

Trabajo de grado para aspirar al título de Médico Veterinario y Zootecnista

Uso de plasma rico en plaquetas y células madre en el tratamiento de úlceras corneales de caninos y felinos: Revisión sistemática de la literatura.

Cristian David Buitrago

David Steven Henao

Asesor:

Juan Carlos González Corrales

Universidad Tecnológica de Pereira

Facultad de Ciencias de la Salud

Medicina Veterinaria y Zootecnia

Pereira

2019

Uso de plasma rico en plaquetas y células madre en el tratamiento de úlceras corneales de caninos y felinos: Revisión sistemática de la literatura.

Use of platelet rich plasma and stem cells in the treatment of corneal ulcers of dogs and cats: Systematic review of the literature.

Cristian David Buitrago¹, David Steven Henao¹

¹Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Risaralda, Colombia

Resumen: El ojo es uno de los órganos sensoriales más importantes para un ser vivo, ya que le permite interpretar el medio que lo rodea al transformar la luz externa en señales eléctricas que viajan hasta los centros cognitivos del cerebro en donde se forma la imagen final del entorno. Entre todos los componentes oculares, la córnea es la que se encuentra más expuesta a sufrir daños por ser la capa más externa del ojo, por lo que las lesiones corneales como las úlceras son uno de los motivos más comunes de consulta veterinaria. Las úlceras corneales son ocasionadas por algún tipo de injuria que genera una alteración en la integridad y funcionalidad de la córnea y se caracterizan principalmente por generar la pérdida de la transparencia corneal y por ser muy dolorosas. En muchas ocasiones, las úlceras corneales se muestran refractarias a los tratamientos convencionales, por lo que la búsqueda de otras terapias se hace necesaria en muchos casos. Dentro de estos tratamientos alternativos se encuentran el Plasma rico en plaquetas (PRP) y las Células madre (CM). Debido a los buenos resultados mostrados en el tratamiento de otras patologías, se realizó una revisión sistemática de la literatura, con el objetivo de destacar los beneficios y potenciales usos del plasma rico en plaquetas y células madre en el tratamiento de úlceras corneales en caninos y felinos. Para tal fin, se llevó a cabo una búsqueda sistemática de información en literatura impresa y en las bases de datos PubMed, Google académico, ScienceDirect y SciELO. Finalizada la revisión bibliográfica, se concluye que la medicina regenerativa, en este caso el plasma rico en plaquetas (PRP) y las células madre (CM), representan una opción efectiva en el tratamiento de úlceras complicadas gracias a sus propiedades de regeneración tisular, brindando una recuperación óptima de las capas corneales como lo demuestran varios estudios clínicos y experimentales revisados. Igualmente, el hecho de que puedan

extraerse del mismo paciente los hace una alternativa más accesible y de menor costo en comparación con otro tipo de tratamientos. A pesar de esto, este tipo de terapias sigue siendo objeto de debate, por lo que son necesarios un mayor número de estudios que ayuden a determinar de manera confiable la efectividad del PRP y las CM en el tratamiento de úlceras corneales.

Palabras clave: Oftalmología veterinaria, medicina regenerativa, técnicas autólogas.

Abstract: The eye is one of the most important sensory organs for a living being, since it allows it to interpret the environment surrounding it by transforming external light into electrical signals that travel to the cognitive centers of the brain where the final image of the environment is formed. Among all the ocular components, the cornea is the one that is most exposed to damage because it is the outermost layer of the eye, so corneal lesions such as ulcers are one of the most common reasons for veterinary consultation. Corneal ulcers are caused by some type of injury that generates an alteration in the integrity and functionality of the cornea and are characterized mainly by generating loss of corneal transparency and by being very painful. In many cases, corneal ulcers are refractory to conventional treatments, so the search for other therapies is necessary in many cases. Platelet-rich plasma (PRP) and Stem Cells (SC) are among these alternative treatments. Due to the good results shown in the treatment of other pathologies, a systematic review of the literature was carried out, with the objective of highlighting the benefits and potential uses of platelet-rich plasma and stem cells in the treatment of corneal ulcers in dogs and cats. For this purpose, a systematic search of information was carried out in printed literature and in PubMed, Google academic, ScienceDirect and SciELO databases. After the literature review, it is concluded that regenerative medicine, in this case platelet-rich plasma (PRP) and stem cells (SC), represent an effective option in the treatment of complicated ulcers due to their properties of tissue regeneration, providing an optimal recovery of corneal structures as evidenced by several clinical and experimental studies reviewed. Likewise, the fact that they can be extracted from the same patient makes them a more accessible and lower cost alternative compared to other types of treatments. Despite this, these types of therapies are still under debate, which is why a greater number of studies are needed

to help reliably determine the effectiveness of PRP and CM in the treatment of corneal ulcers.

Keywords: Veterinary ophthalmology, regenerative medicine, autologous techniques.

Introducción

El ojo es uno de los órganos sensoriales más importantes para un ser vivo, ya que le permite interpretar el medio que lo rodea al transformar la luz externa en señales eléctricas que viajan hasta los centros cognitivos del cerebro en donde se forma la imagen final del entorno (1). El ojo está constituido macroscópicamente por dos grandes partes. Primero por un órgano de percepción visual como es el globo ocular, y segundo por estructuras accesorias, las cuales brindan ayuda y protección al bulbo (2).

Entre todos los componentes oculares, la córnea es la que se encuentra más expuesta a sufrir daños por ser la capa más externa del ojo, por lo que las lesiones corneales como las úlceras son uno de los motivos más comunes de consulta veterinaria (3). Las úlceras corneales son ocasionadas por algún tipo de injuria que genera una alteración en la integridad y funcionalidad de la córnea y se caracterizan principalmente por generar la pérdida de la transparencia corneal y por ser muy dolorosas según su profundidad (4) (5). Este tipo de lesiones son consideradas una urgencia, ya que pueden ser graves y progresar rápidamente comprometiendo la visión del paciente(6). Las úlceras corneales pueden clasificarse según su profundidad y evolución en úlceras simples o complicadas (7).

Entre los factores predisponentes para la formación de úlceras en animales domésticos como perros y gatos, están los ojos prominentes, la esclera visible y la presencia de pliegues nasales, características muy marcadas en razas braquiocefálicas (8). De acuerdo a esto, las razas más afectadas por úlceras son los Pug, Bóxer, Shih Tzu, Bulldog, Cavalier King Charles Spaniel y Persa en el caso de los gatos (9) (10) (11).

Los tratamientos convencionales, los cuales consisten principalmente en el uso de antibióticos, medicamentos cicatrizantes y analgésicos, muchas veces no logran la resolución completa de una úlcera corneal, por lo que la búsqueda de terapias alternativas se hace necesaria en muchos casos (12).

Durante las últimas décadas, gracias a diferentes investigaciones, la medicina regenerativa se ha mostrado como una opción efectiva en el tratamiento de diferentes

enfermedades, puesto que permite la recuperación y regeneración de tejidos que han sufrido algún tipo de lesión (13) (14).

Dentro de estas terapias regenerativas se encuentran el plasma rico en plaquetas (PRP) y las células madre (CM). El PRP ha sido utilizado en el manejo de diferentes patologías, ya que brinda beneficios en cuanto al crecimiento y maduración ósea, estabilización de injertos e implantes, hemostasia y sellado y cicatrización de heridas (15) (16). Esta preparación tiene como objetivo incrementar las probabilidades de una eficiente recuperación de un tejido después de sufrir una lesión o una cirugía, promoviendo la regeneración tisular, previniendo o tratando infecciones y restaurando la función del tejido afectado (17) (18).

Por su parte, las CM también han sido ampliamente utilizadas en el tratamiento de diferentes enfermedades, gracias a que contribuyen a la reparación estructural y funcional de los tejidos puesto que cuentan con propiedades antiinflamatorias, regenerativas, inmunomoduladoras, antioxidantes y estimulantes del angiogénesis (13) (19).

Teniendo en cuenta que las úlceras corneales son una de las patologías oculares más frecuentes en la práctica de la medicina veterinaria y que la falla en el tratamiento puede desencadenar en un daño que comprometa la visión del paciente, el conocimiento de terapias alternativas en el área de la oftalmología veterinaria es necesario, puesto que en muchas ocasiones los tratamientos convencionales no son suficientes para la resolución de estas lesiones. Es por esto que se realizó una revisión sistemática de la literatura, con el fin de destacar los beneficios y potenciales usos del plasma rico en plaquetas y células madre en el tratamiento de úlceras corneales en caninos y felinos.

Objetivo General

- Reconocer las propiedades y beneficios del plasma rico en plaquetas y células madre en el tratamiento de úlceras corneales de caninos y felinos.

Objetivos específicos

- Distinguir las diferentes estructuras anatómicas que componen el órgano de la visión.
- Describir los tipos de úlceras corneales que se presentan en perros y gatos.
- Identificar los principios, métodos de preparación y aplicaciones del plasma rico en plaquetas y células madre en el área de la medicina veterinaria.

Materiales y métodos

Se realizó una búsqueda sistemática de información en literatura impresa y en las bases de datos PubMed, Google académico, ScienceDirect y SciELO con el fin de identificar artículos relevantes para la revisión, usando las palabras de búsqueda: anatomy, eye, dog, cat, corneal ulcer, ulcerative keratitis, platelet rich plasma y stem cells. Se incluyó literatura publicada en inglés y español desde el año 2.000.

Resultados

Anatomía del ojo:

La anatomía del ojo está dividida en dos grandes partes, las cuales son el globo ocular y los órganos accesorios.

El globo ocular es de forma casi esférica y se subdivide en 3 compartimentos, que son la cámara anterior, posterior y vítrea. Además, está compuesto de tres capas o túnicas; la primera es una capa externa fibrosa conformada por la córnea y la esclera que proporciona soporte estructural y permite la entrada de luz al interior del globo ocular, la segunda o también llamada úvea, es una capa media vascular compuesta por el iris, el cuerpo ciliar y la coroides, y la última es una capa interna nerviosa en donde está la retina (20) (21).

En la túnica externa encontramos la esclerótica, una pared fibrosa opaca de color blanco compuesta de fibras colágenas y elásticas. Su principal función es dar forma y proteger las estructuras internas del ojo. Además, sus fibras elásticas actúan contra la presión intraocular del globo y las colágenas ofrecen una superficie para la inserción de los músculos extraoculares y el músculo retractor. Esta se encuentra perforada por nervios y vasos ciliares y puede llegar a presentar alguna pigmentación, sobre todo en su región medial y lateral (1) (2).

La cornea por su parte es la porción anterior avascular y transparente de la túnica fibrosa, y se compone de una capa epitelial externa, el estroma, la membrana de Descemet y una capa endotelial interna. El epitelio externo se conforma de 3 capas de células epiteliales escamosas no queratinizadas, una capa de células basales y una membrana basal. Su función es evitar la entrada de microorganismos y de agua hacia el estroma. El estroma constituye el 90% de la córnea, y se compone de queratocitos, glicosaminoglicanos y haces paralelos de fibrillas de colágeno. La membrana de Descemet por su parte está formada por colágeno y elastina. La última capa o endotelio se encarga de mantener deshidratada la córnea, además de nutrirla y eliminar desechos metabólicos (9) (6) (7).

La anatomía de la córnea permite que la luz se refracte y que además ingrese suficiente luz en el ojo para que la retina perciba una imagen (6). De igual manera, es una barrera física e impermeable que brinda protección del ojo ante el entorno. La

transparencia corneal se presenta debido a la ausencia de vasos sanguíneos y pigmentos, a la superficie anterior no queratinizada de su epitelio, a la organización del estroma y al pequeño diámetro de sus fibras de colágeno (22).

La úvea o capa media vascular se situá entre las capas fibrosas del globo y la retina. Está formada por una capa de tejido conectivo laxo y suele estar pigmentada. Se compone en su parte anterior por el iris y el cuerpo ciliar, y en su parte posterior por la coroides (20).

El iris está formado por una parte anterior que contiene el estroma y el musculo esfínter del iris y una posterior que incluye una capa epitelial y el musculo dilatador (21). Esta estructura separa el espacio interno del ojo en una cámara anterior y una cámara posterior del globo del ojo, las cuales se comunican mediante la pupila. El iris principalmente, se encarga de regular el paso de la luz a través de la pupila, mediante su contracción (miosis) o dilatación (midriasis) (1).

El cuerpo ciliar se encuentra posterior al iris, y está formado por una parte anterior llamada *pars plicata* que contiene los procesos ciliares y una posterior nombrada *pars plana*. Los procesos ciliares se encargan de producir el humor acuoso, el cual circula en las cámaras anterior y posterior del ojo. Este líquido transparente se produce mediante un proceso de ultrafiltración pasiva y de secreción activa; está compuesto en un 99% de agua y aporta nutrientes y elimina productos de desechos del cristalino y la córnea (23) (24).

Por último, la coroides es una capa fuertemente pigmentada y vascularizada que participa en la nutrición del ojo. En los animales diurnos, el coroides absorbe la luz reflejada por el fondo del ojo, mientras que, en los animales nocturnos existe una capa llamada *tapetum lucidum*, la cual refleja la luz en lugar de absorberla, generando así una mejor visión en la noche (25).

En la última capa o túnica nerviosa se encuentra la retina; esta estructura fotosensible es altamente compleja y está conformada por 9 capas denominadas, membrana limitante externa fotorreceptores (conos y bastones), capa nuclear externa, capa plexiforme externa, capa nuclear interna, capa plexiforme interna, capa de células ganglionares, capa de fibras nerviosas y la membrana limitante interna (23).

Cuando la luz incide en la retina, los fotopigmentos en los conos y los bastones absorben la energía de la radiación electromagnética entrante y la traducen en señal eléctrica, la cual es transmitida hacia la corteza visual a través del nervio óptico para la interpretación de la visión (25).

Entre las partes constitutivas del interior del ojo está el cristalino, el cual es una estructura biconvexa, avascular y transparente que se encuentra anclada al cuerpo ciliar mediante fibras colágenas zonulares. Está formado por una capsula, por un núcleo, por una corteza, por el epitelio del cristalino y por las fibras cristalinas. El cristalino se compone en un 65% de agua y en un 35% de proteínas (21).

Otro de los componentes del interior del ojo es el cuerpo vítreo, formado por un líquido gelatinoso, inoloro y transparente conocido como el humor vítreo y por un pequeño número de células que forman el estroma vítreo. El humor vítreo le da estabilidad al ojo y brinda soporte a la retina (1).

Los órganos accesorios que complementan la estructura del ojo son la órbita, los párpados, la conjuntiva, el aparato lagrimal, las fascias y los músculos.

La órbita está conformada por los huesos frontal, lagrimal, esfenoides, cigomático, palatino y maxilar. Esta estructura le brinda protección al globo ocular, además de proporcionar una ruta para el acceso de los vasos y nervios al ojo. La órbita contiene los músculos extraoculares responsables del movimiento del ojo, los músculos retrobulbares, el nervio óptico, la glándula lagrimal y nictitante, vasos sanguíneos y nervios. Su diámetro horizontal y vertical en perros pequeños suele ser de 19,7 y 18,7 mm y de 24 a 23 mm en perros grandes. En gatos, la longitud los diámetros mediolateral y dorsoventral es de aproximadamente 2,5 cm (21) (2).

Los párpados superior e inferior se unen formando los ángulos medial y lateral. Su función es ejercer como primera barrera protectora del ojo, además de distribuir la película lagrimal y retardar la evaporación de las lágrimas (23). Por otro lado, el tercer párpado o membrana nictitante es un pliegue conjuntival modificado cuya principal función es la de brindar protección corneal adicional. Sumado a esto, la glándula del tercer párpado produce del 30% al 50% de la película lagrimal acuosa, esencial para la lubricación ocular (26).

La conjuntiva es una delgada y translúcida membrana que recubre la porción anterior de la esclerótica, la superficie interna de los párpados y el tercer párpado. Esta estructura es importante para los movimientos oculares, la protección inmunológica del ojo y la curación de la córnea (27).

El aparato lagrimal se compone de una película lagrimal preocular secretada por la glándula lagrimal, la glándula del tercer párpado, las glándulas de Meibomio y las células caliciformes, y un sistema de conductos conformado por los puntos nasolagrimales, los canalículos y el conducto nasolagrimal. Este sistema brinda protección del globo ocular ya que tiene propiedades antimicrobianas y ayuda a la eliminación de cuerpos extraños alojados en la conjuntiva y la córnea. Además, proporciona hidratación y permite el paso de oxígeno y nutrientes a las estructuras externas del ojo (22) (28).

Finalmente, las fascias recubren el globo ocular, el nervio óptico y los músculos del ojo. Estos últimos están encargados del movimiento del globo ocular, y se diferencian en cuatro músculos rectos, dos músculos oblicuos, un músculo retractor del globo del ojo y un músculo elevador del párpado superior (1).

Ulceras corneales:

Las úlceras corneales son una de las enfermedades oculares más comunes dentro de la práctica de la medicina veterinaria. Se definen como la pérdida de continuidad de una o más capas corneales, y son ocasionadas por algún tipo de injuria (4). Este tipo de lesiones son consideradas una urgencia, ya que pueden ser graves y progresar rápidamente comprometiendo la visión del paciente (29).

Entre los factores predisponentes para la formación de úlceras corneales en animales domésticos como perros y gatos, están los ojos prominentes, la esclera visible y la presencia de pliegues nasales, características muy marcadas en razas braquiocefálicas (8). De acuerdo a esto, las razas más afectadas por úlceras son los Pug, Bóxer, Shih Tzu, Bulldog, Cavalier King Charles Spaniel y Persa en el caso de los gatos (9) (10) (11).

Las úlceras pueden clasificarse según su profundidad y evolución en úlceras simples o complicadas.

Las simples son aquellas úlceras superficiales del epitelio externo y las úlceras superficiales estromales. En las primeras solo hay daño y pérdida de la capa externa de la córnea, ocasionando una exposición del estroma, pero sin daño de este. Las segundas por su parte, comprometen solo la parte media y anterior del estroma (9) (7).

Estas lesiones son comúnmente causadas por cuerpos extraños, traumatismos, distiquiasis, queratoconjuntivitis seca, cilio ectópico, químicos irritantes, infecciones virales como la del herpesvirus-1 y procedimientos quirúrgicos en donde no se realiza una correcta lubricación del ojo (6) (30) (31). Este tipo de úlceras son muy dolorosas, presentando signos oculares como blefaroespasma, epifora, miosis, fotofobia, protrusión del tercer párpado y edema corneal (32) (33).

El diagnóstico de las úlceras simples superficiales se realiza principalmente a través de la aplicación tópica de colorantes como la fluoresceína, la cual tiñe el estroma expuesto al tener afinidad por el agua. De igual manera, se debe realizar una exploración oftalmológica completa bilateral y sumar exámenes complementarios como el test de Schirmer, el cual evaluará la producción de lágrimas por parte del ojo (34).

Para el tratamiento de las úlceras epiteliales y estromales superficiales se usan especialmente preparaciones de antibióticos tópicos, con el fin de evitar infecciones secundarias de agentes oportunistas (35). Además, se usan medicamentos ciclopejicos para aliviar el espasmo del músculo ciliar y disminuir el dolor (36). En algunos casos se recomienda utilizar AINES tópicos o sistémicos con el propósito de resolver la inflamación ocular aguda, lo cual minimiza la formación de fibrosis, pigmentación corneal, sinequias y glaucoma. Los medicamentos esteroidales están contraindicados, ya que interfieren en el proceso de cicatrización corneal y en sus mecanismos de defensa (37) .

Por otro lado, el uso tópico de acetilcisteína ha demostrado traer beneficios en la reducción del tiempo de recuperación de lesiones corneales (38). Así mismo, se puede utilizar como coadyuvante en el tratamiento de úlceras superficiales el ácido hialurónico, suero autólogo y colirios compuestos de vitamina A (39).

Con un manejo adecuado, estas lesiones se resuelven generalmente en 2 a 6 días con un correcto proceso de cicatrización. Si la lesión continúa presentándose, se debe considerar una úlcera complicada o una causa no descifrada (22).

Las úlceras complicadas son aquellas en donde se presentan anomalías en la cicatrización, procesos infecciosos, presencia de infiltrado celular o comprometen más de la mitad de las estructuras corneales. Según esto, este tipo de lesiones comprenden las úlceras infectadas, úlceras indolentes, úlceras estromales profundas, úlceras colagenolíticas, descemetoceltes, úlceras perforadas y secundarias a degeneración corneal (7).

Las úlceras infectadas se presentan cuando una lesión de la córnea se contamina de agentes oportunistas, generalmente bacterias. Estos microorganismos pueden llegar a generar un aumento en la amplitud y profundidad de la lesión, ya que algunas bacterias como las *Pseudomonas* secretan enzimas proteolíticas las cuales afectan las estructuras corneales (40) (41) .

Para identificar el microorganismo infectante, se usan métodos como citologías, cultivos y antibiogramas de muestras tomadas del tejido corneal. Entre los agentes infecciosos que se han identificado en úlceras infectadas está el *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Micrococcus lactis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas* spp y *Actinomyces bowdenii* (4) (42) (43) (44).

La elección del tratamiento se realiza en función de la progresión de la úlcera y del agente identificado mediante los diferentes métodos diagnósticos (45) (46) . De igual manera, el uso de medicamentos oftálmicos en forma de bioadhesivos en el manejo de úlceras infectadas ha resultado conveniente y satisfactorio (47).

Por otra parte, las úlceras indolentes se identifican por ser lesiones en donde hay crecimiento epitelial, pero sin adhesión de este al estroma ni a la membrana basal del epitelio. Este tipo de úlceras recurrentes se presentan generalmente de manera espontánea en caninos de avanzada edad. Se relaciona su aparición a un defecto en la membrana basal del epitelio o del estroma anterior. Los perros de raza bóxer especialmente, poseen una falla en la capacidad de unir las células epiteliales al

estroma, por lo que es una patología muy frecuente en ellos. En gatos se asocian estas lesiones a la infección por el Herpesvirus Felino tipo 1 (9) (48) (49).

Durante la fase aguda se pueden presentar signos de dolor como blefarospasmo, epifora y fotofobia, los cuales van disminuyendo a medida que la lesión se vuelve crónica. La tinción con fluoresceína permite su diagnóstico al teñir el estroma por debajo del epitelio que se encuentra suelto. De igual manera, durante la exploración se puede observar un borde superpuesto de epitelio no adherido alrededor del borde de la ulcera (22).

Para el tratamiento de estas úlceras recurrentes se han propuesto terapias medicamentosas y quirúrgicas. Dentro de la terapia médica se recomienda el uso de antibióticos tópicos, pero solo de manera preventiva ya que algunos pueden retrasar la recuperación de la córnea (50). De igual manera, otras terapias tópicas como suero autólogo, sustancia P y ácido aminocaproico han demostrado ser útiles en el tratamiento de estas úlceras crónicas (48) (51) (52) (53).

Entre los métodos quirúrgicos comúnmente utilizados para resolver esta patología se encuentra el desbridamiento corneal usando métodos químicos o mecánicos. Esta técnica es ampliamente recomendada ya que al remover el epitelio y membrana basal que se encuentran mal adheridos, se estimula la recuperación de la córnea promoviendo la proliferación de nuevo epitelio y su correcta adhesión (9) (54).

La queratotomía en rejilla, queratotomía punctata y queratotomía mediante el Diamond Burr son otros de los métodos utilizados en la solución de úlceras indolentes.

La primera técnica consiste en realizar incisiones o raspados cruzados sobre la zona de la ulcera utilizando una aguja hipodérmica doblada. En la segunda, usando también una aguja hipodérmica se realizan varias punciones en el estroma expuesto y en la córnea saludable que rodea la lesión (3). La queratotomía mediante Diamond Burr también es utilizada para remover el epitelio no adherido, con tasas de recuperación mejores a los anteriores métodos nombrados. De igual manera, se recomienda el uso de lentes de contacto como protección una vez terminada la cirugía, ya que han demostrado acortar el tiempo de sanación de la córnea (55) (56).

Estas técnicas permiten crear canales para que las células epiteliales penetren la superficie estromal permitiendo una mejor adherencia del epitelio, además de incrementar la presencia de proteínas extracelulares como colágeno IV, laminina y fibronectina (57).

Finalmente, existe otro método quirúrgico para el tratamiento de estas úlceras, conocido como queratectomía superficial. Este procedimiento remueve la zona anormal o dañada del estroma anterior, favoreciendo la recuperación y adhesión del epitelio. Los indicios de recuperación de úlceras mediante esta técnica han demostrado ser del 100%, siendo el tratamiento más efectivo hasta el momento (58) (59).

Las úlceras estromales profundas se clasifican en progresivas y no progresivas. En las no progresivas hay presencia de blefarospasmo, edema, neovascularización y signos de uveítis. El diagnóstico se realiza a través de tinción con fluoresceína y su manejo es similar al de las úlceras superficiales, sumando un injerto de membranas biológicas o flap conjuntival (7) (35).

Las progresivas son lesiones que afectan hasta tres cuartos del estroma y generalmente hay presencia de infección bacteriana. En este tipo de injurias se presenta blefarospasmo, pero en menor intensidad, la uveítis es más severa y hay presencia de infiltrado celular. Para el diagnóstico se recomienda realizar citología y cultivo con el fin de identificar el agente infectante. Al aplicar la fluoresceína hay retención de este alrededor del estroma expuesto, pero sin tinción de la membrana como tal (7) (32).

Las úlceras estromales profundas progresivas son lesiones que comprometen la visión del paciente, por lo que la terapia debe ser agresiva. El uso de antibióticos aminoglicósidos, fluoroquinolonas entre otros estará determinado por el resultado de las citologías y cultivos bacterianos. De igual manera, se deben administrar ciclopejicos y sustancias anticlagenasas con el fin de evitar la progresión de la lesión (22).

Por otra parte, dentro de los procedimientos quirúrgicos usados para mejorar la recuperación de estas lesiones están los flap conjuntivales, los cuales refuerzan la

córnea, proveen fibroblastos y células epiteliales además de prevenir su degeneración y brindar protección antimicrobiana (60).

Las úlceras colagenolíticas o también conocidas como “melting”, son lesiones de aspecto gelatinoso y de color grisáceo que se presentan cuando existe un desbalance entre las proteasas y los inhibidores de las proteasas. Estas enzimas junto con las colagenasas son producidas por las células epiteliales, fibroblastos y leucocitos durante el proceso de curación de la córnea, con la finalidad de remover residuos y células muertas. De igual manera, algunas bacterias como las *Pseudomonas* también producen estas proteasas generando un desbalance y por ende la disolución y destrucción del colágeno estromal. Los signos que pueden aparecer son hipopion, miosis, uveítis anterior y descarga mucoide (61) (62).

La clave en el tratamiento de estas úlceras consiste en la aplicación agresiva de antibióticos tópicos y ciclopejicos añadiendo inhibidores de proteasas como EDTA, acetilcisteína, suero autólogo y heparina (9) (40). La cirugía está indicada en los casos en que la terapia médica sea refractaria. El procedimiento consiste en la remoción de la zona afectada sumado a un flap conjuntival o a un implante de membrana biológica (63).

Cuando la úlcera ha destruido la capa epitelial y el estroma llegando hasta la membrana de Descemet, se presenta una lesión grave que compromete la integridad del ojo conocida como descemetocel. Este tipo de úlcera es considerada una urgencia médica ya que existe riesgo de perforación ocular. Se pueden presentar signos de uveítis severa, infiltrado celular y poca o nula sintomatología de dolor; además, no hay tinción con fluoresceína al ser una membrana hidrofóbica (6) (64) .

Para la resolución de estas lesiones se usan principalmente los métodos quirúrgicos. Entre los procedimientos recomendados para los descemetocel están los colgajos conjuntivales pediculados, la transposición corneoconjuntival y las queratoplastias lamelares (7).

Las úlceras perforadas son consecuencia de traumatismos, úlceras profundas progresivas, infección o secuestro corneal en el caso de los felinos. Los signos clínicos de esta lesión incluyen blefarospasmo, descarga ocular purulenta o serosa, edema

corneal, cámara anterior colapsada y prolapso del iris. El diagnóstico se realiza a partir de los signos clínicos y la tinción con fluoresceína (65) (66).

El tratamiento de estas lesiones es principalmente quirúrgico, con procedimientos que incluyen la queratoplastia lamelar profunda, queratoprótesis, flap conjuntival, injertos corneales y transposición corneoescleral y corneoconjuntival (66) (67).

De igual manera, el uso de biomateriales como membrana amniótica, pericardio bovino, matriz extracelular de vejiga urinaria porcina, submucosa intestinal, entre otros, representan una opción útil en el manejo de úlceras complicadas como las perforaciones, úlceras desechas o descemetoceloses (68) (69) (70) (71) (72).

Finalmente, las úlceras secundarias a degeneración corneal se presentan principalmente en animales de avanzada edad. Una de las principales degeneraciones asociadas a úlceras son las calcificaciones corneales. En estas hay presencia de cristales de calcio en el epitelio corneal y estroma superficial, generando irregularidades y úlceras en las diferentes estructuras corneales. La causa de esta patología se relaciona a inflamaciones oculares crónicas, uveítis, glaucoma y alteraciones del metabolismo corneal. El principal tratamiento es la queratectomía superficial (73).

Uso de plasma rico en plaquetas y células madre en el tratamiento de úlceras corneales:

Plasma rico en plaquetas (PRP):

El plasma rico en plaquetas es una preparación de plasma autólogo que contiene una mayor concentración de plaquetas en comparación a los valores basales en sangre entera. Para cumplir con esta definición, el PRP debe tener un mínimo de 200.000 plaquetas/ μ L, aunque algunos estudios sugieren que para ser efectivo la concentración debe estar entre 750.000 plaquetas/ μ L y 1.000.000 plaquetas/ μ L (74). Esta preparación tiene como objetivo incrementar las probabilidades de una eficiente recuperación de un tejido después de sufrir una lesión o una cirugía, promoviendo la regeneración tisular, previniendo o tratando infecciones y restaurando la función del tejido afectado (17) (18).

El PRP está compuesto principalmente de leucocitos, plaquetas y factores de crecimiento. De igual manera, también incluye tres proteínas conocidas como fibrina, fibronectina y vitronectina, las cuales actúan como moléculas de adhesión celular necesarias para la migración celular durante el proceso de recuperación tisular (75) (76).

Los leucocitos participan en la mediación de la respuesta inflamatoria, la defensa ante agentes infecciosos y en el proceso de reparación y cicatrización de las heridas (77). Las plaquetas por su parte, cumplen un papel importante en la homeostasis, a través de la agregación, formación de coágulos y liberación de sustancias que promueven la reparación de tejidos; además, estas células también influyen en la angiogénesis y respuesta inmune (78).

Por último, los elementos más importantes dentro del PRP son los factores de crecimiento (GF). Estas proteínas se encuentran almacenadas en los gránulos α de las plaquetas y cumplen un papel fundamental en el control y estimulación de la migración, diferenciación y división celular; así como en los procesos de angiogénesis y síntesis de colágeno durante la reparación y regeneración del tejido dañado (79).

Entre los GF encontramos el factor de crecimiento de origen plaquetario (PDGF), el factor de crecimiento de transformación beta ($TGF-\beta$), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (80).

El PDGF produce la migración de neutrófilos, monocitos y fibroblastos al sitio de reparación mediante quimiotaxis. De igual manera, estimula la angiogénesis, la proliferación de fibroblastos y la producción de matriz extracelular. Además, regula la migración y proliferación de células mesenquimales y la activación de macrófagos (81).

El $TGF-\beta$ estimula la angiogénesis, la reepitelización y la producción de colágeno tipo I y III por parte de los osteoblastos. A su vez, media la síntesis de proteasas que inhiben la formación de osteoclastos inhabilitando así la destrucción del colágeno (77).

El FGF participa en la proliferación y diferenciación de osteoblastos e inhibición de osteoclastos. Por otra parte, estimula el crecimiento de fibroblastos, mioblastos, osteoblastos y células endoteliales; además favorece la angiogénesis y la producción de fibronectina y colágeno (82). El IGF estimula los osteoblastos para la síntesis de osteocalcina, fosfatasa alcalina y colágeno tipo I. Igualmente, inhibe la destrucción de matriz extracelular y estimula la proliferación y diferenciación de células mesenquimales (83).

Por otro lado, el VEGF principalmente estimula la angiogénesis regulando la proliferación y migración de células endoteliales mediante quimiotaxis (84). Finalmente, el EGF juega un papel importante en la aceleración de la reepitelización incrementando la proliferación y migración de queratinocitos, fibroblastos, células epidérmicas y epiteliales al sitio de la lesión. De igual forma, este factor de crecimiento estimula la angiogénesis y facilita la organización de tejido de granulación (85).

En la preparación del plasma rico en plaquetas se utiliza el método de centrifugación diferencial, con el fin de separar los componentes celulares y líquidos de la sangre según la densidad específica de estos (74).

El proceso manual comienza con la extracción de sangre y su almacenamiento en tubos con una sustancia anticoagulante como citrato de sodio, ácido cítrico o ácido citrato dextrosa (86) (87). Posteriormente, se realiza una primera centrifugación a una velocidad de 280g, con el propósito de separar la sangre en tres capas. La capa inferior estará compuesta de glóbulos rojos, la capa media por glóbulos blancos y plaquetas, y la capa superior por plasma (83). A su vez, el plasma se divide en 3 fracciones según la cantidad de plaquetas presentes, siendo la fracción superior pobre en plaquetas, la intermedia con una concentración media de plaquetas y la inferior rica en plaquetas (88).

De igual manera, al colectar las dos primeras capas del preparado compuestas de plasma, leucocitos y plaquetas y transferirlas a otro tubo, una segunda centrifugación a una velocidad de 400g puede hacerse con el objetivo de obtener una concentración aún mayor de plaquetas. Como resultado de este segundo giro, se obtendrá un plasma dividido en 3 porciones, en donde la porción intermedia e inferior son las que contienen

el PRP, usado en las diferentes terapias médicas. Con este procedimiento puede obtenerse una concentración plaquetaria hasta de 330% (17) (82) (83).

Por otro lado, existen diferentes kits comerciales que cumplen con la función de separación celular. Entre estas técnicas cerradas de obtención de PRP encontramos el Biomet GPS II y III, MTF Cascade, Harvest SmartPRP, Arthrex ACP, entre otros (89) (90) (91) (92).

El PRP puede ser clasificado de acuerdo a los métodos de preparación y según su contenido celular y arquitectura de la fibrina en plasma puro rico en plaquetas y pobre en leucocitos (P-PRP), plasma rico en plaquetas y leucocitos (L-PRP), plasma rico en plaquetas y fibrina (P-PRF) y plasma rico en plaquetas, leucocitos y fibrina (L-PRF) (93) (94).

Otro de los procesos importantes en la preparación del PRP es la activación previa a su uso. Esta se realiza buscando que los gránulos α de las plaquetas liberen sustancias como los factores de crecimiento entre otras proteínas (77). Cuando el PRP se utiliza para tratar lesiones en tejidos blandos no es necesaria la activación previa, ya que esta se produce al entrar en contacto con el colágeno, el cual es un activador natural (76).

Por otra parte, si el PRP debe ser activado previamente, esta puede hacerse vía exógena a través de diferentes métodos como la adición de cloruro cálcico, trombina bovina o autóloga, crioconservación o combinación de sangre autóloga mas hueso esponjoso autologo puesto que ambos contienen trombina (83) (95) (96) (97) .

Cuando el plasma rico en plaquetas se activa se forma una red de fibrina la cual solidifica el plasma y forma un coagulo o membrana que sirve de vehículo para contener y transportar las moléculas proteicas en el sitio de la lesión. De igual manera, esta mezcla activada debe aplicarse antes de 10 minutos, para evitar que el coagulo se retraiga y secuestre en su superficie las proteínas secretoras (88) (91).

El PRP ha sido utilizado principalmente en el campo de la medicina regenerativa gracias a que brinda beneficios en el crecimiento y maduración ósea, en la estabilización de injertos e implantes, en la hemostasia, y en el sellado y cicatrización de heridas. Numerosos estudios en los campos de la medicina veterinaria y humana

han sido conducidos con el fin de evaluar la efectividad del PRP en diferentes lesiones tisulares (15) (16).

Gran parte de estas investigaciones se han realizado en el tratamiento de problemas osteoarticulares, tales como fracturas, rotura de ligamentos, tendinopatías, defectos óseos congénitos, enfermedades crónicas musculoesqueléticas y patologías periodontales, con resultados satisfactorios en cuanto a tiempo de recuperación, regeneración tisular, dolor, inflamación y consolidación ósea (98) (99) (100) (101) (102) (103) (104) (105).

Un meta-análisis que buscaba evaluar la eficacia del PRP en lesiones musculoesqueléticas de equinos y humanos encontró que en la mayoría de los estudios realizados se encontraron resultados positivos. En aquellos estudios clínicos, el 46.7% de las investigaciones tuvieron efectos benéficos en el tratamiento, mientras que en el 43.3% hubo una ausencia de tales efectos. En cuanto a los estudios experimentales, el 73% arrojó resultados positivos y el 7.9% negativos (14).

Igualmente, gracias a las propiedades del PRP, su uso ha sido ampliado a otros campos de la medicina como la dermatología, cirugía estética, neurocirugía, entre otros (106) (107) (108) (109).

En cuanto al área de la oftalmología, el plasma rico en plaquetas ha sido aplicado especialmente en el manejo de úlceras corneales en forma de gotas o en combinación con biomateriales como membrana de fibrina, pericardio bovino o membrana amniótica (110) (111) (112) (113) . Respecto al PRP en forma de gotas, se recomienda que luego de su preparación se almacene a -20°C hasta que llegue a utilizarse y a 4°C mientras se está usando (114). Se ha expuesto que el almacenaje de las gotas de PRP a -20°C durante 3 a 6 meses no tiene efecto sobre la concentración de los factores de crecimiento y otras proteínas necesarias en la reparación tisular (115).

Los beneficios del plasma rico en plaquetas en el tratamiento de úlceras corneales han sido reportados en diversos estudios. Por ejemplo, en Taiwán, un caso clínico de una perra Golden Retriever de 12 años de edad con presencia de úlceras indolentes en ambos ojos y refractaria al tratamiento médico convencional fue manejada con plasma rico en plaquetas. El PRP autólogo fue aplicado a razón de 0.2ml en forma de

inyección vía subconjuntival en ambos ojos cada 2 semanas durante 2 meses. De igual manera, se acompañó al tratamiento con gotas de cloranfenicol, tracolimus y Liposic®. Luego de 2 meses de iniciada la terapia, las úlceras comenzaron a sanar mejorando la visión considerablemente. Al año de tratamiento, las corneas se habían recuperado por completo, sin presencia de úlceras recurrentes (12).

Otro estudio conducido en Italia, 2 perros con úlceras indolentes y 1 gato con una úlcera infectada fueron manejados con gotas de plasma rico en plaquetas. En el primer caso, las gotas fueron administradas dos veces al día, con mejora considerable de la lesión a los 15 días de tratamiento. En el segundo, las gotas fueron aplicadas igualmente dos veces al día, con resolución completa de la úlcera a los 7 días de iniciada la terapia. En el último caso, las gotas de PRP fueron administradas dos veces al día junto con terapia antibiótica local. El tratamiento fue alargado durante 1 mes debido a la complejidad de la lesión, presentando casi la recuperación total del tejido corneal en este periodo de tiempo (116).

En Brasil, se realizó un trabajo investigativo en el que se trataron 19 caninos con úlceras corneales divididos en 2 grupos. Un grupo se manejó con gotas de PRP y el otro grupo se trató con un coágulo de PRP cubierto por el tercer párpado para su retención. De igual manera, en ambos grupos se manejó un colirio antibiótico a base de tobramicina. Una vez iniciada la terapia se apreció una disminución de la inflamación y una mejora en la sensibilidad ocular. Al quinto día de tratamiento, los pacientes del grupo del coágulo habían sanado completamente sus úlceras, mientras que en el grupo de las gotas lo habían hecho el 70%. El restante del grupo de las gotas se recuperó por completo a los 10 días, concluyendo que ambos métodos son una buena opción como coadyuvante en el tratamiento de úlceras corneales (117).

A nivel experimental, Acosta *et al.* evaluaron la eficacia del plasma rico en plaquetas en el tratamiento de úlceras corneales en conejos albinos. Para tal fin, realizaron úlceras de 10mm en las corneas de los conejos, y los manejaron con diferentes terapias. Un grupo fue manejado con solución salina estéril, otro con un gel extracto desproteínizado de sangre de ternera y el último con gotas de PRP. Diferencias significativas en cuanto a la recuperación de las lesiones existieron entre el grupo del PRP y del extracto desproteínizado de sangre con respecto al grupo control manejado

con solución salina. Según estos resultados, los autores manifiestan que el plasma rico en plaquetas es efectivo para la regeneración de úlceras corneales profundas y superficiales (118).

Por otro lado, a nivel de medicina humana, el PRP ha demostrado ser efectivo en el tratamiento de úlceras recurrentes, úlceras neurotróficas, úlceras causadas por traumas o cuerpos extraños y ojo seco (112) (119) (120) (121).

Células madre:

Las células madre (CM) se definen como células indiferenciadas con capacidad de auto-renovación, replicación y diferenciación en condiciones apropiadas hacia células progenitoras o precursoras de alguno de los 3 linajes embrionarios como son el ectodermo, mesodermo y endodermo (122).

Existen diferentes tipos de CM de acuerdo a su potencial de diferenciación. Están las totipotentes que son capaces de dar origen a todo tipo de células como los blastómeros. Las pluripotentes que tienen la capacidad de formar células de las tres capas embrionarias. Las multipotentes que pueden diferenciarse en muchos tipos de células, pero de una sola capa embrionaria como las células madre hematopoyéticas. Las oligopotentes que pueden originar células de dos o más líneas celulares dentro de un mismo tejido y las unipotentes que solo pueden originar un tipo de línea celular en un tejido como lo es la espermatogonia (122) (123).

De igual manera, las células madre también pueden distinguirse según su origen en células madre embrionarias (CME), células madre adultas o también llamadas células madre mesenquimales estromales (CMM) y células madre pluripotentes inducidas (CMPi). Entre estos tipos, las CM de mayor interés y uso dentro de la terapia médica veterinaria y humana son las células madre mesenquimales estromales (124).

Las CMM, son células multipotentes caracterizadas por tener una morfología fibroblastoide, con capacidad de adherirse al plástico en condiciones de cultivo y facultad para diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condroblastos; además, para que las células sean consideradas CMM deben expresar marcadores específicos de membrana como CD73, CD90, CD105 y no expresar marcadores de células madre hematopoyéticas como CD34 Y CD45 (125) (126).

Este tipo de células han sido ampliamente utilizadas en el campo de la medicina regenerativa gracias a que contribuyen a la reparación estructural y funcional de los tejidos puesto que cuentan con propiedades antiinflamatorias, regenerativas, inmunomoduladoras, antioxidantes y estimulantes del angiogénesis (19) (13).

Las CMM son fáciles de cosechar y expandir en medios de cultivos por sus capacidades de multiplicación y auto-renovación, además de estar disponibles en gran parte de tejidos y órganos adultos. La mayoría de fuentes de células madre mesenquimales son la medula ósea y el tejido adiposo, aunque también pueden obtenerse de la membrana amniótica y el cordón umbilical (127) (128) (129).

El proceso de preparación de las células madre mesenquimales comienza con la obtención de una muestra del tejido que se va a utilizar. Seguidamente, el tejido pasa por un proceso de fragmentación mecánico, lavado y digestión enzimática. Luego de realizar estas técnicas, cada fragmento obtenido es manejado como un explante y cultivado en frascos con medios y condiciones de cultivo específicas. Finalmente, una vez alcanzada una confluencia entre el 70-90%, las células son desprendidas y de nuevo subcultivadas en otros medios, ampliando así la cantidad de células hasta llegar a la cantidad necesaria para la terapia médica (130) (131).

En la medicina veterinaria, las células madre mesenquimales han sido aplicadas en el manejo de diferentes patologías como osteoartritis, rotura de ligamentos, tendinopatías, enfermedades cutáneas y digestivas arrojando buenos resultados (132) (133) (134) (135) (136). En algunos estudios, se han combinado con otros preparados biológicos como el plasma rico en plaquetas, ya que han demostrado actuar sinérgicamente, mejorando los procesos de recuperación y regeneración tisular (137) (138). Inclusive, se ha demostrado que el PRP puede actuar como estimulante de la migración de CMM hacia el sitio de la lesión mediante quimiotaxis (139).

En el área de la oftalmología veterinaria, la mayoría de investigaciones con células madre se han realizado en el tratamiento de queratoconjuntivitis seca (140) (141), por lo que son pocos los estudios que han evaluado la efectividad de la terapia con CM en úlceras corneales.

Gran parte de las investigaciones relacionadas al tratamiento de úlceras corneales con CM, han sido mediante el uso de células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea (CMM-MO). Por ejemplo, Marfe *et al*, usaron células madres por medio de aplicación tópica y sistémica vía endovenosa en tres úlceras corneales equinas refractarias al tratamiento convencional, con resolución completa de las lesiones en el transcurso de dos meses (142).

Por otra parte, un estudio experimental que evaluó la eficacia de las CMM-MO en ratones con úlceras corneales inducidas químicamente, concluyó que la aplicación tópica de células madre puede ser útil en la reparación de la superficie corneal (143). De igual manera, otro estudio experimental destacó la capacidad de curación de las células madre obtenidas del cuello cervical uterino humano en úlceras corneales inducidas en ratones (144). Finalmente, las células madre mesenquimales demostraron ser una efectiva terapia alternativa en el tratamiento de la queratitis eosinofílica felina (145).

Conclusiones

Sin lugar a dudas, la creciente popularidad de razas braquiocefálicas tanto caninas como felinas ha generado un aumento en los casos de úlceras corneales durante los últimos años, convirtiéndose en un tema de vital importancia en la clínica diaria. Este tipo de lesiones representan un reto para el médico veterinario a la hora de abordar su tratamiento, ya que son heridas de rápida progresión que pueden generar daños irreparables en la visión de un paciente. En muchas ocasiones, las úlceras se tornan lesiones recurrentes y de complicado manejo, además de refractarias a los tratamientos convencionales. Sumado a esto, los procedimientos quirúrgicos suelen ser traumáticos y riesgosos para el animal y para su propietario, puesto que el proceso de recuperación implica unos cuidados muy especiales.

La medicina regenerativa, en este caso el plasma rico en plaquetas (PRP) y las células madre (CM), representan una opción efectiva en el tratamiento de úlceras complicadas gracias a sus propiedades de regeneración tisular, brindando una recuperación óptima de las estructuras corneales como lo demuestran varios estudios clínicos y experimentales revisados anteriormente. Igualmente, el hecho de que puedan extraerse del mismo paciente los hace una alternativa más accesible y de menor costo en comparación con otro tipo de tratamientos.

A pesar de esto, este tipo de terapias sigue siendo objeto de debate, por lo que son necesarios un mayor número de estudios que ayuden a determinar de manera confiable la efectividad del PRP y las CM. Así mismo, la sinergia de ambos preparados y su interacción con otros biomateriales en el tratamiento de úlceras corneales y otras patologías oculares debe ser objeto de estudio de futuras investigaciones.

Bibliografía

1. König HE, Liebich HG. Anatomía de los animales domésticos, tomo II 2º ed: Panamericana; 2005.
2. Sisson S, Grossman JD, Getty R. Anatomía de los animales domésticos, tomo II. 5º ed. Barcelona, España: Masson S. A; 2002.
3. Moore PA. Diagnosis and management of chronic corneal epithelial defects (indolent corneal ulcerations). *Clin Tech Small Anim Pract.* 2003;18(3):168-77.
4. Lin CT, Petersen-Jones SM. Antibiotic susceptibility of bacteria isolated from cats with ulcerative keratitis in Taiwan. *The Journal of small animal practice.* 2008;49(2):80-3.
5. Eaton JS, Hollingsworth SR, Holmberg BJ, Brown MH, Smith PJ, Maggs DJ. Effects of topically applied heterologous serum on reepithelialization rate of superficial chronic corneal epithelial defects in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 2017;250(9):1014-22.
6. Belknap EB. Corneal Emergencies. *Topics in companion animal medicine.* 2015;30(3):74-80.
7. Peña MT, Leiva M. Claves clínicas para el diagnóstico y tratamiento de las úlceras corneales en el perro. *Clinica Veterinaria de Pequeños Animales AVEPA.* 2012;32(1):15-26.
8. Ambrósio CE, Packer RMA, Hendricks A, Burn CC. Impact of Facial Conformation on Canine Health: Corneal Ulceration. *PloS one.* 2015;10(5):e0123827.
9. Anthony Moore P. Feline Corneal Disease. *Clinical Techniques in Small Animal Practice.* 2005;20(2):83-93.
10. Krecny M, Tichy A, Rushton J, Nell B. A retrospective survey of ocular abnormalities in pugs: 130 cases. *The Journal of small animal practice.* 2015;56(2):96-102.
11. O'Neill DG, Lee MM, Brodbelt DC, Church DB, Sanchez RF. Corneal ulcerative disease in dogs under primary veterinary care in England: epidemiology and clinical management. *Canine genetics and epidemiology.* 2017;4:5.
12. Yang S-F, Yang H-L, Liang S-L, Wang P-C. CASE REPORT: SUBCONJUNCTIVAL INJECTION WITH AUTOLOGOUS PLATELET-RICH PLASMA FOR REFRACTORY CORNEAL ULCERS IN A DOG. *Taiwan Veterinary Journal.* 2018;44(2):1-6.
13. Gugjoo MB, Amarpal A, Sharma GT. Mesenchymal stem cell basic research and applications in dog medicine. *Journal of cellular physiology.* 2019.
14. Brossi PM, Moreira JJ, Machado TS, Baccarin RY. Platelet-rich plasma in orthopedic therapy: a comparative systematic review of clinical and experimental data in equine and human musculoskeletal lesions. *BMC veterinary research.* 2015;11:98.
15. González Lagunas J. Plasma rico en plaquetas. *Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial.* 2006;28:89-99.
16. Nourissat G, Ornetti P, Berenbaum F, Sellam J, Richette P, Chevalier X. Does platelet-rich plasma deserve a role in the treatment of tendinopathy? *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme.* 2015;82(4):230-4.

17. Davis VL, Abukabda AB, Radio NM, Witt-Enderby PA, Clafshenkel WP, Cairone JV, et al. Platelet-rich preparations to improve healing. Part I: workable options for every size practice. *The Journal of oral implantology*. 2014;40(4):500-10.
18. Boswell SG, Cole BJ, Sundman EA, Karas V, Fortier LA. Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*. 2012;28(3):429-39.
19. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2007;25(11):2739-49.
20. Murphy C, Samuelson DA, Pollock RVH. *Miller's Anatomy of the Dog*. Ch 21: The Eye. Elsevier Saunders; 2012. p. 746-85.
21. Turner SM. *Oftalmología de pequeños animales*. 1° ed. España: Elsevier; 2010.
22. Gelatt KN. *Fundamentos de oftalmología veterinaria* 1° ed. Barcelona, España: Masson S.A; 2003.
23. Cook CS, Peiffer RL, Landis ML. Chapter 1 - Clinical basic science. In: Peiffer RL, Petersen-Jones SM, editors. *Small Animal Ophthalmology (Fourth Edition)*. Edinburgh: W.B. Saunders; 2009. p. 1-13.
24. Pizzirani S, Gong H. Functional Anatomy of the Outflow Facilities. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice*. 2015;45(6):1101-26, v.
25. Moyes CD, Schulte PM. *Principios de fisiología animal*. 1° ed. Madrid, España: Pearson Educacion S.A.; 2007.
26. Cooper S. The canine third eyelid. *Companion Animal*. 2010;15(6):52-7.
27. Leiva M. Conjunctival surgery in the dog. *The 9th VPAT Regional Veterinary Congress; Thailand2016*.
28. Hirt R, Tektas OY, Carrington SD, Arnett R, FitzPatrick E, Knipping S, et al. Comparative anatomy of the human and canine efferent tear duct system--impact of mucin MUC5AC on lacrimal drainage. *Current eye research*. 2012;37(11):961-70.
29. Ollivier FJ. Bacterial corneal diseases in dogs and cats. *Clin Tech Small Anim Pract*. 2003;18(3):193-8.
30. Gervais KJ, Pirie CG, Ledbetter EC, Pizzirani S. Acute primary canine herpesvirus-1 dendritic ulcerative keratitis in an adult dog. *Veterinary ophthalmology*. 2012;15(2):133-8.
31. Park YW, Son WG, Jeong MB, Seo K, Lee LY, Lee I. Evaluation of risk factors for development of corneal ulcer after nonocular surgery in dogs: 14 cases (2009-2011). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2013;242(11):1544-8.
32. Mandell DC, Holt E. Ophthalmic emergencies. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice*. 2005;35(2):455-80, vii-viii.
33. Williams DL, Burg P. Tear production and intraocular pressure in canine eyes with corneal ulceration. *Open veterinary journal*. 2017;7(2):117-25.
34. Williams D. Obvious ophthalmology: corneal ulceration. *Vetcpd*. 2014;1(3):28-33.
35. Whitley RD. Canine and feline primary ocular bacterial infections. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice*. 2000;30(5):1151-67.
36. Klauss G, Constantinescu GM. Nonhypotensive autonomic agents in veterinary ophthalmology. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice*. 2004;34(3):777-800.

37. Giuliano EA. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in veterinary ophthalmology. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice*. 2004;34(3):707-23.
38. Yang G, Espandar L, Mamalis N, Prestwich GD. A cross-linked hyaluronan gel accelerates healing of corneal epithelial abrasion and alkali burn injuries in rabbits. *Veterinary ophthalmology*. 2010;13(3):144-50.
39. Ortiz JF, Acevedo SP, Restrepo B LF. Comparison of autologous serum with a commercial product as an adjunct in the treatment of uncomplicated corneal ulceration in dogs. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2012;25:90-6.
40. Brooks DE, Ollivier FJ. Matrix metalloproteinase inhibition in corneal ulceration. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice*. 2004;34(3):611-22.
41. Marquart ME, Caballero AR, Chomnawang M, Thibodeaux BA, Twining SS, O'Callaghan RJ. Identification of a novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* that causes corneal erosions. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2005;46(10):3761-8.
42. Ekapopphan D, Srisutthakarn A, Moonarmart W, Buddhirongawatr R, Bangphoomi N. Identification and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from severe corneal ulcers of dogs in Thailand. *The Journal of veterinary medical science*. 2018;80(8):1259-65.
43. Sherman A, Daniels JB, Wilkie DA, Lutz E. *Actinomyces bowdenii* ulcerative keratitis in a dog. *Veterinary ophthalmology*. 2013;16(5):386-91.
44. Wang L, Pan Q, Zhang L, Xue Q, Cui J, Qi C. Investigation of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Beijing, China. *Veterinary ophthalmology*. 2008;11(3):145-9.
45. Hindley KE, Groth AD, King M, Graham K, Billson FM. Bacterial isolates, antimicrobial susceptibility, and clinical characteristics of bacterial keratitis in dogs presenting to referral practice in Australia. *Veterinary ophthalmology*. 2016;19(5):418-26.
46. Hartley C. Treatment of corneal ulcers: what are the medical options? *Journal of feline medicine and surgery*. 2010;12(5):384-97.
47. Baeyens V, Felt-Baeyens O, Rougier S, Pheulpin S, Boisrame B, Gurny R. Clinical evaluation of bioadhesive ophthalmic drug inserts (BODI) for the treatment of external ocular infections in dogs. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2002;85(1-3):163-8.
48. Murphy CJ, Marfurt CF, McDermott A, Bentley E, Abrams GA, Reid TW, et al. 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*. 2001;42(10):2252-61.
49. La Croix N, Woerd A, K. Olivero D. Nonhealing corneal ulcers in cats: 29 cases (1991-1999)2001. 733-5 p.
50. Hendrix DV, Ward DA, Barnhill MA. Effects of antibiotics on morphologic characteristics and migration of canine corneal epithelial cells in tissue culture. *American journal of veterinary research*. 2001;62(10):1664-9.
51. Ziakas NG, Boboridis KG, Terzidou C, Naoumidi TL, Mikropoulos D, Georgiadou EN, et al. Long-term follow up of autologous serum treatment for recurrent corneal erosions. *Clinical & Experimental Ophthalmology*. 2010;38(7):683-7.
52. Jeng BH, Dupps WJ, Jr. Autologous serum 50% eyedrops in the treatment of persistent corneal epithelial defects. *Cornea*. 2009;28(10):1104-8.

53. Regnier A, Cazalot G, Cantaloube B. Topical treatment of non-healing corneal epithelial ulcers in dogs with aminocaproic acid. *The Veterinary record*. 2005;157(17):510-3.
54. La Croix NC, van der Woerdt A, Olivero DK. Nonhealing corneal ulcers in cats: 29 cases (1991-1999). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2001;218(5):733-5.
55. Wooff PJ, Norman JC. Effect of corneal contact lens wear on healing time and comfort post LGK for treatment of SCCEDs in boxers. *Veterinary ophthalmology*. 2015;18(5):364-70.
56. Gosling AA, Labelle AL, Breaux CB. Management of spontaneous chronic corneal epithelial defects (SCCEDs) in dogs with diamond burr debridement and placement of a bandage contact lens. *Veterinary ophthalmology*. 2013;16(2):83-8.
57. Bentley E. Spontaneous chronic corneal epithelial defects in dogs: a review. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 2005;41(3):158-65.
58. Bayley KD, Read RA, Gates MC. Superficial keratectomy as a treatment for non-healing corneal ulceration associated with primary corneal endothelial degeneration. *Veterinary ophthalmology*. 2018.
59. Jegou JP, Tromeur F. Superficial keratectomy for chronic corneal ulcers refractory to medical treatment in 36 cats. *Veterinary ophthalmology*. 2015;18(4):335-40.
60. Soontornvipart K, Tuntivanich N, Kecová H, Rau P. Conjunctival Pedicle Graft in Dogs and Cats: A Retrospective Study of 88 Cases. *Acta Veterinaria Brno*. 2003;72(1).
61. Grahn BH, Cullen CL. Diagnostic ophthalmology. Melting corneal ulcer. *The Canadian veterinary journal = La revue vétérinaire canadienne*. 2001;42(8):656-7.
62. Ion L, Ionascu I, Birtoiu A. Melting Keratitis in Dogs and Cats. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. 2015;6:342-9.
63. Pumphrey SA, Pizzirani S, Pirie CG. 360-degree conjunctival grafting for management of diffuse keratomalacia in a dog. *Veterinary ophthalmology*. 2011;14(3):209-13.
64. D.W. E. Descemetocoele. In: D.W. E, editor. *Clinical Atlas of Canine and Feline Ophthalmic Disease* 2015.
65. Sandmeyer LS, Bauer BS, Grahn BH. Diagnostic ophthalmology. Corneal perforation with iris prolapse and anterior uveitis due to injury in a horse. *The Canadian veterinary journal = La revue vétérinaire canadienne*. 2013;54(11):1089-90.
66. Lacerda RP, Pena Gimenez MT, Laguna F, Costa D, Rios J, Leiva M. Corneal grafting for the treatment of full-thickness corneal defects in dogs: a review of 50 cases. *Veterinary ophthalmology*. 2017;20(3):222-31.
67. Dorbandt DM, Moore PA, Myrna KE. Outcome of conjunctival flap repair for corneal defects with and without an acellular submucosa implant in 73 canine eyes. *Veterinary ophthalmology*. 2015;18(2):116-22.
68. Chow DW, Westermeyer HD. Retrospective evaluation of corneal reconstruction using ACell Vet() alone in dogs and cats: 82 cases. *Veterinary ophthalmology*. 2016;19(5):357-66.
69. Balland O, Poinard AS, Famose F, Gouille F, Isard PF, Mathieson I, et al. Use of a porcine urinary bladder acellular matrix for corneal reconstruction in dogs and cats. *Veterinary ophthalmology*. 2016;19(6):454-63.

70. Jirsova K, Jones GLA. Amniotic membrane in ophthalmology: properties, preparation, storage and indications for grafting-a review. *Cell and tissue banking*. 2017;18(2):193-204.
71. Dulaurent T, Azoulay T, Goulle F, Dulaurent A, Mentek M, Peiffer RL, et al. Use of bovine pericardium (Tutopatch(R)) graft for surgical repair of deep melting corneal ulcers in dogs and corneal sequestra in cats. *Veterinary ophthalmology*. 2014;17(2):91-9.
72. Goulle F. Use of porcine small intestinal submucosa for corneal reconstruction in dogs and cats: 106 cases. *The Journal of small animal practice*. 2012;53(1):34-43.
73. Sansom J, Blunden T. Calcareous degeneration of the canine cornea. *Veterinary ophthalmology*. 2010;13(4):238-43.
74. Lansdown DA, Fortier LA. Platelet-Rich Plasma: Formulations, Preparations, Constituents, and Their Effects. *Operative Techniques in Sports Medicine*. 2017;25(1):7-12.
75. Fernandez-Barbero JE, Galindo-Moreno P, Avila-Ortiz G, Caba O, Sanchez-Fernandez E, Wang HL. Flow cytometric and morphological characterization of platelet-rich plasma gel. *Clinical oral implants research*. 2006;17(6):687-93.
76. Dhurat R, Sukesh M. Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective. *Journal of cutaneous and aesthetic surgery*. 2014;7(4):189-97.
77. Wu PI, Diaz R, Borg-Stein J. Platelet-Rich Plasma. *Physical medicine and rehabilitation clinics of North America*. 2016;27(4):825-53.
78. Cole BJ, Seroyer ST, Filardo G, Bajaj S, Fortier LA. Platelet-rich plasma: where are we now and where are we going? *Sports health*. 2010;2(3):203-10.
79. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Gene therapy and wound healing. *Clinics in dermatology*. 2007;25(1):79-92.
80. McCarrel T, Fortier L. Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2009;27(8):1033-42.
81. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological reviews*. 2003;83(3):835-70.
82. Fernández-Delgado N, Hernández-Ramírez P, Forrellat-Barrios M. Espectro funcional de las plaquetas: de la hemostasia a la medicina regenerativa. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 2012;28:200-16.
83. Beca T, Hernández G, Morante S, Bascones A. Plasma rico en plaquetas: Una revisión bibliográfica. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*. 2007;19:39-52.
84. Schultz GS, Wysocki A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2009;17(2):153-62.
85. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2008;16(5):585-601.
86. Gonshor A. Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: background and process. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*. 2002;22(6):547-57.

87. Carmona J, Ríos E, Vilar J, Giraldo C, López C. Efectos de dos anticoagulantes sobre el conteo celular y parámetros de activación plaquetaria de plasma rico en plaquetas de bovinos. *Archivos de medicina veterinaria*. 2014;46:375-80.
88. Rodríguez Flores J, Palomar Gallego MA, Torres García-Denche J. Plasma rico en plaquetas: fundamentos biológicos y aplicaciones en cirugía maxilofacial y estética facial. *Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial*. 2012;34(1):8-17.
89. Moreno R, Gaspar Carreno M, Jimenez Torres J, Alonso Herreros JM, Villimar A, Lopez Sanchez P. [Methods to obtain platelet-rich plasma and osteoinductive therapeutic use]. *Farmacia hospitalaria : organo oficial de expresion cientifica de la Sociedad Espanola de Farmacia Hospitalaria*. 2015;39(3):130-6.
90. Kevy SV, Jacobson MS. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. *The journal of extra-corporeal technology*. 2004;36(1):28-35.
91. Marlovits S, Mousavi M, Gabler C, Erdos J, Vecsei V. A new simplified technique for producing platelet-rich plasma: a short technical note. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*. 2004;13 Suppl 1:S102-6.
92. Lozada JL, Caplanis N, Proussaefs P, Willardsen J, Kammeyer G. Platelet-rich plasma application in sinus graft surgery: Part I--Background and processing techniques. *The Journal of oral implantology*. 2001;27(1):38-42.
93. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in biotechnology*. 2009;27(3):158-67.
94. Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Mishra A, Borzini P, Inchingolo F, Sammartino G, et al. In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2012;13(7):1131-7.
95. Sáez-Torres Barroso C, Calvo Benito J, Gayà Puig A. Calidad del plasma rico en plaquetas: estudio de la activación plaquetaria. *Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial*. 2007;29:240-8.
96. Zandim BM, Souza MVd, Magalhães PC, Benjamin Lda, Maia L, Oliveira ACd, et al. Platelet activation: ultrastructure and morphometry in platelet-rich plasma of horses. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2012;32:83-92.
97. Ploderl K, Strasser C, Hennerbichler S, Peterbauer-Scherb A, Gabriel C. Development and validation of a production process of platelet lysate for autologous use. *Platelets*. 2011;22(3):204-9.
98. Szponder T, Wessely-Szponder J, Sobczynska-Rak A, Zylinska B, Radzki RP, Polkowska I. Application of Platelet-rich Plasma and Tricalcium Phosphate in the Treatment of Comminuted Fractures in Animals. *In vivo*. 2018;32(6):1449-55.
99. Lopez S, Vilar JM, Sopena JJ, Damia E, Chicharro D, Carrillo JM, et al. Assessment of the Efficacy of Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Traumatic Canine Fractures. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(5).
100. Silva R, Rezende C, Carmona J. Uso de concentrados autólogos de plaquetas intraarticulares como coadyuvantes en el tratamiento quirúrgico de la rotura del ligamento cruzado anterior en una perra. *Archivos de medicina veterinaria*. 2011;43:313-6.

101. Costa ELD, Teixeira LEM, Padua BJ, Araujo ID, Vasconcellos LS, Dias LSB. Biomechanical study of the effect of platelet rich plasma on the treatment of medial collateral ligament lesion in rabbits. *Acta cirurgica brasileira*. 2017;32(10):827-35.
102. Franklin SL, Maffuli N, Morrey ME. The Use of Platelet-Rich Plasma for Percutaneous Treatment of Tendinopathies. *Operative Techniques in Orthopaedics*. 2013;23(2):63-8.
103. Oyama T, Nishimoto S, Tsugawa T, Shimizu F. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2004;62(5):555-8.
104. Carmona J, López C, Giraldo C. Uso de concentrados autólogos de plaquetas como terapia regenerativa de enfermedades crónicas del aparato musculoesquelético equino. *Archivos de medicina veterinaria*. 2011;43:1-10.
105. Kassolis JD, Rosen PS, Reynolds MA. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. *Journal of periodontology*. 2000;71(10):1654-61.
106. Lin J, Sclafani AP. Platelet-Rich Plasma for Skin Rejuvenation and Tissue Fill. *Facial plastic surgery clinics of North America*. 2018;26(4):439-46.
107. Tambella AM, Attili AR, Dupre G, Cantalamessa A, Martin S, Cuteri V, et al. Platelet-rich plasma to treat experimentally-induced skin wounds in animals: A systematic review and meta-analysis. *PloS one*. 2018;13(1):e0191093.
108. Singer AJ, Toussaint J, Chung WT, McClain S, Raut V, Rosenberg L. The effects of platelet rich plasma on healing of full thickness burns in swine. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*. 2018;44(6):1543-50.
109. Ikumi A, Hara Y, Yoshioka T, Kanamori A, Yamazaki M. Effect of local administration of platelet-rich plasma (PRP) on peripheral nerve regeneration: An experimental study in the rabbit model. *Microsurgery*. 2018;38(3):300-9.
110. Sandri G, Bonferoni MC, Rossi S, Ferrari F, Mori M, Del Fante C, et al. Thermosensitive eyedrops containing platelet lysate for the treatment of corneal ulcers. *International journal of pharmaceutics*. 2012;426(1-2):1-6.
111. Alio JL, Rodriguez AE, Martinez LM, Rio AL. Autologous fibrin membrane combined with solid platelet-rich plasma in the management of perforated corneal ulcers: a pilot study. *JAMA ophthalmology*. 2013;131(6):745-51.
112. Ortuno-Prados VJ, Alio JL. [Treatment of a neurotrophic corneal ulcer with solid platelet-rich plasma and Tutopatch(R)]. *Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia*. 2011;86(4):121-3.
113. Alio JL, Abad M, Artola A, Rodriguez-Prats JL, Pastor S, Ruiz-Colecha J. Use of autologous platelet-rich plasma in the treatment of dormant corneal ulcers. *Ophthalmology*. 2007;114(7):1286-93 e1.
114. Wrobel-Dudzinska D, Alio J, Rodriguez A, Suchodola-Ratajewicz E, Kosior-Jarecka E, Rymgayllo-Jankowska B, et al. Clinical Efficacy of Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Neurotrophic Corneal Ulcer. *Journal of ophthalmology*. 2018;2018:3538764.
115. Anitua E, de la Fuente M, Riestra A, Merayo-Llodes J, Muruzabal F, Orive G. Preservation of Biological Activity of Plasma and Platelet-Derived Eye Drops After Their Different Time and Temperature Conditions of Storage. *Cornea*. 2015;34(9):1144-8.

116. Di Pietro S, Crinó C, Francesca A, Rosario P, Giusi V, Elisabetta G. Platelet Rich Plasma Eye Drops: Preparation, Storage and Clinical Use in Dogs and Cats. Preliminary Results. *Veterinary Science and Technology*. 2017;2017(1).
117. Merlini NB, Fonzar JF, Perches CS, Sereno MG, Souza VL, Estanislau CA, et al. Uso de plasma rico em plaquetas em úlceras de córnea em cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2014;66:1742-50.
118. Acosta L, Castro M, Fernandez M, Oliveres E, Gomez-Demmel E, Tartara L. [Treatment of corneal ulcers with platelet rich plasma]. *Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia*. 2014;89(2):48-52.
119. Kim KM, Shin YT, Kim HK. Effect of autologous platelet-rich plasma on persistent corneal epithelial defect after infectious keratitis. *Japanese journal of ophthalmology*. 2012;56(6):544-50.
120. Geremicca W, Fonte C, Vecchio S. Blood components for topical use in tissue regeneration: evaluation of corneal lesions treated with platelet lysate and considerations on repair mechanisms. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*. 2010;8(2):107-12.
121. Alio JL, Colecha JR, Pastor S, Rodriguez A, Artola A. Symptomatic dry eye treatment with autologous platelet-rich plasma. *Ophthalmic research*. 2007;39(3):124-9.
122. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000;100(1):157-68.
123. Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*. 2008;132(4):567-82.
124. Talavera J, Gil-Chinchilla JI, Garcia D, Castellanos G, Lopez-Lucas MD, Atucha NM, et al. Terapia con células madre en medicina veterinaria: conceptos generales y evidencias clínicas. *Clinica Veterinaria de Pequeños Animales AVEPA*. 2017;37(2):87-101.
125. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
126. Dulak J, Szade K, Szade A, Nowak W, Jozkowicz A. Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta biochimica Polonica*. 2015;62(3):329-37.
127. Reich CM, Raabe O, Wenisch S, Bridger PS, Kramer M, Arnhold S. Isolation, culture and chondrogenic differentiation of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells--a comparative study. *Veterinary research communications*. 2012;36(2):139-48.
128. Rodriguez-Lozano FJ, Insausti CL, Iniesta F, Blanquer M, Ramirez MD, Meseguer L, et al. Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*. 2012;17(6):e1062-7.
129. Insausti CL, Blanquer M, Bleda P, Iniesta P, Majado MJ, Castellanos G, et al. The amniotic membrane as a source of stem cells. *Histology and histopathology*. 2010;25(1):91-8.
130. Riaño NB, Vera VJ. AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES CANINAS DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*. 2014;61:115-33.

131. Shafieian R, Matin MM, Rahpeyma A, Fazel A, Sedigh HS, Nabavi AS, et al. Effects of Human Adipose-derived Stem Cells and Platelet-Rich Plasma on Healing Response of Canine Alveolar Surgical Bone Defects. *The archives of bone and joint surgery*. 2017;5(6):406-18.
132. Srzentic Drazilov S, Mrkovacki J, Spasovski V, Fazlagic A, Pavlovic S, Nikcevic G. The use of canine mesenchymal stem cells for the autologous treatment of osteoarthritis. *Acta veterinaria Hungarica*. 2018;66(3):376-89.
133. Muir P, Hans EC, Racette M, Volstad N, Sample SJ, Heaton C, et al. Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Modulate Molecular Markers of Inflammation in Dogs with Cruciate Ligament Rupture. *PloS one*. 2016;11(8):e0159095.
134. Pacini S, Spinabella S, Trombi L, Fazzi R, Galimberti S, Dini F, et al. Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue engineering*. 2007;13(12):2949-55.
135. Spaas JH, Broeckx S, Van de Walle GR, Poletini M. The effects of equine peripheral blood stem cells on cutaneous wound healing: a clinical evaluation in four horses. *Clinical and experimental dermatology*. 2013;38(3):280-4.
136. Webb TL, Webb CB. Stem cell therapy in cats with chronic enteropathy: a proof-of-concept study. *Journal of feline medicine and surgery*. 2015;17(10):901-8.
137. Mahmoudian-Sani MR, Rafeei F, Amini R, Saidijam M. The effect of mesenchymal stem cells combined with platelet-rich plasma on skin wound healing. *Journal of cosmetic dermatology*. 2018;17(5):650-9.
138. Del Bue M, Ricco S, Ramoni R, Conti V, Gnudi G, Grolli S. Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: their association in vitro and in vivo. *Veterinary research communications*. 2008;32 Suppl 1:S51-5.
139. Holmes HL, Wilson B, Goerger JP, Silverberg JL, Cohen I, Zipfel WR, et al. Facilitated recruitment of mesenchymal stromal cells by bone marrow concentrate and platelet rich plasma. *PloS one*. 2018;13(3):e0194567.
140. Villatoro AJ, Fern, #xe1, ndez V, Claros S, Rico-Llanos GA, et al. Use of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Keratoconjunctivitis Sicca in a Canine Model. *BioMed Research International*. 2015;2015:10.
141. Bittencourt MK, Barros MA, Martins JF, Vasconcellos JP, Morais BP, Pompeia C, et al. Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Dogs With Keratoconjunctivitis Sicca. *Cell medicine*. 2016;8(3):63-77.
142. Marfe G, Massaro-Giordano M, Ranalli M, Cozzoli E, Di Stefano C, Malafoglia V, et al. Blood derived stem cells: an ameliorative therapy in veterinary ophthalmology. *Journal of cellular physiology*. 2012;227(3):1250-6.
143. Sel S, Schilling UM, Nass N, Simm A, Garreis F, Knak M, et al. Bone marrow cells and CD117-positive haematopoietic stem cells promote corneal wound healing. *Acta ophthalmologica*. 2012;90(5):e367-73.
144. Bermudez MA, Sendon-Lago J, Eiro N, Trevino M, Gonzalez F, Yebra-Pimentel E, et al. Corneal epithelial wound healing and bactericidal effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2015;56(2):983-92.
145. Villatoro AJ, Claros S, Fernandez V, Alcoholado C, Farinas F, Moreno A, et al. Safety and efficacy of the mesenchymal stem cell in feline eosinophilic keratitis treatment. *BMC veterinary research*. 2018;14(1):116.

