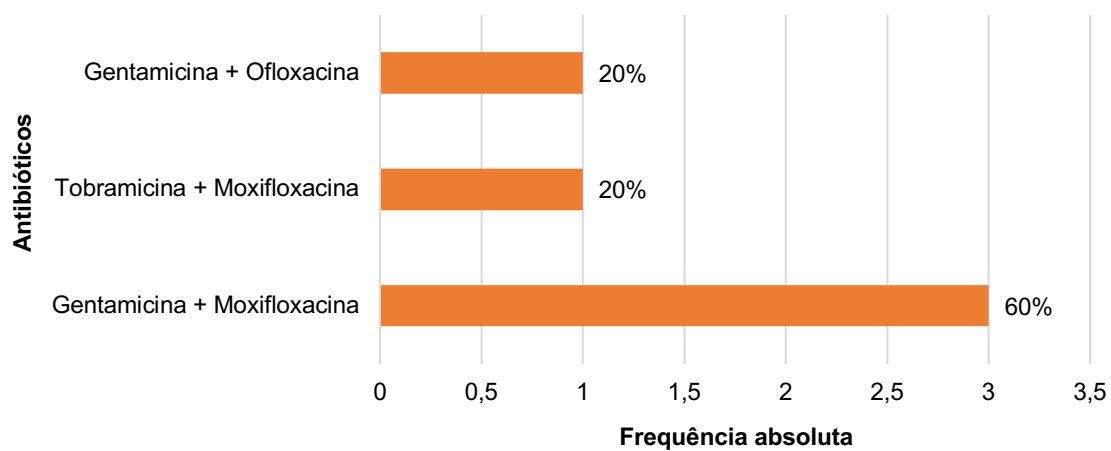


### 3.3.2.2. Antibiótico tópico

A combinação de fármacos mais usada foi gentamicina e moxifloxacina (n=3; 60%). As restantes associações, gentamicina e ofloxacina e tobramicina e moxifloxacina, foram prescritas uma vez (20%) cada (gráfico 11).

Assim, os antibióticos mais frequentemente aplicados são a gentamicina (n=4; 80%) e a moxifloxacina (n=4; 80%), seguidos da ofloxacina (n=1; 20%) e da tobramicina (n=1; 20%).

**Gráfico 11:** Frequência absoluta e relativa da antibioterapia tópica administrada no grupo de animais com úlceras indolentes.



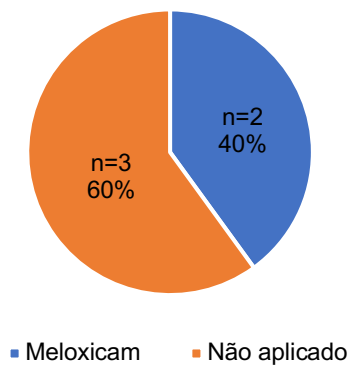
### 3.3.2.3. Agente midriático cicloplégico

A tropicamida foi usada em todos os casos de ulceração indolente (n=5; 100%).

### 3.3.2.4. AINEs

Nos únicos 2 dos 5 animais avaliados (40%) em que foi receitado um AINE, a sua administração foi sistémica (meloxicam) (gráfico 12).

**Gráfico 12:** Distribuição da utilização de AINES no grupo de animais com úlceras indolentes.

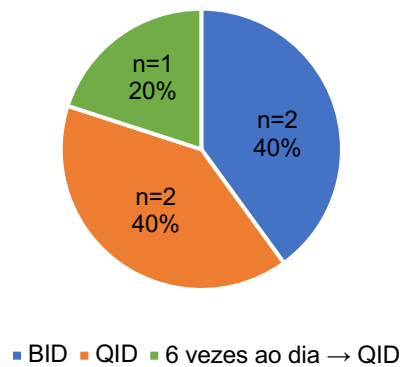


### 3.3.2.5. Plasma autólogo

A todos os animais com lesões indolentes foi receitado plasma autólogo (n=5; 100%).

A frequência da administração variou entre QID (n=2; 40%), BID (n=2; 40%) e, inicialmente, seis vezes ao dia, passando depois a QID (n=1; 20%) (gráfico 13).

**Gráfico 13:** Distribuição da frequência de administração de plasma autólogo no grupo de animais com úlceras indolentes.



### 3.3.2.6. Outras terapêuticas médicas

O substituto lacrimal foi aplicado em todos os pacientes (n=5; 100%).

### 3.3.3. Úlceras profundas

Foram identificados 13 animais com doença ulcerativa estromal (43,33%).

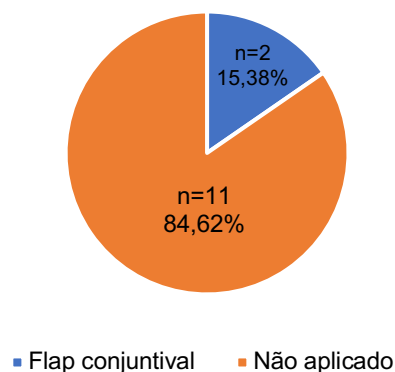


**Figura 3:** Olho direito de cão da raça Buldogue Francês. Aspeto lesional de uma úlcera estromal profunda central com presença de descemetocelo central. De notar o edema da córnea generalizado impedindo a visualização da câmara anterior. Anel de neovascularização perilimbico em 360 ° a cerca de 3-4 mm do limbo esclerocórneo, pressupondo alguma cronicidade do processo (Fotografia gentilmente cedida pela Professora Doutora Esmeralda Delgado).

#### 3.3.3.1. Cirurgia

Dois animais com defeitos profundos (15,38%), para além do tratamento médico, beneficiaram ainda da realização de um procedimento cirúrgico. A estes, foi realizado *flap* conjuntival (gráfico 14).

**Gráfico 14:** Distribuição da realização de cirurgias no grupo de animais com úlceras profundas.

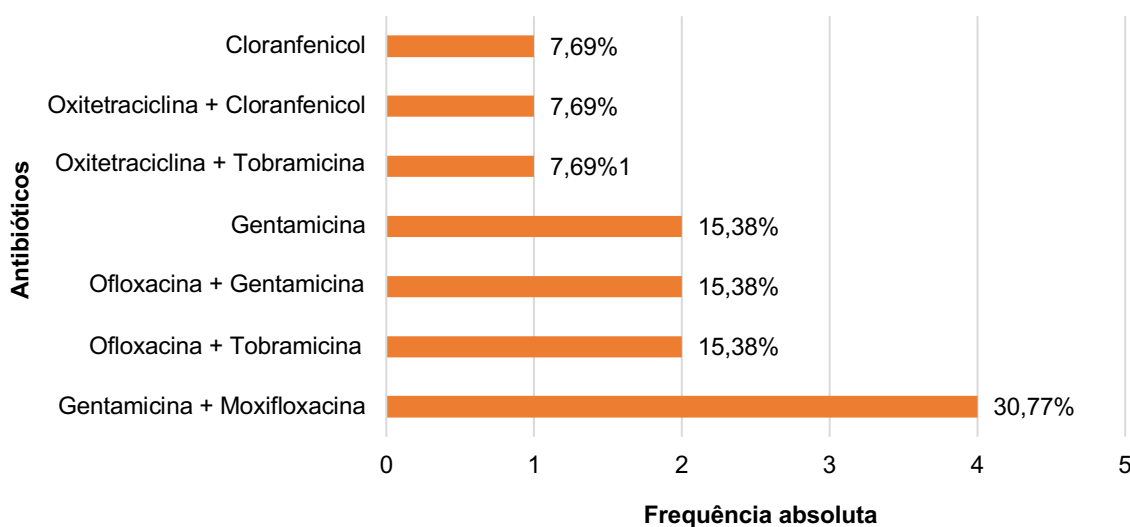


### 3.3.3.2. Antibiótico tópico

Nestes casos, os antibióticos mais receitados foram a gentamicina (n=8; 61,54%) e a moxifloxacina (n=4; 30,77%) e a ofloxacina (n=4; 30,77%). A tobramicina foi administrada em apenas 3 animais (23,08%). Menos aplicados foram o cloranfenicol (n=2; 15,38%) e a oxitetraciclina (n=2; 15,38%).

3 dos animais que sofreram ulceração estromal (23,08%) fizeram antibioterapia com um fármaco apenas, nomeadamente gentamicina (n=2; 15,38%) ou cloranfenicol (n=1; 7,69%). Aos remanescentes 10 indivíduos (76,92%) foram aplicados fármacos em combinação, sendo a mais frequente gentamicina e moxifloxacina (n=4; 30,77%), seguidos da ofloxacina e gentamicina (n=2; 15,38%) e ofloxacina e tobramicina (n=2; 15,38%) e, menos regularmente, oxitetraciclina e cloranfenicol (n=1; 7,69%) e oxitetraciclina e tobramicina (n=1; 7,69%) (gráfico 15).

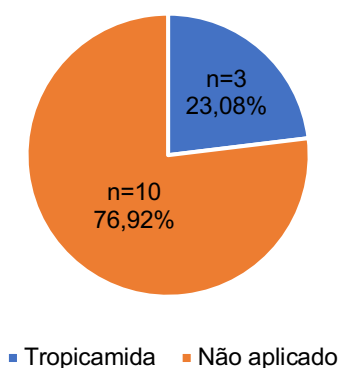
**Gráfico 15:** Frequência absoluta e relativa da antibioterapia tópica administrada no grupo de animais com úlceras profundas.



### 3.3.3.3. Agente midriático ciclopérgico

Em apenas 23,08% dos 13 animais (n=3) foi aplicada tropicamida. Nos restantes 76,92% (n=10) optou-se por não se administrar nenhum agente midriático ciclopérgico (gráfico 16).

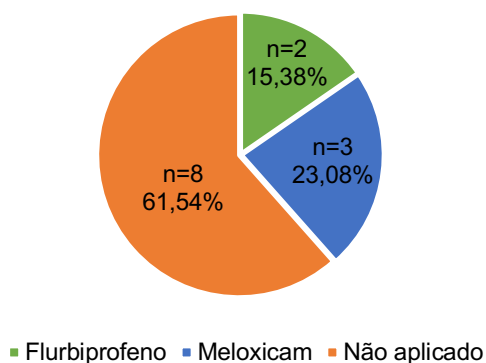
**Gráfico 16:** Distribuição da utilização de agente midriático ciclopérgico no grupo de animais com úlceras profundas.



#### 3.3.3.4. AINEs

Na grande maioria, a administração de um AINE foi excluída do plano terapêutico (n=8; 61,54%). Em 2 animais (15,38%) prescreveu-se flurbiprofeno tópico. Nos restantes 3 (23,08%), optou-se por administrar um AINE sistemicamente, recorrendo ao meloxicam (gráfico 17).

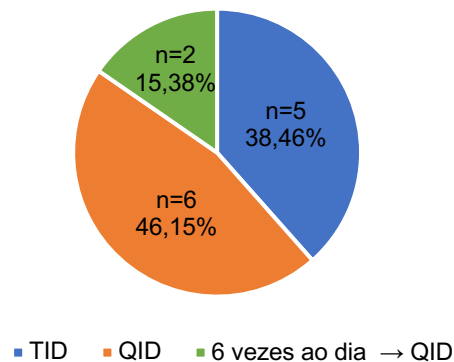
**Gráfico 17:** Distribuição da utilização de AINES no grupo de animais com úlceras profundas.



#### 3.3.3.5. Plasma autólogo

O plasma autólogo foi administrado a todos os cães com úlceras estromais incluídos neste estudo (n=13; 100%). A frequência de aplicação foi TID em 5 dos animais (38,46%), QID em 6 (46,15%) e, em apenas 2 (15,38%), a administração começou por ser feita seis vezes ao dia e passou depois a QID (gráfico 18).

**Gráfico 18:** Distribuição da frequência de administração de plasma autólogo no grupo de animais com úlceras profundas.



### 3.3.3.6. Outras terapêuticas médicas

Em todos os animais avaliados, o substituto lacrimal foi aplicado (n=13; 100%).

Foi necessário realizar antibioterapia sistêmica em 2 casos, através da administração de cefazolina (n=1; 7,69%) e enrofloxacina (n=1; 7,69%).

Um dos indivíduos (7,69%) beneficiou ainda do uso de tramadol para alívio da dor.

## 3.4. Evolução e recuperação

### 3.4.1. Úlceras superficiais

#### 3.4.1.1. Úlceras superficiais em que não foi administrado plasma autólogo

Para os 7 animais que apresentavam lesões superficiais cujo plano terapêutico não incluiu a aplicação de plasma autólogo, foram necessárias, em média,  $2,57 \pm 0,53$  consultas de monitorização, entre 2 a 3.

A resolução destes casos deu-se, em média,  $25,71 \pm 11,80$  dias após estabelecimento do diagnóstico, variando num mínimo de 12 e máximo de 40 dias.

Na tabela 2, encontram-se algumas informações relativas a cada consulta de monitorização realizada nestes pacientes, nomeadamente, a prevalência de animais em cada, os dias máximos e mínimos a que ocorreram após o diagnóstico, a média dos dias em que decorreram e o desvio padrão destes na amostra.

**Tabela 2:** Número de dias mínimos e máximos, médias e desvios padrões do tempo decorrido entre o diagnóstico e as várias consultas de controlo realizadas nos casos de ulceração superficial em que não foi administrado plasma autólogo e frequências absolutas e relativas dos animais presentes em cada.

	Dias máximo	Dias mínimo	Média dos dias	Desvio padrão dos dias	Frequências absolutas e relativas de animais presentes
<b>1ª consulta</b>	17	2	8,57	6,95	7(100%)
<b>2ª consulta</b>	28	6	17,23	7,20	7(100%)
<b>3ª consulta</b>	40	13	31,50	18,56	4(57,14%)

### 3.4.1.2. Úlceras superficiais em que foi administrado plasma autólogo

O plasma autólogo fez parte do tratamento de 5 animais com úlceras superficiais.

Nestes, foram realizadas, em média  $2,60 \pm 0,89$  reavaliações (entre 2 a 4).

A recuperação ocorreu, em média  $24,60 \pm 12,70$  dias após o diagnóstico, variando entre 13 e 46 dias.

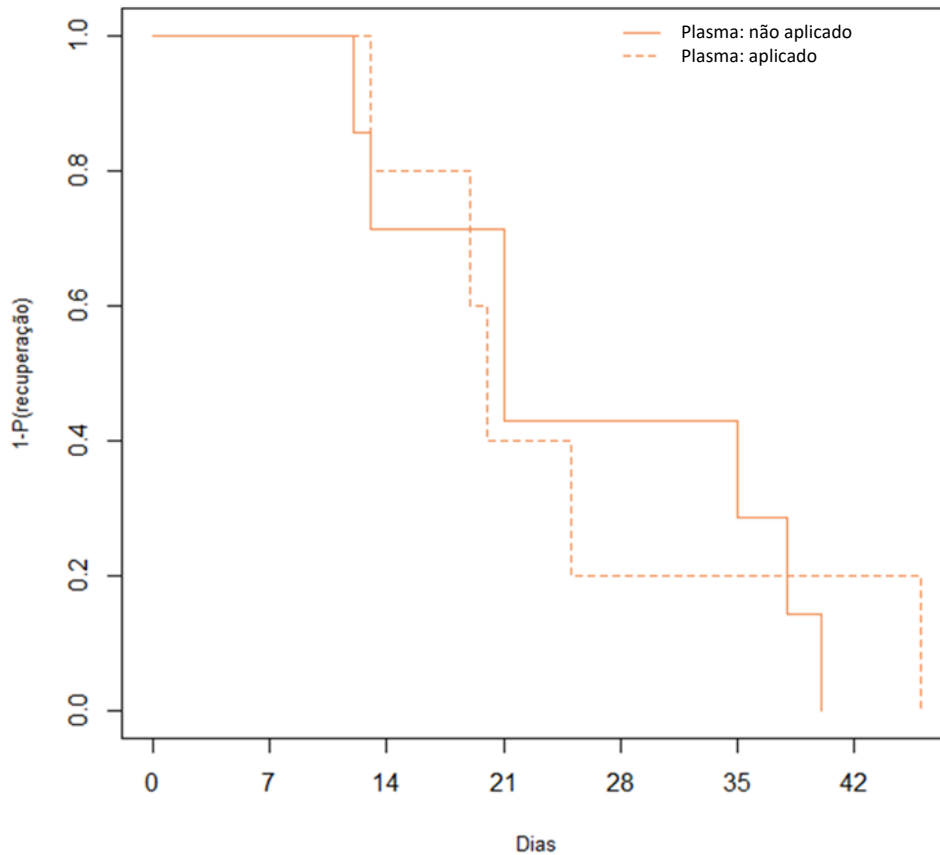
À semelhança da tabela 1, também na tabela 3 se encontram algumas informações relativas a cada consulta de monitorização realizada nestes pacientes, nomeadamente, a prevalência de animais em cada, os dias máximos e mínimos a que ocorreram após o diagnóstico, a média dos dias em que decorreram e o desvio padrão destes na amostra.

**Tabela 3:** Número de dias mínimos e máximos, médias e desvios padrões do tempo decorrido entre o diagnóstico e as várias consultas de controlo realizadas nos casos de ulceração superficial em que foi administrado plasma autólogo e frequências absolutas e relativas dos animais presentes em cada.

	Dias máximo	Dias mínimo	Média dos dias	Desvio padrão dos dias	Frequências absolutas e relativas de animais presentes
<b>1ª consulta</b>	12	5	7,40	3,36	5(100%)
<b>2ª consulta</b>	25	12	17,80	5,36	5(100%)
<b>3ª consulta</b>	24	19	21,50	3,54	2(40%)
<b>4ª consulta</b>	46	46	46,00	0,00	1(20%)

### 3.4.1.3. Comparação do tempo decorrente até à recuperação de lesões superficiais nos casos tratados e não tratados com plasma autólogo

**Gráfico 19:** Curva de *Kaplan Meier* para as lesões superficiais tratadas e não tratadas com plasma autólogo.



A mediana dos tempos decorrente do diagnóstico à resolução nos grupos de doentes não tratados e tratados com plasma autólogo foi, respetivamente, 21 (IC 95%: 12-38) e 20 (IC 95%: 13-46) dias.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as curvas dos cães aos quais foi ministrado plasma e aqueles em que este não foi usado ( $p=0,9$ ) (gráfico 19).

Considerando a heterogeneidade da amostra e os diferentes protocolos terapêuticos aplicados, bem como o facto de não terem sido considerados grupos controlo, não é possível retirar resultados conclusivos relativamente ao sucesso da plasmaterapia nestes grupos.

### 3.4.2. Úlceras graves (indolentes e profundas)

#### 3.4.2.1. Úlceras indolentes

A duração média da doença na amostra de animais com ulceração indolente foi de  $78,00 \pm 31,19$  dias (entre 31 a 111), tendo sido necessárias, em média,  $6,60 \pm 2,61$  consultas de reavaliação (entre 3 a 10).

Na tabela 4 encontram-se alguns dados referentes a cada consulta de monitorização realizada nestes pacientes.

**Tabela 4:** Número de dias mínimos e máximos, médias e desvios padrões do tempo decorrido entre o diagnóstico e as várias consultas de controlo realizadas nos casos de ulceração indolente e frequências absolutas e relativas dos animais presentes em cada consulta.

	<b>Dia máximo</b>	<b>Dia mínimo</b>	<b>Média dos dias</b>	<b>Desvio padrão dos dias</b>	<b>Frequências absolutas e relativas de animais presentes</b>
<b>1ª consulta</b>	9	7	8,00	1,00	5(100%)
<b>2ª consulta</b>	38	14	21,20	9,623	5(100%)
<b>3ª consulta</b>	52	21	32,40	11,63	5(100%)
<b>4ª consulta</b>	65	28	47,50	15,42	4(80%)
<b>5ª consulta</b>	86	35	60,00	21,02	4(80%)
<b>6ª consulta</b>	111	42	73,50	28,87	4(80%)
<b>7ª consulta</b>	73	56	64,50	12,02	2(40%)
<b>8ª consulta</b>	87	70	78,50	12,02	2(40%)
<b>9ª consulta</b>	95	95	95,00	0,00	1(20%)
<b>10ª consulta</b>	101	101	101,00	0,00	1(20%)

### 3.4.2.2. Úlceras profundas

Para os animais com queratopatias ulcerativas profundas foram necessárias, em média,  $5,00 \pm 2,16$  consultas de controlo, oscilando entre 2 a 8.

A cura destes pacientes verificou-se, em média  $43,31 \pm 31,34$  dias após o diagnóstico, variando entre 10 e 108 dias.

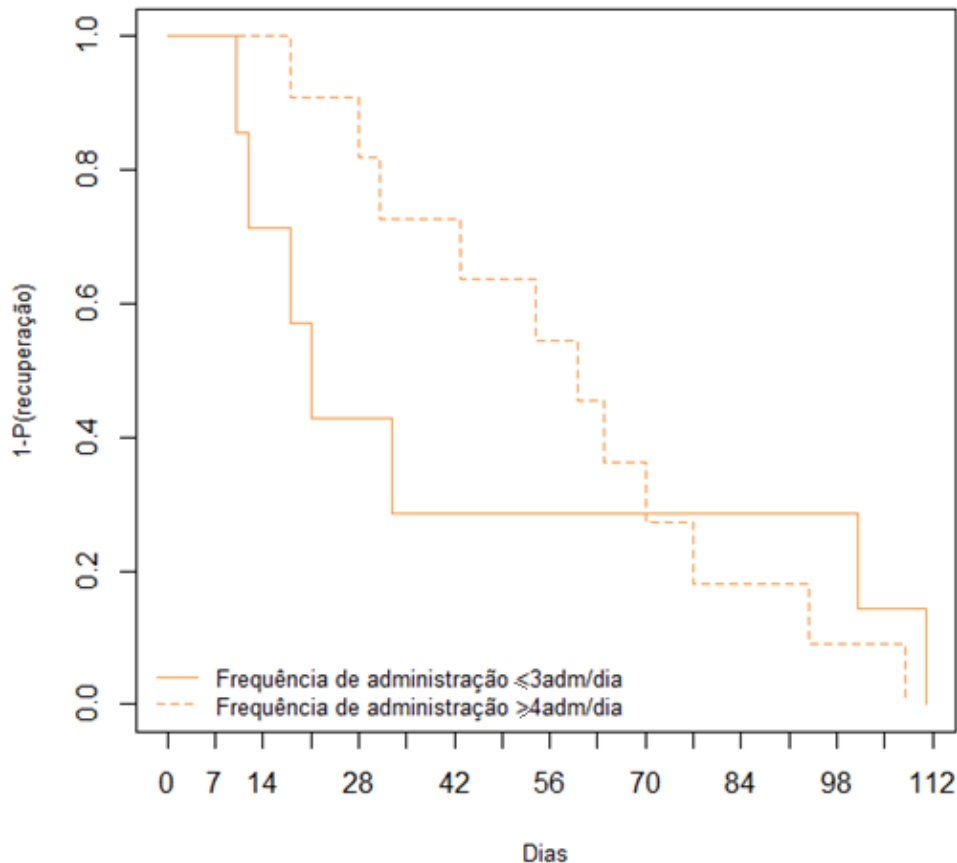
Na tabela 5 encontram-se algumas informações referentes a cada reavaliação dos cães com úlceras estromais.

**Tabela 5:** Número de dias mínimos e máximos, médias e desvios padrões do tempo decorrido entre o diagnóstico e as várias consultas de controlo realizadas nos casos de ulceração indolente e frequências absolutas e relativas dos animais presentes em cada consulta.

	Dia máximo	Dia mínimo	Média	Desvio padrão	Frequências absolutas e relativas de animais presentes
1ª consulta	11	2	5,15	2,64	13(100%)
2ª consulta	22	6	10,62	4,17	13(100%)
3ª consulta	40	10	17,92	7,96	12(92,31%)
4ª consulta	57	13	27,50	13,46	8(61,54%)
5ª consulta	80	24	39,29	19,72	7(53,85%)
6ª consulta	94	31	50,17	23,79	6(46,15%)
7ª consulta	83	39	59,33	22,19	3(23,07%)
8ª consulta	108	54	75,33	28,73	3(23,07%)

### 3.4.2.3. Comparação do tempo decorrente até à recuperação de lesões graves (indolentes e profundas) consoante a frequência de administração do plasma

**Gráfico 20:** Curva de *Kaplan Meier* para as lesões graves tratadas com mais de 4 administrações diárias de plasma autólogo e com menos de 3 administrações diárias.



A mediana da duração da doença nos doentes que receberam menos de 3 administrações diárias foi de 21 dias (IC 95%: 10-111) e no grupo em que este foi usado com uma frequência de mais de 4 vezes ao dia foi de 60 dias (IC 95%: 18-108).

As diferenças que existem entre as curvas dos animais com mais e menos aplicações diárias não têm significado estatístico ( $p=0,9$ ) (gráfico 2). Tendo em conta a diversidade da amostra e de planos terapêuticos instituídos e a ausência de grupos controlo, não é possível comprovar a eficácia do uso de plasma autólogo nestes pacientes.

## 4. Discussão

### 4.1. Caracterização da amostra em estudo

O grupo de 30 animais que compõe a amostra em estudo encontra-se distribuído por 14 raças distintas. A verificação de que a afeção afeta uma grande diversidade de cães, vai de acordo com a informação que consta na literatura consultada (Kim *et al.* 2009; Goulle 2011; Ramani *et al.* 2012; Dorbandt *et al.* 2015; O'Neill *et al.* 2017; Patel *et al.* 2020).

Nos ensaios de Kim *et al.* (2009), de Goulle (2011), de Dorbandt *et al.* (2015) e de O'Neill *et al.* (2017) a ocorrência de ulceração corneal verificou-se maioritariamente em indivíduos da raça Shih Tzu, numa prevalência de 50% (16/32), 18,33% (11/60), 22% (16/73) e 8,4% (70/834) respetivamente. Já num estudo desenvolvido por Ramani *et al.* (2012), a incidência foi superior em cães Pug (37,26%; 196/526). Resultados semelhantes a este último foram observados por Patel *et al.* em 2020 (51,51%; 17/33).

Dos 30 canídeos analisados no presente estudo, 21 (70%) pertencem a raças braquicéfalas.

No ensaio de O'Neill *et al.* (2017), a amostra avaliada foi distribuída por dois grupos: cães braquicéfalos e cães não braquicéfalos. No primeiro, a percentagem de indivíduos com úlcera da córnea foi de 3,76%, ao passo que no último esta foi apenas de 1,31%.

O estudo desenvolvido por Packer *et al.* publicado em 2015 refere que, pela sua conformação craniofacial, os braquicéfalos apresentam cerca de 20% mais de probabilidade de desenvolverem ulceração corneal do que os restantes.

Relativamente aos defeitos indolentes, Wilkie e Whitaker (1997) afirmam que raças como Boxer, Golden Retriever, Corgi e Poodle miniatura parecem ser predispostas para o seu desenvolvimento. Em 2003, Moore afirmou que estas foram já identificadas em mais de 45 raças diferentes, sendo a Boxer a mais comumente afetada (24,56%; 127/517). O estudo de Murphy *et al.* (2001) está de acordo com estas observações, já que também eles verificaram que a raça que surgiu mais frequentemente foi a Boxer (17,77%; 8/45), seguido da Golden Retriever (13,33%; 6/45).

No presente estudo nenhum dos cães que desenvolveram úlceras indolentes pertencem a alguma das raças anteriormente enumeradas. Dos 5 animais com esta afeção avaliados, 2 (40%) eram Buldogues Franceses, e os restantes eram das raças Husky Siberiano (n=1; 20%), Shih Tzu (n=1; 20%) e de raça indefinida (n=1; 20%).

A maior prevalência de ulceração verificou-se em Buldogues franceses (n=8; 27%), seguidos de cães de raça indeterminadas, com 4 animais (13%). Com elevada frequência surgem outros braquicéfalos, como os Pug (n=3; 10%), Boxer (n=2; 7%), Pequinês (n=2; 7%),

Shar Pei (n=2; 7%), Shih Tzu (n=2; 7%), Buldogue Inglês (n=1; 3%) e Cavalier King Charles Spaniel (n=1; 3%).

A popularidade das raças braquicéfalas tem vindo a crescer em todo o mundo nos últimos anos (Kennel Club 2020, citado por Nutbrown-Hughes 2020). Desta forma, a elevada prevalência de doença ulcerativa corneal nestes cães pode justificar-se não só pelas suas características anatómicas que os tornam mais predispostos para o desenvolvimento de ulceração corneal, mas também por serem pacientes frequentes em clínica de pequenos animais. No estudo de Costa, Steinmetz *et al.* (2021), foram denotadas diferenças geográficas relativamente à popularidade das várias raças caninas, tendo em Portugal a Buldogue Francês sido a predominante. De facto, neste estudo, esta também foi a raça mais representada (n=8; 27%).

Nos estudos desenvolvidos por Gouille (2011), O'Neill *et al.* (2017) e Patel *et al.* (2020), a distribuição dos casos de ulceração foi semelhante em ambos os sexos. Já Ramani *et al.* (2012) descreveram uma maior incidência da doença em machos (60,2%), assim como Amol (2016) e Dorbandt *et al.* (2015), em que, respetivamente, 63,63% e de 75,34% dos avaliados eram do sexo masculino.

Em relação às úlceras indolentes, Murphy *et al.* (2001) observaram que as fêmeas foram mais frequentemente afetadas (55,56%). No entanto, Moore (2003) verificou precisamente o contrário, tendo registado menos ocorrências em cadelas (45,33%).

Wilkie e Whittaker (1997) afirmaram que cães de qualquer género podem ser afetados por queratopatias ulcerativas. No entanto, um estudo retrospectivo posterior, levado a cabo por Sanchez, Innocent *et al.* em 2007, refere uma diferença significativa na distribuição sexual de lesões ulcerativas em determinadas raças, nomeadamente Cavalier King Charles Spaniel e Shih Tzu, em que os machos são mais frequentemente afetados.

Na amostra analisada, a maioria dos casos ocorreu em fêmeas (n=18; 60%).

Apenas 3 cães das raças em que está descrita uma predisposição para o desenvolvimento de doença ulcerativa corneal em machos fizeram parte desta avaliação, nomeadamente um macho Cavalier King Charles Spaniel e um macho e uma fêmea Shih Tzu. Assim, os representantes destas raças encontram-se em número insuficiente para corroborar os resultados do ensaio de Sanchez, Innocent *et al.* (2007).

Para além disso, neste estudo foram integrados todos os animais com diagnóstico de ulceração corneal no HRVM no período considerado e, como tal, a distribuição de género verificada pode dever-se somente ao facto de mais fêmeas se terem apresentado às consultas neste intervalo de tempo.

No presente estudo, a idade média de ocorrência das lesões foi  $6,69 \pm 4,03$  anos, variando entre 2 meses (0,17 anos) e 14 anos. A idade mediana correspondeu a 7 anos.

Estes resultados estão em concordância com o que é descrito na maior parte da bibliografia consultada. Nos estudos de Kim *et al.* (2009) e de Ramani *et al.* (2012), a incidência de doença ulcerativa corneal foi superior em animais com idade inferior a 3 anos. Segundo Kim *et al.* (2009), tal pode dever-se ao facto de os animais mais jovens serem bastante ativos, e, por isso, mais suscetíveis a sofrerem traumatismos corneanos. Tanto no ensaio de Amol (2016) como no de Patel *et al.* (2020), a ulceração corneal foi mais comumente registada em cães na faixa etária dos 1 aos 5 anos. A idade média de ocorrência de queratopatia ulcerativa na avaliação de Gouille (2011) foi de aproximadamente 5,4 anos. Em 2017, O'Neill *et al.*, verificaram que a prevalência desta patologia é superior em indivíduos adultos, com idades compreendidas ente os 6 e os 8,9 anos. Achados semelhantes a este último estudo foram observados por Dorbandt *et al.*, que constataram que a idade média de diagnóstico da afeção se encontrava aproximadamente nos 7,4 anos.

No que diz respeito a DECCE, Wilkie e Whittaker (1997), reportaram que, embora estes possam ocorrer em cães de qualquer idade, os mais velhos estão mais predispostos a desenvolvê-los. Moore (2003) afirmou que os animais de meia idade são os mais frequentemente afetados, tendo observado uma média de idade de ocorrência de cerca de 8,2 anos. No estudo de Murphy *et al.* (2001), esta foi mais avançada, rondando os 9,2 anos.

A idade de ocorrência de DECCE nesta amostra está compreendida entre os 6 e 12 anos, sendo a média e mediana destes valores, respetivamente,  $8,00 \pm 2,55$  anos e 7 anos. Estas observações estão de acordo com o que foi descrito pelos vários autores referidos.

Segundo Amol (2016), a distribuição etária da doença ulcerativa corneal é muito variável, uma vez que é influenciada por parâmetros como a localização geográfica, o período de tempo e a raça do animal.

#### **4.2. Caracterização clínica da doença ulcerativa**

Segundo Wilkie e Whitaker (1997), a maioria das lesões ulcerativas da córnea são superficiais. Resultados concordantes foram obtidos por Patel *et al.* (2020), que registaram 62,16% dos defeitos como erosões.

À semelhança do que foi descrito por estes autores, também neste estudo a maior parte das úlceras foram inicialmente classificadas como superficiais (n=17; 56,67%), tendo posteriormente sido verificado um comportamento indolente em 16,67% destas (n=5).

No entanto, o inverso foi observado por Kim *et al.* (2009) e Amol (2016), em que a prevalência de ulceração estromal foi superior, sendo a percentagem desta respetivamente para cada estudo, 56% e 57,58%.

No presente ensaio, excluíram-se da caracterização da extensão lesional os DECCE (16,67%), por não existirem dados relativos à sua dimensão inicial e também por ser um

parâmetro sem significado neste estudo, uma vez que o tratamento médico é iniciado após o desbridamento, altura em que todas elas passaram a extensas.

Para 2 dos casos de erosões superficiais considerados (16,67%) não existiam informações referentes à extensão lesional. Isto verificou-se também para mais de metade dos defeitos profundos (n=8; 61,54%), que não puderam ser incluídos nesta avaliação.

Relativamente às restantes lesões epiteliais, 4 (33,33%) abrangeram mais de 5 mm de diâmetro epitelial, tendo sido classificadas como extensas. Já para os defeitos estromais, 30,77% (n=4) eram extensos e acompanhados de queratomalácia.

Úlceras lineares ou com diâmetro inferior a 5 mm foram consideradas de pequena dimensão. Estas ocorreram em 6 (50%) e 1 (7,69%) das úlceras superficiais e profundas, respetivamente.

Não tendo conhecimento de alguns dados, torna-se difícil estabelecer uma relação de comparação com resultados obtidos por outros autores. No entanto, tendo em consideração o que se pôde observar, as conclusões do presente estudo estão de acordo com as obtidas noutras avaliações. Num estudo desenvolvido por Pandey *et al.* publicado em 2018, todas as úlceras profundas avaliadas apresentavam dimensões de cerca de 5 mm de diâmetro, ao passo que as superficiais exibiam diâmetros de 2 mm (30%), 3 mm (50%) e 4 mm (20%). Numa outra análise feita a uma população de dimensão considerável (111 animais) com lesões profundas, levada a cabo por Costa, Leiva *et al.* (2019), a dimensão média dos defeitos diagnosticados foi de cerca de 6,2 mm de diâmetro.

A frequência de queratomalácia nas úlceras profundas avaliadas no presente estudo foi de 30,77% (4/13), resultados superiores aos obtidos por Amol em 2016 (16,67%; 4/24) e O'Neill *et al.* em 2017 (5%; 42/834).

#### **4.3. Tratamento instituído no HRVM e evolução clínica**

Independentemente do tipo de ulceração, existem duas medidas gerais que, segundo a bibliografia consultada (Maggs 2008; Marrion 2008; Ledbetter *and* Gilger 2014; Sanchez 2014; Belknap 2015), são fundamentais para o sucesso do tratamento médico e/ou cirúrgico instituído. Antes de iniciar o tratamento, deve ser identificada e removida a causa da úlcera ou os fatores de agravamento que lhe possam estar associadas. No decorrer da terapêutica e até se verificar a cura completa da lesão, deve ser colocado um colar isabelino ao animal.

De acordo com Startup (1984) e Oliver *and* Smith (2014) devem ainda ser incluídas no plano terapêutico limpezas da superfície ocular e do saco conjuntival com soluções de irrigação, de modo a eliminar detritos e corrimentos e assegurar, assim, o êxito da antibioterapia.

No presente estudo, em todos os 30 animais avaliados, estas três medidas enunciadas foram implementadas. Relativamente às limpezas oculares, estas foram feitas rotineiramente antes da administração de medicação tópica com soro fisiológico estéril a 0,9%.

Os substitutos lacrimais são frequentemente prescritos em casos de queratopatias ulcerativas (Oliver *and* Smith 2014; Sanchez 2014). Com base na literatura consultada, os produtos mais usados são as lágrimas artificiais (Amol 2016; Hung *et al.* 2020; Costa, Steinmetz *et al.* 2021).

Também neste estudo, em todos os animais (100%), o uso de Lubrithal® fez parte do plano terapêutico. Este produto consiste num polímero aniônico de elevado peso molecular de ácido acrílico reticulado com um poliéter de sacarose solúvel em água (Al-Mansouri *et al.* 1994).

Na literatura estão descritos raros efeitos adversos após aplicação tópica ocular de colírios obtidos a partir do sangue do próprio paciente, tais como aumento do desconforto, epitelopatia ligeira, conjuntivite bacteriana e eczema das pálpebras (López-García *et al.* 2008, citados por Quinto *et al.* 2008) e deposição de imunoglobulinas na córnea quando utilizado soro autólogo a 100% (McDonnell *et al.* 1988). A maior parte dos autores descreve esta terapêutica como segura e bem tolerada (Tsubota *et al.* 1999; Associação Portuguesa de Farmacêuticos Hospitalares 2008; Quinto *et al.* 2008; Semeraro *et al.* 2014; Giannaccare *et al.* 2017; Marchand *et al.* 2018). Neste estudo não foram reportados quaisquer efeitos adversos decorrentes do uso de plasma autólogo, tanto a curto como a longo prazo.

Após eliminação da causa e de possíveis fatores de agravamento da lesão, as úlceras não complicadas devem cicatrizar com relativa facilidade. Assim, o tratamento indicado para estes casos, segundo a bibliografia consultada (Kern 1990; Wilkie *and* Whittaker 1997; Miller 2001; Crispin 2005; Maggs 2008; Marrion 2008; Ledbetter *and* Gilger 2014; Sanchez 2014; Belknap 2015) é exclusivamente do foro médico e consiste em antibioterapia tópica profilática e manejo da dor ocular.

À semelhança do que foi realizado no HRVM, também nos animais considerados nos estudos de Kim *et al.* (2009), Amol (2016) e Costa, Steinmetz *et al.* (2021), relativos ao manejo de lesões corneais superficiais, o tratamento instituído foi de caráter médico.

No estudo de Sfaciotte *et al.* (2018), a grande maioria das bactérias envolvidas em queratopatias ulcerativas mostrou-se sensível ao cloranfenicol (80,77%), à tobramicina (74,08%) e à gentamicina (69,23%), ao passo que mais de metade dos agentes apresentou resistência às tetraciclina (69,23%). Relativamente às fluoroquinolonas, 81,81% dos microrganismos não mostraram suscetibilidade a pelo menos um antibiótico desta classe.

Hewitt *et al.* (2020) verificaram também que, em regime de monoterapia, as substâncias cloranfenicol e gentamicina apresentaram-se eficazes para 83% e 74% das bactérias isoladas, respetivamente.

A grande diversidade de agentes bacterianos encontradas em úlceras corneais justifica a utilização de fármacos em associação no maneio destas situações, uma vez que é difícil encontrar um único antibiótico que apresente um espetro de ação tão alargado (La Croix 2018). No HRVM, optou-se por prescrever antibióticos em combinação a 9 dos 12 animais com lesões epiteliais (75%) e nos restantes 3 (25%), por usar um fármaco isoladamente.

Num dos animais com lesão superficial (8,33%) o único antibiótico aplicado foi a gentamicina. Para os restantes dois doentes em que se optou por receitar um só fármaco, recorreu-se a fluoroquinolonas, nomeadamente, moxifloxacina para um (8,33%) e ofloxacina para outro (8,33%).

O cloranfenicol foi usado em associação com a gentamicina num caso de lesão superficial (8,33%). As restantes associações prescritas para estes doentes incluíram moxifloxacina e gentamicina (n=3; 25%), moxifloxacina e tobramicina (n=2; 16,67%), moxifloxacina e oxitetraciclina (n=1; 8,33%), ofloxacina e gentamicina (n=1; 8,33%) e oxitetraciclina e tobramicina (n=1; 8,33%).

Relativamente aos antibióticos prescritos para os animais avaliados, com exceção das fluoroquinolonas, todas as opções eleitas se mostraram eficientes de acordo com os estudos referidos (Sfaiotte *et al.* 2018; Hewitt *et al.* 2020). Embora num animal (8,33%) tenha sido aplicada oxitetraciclina, que demonstrou baixa eficácia, esta foi combinada com tobramicina, altamente eficaz.

O uso de fluoroquinolonas deve ser reservado para o maneio de casos mais severos, em que se suspeita do envolvimento de agentes mais resistentes. No entanto, como são particularmente eficientes contra *Pseudomonas aeruginosa*, atingem elevadas concentrações na córnea e estão associadas a uma baixa toxicidade, foram largamente usadas no tratamento de lesões superficiais e profundas na ausência de avaliação bacteriológica, o que contribuiu para um aumento da resistência dos agentes bacterianos a estas substâncias e compromete a sua utilização como antibióticos em úlceras infetadas na atualidade (Maggs 2008; Miller 2013; Sanchez 2014). Com base nos estudos de Sfaiotte *et al.* (2018) e Hewitt *et al.* (2020), conclui-se que, de facto, a resistência das bactérias a estas substâncias é, atualmente, comum.

No presente estudo, foram usadas fluoroquinolonas em 9 cães (75%) com defeitos superficiais. 4 destes pacientes (33,33%) apresentavam lesões classificadas como extensas, o que pode justificar a sua utilização enquanto profilático.

Na avaliação de Kim *et al.* (2009) foi eleito como antibiótico tópico para manejo destas situações uma fluoroquinolona (ofloxacina). É importante referir que este estudo tem algum tempo, não sendo as resistências bacterianas aos antibióticos verificadas na altura semelhantes às atuais. Num ensaio mais recente, publicado em 2021, da autoria de Costa, Steinmetz *et al.*, optou-se por administrar tobramicina ou gentamicina. Já Amol (2016) indica que foram usados antibióticos tópicos enquanto profiláticos, no entanto, não refere quais.

Nos cães considerados no ensaio de Kim *et al.* (2009), recorreu-se ainda à administração de antibiótico sistémico, nomeadamente amoxicilina e ácido clavulânico em combinação, enquanto adjuvante da antibioterapia tópica. Em nenhum dos animais com defeitos superficiais avaliados no HRVM foram prescritos antibióticos sistémicos.

Para controlo da dor ocular e promoção do conforto dos pacientes, está indicada a administração de um agente midriático ciclopérgico (Kern 1990; Wilkie e Whittaker 1997; Miller 2001; Maggs 2008; Marrion 2008; Ledbetter *and* Gilger 2014; Sanchez 2014; Belknap 2015).

Kern (1990) refere que a utilização destas substâncias em úlceras não complicadas deve ser minimizada, uma vez que a fotofobia induzida pela midríase tónica pode ser ainda mais incomodativa que o espasmo da íris. No entanto, nos estudos avaliados referentes ao manejo de lesões epiteliais (Kim *et al.* 2009; Amol 2016; Costa, Steinmetz *et al.* 2021), a todos os animais neles incluídos foi aplicada atropina a 1%. O mesmo não se verificou neste estudo, em que foi ministrada tropicamida a 1% a apenas um doente (8,33%) e nos restantes 11 (91,67%), excluíram-se agentes midriáticos ciclopérgicos do plano terapêutico.

Para promover um maior conforto do animal, podem ainda prescrever-se AINES tópicos (Belknap 2015) ou sistémicos (Maggs 2008; Marrion 2008). O uso tópico ocular destas substâncias no tratamento de queratopatias ulcerativas é controverso, por estar associado ao desenvolvimento de queratomalácia (Mian *et al.* 2006; Bekendam *et al.* 2007; Wolf *et al.* 2007; Feiz *et al.* 2009; Gueudry *et al.* 2009; Khalifa *and* Mifflin 2011; Prasher 2012; Oliver *and* Smith 2014; Sanchez 2014; Belknap 2015; Rigas *et al.* 2019). Ainda assim o flurbiprofeno em colírio foi utilizado por alguns autores (Kim *et al.* 2009; Amol 2016) no manejo de lesões epiteliais da córnea. Também no presente estudo, em 2 dos animais com doença ulcerativa superficial avaliados que se apresentavam muito desconfortáveis (16,67%), este foi prescrito. Kim *et al.* (2009) refere ainda o uso de carprofeno enquanto anti-inflamatório sistémico nos pacientes avaliados. No HRVM, foram usados AINES sistémicos (meloxicam) em apenas 2 (16,67%) cães com queratopatias ulcerativas superficiais.

Para resolução de lesões epiteliais, não está indicada a administração tópica ocular de qualquer produto obtido a partir do sangue do próprio paciente.

Nos estudos de Kim *et al.* (2009) e Costa, Steinmetz *et al.* (2021), nenhum destes foi incluído no plano terapêutico dos animais avaliados. Já no de Amol (2016), foi prescrito soro

autólogo a todos os doentes. No presente trabalho, o plasma autólogo foi usado em 5 cães com lesões superficiais (41,66%) não complicadas e nos remanescentes 7 indivíduos (58,33%), não foi aplicado.

O soro sanguíneo é um dos constituintes do plasma. Estes têm uma composição muito semelhante. No entanto, o plasma contém fatores de coagulação, enquanto que o soro não (Kuruc et al. 2020; Latham 2021).

A bibliografia referente ao uso de plasma é muito escassa. Como o plasma e o soro sanguíneo apresentam uma composição idêntica, e uma vez que não foram encontrados estudos referentes ao uso de plasma no manejo de úlceras superficiais, realiza-se uma análise comparativa dos resultados obtidos nesta avaliação com os de estudos referentes ao uso de soro autólogo.

A utilização de colírios de soro autólogo mostrou estar associada a uma cura mais rápida de defeitos epiteliais (Sommer 1983; Tsubota *et al.* 1999; Imanishi *et al.* 2000; Poon *et al.* 2001; Geerling 2004; Liu, Hartwig, Harloff, Herminghaus, Wedel, Kasper, Geerling 2006).

Um estudo da autoria de Pflugfelder (2006), comparou o intervalo de tempo decorrente desde o início do tratamento até à cicatrização completa de úlceras superficiais em animais nos quais foi ministrado soro autólogo e outros nos quais foi aplicado ácido hialurónico. Os resultados deste ensaio foram os expectáveis: no grupo ao qual foi receitado soro autólogo o tempo médio de recuperação foi inferior ( $4,3 \pm 2,0$  dias) ao do grupo tratado com ácido hialurónico ( $7,1 \pm 4,8$  dias).

Neste estudo, tanto a média como a mediana de duração da doença, apesar de próximas, são mais reduzidas no grupo de pacientes em que o plasma foi aplicado ( $24,60 \pm 12,70$  dias e 20 dias, respetivamente) do que no grupo de cães aos quais não foram receitados estes colírios ( $25,71 \pm 11,80$  dias e 21 dias, respetivamente). No entanto, após uma análise de sobrevivência com curvas de *Kaplan Meier* e aplicação do teste de *log-rank*, concluiu-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre as medianas dos tempos de cura dos animais tratados e não tratados com plasma autólogo ( $p=0,9$ ).

A disparidade verificada entre os resultados do presente estudo e o que está descrito na bibliografia pode justificar-se pelo facto de a amostra ser pequena e de existir muita heterogeneidade dentro dos grupos, quer em relação à gravidade da patologia, quer em relação ao protocolo terapêutico elegido.

Tendo conhecimento dos benefícios associados à aplicação de soro ou plasma e das mínimas desvantagens que esta representa, mesmo em casos em que a lesão se restringe ao epitélio, se esta for de extensão considerável, é boa prática utilizar-se um destes produtos enquanto adjuvante terapêutico.

Analisando mais detalhadamente os dados recolhidos, verificamos que para os casos de úlceras superficiais classificadas como extensas (n=4, 33,33%) foi prescrito plasma autólogo no início do tratamento. Já nas lesões simples e de diâmetro reduzido, que corresponderam a metade dos casos avaliados (n=6; 50%), optou-se por não aplicar este produto inicialmente. Num animal com defeito de pequena dimensão (8,33%), no tempo decorrente desde o diagnóstico até ao primeiro controlo, ocorreu um agravamento da situação e, por isso, adicionou-se ao plano terapêutico plasma autólogo.

Relativamente aos remanescentes 2 casos (16,67%), não constavam quaisquer dados relativos à dimensão lesional na ficha do animal. Considerando que não foi realizada plasmaterapia autóloga, a autora pensa tratar-se de defeitos pouco extensos.

Sendo o presente estudo uma análise retrospectiva do tratamento instituído em doentes com ulceração corneal num hospital de referência, não foram encontrados animais com lesões superficiais extensas nos quais não tenham sido usados colírios de plasma autólogo.

Desta forma, a pequena diferença nos tempos de cicatrização encontrada, pode justificar-se pela maior severidade dos casos em que foi instituída plasmaterapia.

A disparidade da duração da doença em ambos os grupos não foi grande, o que sugere que o uso de plasma nos casos mais graves favoreceu a regeneração epitelial e auxiliou na aproximação dos intervalos de tempo até à recuperação nos vários pacientes.

Diversos autores (Miller 2001; Marrion 2008; Turner 2008; Ledbetter & Gilger 2014) parecem concordar que a reavaliação dos doentes com ulceração superficial deve ocorrer 7 dias após o diagnóstico, altura na qual o animal já deverá estar recuperado ou perto de atingir a cura.

No presente estudo, nem todos os cães foram reavaliados no espaço de uma semana por diversos fatores, nomeadamente incompatibilidade de horários de clínicos e tutores, necessidade de acompanhamentos mais frequentes ou, porque se encontravam hospitalizados, existindo oportunidade de serem monitorizados com mais frequência.

Nesta avaliação, as primeiras consultas tiveram lugar, em média, aos  $8,57 \pm 6,95$  dias e aos  $7,40 \pm 3,36$  dias após o diagnóstico para os grupos de pacientes não tratados e tratados com plasma autólogo, respetivamente, não tendo sido identificados animais recuperados em nenhum destes controlos iniciais.

A prescrição isolada de tratamento médico raramente é suficiente para resolver DECCE, pois a membrana basal subjacente e a porção anterior do estroma anormal impedem a fixação epitelial (Sanchez 2014).

No presente estudo, o diagnóstico dos 5 casos de defeitos epiteliais persistentes baseou-se precisamente na ausência de resposta ao tratamento médico instituído em conjunto com o padrão de coloração da lesão depois de aplicado o corante fluoresceína.

Deste modo, após estabelecimento do diagnóstico, estes cinco olhos foram sujeitos a um desbridamento do epitélio anormal não aderente da superfície corneal. A remoção do tecido lesado da membrana basal associada e de detritos presentes no estroma exposto, estimula a proliferação do epitélio adjunto e promove a sua união ao estroma subjacente (Moore 2003). Utilizou-se, para o efeito, um cotonete de algodão estéril.

As taxas de sucesso globais associadas ao uso isolado de desbridamento reportadas em diversas publicações variaram: 20% (Kirschner *et al.* 1991), 38% (Morgan *and* Abrams 1994), 50% (Bentley 2005) e 84% (Stanley *et al.* 1998). No estudo de Stanley *et al.* (1998), para grande parte dos casos de DECCE em estudo (63%), foi suficiente executar este procedimento apenas uma vez. Nos restantes 21%, foi necessária a sua repetição.

No presente trabalho, todos os animais atingiram a cura com esta técnica, tendo a maioria (n=3; 60%) sido submetidos a dois desbridamentos. No entanto, o número de defeitos considerados neste estudo (n=5) é reduzido e muito inferior ao dos ensaios referido anteriormente, pelo que não tem significado estabelecer-se uma comparação entre estes.

É recomendada a instituição de antibioterapia tópica de largo espectro para prevenir infeção pós cirúrgica (Miller 2001; Moore 2003; Maggs 2008; Marrion 2008; Turner 2008; Ledbetter *and* Gilger 2014; Sanchez 2014; Belknap 2015).

Segundo Moore (2003), no manejo de úlceras persistentes, pela sua ação epiteliotóxica, deve evitar-se a administração de gentamicina. Já a oxitetraciclina foi descrita como tendo um efeito benéfico adicional de aceleração da cicatrização do epitélio corneal (Chandler *et al.* 2010), pelo que se deve privilegiar a sua aplicação.

Os protocolos antibióticos eleitos no manejo de defeitos persistentes, variam bastante entre autores. Na avaliação retrospectiva de Wu, Smith *et al.* (2018) o fármaco receitado para a generalidade dos pacientes analisados foi a oxitetraciclina. No estudo de Bayley *et al.* (2018) a antibioterapia tópica consistiu na administração de cloranfenicol, ao passo que no de Boutin *et al.* (2020), passou pelo uso de tobramicina. Para os animais considerados por Hung *et al.* (2020) foram prescritos cloranfenicol ou ofloxacina.

Ao contrário do verificado nestes trabalhos, no presente, recorreu-se à associação de fármacos para alargar o espectro de atuação da antibioterapia. A combinação mais usada foi gentamicina e moxifloxacina (n=3; 60%), seguida das junções gentamicina e ofloxacina e tobramicina e moxifloxacina, prescritas uma vez (n=1, 20%) cada. A nenhum animal foi prescrito oxitetraciclina.

Apesar dos fármacos eleitos nesta avaliação não terem sido semelhantes aos usados por outros autores nem, segundo a bibliografia consultada, os mais apropriados, a amostra considerada é de dimensão reduzida (n=5), pelo que não se podem tirar conclusões definitivas.

É indicada a prescrição de um agente midriático cicloplégico se o animal apresentar miose ou sinais de dor ocular (Moore 2003). Considerando o seu quadro clínico, foi receitada tropicamida a todos os pacientes com úlceras indolentes incluídos nesta avaliação. Em alguns destes (n=2; 40%), os sinais de desconforto eram intensos e, por isso, foi ainda incluído no seu plano de tratamento um AINE sistémico, nomeadamente meloxicam.

Ao contrário do verificado no HRVM, nos cães considerados nos estudos de Bayley *et al.* (2018), Wu, Smith *et al.* (2018), Boutin *et al.* (2020) e Hung *et al.* (2020), não foram prescritas estas substâncias. Para promoção do bem-estar destes paciente, foram administrados AINES orais (Bayley *et al.* 2018; Wu, Smith *et al.* 2018; Boutin *et al.* 2020; Hung *et al.* 2020), tramadol (Wu, Smith *et al.* 2018; Hung *et al.* 2020) e gabapentina (Boutin *et al.* 2020), em combinações variadas.

No presente estudo, fez ainda parte do tratamento médico dos indivíduos diagnosticados com defeitos epiteliais crónicos, a ministração tópica de plasma autólogo.

Não foram encontrados estudos relativos ao uso de plasma sanguíneo no tratamento de lesões corneais indolentes. Dadas as similaridades deste com o soro do sangue, foram comparadas as observações retiradas nesta avaliação com as de outros autores que usaram soro autólogo.

Inúmeros ensaios realizados em medicina humana demonstraram os efeitos benéficos da aplicação de colírios de soro sanguíneo no tratamento de DECCE (Tsubota *et al.* 1999; Poon *et al.* 2001; Young *et al.* 2004; Schrader *et al.* 2006; Jeng and Dupps 2009; Botella *et al.* 2011; Cho *et al.* 2012; Arain *et al.* 2013; Lekhanont *et al.* 2013; Semeraro *et al.* 2014).

Dois ensaios em medicina humana (Poon *et al.* 2001; Lekhanont *et al.* 2013) descrevem a evolução clínica de doentes com defeitos epiteliais persistentes nos quais se adicionou soro a 100% ao plano de tratamento.

Poon *et al.* (2001) verificaram uma recuperação de 5 dos 6 olhos avaliados (83,33%) 4 semanas após o início do tratamento. O remanescente (16,67%) estava curado ao fim de 8 semanas. Já Lekhanont *et al.* (2013) reportaram uma taxa de resolução de 93,2% dos 181 pacientes examinados passadas 2 semanas de utilização do produto.

Neste estudo, a cura dos casos de ulceração indolente verificou-se, em média,  $78 \pm 31,19$  dias após o diagnóstico, tendo variado consideravelmente (entre 31 e 111 dias). Comparando estes resultados com os dos enunciados anteriormente, nenhuma das lesões cicatrizou após 2 semanas de tratamento, tendo a cura sido atingida após as 4 e antes das 8 semanas em todos os animais.

É importante realçar que o número de indivíduos avaliados neste e nos outros ensaios referidos não foi semelhante e o plano terapêutico instituído para cada variou

consideravelmente. Desta forma, com base nesta amostra, não se podem extrair conclusões sobre a eficácia do plasma autólogo no tratamento de lesões indolentes.

Estão indicadas para casos de ulceração indolente monitorizações a cada 7 a 14 dias, na ausência de sinais clínicos (Miller 2001; Marrion 2008). Apesar de os 5 animais com DECCE avaliados não apresentarem sinais clínicos e não exigirem controlos mais frequentes, não foi possível cumprir rigorosamente estas recomendações por incompatibilidade de horários dos clínicos e tutores.

No caso das úlceras profundas, é indicada cirurgia quando a profundidade da úlcera é igual ou superior a 50% da espessura estromal, pois a capacidade de regeneração do estroma é limitada e a sua recuperação dá-se lentamente (Maggs 2008; Ledbetter *and* Gilger 2014).

No seu estudo, publicado em 2009, Kim *et al.* afirmaram que com o uso isolado de medicação, a taxa de recuperação de úlceras estromais foi de 71%, ao passo que, quando realizado *flap* conjuntival associado a tarsorrafia temporária, esta subiu para os 100%. Também Dorbandt *et al.* (2015), que avaliaram 37 olhos com defeitos profundos sujeitos a *flap* conjuntival, verificaram uma taxa de sucesso de 100% nos de úlceras estromais.

Das úlceras estromais avaliadas neste estudo, 2 delas eram muito profundas, tendo sido executados *flaps* conjuntivais (15,38%).

Úlceras acompanhadas por perdas estromais estão, normalmente, associadas a infeção microbiana e, por essa razão, devem ser sempre sujeitas a exame citológico, cultura bacteriana e TSA, de forma a auxiliar na seleção dos fármacos mais adequados e, desta forma, minimizar o desenvolvimento de resistência dos agentes infecciosos (Wilkie *and* Whittaker 1997; Miller 2001; Maggs 2008; Miller 2013; Ledbetter *and* Gilger 2014; Sanchez 2014; Belknap 2015).

No presente estudo, nenhuma das lesões foi sujeita a citologia, cultura ou TSA, tendo a antibioterapia sido empregue de forma empírica.

Também nos trabalhos de Bayley *et al.* (2018), Wu, Smith *et al.* (2018) e Boutin *et al.* (2020) sobre o tratamento de defeitos corneais persistentes é referido que nas situações em que se verificou um agravamento lesional, não foram realizadas análises microbiológicas. Nos estudos de Kim *et al.* (2009), Amol (2016), Pandey *et al.* (2018) e Costa, Steinmetz *et al.* (2021), relativos ao tratamento de úlceras profundas, não constam informações de que estes exames tenham sido efetuados.

Está indicado para estas situações iniciar-se antibioterapia tópica intensiva antes dos resultados dos resultados do TSA chegarem (Ledbetter *and* Gilger 2014; Sanchez 2014).

De acordo com a maior parte dos autores (Maggs 2008; Marrion 2008; Miller 2013; Sanchez 2014; Belknap 2015), devem reservar-se para estes casos, a utilização de fluoroquinolonas. Segundo Ledbetter e Gilger (2014), são boas opções a monoterapia com

uma fluoroquinolonas de última geração, a combinação de fluoroquinolonas de gerações iniciais ou a associação de um aminoglicosídeo com uma cefalosporina de primeira geração.

Pode também recorrer-se ao uso de soluções fortificadas (Maggs 2008; Turner 2008; Sanchez 2014), que atingem altas concentrações no tecido corneal embora, segundo um estudo de Lin e Boehnke (2000), alguns destes, designadamente a gentamicina e a anfotericina B, podem ter um impacto negativo na sua cicatrização.

Nos trabalhos de Kim *et al.* (2009), Amol (2016), Singh *et al.* (2016), Pandey *et al.* (2018) e Costa, Steinmetz *et al.* (2021), que avaliaram o tratamento prescrito a doentes com queratopatias ulcerativas profundas, constatou-se que, na generalidade, os antibióticos mais usados pertenceram à classe das fluoroquinolonas.

Também no presente estudo, os três protocolos mais comumente instituídos aos doentes com úlceras complicadas (n=8; 61,53%) consistiram na combinação de um aminoglicosídeo com uma fluoroquinolona, especificamente, gentamicina e moxifloxacina (n=4; 30,77%), gentamicina e ofloxacina (n=2; 15,38%) e tobramicina e ofloxacina (n=2; 15,38%). Nos restantes 5 pacientes (38,47%) foram receitadas as junções tobramicina e oxitetraciclina e oxitetraciclina e cloranfenicol a 1 animal cada (7,69%) e aplicadas isoladamente gentamicina a 2 (15,38%) e cloranfenicol a 1 (7,69%). Não foram usadas soluções fortificadas em nenhum animal.

O doente que recebeu cloranfenicol apresentava uma lesão classificada como “profunda e pouco extensa”, o que pode justificar a escolha do uso isolado deste fármaco. Para os remanescentes 4 animais em que não foi receitada uma combinação aminoglicosídeo e fluoroquinolona, não constam quaisquer informações relativas à extensão da lesão. No entanto, com base na antibioterapia, a autora deduz tratarem-se de casos de pouca dimensão e não progressivos que, segundo a bibliografia consultada (Miller 2001; Turner 2008), podem ser abordados de uma forma semelhante às úlceras superficiais.

Os antibióticos sistémicos podem ser usados enquanto adjuvantes terapêuticos na presença de perfuração ocular ou quando há risco de esta ocorrer. Vários autores indicam como fármacos a administrar nestes casos a combinação amoxicilina e ácido clavulânico ou uma cefalosporina (Turner 2008; Marrion 2008; Sanchez 2014), pelo seu espetro de atuação e boa penetração ocular na presença de inflamação (Regnier *et al.* 2014).

À semelhança do que foi indicado por estes, Kim *et al.* (2009), quando necessário, optaram por usar a associação amoxicilina e ácido clavulânico. No trabalho de Costa, Steinmetz *et al.* (2021) o fármaco eleito foi a cefalexina e no de Pandey *et al.* (2018), a moxifloxacina. Já no presente estudo, nos 2 cães (15,38%) com indicação para realização de antibioterapia sistémica, foram prescritas cefazolina e enrofloxacina.

A analgesia destes pacientes passa pela administração de um agente midriático cicloplégico, AINES sistêmicos ou tópicos e opióides (Maggs 2008; Marrion 2008; Ledbetter *and* Gilger 2014; Sanchez 2014; Belknap 2015).

No momento da seleção do fármaco de ação analgésica a administrar tem que se atender a duas importantes considerações: se existir ameaça de rotura, o uso de um agente midriático cicloplégico reduz a possibilidade de formação de sinéquia anterior (Ledbetter *and* Gilger 2014); e que na presença de queratomalácia, a administração de AINES tópicos é altamente desaconselhada (Maggs 2008; Sanchez 2014).

No presente estudo, estas duas premissas foram tidas em conta aquando a prescrição dos fármacos, tendo-se optado por ministrar tropicamida a 3 (23,08%), tramadol oral a 1 (7,69%), flurbiprofeno a 2 (15,38%) e meloxicam *per os* a 3 (23,08%).

Na avaliação de Kim *et al.* (2009) a atropina e o flurbiprofeno fizeram parte do tratamento de todos os doentes considerados, assim como nos de Amol (2016). Singh *et al.* (2016) optaram por prescrever atropina e cetorolaco de trometamina. Já para os animais incluídos trabalho de Costa, Steinmetz *et al.* em 2021, apenas foi receitada atropina. Já Pandey *et al.* (2018) prescreveram atropina, flurbiprofeno e ainda meloxicam.

Em relação ao tratamento médico, a grande diferença no maneo de úlceras progressivas em relação a não progressiva é que nas primeiras é indispensável a inclusão de um agente anticolagenases no plano terapêutico, de modo a normalizam a atividade proteolítica e travar a exacerbação da lesão (Maggs 2008; Turner 2008; Ledbetter *and* Gilger 2014; Sanchez 2014; Belknap 2015).

Várias substâncias ou produtos podem ser aplicados com esta finalidade: soro sanguíneo, tetraciclina, N-acetilcisteína, EDTA, ilomostato e  $\alpha$ 1-antitripsina (Ledbetter *and* Gilger 2014; Oliver *and* Smith 2014).

O soro sanguíneo tem uma forte atividade anticolagenase, a par das suas propriedades lubrificantes, antibacterianas, epiteliotróficas e proneurais (Sommer 1983; Tsubota *et al.* 1999; Imanishi *et al.* 2000; Poon *et al.* 2001; Geerling 2004; Associação Portuguesa de Farmacêuticos Hospitalares 2008; Conway 2015; Goyal *and* Hamrah 2016, citados por Marchand *et al.* 2018).

No maneo de úlceras profundas, no trabalho de Kim *et al.* (2009), foi prescrita N-acetilcisteína. Para os animais avaliados por Amol (2016), foram usados soro autólogo, EDTA e doxiciclina. Um dos cães analisado por Singh *et al.* em 2016, beneficiou da ministração subconjuntival de soro autólogo.

No presente estudo, a plasmaterapia autóloga tópica fez parte do plano terapêutico tanto dos doentes com úlceras profundas em que foi verificada a presença de queratomalácia (n=4; 30,77%), como aqueles em que esta não foi diagnosticada (n=9; 69,23%).

Nesta avaliação, assume-se que o soro e o plasma apresentam ações semelhantes, uma vez que em termos de composição são muito idênticos. No entanto, para obtenção do plasma aplicado no HRVM, utilizou-se como anticoagulante o EDTA, o que possivelmente conferiu uma maior ação anticolagenase ao produto administrado.

Martin de Bustamante *et al.* (2018) avaliaram a evolução clínica de 13 gatos diagnosticados com ulceração profunda cuja abordagem terapêutica foi semelhante à do presente estudo. O manejo destes passou por instituição de antibioterapia, soroterapia e analgesia, com atropina, buprenorfina, AINES e corticosteroides sistêmicos, em combinações variadas. Para além das similaridades existentes entre os dois trabalhos em termos de dimensão da amostra e tratamento médico aplicado, também em ambas as avaliações 4 lesões eram acompanhadas de queratomalácia.

A duração média da doença nos gatos foi de 21 dias (entre 9 a 103), tendo sido necessárias, em média, 4 monitorizações (entre 2 a 6).

Os resultados da presente avaliação são bastante semelhantes aos dos referidos anteriormente. Apenas o período de doença foi significativamente inferior no estudo de Martin de Bustamante *et al.* (2018) em relação ao destes animais. No primeiro foi de 21 dias, ao passo que no segundo foi de 43,31 dias. No entanto, os tempos decorrentes até à resolução mínimos e máximos em ambas os trabalhos não foram assim tão dispares: 9 e 103 no estudo realizado em gatos e 12 a 108 no presente.

Ao contrário do que se verificou, seria expectável que o tempo decorrente até à cura fosse inferior no grupo de pacientes avaliados no presente estudo, uma vez que 2 destes beneficiaram da realização de *flap* conjuntival e que na formulação do plasma neles aplicado foi usado EDTA, que potenciou a ação anticolagenase deste produto. Todavia, a amostra considerada neste estudo é heterogénea e não foram tidos em consideração grupos controlo, o que nos impossibilita de retirar conclusões significativas.

Estão indicados para casos de ulceração profunda acompanhamentos frequentes, a cada 2 a 3 dias até reepitelização ou ausência de corrimento purulento (se presente ao diagnóstico) e, posteriormente, a cada 7 a 14 dias até cura completa (Marrion 2008). Nesta avaliação, não foi cumprido este critério rigorosamente, no entanto, a frequência das reavaliações foi proporcional à gravidade das lesões.

Assim, para os 4 casos de ulceração acompanhados por queratomalácia, as duas primeiras consultas de controlo ocorreram em média aos  $4,75 \pm 4,27$  dias e  $11,50 \pm 7,18$  dias após o diagnóstico, respetivamente.

Uma vez que todos os animais com queratopatias ulcerativas graves (indolentes e profundas) foram tratados com plasma autólogo, para avaliarmos a eficácia deste produto no tratamento destas lesões foi feita uma comparação do tempo mediano de duração da doença

consoante a frequência de administração do produto (quatro ou mais administrações por dia e três ou menos aplicações diárias).

A mediana dos tempos de duração da patologia foi significativamente mais baixa nos animais aos quais o plasma foi aplicado três ou menos vezes ao dia (21 dias) que nos submetidos a quatro ou mais administrações diárias (60 dias).

Após uma análise de sobrevivência com curvas de *Kaplan Meier* e aplicação do teste de *log-rank*, concluiu-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre as medianas dos tempos de recuperação nestes dois grupos considerados ( $p=0,9$ ).

Estas conclusões parecem não estar de acordo com o que foi já reportado por vários autores, que referem a influência positiva que a soroterapia tem na regeneração de úlceras corneais indolentes (Tsubota *et al.* 1999; Poon *et al.* 2001; Young *et al.* 2004; Schrader *et al.* 2006; Jeng and Dupps 2009; Cho *et al.* 2012; Arain *et al.* 2013; Lekhanont *et al.* 2013; Semeraro *et al.* 2014) e profundas (Ollivier *et al.* 2003; Conway 2015; Martin de Bustamante *et al.* 2018).

A justificação apresentada para estes resultados é semelhante à que foi dada para fundamentar os do ensaio com lesões superficiais: as úlceras estromais avaliadas apresentam gravidades variadas (“pouco extensas”, “extensas” e “extensas acompanhadas de queratomalácia”), tendo sido nas mais complicadas usado plasma autólogo com mais regularidade. Para além disso, o número de doentes considerados para cada grupo é diferente, sendo 7 (38,89%) os animais aos quais foram administradas gotas menos de três vezes ao dia e 11 (61,11%) os que receberam plasma mais regularmente, e também o tratamento instituído a cada um variou. Desta forma, o tamanho da amostra e dos grupos considerados, assim como a heterogeneidade dentro de cada um deles, impossibilita que sejam retiradas conclusões relativamente à eficácia da plasmaterapia no maneio de queratopatias ulcerativas graves.

## **5. Conclusões, limitações do estudo e perspetivas futuras**

No presente estudo, tanto na comparação dos resultados dos grupos de indivíduos com úlceras superficiais tratados e não tratados com plasma autólogo, bem como na comparação dos animais com úlceras graves (indolentes e profundas) sujeitos a três ou menos e quatro ou mais administrações de plasma diárias, não foram encontradas diferenças que evidenciassem o sucesso da plasmaterapia.

Sendo a presente dissertação um estudo retrospectivo, foram encontradas algumas restrições à sua elaboração.

Este trabalho consistiu numa avaliação do tratamento instituído em doentes com ulceração corneal num hospital de referência, onde há conhecimento dos benefícios

associadas à aplicação ocular de plasma sanguíneo na resolução desta doença e das mínimas desvantagens que lhes estão associadas quando é elaborado, acondicionado e administrado corretamente, o que tornou difícil encontrar animais com lesões complicadas para as quais estes colírios não tenham sido prescritos.

Desta forma, no HRVM, consoante a gravidade clínica, optou-se ou não por receitar plasma autólogo e, naqueles em que este foi usado, na escolha da frequência de administração também foi tida em conta a gravidade da situação, o que limitou a capacidade de determinar com significância estatística que o uso de plasma autólogo está associado a uma mais rápida cicatrização das lesões.

Para além disso, o número de animais que compôs a amostra em estudo foi reduzido e não foi possível considerar grupos controlo, o que dificultou ainda mais a análise estatística realizada.

Um outro aspeto que pode ter enviesado os resultados obtidos é o restante plano terapêutico, nomeadamente a antibioterapia. Nenhuma úlcera foi sujeita a um exame microbiológico, tendo sido receitados antibióticos sem considerar os resultados do TSA. Isto coloca a hipótese de não ter sido usado o fármaco mais adequado, o que condicionou a resposta aos restantes componentes do tratamento, nomeadamente o plasma autólogo. Para além disso, verificou-se uma grande variabilidade nos protocolos antibióticos elegidos.

É ainda importante referir que os animais não foram avaliados diariamente, tendo sido assumido como momento da recuperação a consulta em que se verificou uma ausência de retenção do corante fluoresceína, podendo esta cura ter ocorrido a qualquer altura entre essa observação e a última reavaliação do animal.

Uma outra limitação encontrada na elaboração deste trabalho foi a dificuldade em realizar uma análise comparativa dos resultados obtidos com observações retiradas por outros autores, pela ausência de estudos referentes à utilização de plasma autólogo no maneio de úlceras da córnea.

Vários autores reportaram uma cicatrização de úlceras corneais mais rápida quando aplicados colírios formulados a partir do sangue do animal. Embora os resultados deste estudo não tenham sido estatisticamente significativos, também apontam nesse sentido.

Algo que este trabalho enfatizou é que a eficácia da plasmaterapia autóloga depende de vários fatores, nomeadamente da gravidade da situação.

Foi ainda possível evidenciar neste estudo que a administração tópica ocular de plasma autólogo é segura e bem tolerada.

A realização de avaliações retrospectivas sobre a aplicação de fármacos ou produtos no tratamento de várias doenças é útil, na medida em que permite conhecer novos dados acerca destes e das doenças consideradas.

Para além disso, em medicina veterinária são ainda muito poucos os estudos relativos à utilização de plasma autólogo no tratamento da doença ulcerativa corneal, e os que existem são maioritariamente estrangeiros. O presente estudo pretende contribuir para impulsionar a elaboração de outros trabalhos nacionais acerca desta temática.

## Bibliografia

- Alio JL, Rodriguez AE, Abdelghany AA, Oliveira RF. 2017. Autologous Platelet-Rich Plasma Eye Drops for the Treatment of Post-LASIK Chronic Ocular Surface Syndrome. *Journal of Ophthalmology*. 2017: 1-18.
- Al-Mansouri S, Tabbara KF, Rask-Pedersen E. 1994. Lubrithal® (Leo viscous eye gel), precorneal residence time in normal and dry eyes. *Documenta Ophthalmologica*. 88(2): 187-194.
- Amol PE. 2016. Studies on the incidence, diagnosis and management of different ocular affections in brachycephalic dogs [Ph.D thesis]. Anand: Anand Agricultural University.
- [APFH] Associação Portuguesa de Farmacêuticos Hospitalares. 2008. Protocolo de utilização do colírio de soro autólogo. Coimbra: APFH.
- Arain MA, Dar AJ, Adeeb L. 2013. Autologous serum eye drops for the treatment of persistent corneal epithelial defects. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*. 23(10): 737-739.
- Bayley KD, Read, RA, Gates MC. 2018. Superficial keratectomy as a treatment for non-healing corneal ulceration associated with primary corneal endothelial degeneration. *Veterinary Ophthalmology*. 2018: 1-8.
- Bekendam PD, Narváez J, Agarwal M. 2007. Case of corneal melting associated with the use of topical nepafenac. *Cornea*. 26(8): 1002-1003.
- Belknap EB. 2015. Corneal emergencies. *Topics in Companion Animal Medicine*. 30(3): 74-80.
- Bentley E. 2005. Spontaneous chronic corneal epithelial defects in dogs: a review. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 41(3): 158-165.
- Bernabei F, Roda M, Buzzi M, Pellegrini M, Giannaccare G, Versura P. 2019. Blood-based treatments for severe dry eye disease: the need of a consensus. *Journal of Clinical Medicine*. 8(9): 1478.
- Bewick V, Cheek L, Ball J. 2004. Statistics review 12: survival analysis. *Critical Care*. 8(5): 389-394.
- Botella AJ, Peiró JFM, Márques K, Cambero NM, Otaolauruchi JS. 2011. Effectiveness of 100% autologous serum drops in ocular surface disorders. *Farmacia Hospitalaria*. 35(1): 8-13.
- Boutin M, Coutellier M, Ollivier FJ. 2020. Cotton-tip debridement, scalpel blade debridement, and superficial grid keratotomy for treatment of spontaneous chronic corneal epithelial defects (SCCED): A retrospective evaluation of 308 cases. *Veterinary Ophthalmology*. 00: 1-8.
- Bradley JC, Simoni J, Bradley RH, McCartney DL, Brown SM. 2009. Time- and temperature-dependent stability of growth factor peptides in human autologous serum eye drops. *Cornea*. 28(2): 200-205.

- Brooks DE, Ollivier FJ. 2004. Matrix metalloproteinase inhibition in corneal ulceration. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 34(3): 611-622.
- Chandler HL, Gemensky-Metzler AJ, Bras ID, Robbin-Webb TE, Saville WJA, Colitz CMH. 2010. In vivo effects of adjunctive tetracycline treatment on refractory corneal ulcers in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 237(4): 378-386.
- Cho YK, Huang W, Kim GY, Lim BS. 2012. Comparison of autologous serum eye drops with different diluents. *Current Eye Research*. 38(1): 9-17.
- Clark JS, Bentley E, Smith LJ. 2011. Evaluation of topical nalbuphine or oral tramadol as analgesics for corneal pain in dogs: a pilot study. *Veterinary Ophthalmology*. 14(6): 358-364.
- Conway ED. 2015. Investigations into the anti-collagenase efficacy of serum and plasma [M.Sc. Thesis]. West Lafayette: Purdue University.
- Costa D, Leiva M, Sanz F, Espejo V, Esteban J, Vergara J, Díaz C, Huguet E, Cairó M, Ríos J, et al. 2019. A multicenter retrospective study on cryopreserved amniotic membrane transplantation for the treatment of complicated corneal ulcers in the dog. *Veterinary Ophthalmology*. 22(5): 695.
- Costa J, Steinmetz A, Delgado E. 2021. Clinical signs of brachycephalic ocular syndrome in 93 dogs. *Irish Veterinary Journal*. 74(3): 1-8.
- Crispin SM. 2005. Section 3: General and canine ophthalmology, Cornea, anatomy and physiology. In: *Notes on veterinary ophthalmology*. 1st ed. Oxford: Blackwell Science Ltd.; p. 109-110.
- Dall'Ara P, Turin L. 2019. Immunology of the canine eye in health and disease: a concise review. *Veterinárni Medicina*. 64(1): 1-17.
- Dawson C, Naranjo C, Sanchez-Maldonado B, Fricker GV, Linn-Pearl RN, Escanilla N, Kafarnik C, Gould DJ, Sanchez RF, Matas-Riera M. 2015. Immediate effects of diamond burr debridement in patients with spontaneous chronic corneal epithelial defects, light and electron microscopic evaluation. *Veterinary Ophthalmology*. 20(1): 11-15.
- Del Cid RMDA, Escoriaza IMDE. 2009. Subconjunctival application of regenerative factor-rich plasma for the treatment of ocular alkali burns. *European Journal of Ophthalmology*. 19(6): 909-915.
- Dewhurst E, Carter J, Scurrill E. 2014. Laboratory investigation of ophthalmic disease. In: Gould D, McLellan G, editors. *BSAVA manual of canine and feline ophthalmology*. 3rd ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association; p. 51.
- Dorbandt DM, Moore PA, Myrna KE. 2015. Outcome of conjunctival flap repair for corneal defects with and without an acellular submucosa implant in 73 canine eyes. *Veterinary Ophthalmology*. 18(2): 116-122.
- Dubielzig RR, Ketrings K, McLellan GJ, Albert DM. 2010. Diseases of the cornea and sclera. In: *Veterinary ocular pathology*. 1st ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; p. 211-212, 222.

- Fea AM, Aragno V, Testa V, Machetta F, Parisi S, D'Antico S, Spinetta R, Fusaro E, Grignolo FM. 2016. The Effect of Autologous Platelet Lysate Eye Drops: An In Vivo Confocal Microscopy Study. *BioMed Research International*. 2016: 1–10.
- Featherstone HJ, Heinrich CL, Donaldson D, Hartley C, Dietrich UM, Ekesten B. 2014. Eye examination and diagnostics. In: Gelatt KN, editor. *Essentials of veterinary ophthalmology*. 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; p. 111, 114-115, 117, 119.
- Feiz V, Oberg TJ, Kurz CJ, Mamalis N, Moshirfar M. 2009. Nepafenac-associated bilateral corneal melt after photorefractive keratectomy. *Cornea*. 28(8): 948-950.
- Fischer KR, Opitz A, Böeck M, Geerling G. 2012. Stability of serum eyedrops after storage of 6 months. *Cornea*. 31(11): 1313-8.
- Geerling G. 2004. Autologous serum eye drops for ocular surface disorders. *British Journal of Ophthalmology*. 88(11): 1467-1474.
- Giannaccare G, Versura P, Buzzi M, Primavera L, Pellegrini M, Campos EC. 2017. Blood derived eye drops for the treatment of cornea and ocular surface diseases. *Transfusion and Apheresis Science*. 56(4): 595-604.
- Gosling AA, Labelle AL, Breaux CB. 2013. Management of spontaneous chronic corneal epithelial defects (SCCEDs) in dogs with diamond burr debridement and placement of a bandage contact lens. *Veterinary Ophthalmology*. 16(2): 83-88.
- Goulle F. 2011. Use of porcine small intestinal submucosa for corneal reconstruction in dogs and cats: 106 cases. *Journal of Small Animal Practice* 53(1): 34-43.
- Grahn BH, Wolfer J. 2009. Therapeutics. In: Peiffer RL, Petersen-Jones SM, editors. *Small animal ophthalmology: a problem-oriented approach*. 4th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; p. 50-51.
- Gueudry J, Lebel H, Muraine M. 2009. Severe corneal complications associated with topical indomethacin use. *British Journal of Ophthalmology*. 94(1): 133-134.
- Gum GG, MacKay EO. 2014. Physiology of the eye. In: Gelatt KN, editor. *Essentials of veterinary ophthalmology*. 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; p. 40-45, 49.
- Heinrich C. 2014. The ocular examination. In: Gould D, Mclellan G, editors. *BSAVA manual of canine and feline ophthalmology*. 3rd ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association; p. 7-8, 16-17, 18-20.
- Herring IP. 2007. Clinical pharmacology and therapeutics. In: Gellat KN, editor. *Veterinary ophthalmology*. 4th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; p. 332-354.
- Hewitt JS, Allbaugh RA, Kenne DE, Sebbag L. 2020. Prevalence and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from dogs with ulcerative keratitis in midwestern United States. *Frontiers in Veterinary Science*. 7:583965.
- Hung JH, Leidreiter K, White JS, Bernays ME. 2020. Clinical characteristics and treatment of spontaneous chronic corneal epithelial defects (SCCEDs) with diamond burr debridement. *Veterinary Ophthalmology*. 23(4): 764-769.

- Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I, Kita M, Sotozono C, Kinoshita S. 2000. Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Progress in retinal and eye research*. 19(1): 113-129.
- Jaksz M, Fischer M-C, Fenollosa-Romero E, Busse C. 2020. Autologous corneal graft for the treatment of deep corneal defects in dogs: 15 cases (2014-2017). *Journal of Small Animal Practice*. 62(2): 1-2, 7-8. 123-124, 129-130.
- Jeng BH, Dupps WJ. 2009. Autologous serum 50% eyedrops in the treatment of persistent corneal epithelial defects. *Cornea*. 28(10): 1104-1108.
- Junqueira LC, Carneiro J. 2013. Sistemas fotorreceptor e audiorreceptor. In: *Histologia básica*. 12<sup>a</sup> edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, S. A.; p. 448-450.
- Kern TJ. 1990. Ulcerative keratitis. *Veterinary clinics of North America: small animal practice*. 20(3): 645-649.
- Khalifa YM, Mifflin MD. 2011. Keratitis and corneal melt with ketorolac tromethamine after conductive keratoplasty. *Cornea*. 30(4): 477-478.
- Kim JY, Won H, Jeong S. 2009. A retrospective study of ulcerative keratitis in 32 dogs. *The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*. 7(1): 27-31.
- Kirschner SE, Brazzell RK, Stern ME, Baird L. 1991. The use of topical epidermal growth factor for the treatment of nonhealing corneal erosions in dogs. *The Journal of the American Animal Hospital Association*. 27: 449-452.
- Kuruc M, Zheng H, Sowerhardy A, Avadhani S, Roy D, Verhamme IM, Roy S. 2020. New Strategies to Categorize Blood for Proteomic Biomarker Discovery. *Proteomics Bioinformatics*, 2(2): 90-107.
- La Croix N. 2018. Antibiotics to treat corneal ulceration. *Veterinary Medical Center of Long Island* [Internet]. [accessed 2021 July 4]: [1 p.] <https://vmcli.com/antibiotics-to-treat-corneal-infections/>
- Labelle P. 2017. The eye1. In Zachary JF, editor. *Pathologic basis of veterinary disease*. 6th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; p. 1270, 1278.e2, 1297-1298.
- Latham K. 2021. Serum vs. Plasma. *Biology Dictionary* [Internet]. [accessed 2022 February 1]. [1 p.] <https://biologydictionary.net/serum-vs-plasma/>
- Ledbetter EC, Gilger BC. 2014. Canine cornea: diseases and surgery. In Gelatt KN, editor. *Essentials of veterinary ophthalmology*. 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; p. 216-217, 221-231, 234-236.
- Lekhanont K, Jongkhajornpong P, Choubtum L, Chuckpaiwong V. 2013. Topical 100% serum eye drops for treating corneal epithelial defect after ocular surgery. *BioMed Research International*. 2013: 1-7.
- Lelescu CA, Dumitras DA, Iurian S, Staffieri, Muresan C. 2020. Effects of topical application of tramadol with/without dexmedetomidine and proparacaine on corneal sensitivity in rats. *International Ophthalmology*. 41(2):465-473.

- Lin C-P, Boehnke M. 2000. Effect of fortified antibiotic solutions on corneal epithelial wound healing. *Cornea*. 19(2): 204-206.
- Liu L, Hartwig D, Harloff S, Herminghaus P, Wedel T, Geerling G. 2005. An optimized protocol for the production of autologous serum eye drops. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 243(7): 706-714.
- Liu L, Hartwig D, Harloff S, Herminghaus P, Wedel T, Kasper K, Geerling G. 2006. Corneal epitheliotropic capacity of three different blood-derived preparations. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 47(6): 2438.
- Maggs DJ. 2008. Basic diagnostic techniques. In Maggs DJ, Miller PE, Ofri R, editors. *Slatter's fundamentals of veterinary ophthalmology*. 4th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; p. 83-84, 98-100.
- Maggs DJ. 2008. Cornea and sclera. In Maggs DJ, Miller PE, Ofri R, editors. *Slatter's fundamentals of veterinary ophthalmology*. 4th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; p. 175-176, 183-190.
- Maggs DJ. 2008. Ocular pharmacology and therapeutics. In Maggs DJ, Miller PE, Ofri R, editors. *Slatter's fundamentals of veterinary ophthalmology*. 4th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; p. 56-57, 59.
- Marchand M, Harissi-Dagher M, Germain M, Thompson P, Robert M-C. 2018. Serum drops for ocular surface disease: national survey of Canadian cornea specialists. *Canadian Journal of Ophthalmology*. 53(3): 266-271.
- Marrion R. 2008. Diseases of the cornea and sclera. In Morgan RV, editor. *Handbook of small animal practice*. 5th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; p. 958-961.
- Martin de Bustamante MG, Good KL, Leonard BC, Hollingsworth SR, Edwards SG, Knickelbein KE, Cooper AE, Thomasy MS, Maggs DJ. 2018. Medical management of deep ulcerative keratitis in cats: 13 cases. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 21(4):387-393.
- McDonnell PJ, Schanzlin DJ, Rao NA. 1988. Immunoglobulin deposition in the cornea after application of autologous serum. *Archives of Ophthalmology*. 106(10): 1423-5
- Meekins JM, Rankins AJ, Samuelson DA. 2021. Ophthalmic anatomy. In Gellat KN, Ben-Shlomo G, Gilger BC, Hendrix DVH, Kern TJ, Plummer CE, editors. *Veterinary ophthalmology*. 6th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; p. 53-54, 57-59.
- Mian SI, Gupta A, Pineda R. 2006. Corneal ulceration and perforation with ketorolac tromethamine (Acular®) Use After PRK. *Cornea*. 25(2): 232-234.
- Miller D. 2013. Pharmacological treatment for infectious corneal ulcers. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 14(5): 543-560.
- Miller WW. 2001. Evaluation and management of corneal ulcerations: a systematic approach. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*. 16(1): 52-56.
- Moore PA. 2003. Diagnosis and management of chronic corneal epithelial defects (indolent corneal ulcerations). *Clinical Techniques in Small Animal Practice*. 18(3): 168-177.

- Morgan RV, Abrams KL. 1994. A comparison of six different therapies for persistent corneal erosions in dogs and cats. *Progress in veterinary & comparative ophthalmology*. 4: 38-43.
- Murphy CJ, Marfurt CF, McDermott A, Bentley E, Abrams GA, Reid TW, Campbell S. 2001. Spontaneous chronic corneal epithelial defects (SCCED) in dogs: clinical features, innervation, and effect of topical SP, with or without IGF-1. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 42(10): 2252-2261.
- Nutbrown-Hughes D. 2020. Brachycephalic ocular syndrome. *The Veterinary Nurse*. 11(8): 354-362.
- Ollivier FJ, Brooks DE, Kallberg ME, Komaromy AM, Lassaline ME, Andrew SE, Gelatt KN, Stevens GR, Blalock TD, van Setten G, et al. 2003. Evaluation of various compounds to inhibit activity of matrix metalloproteinases in the tear film of horses with ulcerative keratitis. *American Journal of Veterinary Research*. 64(9): 1081-1087.
- O'Neill DG, Lee MM, Brodbelt DC, Church DB, Sanchez RF. 2017. Corneal ulcerative disease in dogs under primary veterinary care in England: epidemiology and clinical management. *Canine Genetics and Epidemiology*. 4(5).
- Packer RMA, Hendricks A, Burn CC. 2015. Impact of facial conformation on canine health: corneal ulceration. *PLOS One*. 10(5): e0123827.
- Pandey P, Shahi A, Kumar D, Shukla MK. 2018. Clinical evaluation of surgical procedures for corneal ulcer in dogs. *The Indian Journal of Veterinary Sciences & Biotechnology*. 13(4): 95-99.
- Patel KP, Parikh PV, Mahla JK, Ashwath SN, Kelawala DN. 2020. Incidence of corneal ulcer in dogs – a retrospective study. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 9(8): 3174-3179.
- Petersen-Jones SM, Crisrin SM. 1999. In: *Manual de oftalmología en pequeños animales*. Barcelona: Ediciones S, p. 154-156, 160.
- Pflugfelder SC. 2006. Is autologous serum a tonic for the ailing corneal epithelium?. *American Journal of Ophthalmology*. 142(2): 316-317.
- Plummer CE. 2015. Practical techniques from the NAVC Institute: addressing brachycephalic ocular syndrome in the dog. *Today's Veterinary Practice* [Internet]. [accessed 2021 July 20]. March/April 2015: 21-25. <https://todaysveterinarypractice.com/practical-techniques-from-the-navc-institute-addressing-brachycephalic-ocular-syndrome-in-the-dog-2/>
- Poon AC, Geerling G, Dart JK, Fraenkel GE. 2001. Autologous serum eyedrops for dry eyes and epithelial defects: clinical and in vitro toxicity studies. *British Journal of Ophthalmology*. 85(10): 1188-1197.
- Prasher P. 2012. Acute corneal melt associated with topical bromfenac use. *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice*. 38(4): 260-262.
- Quinto GG, Campos M, Behrens A. 2008. Autologous serum for ocular surface diseases. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 71(6): 47-54.

- Ramani C, Ahirwar MK, Shafiuzama Md, Nagarajan L. 2012. Incidence of corneal ulcer in dogs – a retrospective study. *Tamilnadu J. Veterinary & Animal Sciences*. 8(5): 250-252.
- Regnier A, Clode A, Rankin A, Herring I, Plummer CE, Gelatt KN. 2014. Ocular pharmacology and therapeutics. In: Gelatt KN, editor. *Essentials of veterinary ophthalmology*. 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; p. 67, 77-79.
- Reid TW. 1994. Growth control of cornea and lens epithelial cells. *Progress in Retinal and Eye Research*. 13(2): 507-554.
- Rigas B, Huang W, Honkanen R. 2019. NSAID-induced corneal melt: clinical importance, pathogenesis and risk mitigation. *Survey of Ophthalmology*. 65(1): 1-11.
- Rosolen SG, Multari D, Woods M, Jongh O. 2009. Diagnostics. In: Peiffer R, Petersen-Jones S. *Small animal ophthalmology*. 4th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; p. 16-20, 46-48.
- Samuelson DA. 2014. Ophthalmic structures. In: Gelatt KN, editor. *Essentials of veterinary ophthalmology*. 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons; p. 14-19, 21-25, 31-32.
- Sanchez RF. 2014. The cornea. In: Gould D, Mclellan G, editors. *BSAVA manual of canine and feline ophthalmology*. 3rd ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association; p. 200-206, 209-213.
- Sanchez RF, Innocent G, Mould J, Billson FM. 2007. Canine keratoconjunctivitis sicca: disease trends in a review of 229 cases. *Journal of Small Animal Practice* 48(4): 211-217.
- Schrader S, Wedel T, Moll R, Geerling G. 2006. Combination of serum eye drops with hydrogel bandage contact lenses in the treatment of persistent epithelial defects. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 244(10): 1345-1349.
- Semeraro F, Forbice E, Braga O, Bova A, Di Salvatore A, Azzolini C. 2014. Evaluation of the efficacy of 50% autologous serum eye drops in different ocular surface pathologies. *BioMed Research International*. 2014: 1-11.
- Sfaciotte RAP, Coronel LG, Snak A, Bordin JT, Yamamoto LK, Vignoto VKC, Osaki SC, Wosiacki SR. 2018. Multidrug-resistant bacterial pathogens assessment in canine ophthalmic infections. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*. 13(1): 7-15.
- Sharma A, Gupta AK, Singh M, Dwivedi DK. 2019. Bacterial investigation and antibiogram in corneal ulcers in dogs. *Journal of Animal Research*. 9(1): 195-199.
- Shimmura S. 2003. Albumin as a tear supplement in the treatment of severe dry eye. *British Journal of Ophthalmology* 87(10): 1279-1283.
- Shtein RM, Shen JF, Kuo AN, Hammersmith KM, Li JY, Weikert MP. 2019. Autologous serum-based eye drops for treatment of ocular surface disease. *Ophthalmology*. 127(1): 128-133.
- Singh NP, Jhirwal SK, Gahlot TK. 2016. Management of Corneal Ulcer. *Research & Reviews: Journal of Veterinary Sciences*. 2(1): 4-5.

- Stades FC, Wyman M, Boevé MH, Neumann W, Spiess B. 2007. In: *Ophthalmology for the veterinary practitioner*. 2nd ed. Hannover: Schlütersche; p.132.
- Stanley RG, Hardman C, Johnson BW. 1998. Results of grid keratotomy, superficial keratectomy and debridement for the management of persistent corneal erosions in 92 dogs. *Veterinary Ophthalmology*. 1(4): 233-238.
- Startup FG. 1984. Corneal ulceration in the dog. *Journal of Small Animal Practice*. 25(12): 740-743.
- Sommer A. 1983. Effects of vitamin A deficiency on the ocular surface. *Ophthalmology*. 90(6): 592-600.
- Tsubota K, Goto E, Shimmura S, Shimazaki J. 1999. Treatment of persistent corneal epithelial defect by autologous serum application. *Ophthalmology*. 106(10): 1984-1989.
- Tsvetanovo A, Powell RM, Tsvetanov KA, Smith KM, Gould DJ. 2021. Melting corneal ulcers (keratomalacia) in dogs: A 5-year clinical and microbiological study (2014–2018). *Veterinary Ophthalmology*. 24(11): 265-278.
- Turner SM. 2008. Cornea-introduction. In: *Saunders solutions in veterinary practice: small animal ophthalmology*. 1st ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; p. 121-123.
- Turner SM. 2008. Deep corneal ulcer. In: *Saunders solutions in veterinary practice: small animal ophthalmology*. 1st ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; p. 134.
- Turner SM. 2008. Laboratory investigation. In: *Saunders solutions in veterinary practice: small animal ophthalmology*. 1st ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; p.11
- Turner SM. 2008. The ophthalmic examination. In: *Saunders solutions in veterinary practice: small animal ophthalmology*. 1st ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; p. 5-8.
- Vongsakul S, Tuntivanich P, Sirivaidyapong S, Kalpravidh M. 2009. Canine amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction of created deep corneal ulcers in dogs. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*. 39(2): 135-144.
- Wilkie DA, Whittaker C. 1997. Surgery of the cornea. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 27(5): 1074.
- Wilson SE. 2020. Corneal wound healing. *Experimental Eye Research*. 108089: 4-19.
- Wolf EJ, Kleiman LZ, Schrier A. 2007. Nepafenac-associated corneal melt. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 33(11): 1974-1975.
- Wu D, Smith SM, Stine JM, Michau TM, Miller TR, Pederson SL, Freeman KS. 2018. Treatment of spontaneous chronic corneal epithelial defects (SCCEDs) with diamond burr debridement vs combination diamond burr debridement and superficial grid keratotomy. *Veterinary Ophthalmology*. 2018: 1-10.
- Wu MF, Stachon T, Seitz B, Langenbucher A, Szentmáry N. 2017. Effect of human autologous serum and fetal bovine serum on human corneal epithelial cell viability, migration and proliferation in vitro. *International Journal of Ophthalmology*. 10(6): 908-913.

- Yamada C, King KE, Ness PM. 2008. Autologous serum eyedrops: literature review and implications for transfusion medicine specialists. *Transfusion*. 48(6): 1245-1255.
- Young AL, Cheng ACO, Ng HK, Cheng LL, Leung GYS, Lam DSC. 2004. The use of autologous serum tears in persistent corneal epithelial defects. *Eye*. 18(6): 609-614.

## **Anexos**

### ***Abstract apresentado no Congresso Virtual da Sociedade Europeia de Oftalmologia Veterinária (ESVO – European Society of Veterinary Ophthalmology)***

#### **Abstract title**

USE OF AUTOLOGOUS PLASMA IN THE TREATMENT OF CORNEAL ULCERS IN DOGS: A RETROSPECTIVE STUDY OF 30 CASES

#### **Abstract content**

Authors:

Leonor FERREIRA<sup>1</sup>; Luís MONTENEGRO<sup>2</sup>, Esmeralda DELGADO<sup>1</sup>

Authors' affiliation:

1 CIISA - Centre for Interdisciplinary Research in Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon; CIISA - Centre for Interdisciplinary Research in Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon

1 Hospital Referência Veterinária Montenegro, R. Abraços 34, Porto, Portugal

Purpose:

To evaluate the use of autologous plasma in the treatment of corneal ulcers in dogs.

Material / methods:

30 patients diagnosed with corneal ulcers at a referral center within a six-month period were evaluated. Characterization of the sample, ulcer type and treatment was performed. To formulate plasma eyedrops, blood was collected to EDTA tubes, left to clot at room temperature, centrifuged and plasma transferred to sterile Eppendorf tubes. The sample included 14 different breeds, mostly brachycephalic (70%) with a median age of  $6.69 \pm 4.03$  years (range 0.17-14 years). Median healing times of superficial lesions treated with and without plasma were compared. For severe defects (indolent or deep) these times were correlated with administration frequency. Statistical survival analysis was performed.

Results:

43.3% (n=13) of the ulcers were stromal and 56.7% (n=17) were superficial. From these, 40% (n=12) responded to treatment and 16.7% (n=5) had an indolent behavior. Most superficial ulcers were not extense (n=6; 50%) and the deep ones were predominantly wide and melting (n=4; 30.77%). Autologous plasma was applied in some superficial (n=5) and in

all severe ulcers (n=18). Median recovery times for superficial lesions treated with or without plasma were compared (Kaplan Meier; p=0.9) as well as healing times in severe defects according to frequency of administration (Kaplan Meier; p=0.9). No significant statistical differences were found.

Discussion:

Autologous plasma has anti-collagenase and healing properties, being easy to obtain and safe to use. No conclusions on the success of serotherapy were drawn, probably due to sample size, population heterogeneity, differences in therapies and absence of control groups.

Support / interest disclosure:

This work was supported by FCT - Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., under the Project UIDB/00276/2020.

Preferred presentation: poster