

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

JÉSSICA FONTES VELOSO

**TESTE DA CRISTALIZAÇÃO LACRIMAL (TCL) E AVALIAÇÃO
PROTEÔMICA DA LÁGRIMA DE FELINOS DOMÉSTICOS HÍGIDOS**

ILHEUS – BAHIA
2020

JÉSSICA FONTES VELOSO

**TESTE DA CRISTALIZAÇÃO LACRIMAL (TCL) E AVALIAÇÃO
PROTEÔMICA DA LÁGRIMA DE FELINOS DOMÉSTICOS HÍGIDOS**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como exigência para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Clínica e Sanidade Animal

Orientadora: Profa. Dra. Renata Santiago Alberto Carlos

**ILHÉUS – BAHIA
2020**

V443

Veloso, Jéssica Fontes.

Teste da cristalização lacrimal (TCL) e avaliação proteômica da lágrima de felinos domésticos hígidos / Jéssica Fontes Veloso. – Ilhéus, BA: UESC, 2020. xvi, 103f. : il.; anexos.

Orientadora: Renata Santiago Alberto Carlos.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Inclui referências.

1. Síndrome do olho seco. 2. Aparelho lacrimal – Doença - Diagnóstico. 3. Cromatografia a líquido. 4. Eletroforese. 5. Proteínas. I. Título.

CDD 617.764

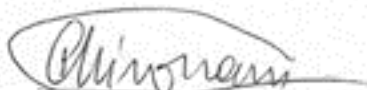
JÉSSICA FONTES VELOSO

**TESTE DA CRISTALIZAÇÃO LACRIMAL (TCL) E AVALIAÇÃO
PROTEÔMICA DA LÁGRIMA DE FELINOS DOMÉSTICOS HÍGIDOS**

Aprovada, 19 de fevereiro de 2020.



Renata Santiago Alberto Carlos – DSc
Orientador – UESC



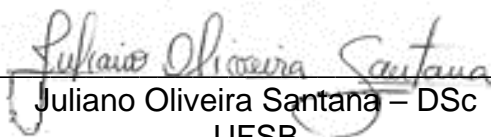
Carlos Priminho Pirovani – DSc
UESC



Paula Elisa Brandão Guedes – DSc
UESC



Roueda Abou Said – DSc
UESC



Juliano Oliveira Santana – DSc
UFSB

ILHÉUS – BAHIA

2020

*Quando não entendemos nosso **sacrifício** diário, ele vira um peso. Quando entendemos o seu propósito, ele nos **aperfeiçoa**.*

Autor desconhecido.

AGRADECIMENTOS

Nesse caminho de quatro anos de dedicação e estudo, houve a participação de muitas pessoas e instituições que foram de fundamental importância na concepção desta pesquisa.

Primeiramente, agradeço aos meus pais Dusty e Márcio, pois sei que sem o apoio (em todos os sentidos) de vocês eu não estaria aqui neste momento buscando fechar mais um grande ciclo em minha vida. Vocês são meus maiores exemplos de amor, dedicação, orgulho e admiração, amo vocês!

Ao meu companheiro diário, marido, Jorge Eduardo, te agradeço a paciência, o apoio e a ter me dado o maior amor da minha vida neste período, minha benção, meu filho Theo, que me fortalece a cada dia e me mostra que a gente tem forças mesmo quando pensamos que não conseguimos mais. Amo vocês!

À toda minha família, agradeço, pela torcida forte pelo meu sucesso e o orgulho que sentem desta minha conquista. Além disso, por toda a dedicação em me ajudar a ter tempo para escrever o trabalho.

À minha orientadora, Renata Santiago, sou muito grata pelos ensinamentos, confiança e amizade. Nesse caminho longo sei que não foi fácil. Eu completo agora 8 anos sob sua orientação desde a graduação e não tenho palavras para descrever a sua dedicação neste caminho, você sempre foi muito correta, ética, incentivadora e protetora ao mesmo tempo. Que nosso futuro nos reserve grandes parcerias, batalharei por isso. Obrigada!

Agradeço a minha amiga e colega Paula Brandão, que se empenhou em todos os momentos para ajudar com as coletas, bem como com todos os passos da análise proteômica.

Agradeço à colega Thais Nascimento, por me auxiliar com os animais do estudo, desde seleção à coleta para triagem. Também agradeço as alunas de iniciação científica Claudia, Larissa e Lohana.

Agradeço ao pessoal do Hospital Veterinário, Silvina, Givaldo e Aslânia pelo auxílio com os animais e a disponibilidade em ajudar sempre.

Agradeço ao Professor Carlos Priminho e Professor Juliano Santana, por todo o auxílio durante a análise proteômica e a todo o pessoal do Centro de

Biotecnologia e Genética (CBG), principalmente Horlei e Ivina, pela dedicação, dicas e ajuda durante o período que frequentei os laboratórios.

Agradeço a Professora Arianne da UFBA e suas orientadas Ana Cláudia e Ariane, por toda ajuda com o experimento da proteômica, bem como correções do artigo 1 deste experimento.

À Fapesb e a UESC, pelo financiamento do projeto, possibilitando a realização da pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, pela disponibilidade e prestação de serviços durante todo o curso em especial, Eduardo Viana sempre disponível.

Aos componentes da banca, agradeço a disponibilidade e a vontade de tornar junto comigo este trabalho muito melhor, agregando conhecimento para a comunidade acadêmica.

Agradeço aos animais que fizeram parte desse trabalho, meu respeito e gratidão serão eternos.

E, por fim, a todos que direta ou indiretamente participaram desta conquista.

Muito obrigada!

RESUMO

TESTE DA CRISTALIZAÇÃO LACRIMAL (TCL) E AVALIAÇÃO PROTEÔMICA DA LÁGRIMA DE FELINOS DOMÉSTICOS HÍGIDOS

No presente trabalho foi realizado o teste da cristalização lacrimal (TCL) em amostras de sessenta felinos domésticos hígidos e análise proteômica do fluido lacrimal (FL) de doze felinos. O TCL é um teste oftálmico de caráter qualitativo, visando avaliar a osmolaridade indireta do FL. Ainda não havia sido realizado em amostras da espécie felina, mas, apesar de originalmente desenvolvido para a espécie humana, já foi adaptado para cães, cavalos, macacos e camelos. Como forma complementar, tem-se desenvolvido diferentes técnicas de análise proteômica para avaliação do FL, visando identificação de proteínas que possam ser utilizadas como biomarcadores para diagnóstico precoce, prognóstico, desenvolvimento de novos fármacos, bem como para elucidar a fisiologia de sistemas e fisiopatologia de alterações. Objetivou-se verificar o enquadramento de amostras de felino nas escalas propostas para classificação do TCL de humanos, e, descrever as proteínas encontradas no FL de indivíduos dessa espécie. Para tal, as amostras de FL para TCL foram coletadas através do Teste de Schirmer – 1 (TLS-1), e, as tiras logo após o teste foram acondicionadas em microtubos e centrifugadas para obtenção da alíquota que era depositada em uma lâmina microscópica de vidro, analisada através do microscópio de luz polarizada, e registrada através de fotos. Enquanto as amostras para análise proteômica também foram obtidas por TLS-1, acondicionadas em microtubos que foram submetidos a centrifugação refrigerada a -4°C , porém a alíquota era imediatamente congelada até posterior análise por espectrometria de massas (EM) com gel bidimensional de poliacrilamida (2D-SDS-PAGE) associada a cromatografia líquida de alta eficiência (ULPC). A cristalização de amostras de felinos apresentou alta densidade de cristais, poucas lacunas entre os ramos, e, grande quantidade de núcleos facilmente visíveis. Os ramos são finos e suas ramificações primárias e secundárias bem definidas. Os tipos I e II da escala de Rolando e os graus 1 e 2 da escala de Masmali foram os mais comumente

observados (50%, 46,6%, 56,6% e 28,4%, respectivamente) das escalas propostas. A distribuição normal não foi encontrada para as classificações obtidas ($P < 0,001$) bem como não foi observada diferença entre classificações dos olhos direito e esquerdo ($P \geq 0,102$). Proteínas já descritas em estudos com amostras de FL de outras espécies foram descritas pela primeira vez em felinos, como: lactotransferrina, albumina sérica e lipocalinas alérgicas. Oito outras proteínas foram descritas nas amostras de felinos e podem ser consideradas inéditas em amostras de FL de todas as espécies, dentre elas estão: três proteínas quinase dependentes da ciclina, o receptor de apelina, proteína secretória relacionada ao C1q/TNF, aciltransferase, α -1,4 glucano fosforilase e o domínio de repetição WD-1. O TCL pode ser considerado de boa aplicabilidade em felinos como uma avaliação complementar da superfície ocular, e, a técnica de proteômica escolhida superou as limitações relacionada ao pequeno volume de amostra e apresentou alta sensibilidade na identificação de proteínas. Mais estudos da aplicabilidade das escalas do TCL, bem como da expressão de proteínas do FL de felinos são necessários e podem trazer no futuro grande auxílio na prevenção, diagnóstico precoce, prognóstico, bem como tratamento de doenças oftálmicas e até mesmo sistêmicas.

Palavras-chave: Cristais lacrimais. Cromatografia Líquida. Diagnóstico. Eletroforese. Peptídeo. Proteínas lacrimais.

ABSTRACT

TEAR FERNING TEST (TFT) AND PROTEOMIC ANALYSIS OF TEAR FILM IN HEALTHY DOMESTIC CATS

In the present study Tear Ferning Test (TFT) was performed in samples of sixty healthy domestic cats, and proteomic analysis of the Tear Film (TF) in twelve cats. TFT is a qualitative ophthalmic test that evaluate the indirect osmolarity of TF. It had not yet been performed on feline specimens, and although it was originally developed for humans, it has been used on dogs, horses, capuchin monkeys and camels. As a complementary tool, different proteomic techniques have been developed for the evaluation of TF, aiming to identify proteins that can be used as biomarkers for early diagnosis, prognosis, development of new drugs, as well as to elucidate the systems physiology and pathophysiology of diseases. The aim of this study was to verify the classification of feline samples in the proposed scales for TFT of humans, and to describe the proteins found in the TF of this species. For that purpose, the TF samples for TFT were collected through Schirmer Tear Test – 1 (STT-1), the strips were placed in microtubes immediately after, and centrifuged to obtain the aliquot that was deposited on a microscopic slide of glass, analyzed through the polarized light microscope and recorded through photograph. The samples for proteomic analysis were also obtained by STT-1, placed in microtubes, subjected to refrigerated centrifugation at -4°C , and the aliquot was immediately frozen at -20°C until further analysis by mass spectrometry (MS) with two dimensional polyacrylamide electrophoresis (2D-SDS-PAGE) associated with ultra-performance liquid chromatography (ULPC). Ferning patterns of cat's TF samples showed full crystallization with high density, without gaps between the ferns and branches, forming several nuclei that were easily distinguished. The branches are thin and their primary and secondary branches well defined. Types I and II by Rolando scale and grades 1 and 2 by Masmali scale were the most observed (50%, 46.6%, 56.6% and 28.4%, respectively) of the proposed scales. Normal distribution was not found for the obtained classifications ($P<0.001$), as well as no difference was observed

between classifications of the right and left eyes ($P \geq 0.102$). Proteins already described in studies with TF samples from other species have been described for the first time in felines, such as: lactotransferrin, serum albumin and lipocalin allergens. Eight other proteins that were found in feline samples can be considered new in TF samples of all species already reported so far, among them are: three cyclin-dependent protein kinase, the apelin receptor, secretory protein related to C1q/TNF, acyltransferase, α -1,4 glucan phosphorylase and the WD-1 repeat domain. TFT can be feasible in cats as a complementary evaluation of the ocular surface, and, the chosen proteomics technique overcame the limitations related to the small sample volume and showed high sensitivity in the identification of proteins. Further studies on the use of TFT scales, as well as on the expression of feline TF proteins are needed and can bring in the future great help in prevention, early diagnosis, prognosis, as well as treatment of ophthalmic and systemic diseases.

Keywords: Diagnosis. Electrophoresis. Liquid chromatography. Peptide. Tear crystals. Tear proteins.

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
01	Anatomia do sistema lacrimal de felinos. Fonte: adaptado de McCracken et al. (2008)	20
02	Par de fita de papel Whatman 41 milimetrada, utilizada para realizar teste lacrimal de Schirmer (TLS). Fonte: arquivo pessoal.....	25
03	Imagens de exemplos de amostras de FL segundo a escala de Rolando (A: Tipo I; B: Tipo II; C: Tipo III; e D: Tipo IV) e em paralelo comparando com a aparência de folha de samambaia que os cristais podem assumir (E). Fonte: Adaptado de Rolando (1984)	26
04	Examples of tear ferning patterns in cats according to the Rolando (a,b,c) and Masmali (d,e,f) grading scales. Type I representation: dendritic fern growth is uniform, nuclei (yellow arrows) are easily distinguished and no gaps are seen between the branches. (b) Type II: small spaces (green arrows) begin to appear between the branches and the ferns are thicker. (c) Type III: incomplete crystallization process; coarse crystals (red arrows) are formed in single and small size, and branches are rare. (d) Grade 0 representation: full crystallization without gaps between the ferns and branches, and nuclei well demarcated. (e) Grade 1: branch density is decreased and small spaces appear between them. (f) Grade 2: small branches—sometimes thick and large—with clear gaps between the ferns (blue arrows), and nuclei not visible.....	50
05	Superfície ocular de um dos felinos do estudo, sendo corada por fluoresceína sódica e visualizada com luz de cobalto, constatando higidez por ausência de corante impregnado na córnea. Fonte: arquivo pessoal.....	56

06	Animal contido e sendo realizada a técnica de coleta de amostra lacrimal através do TLS-1. Fonte: arquivo pessoal.....	57
07	Mapa proteico no gel bidimensional de amostra de FL de felinos, escaneado e apresentando 90 spots identificados. Destes, os numerados, corresponderam aos peptídeos identificados por espectrometria de massas. Fonte: arquivo pessoal.....	62
08	Perfil eletroforético do fluido lacrimal de gatos revelados em SDS-PAGE corado com azul brilhante de comassie. Coluna (A) é o marcador molecular; (B) pool de amostra de felinos; e (C) repetição do pool. As bandas de peptídeos foram identificadas combinando suas migrações com as dos padrões de peso molecular e em vermelho está demarcado a lactotransferrina (LF) que possui 79 kDa. Fonte: arquivo pessoal.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
01	Tabela 1. Critérios adotados para a avaliação e classificação dos padrões de cristalização da lágrima segundo Rolando (1984) e Masmali (2014)	27
02	Table 1. Grading results for Rolando scale and Masmali scale for tear ferning in healthy cats.....	41
03	Table 2. Cohen's kappa agreement coefficient and <i>P</i> -value among the evaluators' (A, B and C) for tear crystallization of cats according to Rolando and Masmali scales.....	42
04	Tabela 2. Peptídeos identificados no experimento em amostra de FL de felinos hígidos.....	63

LISTA DE QUADROS

Quadro		Página
01	Proteína Lactotransferrina identificada pelo EM no estudo, marcado com os 45 peptídeos sequenciados na amostra lacrimal de felinos.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

2-DE – Eletroforese bidimensional em gel

AA – Aminoácidos

ARVO – *Association for Research in Vision and Ophthalmology's*

EM – Espectrometria de massas

ESI – Electrospray

FL – Fluido lacrimal

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

ISFM – *International Society of Feline Medicine*

JFMS – *Journal of Feline Medicine Surgery*

m/z – Massa e carga

MALDI – Ionização e Dessorção a Laser assistida por Matriz

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio

SO – Superfície ocular

TCL – Teste da cristalização lacrimal

TLS-1 – Teste lacrimal de Schirmer-1

TOF – Separação baseada no tempo de voo

ULPC – Cromatografia líquida de ultra eficiência

SUMÁRIO

	Página
Resumo.....	VI
Abstract.....	VIII
Lista de Figuras.....	X
Lista de Tabelas.....	XII
Lista de Quadros.....	XIII
Lista de Abreviaturas.....	XIV
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 HIPÓTESE.....	19
3 OBJETIVO.....	19
3.1 Geral.....	19
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
4.1 Sistema lacrimal.....	20
4.2 Fluido lacrimal	20
4.2.1 Camada lipídica.....	21
4.2.2 Camada aquosa	22
4.2.3 Camada mucosa	22
4.3 Dinâmica do FL	24
4.4 Avaliação da superfície lacrimal	24
4.5 Análise proteômica do FL.....	27
5 CAPÍTULO I.....	33
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
5.2 Artigo Científico	35
6 CAPÍTULO II.....	51
6.1 INTRODUÇÃO.....	52
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
6.3 MATERIAL E MÉTODOS	55
6.3.1 Considerações Éticas.....	55
6.3.2 Animais	55
6.3.3 Critérios de Inclusão	55
6.3.4 Semiotécnica Oftálmica	55
6.3.5 Sorologia para FIV e FeLV	56
6.3.6 Sorologia para <i>Toxoplasma gondii</i>	56
6.3.7 Sorologia para Coronavirus.....	56
6.3.8 Coleta da lágrima e quantificação	57

6.3.9 Quantificação das proteínas da amostra lacrimal pelo método de Bradford (1976)	58
6.3.10 Remoção de sal da amostra lacrimal e quantificação da amostra pelo método de 2D Quant Kit.....	58
6.3.11 Primeira dimensão: focalização isoeétrica	58
6.3.12 Segunda dimensão: eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	59
6.3.13 Visualização dos <i>spots</i> e análise de imagens	59
6.3.14 Extração de peptídeos em gel e análise por espectrometria de massas.....	60
6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
6.5 CONCLUSÃO	73
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
REFERÊNCIAS	76
ANEXO A.....	89
ANEXO B.....	98
ANEXO C.....	99
ANEXO D.....	100
ANEXO E.....	101
ANEXO F	103

1 INTRODUÇÃO

Existem evidências crescentes que deficiências no fluido lacrimal (FL) podem ser cofatores importantes ou causas de algumas das doenças oculares mais comuns e frustrantes de gatos (TOMLINSON, KHANAL, 2005; SEBBAG et al., 2015; UHL et al., 2018). Portanto, a avaliação do sistema lacrimal de animais vem se tornando cada vez mais frequente e explorada. Rotineiramente, o teste mais empregado para análise do FL em todas as espécies é o teste lacrimal de Schirmer – 1 (TLS-1), entretanto seu resultado é estritamente quantitativo. Nele, é possível mensurar a produção lacrimal do indivíduo ao inserir uma tira de papel padronizada e milimetrada por sessenta segundos no saco conjuntival de cada olho (BARABINO et al., 2004; GELATT et al., 2013).

Embora exista um intervalo de valores para TLS-1 que representa a faixa de normalidade de produção lacrimal, um resultado superior ou inferior nem sempre é suficiente para diagnóstico de patologias de superfície ocular (SO) (SEBAGG et al., 2015). Uma vez que o FL é composto por milhares de moléculas com diferentes estruturas e funções, sabe-se que determinado indivíduo pode apresentar volume na faixa de referência ideal, mas, nem sempre, o fluido terá as características físicas consideradas de boa qualidade para que execute suas funções fisiológicas corretamente (TSUBOTA; TSENG, 2001; SLATTER, 2008; SEBAGG et al., 2015).

Pensando nisso, o Teste da Cristalização Lacrimal (TCL) foi desenvolvido para amostras de FL de seres humanos, com intuito de incrementar a avaliação da SO com algum teste que inferisse qualidade da lágrima (ROLANDO et al., 1984; BARABINO et al., 2004; MASMALI et al., 2014). O princípio básico do teste é que quando a lágrima seca após evaporação, apresenta padrão de cristal que pode ser examinado e portanto diferenciado quanto a sua densidade, exuberância, espessura de ramos primários, secundários e terciários e visibilidade de núcleos (ROLANDO et al., 1984; MASMALI et al., 2014; ORIA et al., 2017). Dessa forma, ao enquadrar a amostra nas escalas existentes, pode-se diferenciar o que seriam amostras de FL de boa qualidade e os de baixa qualidade, podendo no futuro ser aplicada para identificar alterações patológicas que modifiquem o padrão do cristal.

As estruturas mais externas do olho, como a córnea e a conjuntiva, são protegidas pela presença do FL e, portanto, pode ser considerado a primeira defesa do sistema ocular (CHOY et al., 2001). As funções mais importantes do FL são: de manutenção da superfície lisa para proporcionar a refração da luz, lubrificação das pálpebras, conjuntiva e córnea, fornecimento de nutrientes para a córnea com remoção de metabólitos, fornecimento de células de defesa para córnea e conjuntiva bem como remoção de corpos estranhos e, defesa da superfície ocular de patógenos através de substâncias antibacterianas específicas e não específicas (LEMP; BLACKMAN, 1981; LEMBACH et al., 2001; ZHOU et al., 2007).

Doenças oculares em felinos relacionadas às alterações no FL incluem sequestro corneano (DAVIDSON et al., 1992), úlcera de córnea, úlcera indolente, cegueira (CULLEN et al., 1999), conjuntivite (LIM; CULLEN, 2005; DAVIS; TOWNSEND, 2011) e ceratoconjuntivite pós infecção por herpesvírus felino tipo 1 (LIM et al., 2009; THOMASY et al., 2011). Embora pouco se saiba sobre a síndrome do olho seco em felinos, a condição é bem descrita em cães sendo que as causas relatadas incluem dacrioadenite imunomediada, aplasia/hipoplasia glandular congênita e disfunção glandular neurogênica ou induzida por drogas (MILLER, 2013). É provável que alterações clinicamente importantes do FL possam não estar sendo diagnosticadas ou sejam subdiagnosticadas na espécie felina (SEBBAG et al., 2015).

A coleta da alíquota de lágrima é considerada não invasiva, rápida e segura para o animal, e, esta amostra, quando comparada com amostras de sangue e urina, é considerada mais pura (LI et al., 2005). Isto favoreceu o desenvolvimento e aplicação de técnicas de proteômica para análise molecular da composição do FL, buscando identificar proteínas que possam ser utilizadas como biomarcadores para diagnóstico precoce de diversas condições patológicas, prognóstico, desenvolvimento de novos fármacos para tratamento, bem como para elucidar a fisiologia de sistemas e fisiopatologia de alterações (EVANS et al., 2001; HERBER et al., 2002; ZHAO et al., 2010; KATSAFADOU et al., 2016). Aliados, todos esses fatores evidenciam a importância de estudos elucidativos a respeito do FL de felinos domésticos.

2 HIPÓTESE

Os felinos domésticos hípidos possuem fluido lacrimal que cristalizam, formando padrões de cristais dentro de classificações de normalidade e que possuem proteínas exclusivas desta espécie.

3 OBJETIVO

3.1 Geral

Padronizar o Teste da Cristalização da Lágrima (TCL) em felinos domésticos hípidos, fazendo paralelo com as duas escalas de classificação propostas para seres humanos, bem como realizar análise proteômica de amostras de lágrimas de doze felinos através da técnica de espectrometria de massas associada a gel bidimensional 2D.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Sistema lacrimal

O sistema lacrimal (Figura 1) é constituído pelo aparelho secretor cuja função é formar o FL e pelo aparelho excretor que drenará este fluido após ter sido espalhado na superfície ocular. A formação do FL ocorre na glândula lacrimal principal, glândula da terceira pálpebra, glândulas de meibômio e nas células caliciformes da conjuntiva bulbar. Já sua drenagem é feita através de canalículos lacrimais e ducto nasolacrimal (CRISPIN, 2000; TSUBOTA; TSENG, 2001; COLITZ, 2008; SLATTER, 2008; SAMUELSON, 2013). O sistema lacrimal compõe parte do que se denomina superfície ocular, que também é composta pelo epitélio corneal, limbo, conjuntiva bulbar e das superfícies das pálpebras inferior, superior e da terceira pálpebra (SAMUELSON, 2013).

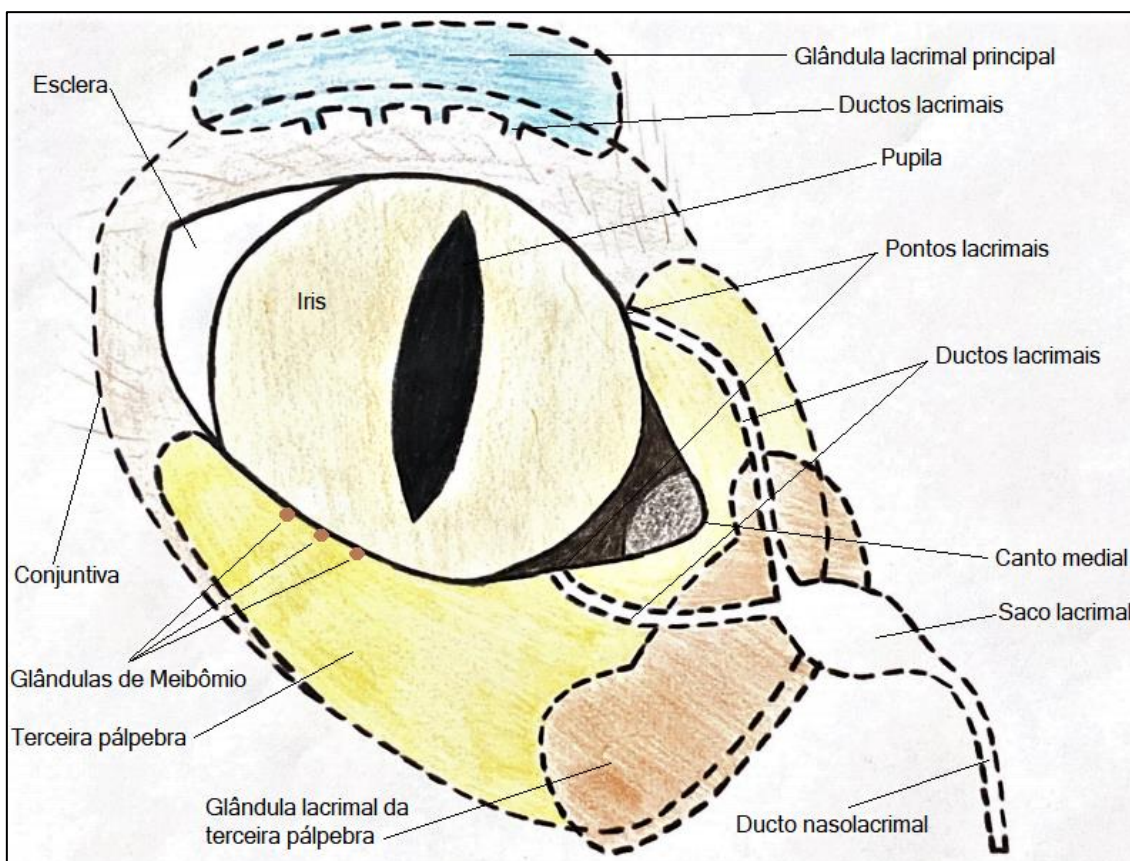


Figura 1. Anatomia do sistema lacrimal de felinos. Fonte: adaptado de McCracken et al. (2008).

4.2 Fluido lacrimal

O FL é um fluido complexo viscoso e único, composto por milhares de moléculas com diferentes estruturas e funções, montadas sobre a superfície hidrofóbica do

epitélio corneal. Fazem parte deste fluido lipídeos, mucinas, enzimas, carboidratos, metabólitos, eletrólitos e proteínas (VAN HAERINGEN, 1981; WU; ZHANG, 2007). As proteínas são uma das principais classes de compostos presentes no FL, mais de 1500 (mil e quinhentas) já foram descritas em amostras de seres humanos através de análise proteômica, sendo as mais abundantes: lisozima, lactoferrina, lipocalina, IgA, albumina, transferrina e IgG (ZHOU et al., 2012).

Três camadas distintas compõem o FL, sendo a mais externa a lipídica, a intermediária aquosa e a mais interna a mucosa (MOORE et al, 1987; DAVIDSON; KUONEN, 2004). Estruturas mais externas do olho, como a córnea e a conjuntiva, são protegidas pela presença deste filme e, portanto, ele pode ser considerado a primeira defesa do sistema ocular (CHOY et al., 2001). As funções mais importantes do FL são: manutenção da superfície lisa para proporcionar a refração da luz, lubrificação das pálpebras, conjuntiva e córnea, fornecimento de nutrientes para córnea com remoção de metabólitos, fornecimento de células de defesa para córnea e conjuntiva, bem como remoção de corpos estranhos e defesa da superfície ocular de patógenos através de substâncias antibacterianas específicas e não específicas (LEMP; BLACKMAN, 1981; LEMBACH et al., 2001; KOCH; SYKES, 2002; CRISPIN, 2002; ZHOU et al., 2007; SLATTER, 2008; COLITZ, 2008; PICCIONE, 2009; GELATT et al., 2013).

Portanto, modificações na composição e estrutura do FL podem incitar injúrias diretas sobre a SO. Assim, para que isso não ocorra, ele deve ser o mais estável e saudável possível, assegurando a homeostase ocular e consequente manutenção tanto da qualidade óptica quanto da saúde ocular dos indivíduos (TSUBOTA, TSENG 2001; SLATTER, 2008).

4.2.1 Camada lipídica

A camada lipídica possui aproximadamente 1 μm de espessura, é secretada pelas glândulas de meibômio localizadas na conjuntiva, composta por uma combinação de lipídeos anfipáticos (FOULKES, 2013; GELATT et al., 2013). Ela é basicamente constituída por colesterol, triglicerídeos e fosfolipídios, sendo esta última fração sua porção polar que mantém contato com a camada aquosa do FL e a apolar com o ar (DAVIDSON; KUONEN, 2004; SLATTER, 2008;

COLITZ, 2008). Dessa forma, a camada lipídica promove aderência do FL às margens das pálpebras inferior e superior através da sua única camada elástica que cobre a fase aquosa. A camada lipídica impede o transbordamento do FL devido à sua alta tensão superficial, e, além disso reduz a evaporação da camada aquosa, aumenta o tempo de quebra do filme lacrimal e a sua osmolaridade. A redução na liberação do componente lipídico desestabiliza o FL e gera aumento na sua evaporação, contribuindo para o surgimento de patologias oftálmicas importantes, como defeitos epiteliais crônicos. (DAVIDSON; KUONEN, 2004; COLITZ, 2008).

4.2.2 Camada aquosa

A camada aquosa promove a lubrificação e nutrição da córnea, que é uma estrutura avascular do sistema ocular, além de também lubrificar a conjuntiva e a membrana nictitante, facilitando a passagem das pálpebras e membrana nictitante sobre a córnea durante o movimento de piscar. Possui ainda a função de proteção, pois remove material estranho, metabólitos provenientes da córnea e debris celulares (MOORE, 1999). É secretada na glândula lacrimal principal, em maior parte, e na glândula superficial da terceira pálpebra (OHASHI et al., 2006). É a camada mais espessa do FL, com aproximadamente 7 μm , que corresponde a 60% da espessura total, e é composta de 98% de água e 2% de sólidos, em sua maioria proteínas (GELATT et al., 2013). Os componentes essenciais contidos na porção aquosa para nutrição da córnea são sais inorgânicos, oxigênio, glicose, ureia, mucinas solúveis e proteínas. A concentração média de proteínas em cães na camada aquosa é de 3,5 a 6,2 mg/ml, sendo, principalmente, globulinas (93%), principalmente de imunoglobulinas A e G, albumina (4%), lisozimas (3%) e lactoferrinas (GELATT et al., 2013).

As mucinas solúveis são responsáveis por diminuir a tensão superficial e melhorar a consistência da camada aquosa, contribuindo assim, para a viscosidade do FL (MOORE, 1999; DAVIDSON et al, 2004; SLATTER, 2008; COLITZ, 2008; PICCIONE, 2009; GELATT et al., 2013).

4.2.3 Camada mucosa

A camada mais interna do FL é a mucosa, com espessura aproximadamente de 0,02 – 0,05 μm , composta por mucinas. Sua função

específica é ancorar a porção aquosa do FL ao epitélio corneano e impedir a adesão de corpos estranhos, células inflamatórias ou agentes patogênicos. Juntamente às outras duas camadas, auxilia na manutenção da superfície ocular lisa e lubrifica a córnea e conjuntiva. Esta camada é secretada pelas células caliciformes da conjuntiva e sua secreção é feita por estímulos sensoriais simpáticos e parassimpáticos na córnea e conjuntiva (MCKENZIE et al., 2000; SLATTER, 2008; COLITZ, 2008; GELATT et al., 2013; MANTELLI, 2013).

A mucina é um grupo de glicoproteínas de diferentes formas moleculares que apresentam como particularidade a presença de um polo hidrofílico em contato com a fase aquosa e um polo hidrofóbico em contato com o epitélio corneano hidrofóbico, funcionando como um meio de ligação entre eles (GRAHN; STOREY, 2004). Sua propriedade viscoelástica à camada mucosa do FL secretado pelas glândulas é o que oferece proteção a agressões externas e lubrificação ao órgão/estrutura onde se situam. Pelo menos quatro subtipos de mucinas secretadas em forma de gel (MUC5AC, MUC7, MUC2 e MUC19) e quatro tipos de mucinas associadas à membrana (MUC1, MUC4, MUC16 e MUC20) são expressas na superfície ocular (INATOMI et al., 1996; PFLUGFELDER et al., 2000; ARGUESO et al., 2003; YU et al., 2008; WOODWARD; ARGUESO, 2014). Estas glicoproteínas possuem peso molecular entre 20 a 40 kDa e são complexos caracterizados pela presença de hexosamina, hexose e ácido siálico. Por conta disso, desempenham um papel importante na lubrificação da superfície ocular pois tornam o epitélio corneano hidrofóbico mais hidrofílico, o que permite o espalhamento do FL e sua estabilização (VAN HAERINGEN, 1981; GELATT et al., 2013).

A deficiência na produção de mucina leva à perda de sua função protetora e lubrificante e à quebra rápida do FL sobre a córnea. O FL, ao perder sua estabilidade por não haver a quantidade de mucina ideal, promove o ressecamento da córnea, condição na qual podem surgir sinais clínicos de conjuntivites, úlcera de córnea, úlcera indolente, ceratite pigmentar, sequestro corneado e síndrome do olho seco nos indivíduos (MOORE, 1999; GRAHN; STOREY, 2004).

4.3 Dinâmica do FL

O FL é totalmente renovado em poucos minutos. Em cães, a secreção basal é de 0,5 a 1,0 µl/min, porém esta produção pode variar ligeiramente num mesmo indivíduo ao longo do dia (BERGER; KING, 1998). A qualidade do FL não depende apenas da produção normal das diversas frações acima mencionadas, como também da sua distribuição pela superfície ocular. O FL deve ser continuamente espalhado sobre o epitélio corneano pela ação constante das pálpebras e da membrana nictitante durante a piscada. O excesso de líquido se acumula no fórnix conjuntival inferior por gravidade e é drenado pelos ductos lacrimais e nasolacrimais, outra parte é eliminada por evaporação (SLATTER, 2008; GELATT et al., 2013).

4.4 Avaliação da superfície lacrimal

A avaliação da superfície ocular está diretamente envolvida no diagnóstico e na terapêutica de diversas afecções sediadas nesta região. Dentre os testes mais utilizados, estão: o Teste Lacrimal de Schirmer (TLS), o tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL) e a coloração da superfície ocular com rosa bengala, lissamina verde e fluoresceína sódica. Os testes de coloração têm por objetivo evidenciar regiões desprovidas da cobertura do FL, indicando instabilidade dele (HAMRAH et al., 2011; GELATT et al., 2013). A fluoresceína é hidrossolúvel e, portanto, ela penetra o estroma hidrofílico da córnea quando presente lesão, evidenciado a injúria pela coloração verde brilhante (BARABINO et al., 2004). O rosa bengala liga-se às células epiteliais desprovidas de determinadas proteínas (notadamente mucina), corando, portanto, células desvitalizadas e necróticas, além de muco. Entretanto, vem deixando de ser utilizado na rotina devido à sua alta toxicidade epitelial e intenso desconforto após instilação. A lissamina verde age de forma similar ao rosa bengala, mas cora apenas a membrana danificada das células e não as células epiteliais saudáveis. Além disso, não é tóxica e os indivíduos toleram bem a sua aplicação (BARABINO et al., 2004; OLLIVIER et al., 2007).

O TRFL, por sua vez, é uma avaliação qualitativa posterior à instilação do corante de fluoresceína, que é visibilizada por meio de um exame com lâmpada de fenda e luz de cobalto, ao detectar o aparecimento dos primeiros pontos enegrecidos no epitélio corneano, que indicam instabilidade do FL (PENG et

al.,2013). Entretanto há vieses que comprometem o resultado do TRFL, como: quantidade de colírio corante instilado, marcação do início da contagem do tempo e duração do exame (SAITO; KOTANI, 2001).

O teste considerado padrão na rotina oftálmica é o TLS, que foi desenvolvido por Schirmer em 1903 e que, a partir de 1991 com o uso de tiras de papel Whatman 41 (Figura 2) para padronizar o procedimento, passou a ser amplamente utilizado (BARABINO et al., 2004). O teste promove a exploração quantitativa da produção da fase aquosa do FL, através do uso de uma tira de papel filtro medindo (0,5 x 5,0 cm) graduada de 5,0 em 5,0 mm. Para a realização do teste insere-se a ponta da tira no fórnix conjuntival inferior e observa-se a marcação da lágrima no período de 60 segundos (GELATT et al., 2013).

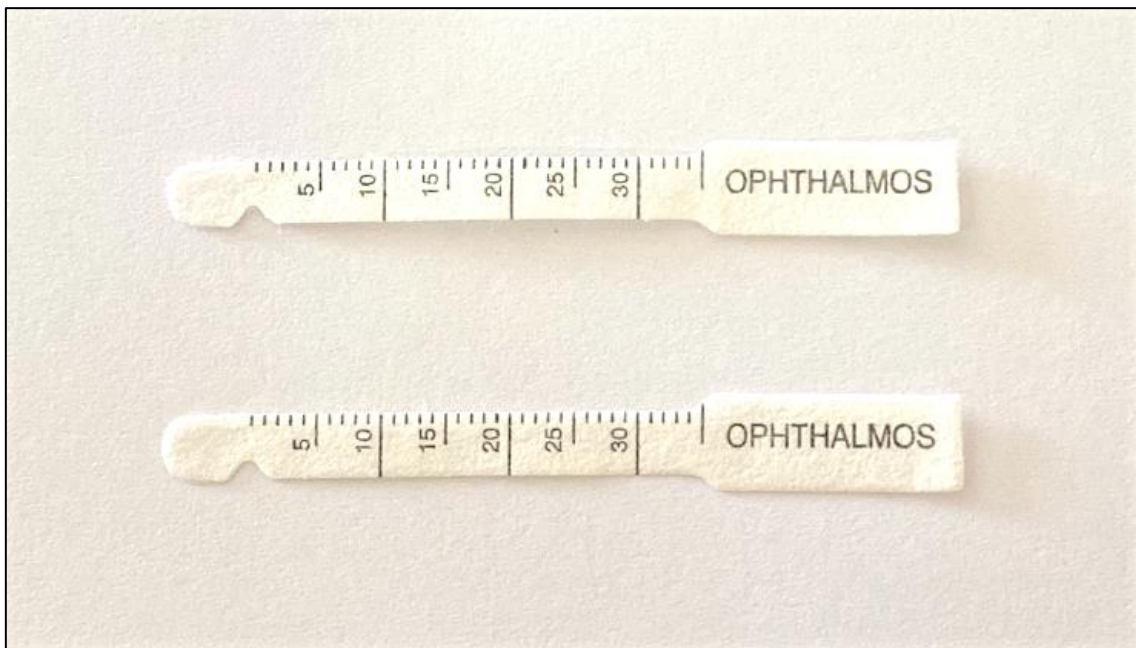


Figura 2. Par de fita de papel Whatman 41 milimetrada, utilizada para realizar teste lacrimal de Schirmer (TLS). Fonte: arquivo pessoal.

Existem dois tipos de TLS, o 1 e o 2, sendo a diferença entre eles que o TLS-2 é realizado após instilação tópica de colírio anestésico e secagem do fórnix conjuntival, medindo assim a produção lacrimal basal. Ambos testes têm seus resultados apresentados em milímetros por minuto (mm/min) (PICCIONE et. al., 2009). Para felinos, valores entre 9 e 34 mm/min podem ser considerados dentro da faixa de normalidade (SEBBAG et al., 2015).

Outros exames menos usuais na prática clínica para avaliação de superfície ocular também estão disponíveis, como a citologia conjuntival de

impressão, biópsia conjuntival, análise do perfil proteico do FL, mensuração da osmolaridade da lágrima e o teste de cristalização lacrimal (TCL) (ROLANDO et al., 1984; BARABINO et al., 2004; FELBERG et al., 2008; GELATT et al., 2013; MASMALI et al., 2014).

O princípio do TCL é de que a lágrima quando seca apresenta cristalização de alguns de seus componentes, que assumem formatos variados, lembrando “folhas de samambaia” (figura 3). Portanto, é uma forma qualitativa e ao mesmo tempo subjetiva de avaliar a formação de cristais a partir da evaporação de amostras lacrimais, o que indicaria a osmolaridade indireta do FL. Entretanto, é um teste que foi padronizado apenas para amostras de seres humanos (ROLANDO et al., 1984; MASMALI et al., 2014) e vem sendo estudado e estabelecido para avaliação em cães (ORIA et al., 2017), equinos (SILVA et al., 2016), camelos (MASMALI et al., 2018) e macacos (RAPOSO et al., 2018). Não há estudos quanto à realização do TCL em felinos.

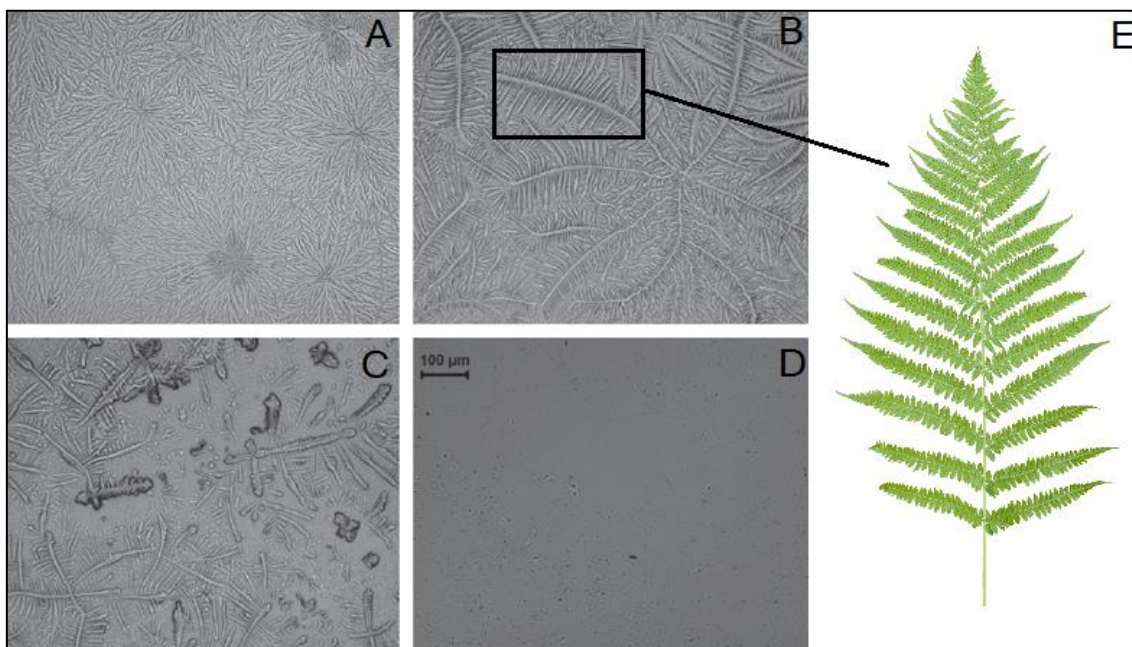


Figura 3. Imagens de exemplos de amostras de FL segundo a escala de Rolando (A: Tipo I; B: Tipo II; C: Tipo III; e D: Tipo IV) e em paralelo comparando com a aparência de folha de samambaia que os cristais podem assumir (E). Fonte: Adaptado de Rolando (1984).

Rolando (1984) classificou os achados do TCL de seres humanos em quatro grupos distintos (tipos I, II, III e IV) de acordo com a presença e exuberância destas folhas (Tabela 1), e, posteriormente, outra escala foi proposta por Masmali et al. (2014) com o objetivo de melhorar algumas brechas nas classificações anteriores, sendo, portanto, classificadas nos graus 0, 1, 2, 3

e 4 (Tabela 1). Na prática clínica, em humanos, os tipos I e II e os graus 0 e 1 são classificações de cristais lacrimais de amostras que podem ser consideradas normais, enquanto a partir dessas graduações o FL perde sua qualidade e já pode ser considerado deficiente, indicando síndrome do olho seco (ROLANDO et al., 1984; MASMALI et al., 2014).

Tabela 1 - Critérios adotados para a avaliação e classificação dos padrões de cristalização da lágrima segundo Rolando (1984) e Masmali (2014).

CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO DE CRISTALIZAÇÃO DA LÁGRIMA	
ROLANDO (1984)	MASMALI et al. (2014)
Tipo I - Cristalização da lágrima origina árvores de cristais multiramificados, sem espaços vazios entre as arborificações.	Grau 0 - O fenômeno de cristalização é cheio, sem espaços ou lacunas entre as samambaias.
Tipo II - Os ramos são mais curtos e as arborificações são menores, com a aparição de espaços entre elas.	Grau 1 - A densidade dos ramos da samambaia diminui com o aparecimento de pequenos espaços e lacunas entre os galhos.
Tipo III - Os espaços entre as arborificações são amplos e as ramificações são raras, com presença de cristais grosseiros.	Grau 2 - Os ramos da samambaia são reduzidos e podem se tornar grossos e grandes, com a presença de espaços claros e lacunas.
Tipo IV - É caracterizado por grumos de cristais que raramente formam pequenas arborificações, ou ausência total de cristalização.	Grau 3 - Os espaços e as lacunas estão aumentados e bem visíveis no grau 3 sem formação de samambaias, mas com a presença de grandes cristais.
	Grau 4 - O fenômeno da cristalização neste padrão está totalmente ausente.

4.5 Análise proteômica do FL

Os componentes do FL refletem quantitativa e qualitativamente a saúde da superfície ocular, portanto, são úteis para avaliação nas condições de saúde e doença, bem como de algumas condições sistêmicas. As lágrimas têm sido usadas como fonte de biomarcadores de doenças oftálmicas e sistêmicas, isso torna o FL uma fonte valiosa para análise objetiva de sua composição em condições fisiológicas e patológicas da superfície ocular (ZHOU et al., 2003; ZHOU et al., 2007; ZHOU et al., 2012). A esse respeito, sugere-se que a composição química do FL em felinos é provavelmente menos complexa em comparação com o plasma e a urina, entretanto quantas e quais as proteínas podem conter ainda não está elucidado.

O proteoma é o conjunto de proteínas e isoformas expressas por algum tecido em decorrência de um estímulo e, nesse contexto, a análise proteômica se tornou uma ferramenta importante na medicina, biomedicina e nas pesquisas em veterinária (FREITAS CAMPOS et al., 2008; BANACH et al., 2013; ADASZEK et al., 2014). As proteínas são moléculas com as mais distintas funções celulares, sendo capazes de orquestrar expressão de genes, catalisar reações metabólicas, além de compor a parte estrutural da célula. Modificações genéticas que promovam a ausência de algumas proteínas ou defeitos em sua estrutura, afetando sua função, podem acarretar doenças ou ser marcadores destas (ARN et al., 2014). Os estudos moleculares da composição do FL são fonte de informação empregadas na identificação de proteínas utilizadas como biomarcadores para diagnóstico precoce de diversas condições patológicas, prognóstico, desenvolvimento de novos fármacos para tratamento, bem como para elucidar a fisiologia de sistemas e fisiopatologia de alterações (ZHAO et al., 2010; KATSAFADOU et al., 2016).

Alterações na expressão de proteínas do FL foram descritas em alguns estudos com seres humanos quando em condições patológicas locais e sistêmicas (HOHENSTEINBLAU et al., 2013, HAGAN et al., 2016). Kuo et al. (2019) conseguiram comprovar, através da proteômica de amostras lacrimais, que pacientes humanos com síndrome do olho seco, mesmo em tratamento considerado eficaz, possuem perfil de expressão de proteínas diferentes de FL de indivíduos sem a síndrome. Além disso, com esta metodologia também foi possível identificar um pequeno subgrupo de proteínas no FL que são afetadas no processo de envelhecimento de humanos, muitas inclusive estando relacionadas com inflamação (NÄTTINEN et al., 2019). A proteômica também tem demonstrado que o FL é uma importante fonte de potenciais biomarcadores para doenças como alzheimer (KALLO et al., 2016; KENNY et al., 2019) e esclerose múltipla, inclusive sendo sugerido seu uso para teste de triagem antes de avançar para técnicas diagnósticas mais invasivas (SALVISBERG et al., 2014). Na medicina veterinária, ainda carece de estudos no tema.

O FL quando comparado a outro tipo de amostra, exemplo sangue e urina, é considerado mais puro e, portanto, uma amostra ideal para diagnóstico rápido (LI et al., 2005). Alguns estudos avaliaram o FL de animais, especialmente de cães, pois se tem um interesse particular nesta espécie devido à proximidade

com os seres humanos, uma vez que vivem sob as mesmas condições e frequentemente sofrem de doenças com etiopatogenia semelhante (SHAMSI et al., 2011; ZHOU; BEUERMAN, 2012). Outra grande vantagem de se investigar esse tipo de amostra é que as lágrimas estão próximas do local de doença (por exemplo no caso de doenças em superfície ocular, glândulas lacrimais, conjuntiva e pálpebras) quando comparada com a detecção de biomarcadores de câncer no sangue, onde as moléculas são altamente diluídas na circulação (ZHOU; BEUERMAN, 2017).

O método de coleta da amostra lacrimal influencia na proporção e quantidade de proteínas, sendo que dois métodos rotineiramente utilizados para obtenção do FL tem sido o TLS-1 e o tubo de microcapilar de vidro (ZHOU et al., 2012, FARIAS et al., 2013; POSA et al., 2013). Ao testarem estas duas formas de coleta em amostras de cães e gatos, Farias e colaboradores (2013) concluíram que a média da concentração proteica pelo método de Bradford das amostras obtidas através das tiras do Schirmer foi superior à obtida com o tubo microcapilar. Uma terceira técnica de coleta, as esponjas cirúrgicas, foi testada em gatos por Sebbag e colaboradores (2018) e comparada com as tiras de Schirmer. Porém, apesar da concentração de proteína ter sido maior com as esponjas do que com o Schirmer, houve grande variação no volume coletado, por vezes não atingindo a quantidade facilmente coletada através da fita de Schirmer.

Uma grande proporção das análises iniciais das proteínas do FL dependem do uso de diferentes métodos eletroforético e cromatográficos, seguidos de *Western Blotting* ou ensaio imunoenzimático (ELISA) (JANSSEN et al., 1981; KIJLSTRA et al., 1989; GORG et al., 2004). Esses métodos, no entanto, permitem apenas a análise de um número limitado de proteínas, deixando a caracterização do perfil global de proteínas lacrimais para ser mais bem explorado através da eletroforese bidimensional (2-DE) em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (GRUS et al., 2001; HERBER et al., 2002; GORG et al., 2004; ACERA et al., 2011; AZKARGORTA et al., 2016).

O desenvolvimento desta tecnologia exploratória de separação de proteínas de amostras complexas permitiu o progresso na caracterização global do proteoma lacrimal. O 2-DE foi estabelecido nos anos 90 como uma técnica poderosa para separação de proteínas e posterior análise proteômica,

especialmente aplicável para análise exploratória ou comparações quantitativas (JOO et al., 2003; SORIA et al., 2013; LI et al., 2014; AZKARGORTA et al., 2016). Esta técnica consiste na aplicação de um campo elétrico para separação destas macromoléculas, primeiramente de acordo com o ponto isoelétrico (PI) e, posteriormente, por volume molecular (GORG et al., 2004).

Associados a estes, métodos de separação e quantificação de amostras complexas por cromatografia e espectrometria de massa (EM) foram desenvolvidos e aplicados (LI et al., 2005). A EM é capaz de determinar a relação entre massa e carga (m/z) de analitos ionizados em fase gasosa, melhorando a obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade (EL-ANEED et al., 2009). Já a cromatografia é um processo físico de separação, no qual os componentes são separados e distribuídos em uma fase estacionária e uma fase móvel, garantindo alta seletividade e eficiência de separação (KITSON et al., 1996; CATHERMAN et al., 2014)). Várias técnicas cromatográficas, como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com exclusão por tamanho, HPLC de fase reversa e HPLC de troca iônica foram usadas para isolamento e análise de proteínas lacrimais (LI et al., 2005; ZHOU et al., 2006; CHEN et al., 2011). O acoplamento de um cromatógrafo com o EM combina as vantagens de ambas técnicas (ARDREY, 2003).

O desenvolvimento destas técnicas coincidiu com o grande volume de informações fornecidas pelos primeiros estudos de sequenciamento genômico. Esse progresso provocou um aumento exponencial nas capacidades analíticas das abordagens proteômica, e, naturalmente, intensificou a análise do FL (AZKARGORTA et al., 2016). Vários estudos projetados para identificar maior número de proteínas lacrimais por EM foram realizados na última década, acelerando a identificação de novas proteínas (ZHOU et al., 2012).

A eletroforese se configura como uma etapa preliminar à EM, servindo inclusive como pré fracionamento da amostra analisada. Ao estudar o gel 2-DE SDS-PAGE obtido já é possível uma análise do conteúdo proteico expresso. As bandas (*spots*) identificadas são excisadas e após tratamento e extração, analisadas por EM. Para tratamento da amostra, a depender da metodologia escolhida, previamente à digestão enzimática das proteínas com a tripsina, é necessário fazer uma redução das pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína, sendo o reagente mais utilizado para isso o ditioneitol (DTT). Em

seguida, para evitar nova estruturação das pontes, realiza-se a alquilação dos enxofres com iodoacetamida (ZHANG et al., 2013).

O espectrômetro de massas é um instrumento constituído por uma fonte de ionização, um analisador de massas, um detector e um sistema para aquisição de dados (EMIDIO et al., 2015). As fontes de ionização empregadas em EM aplicada à análise proteômica são *Electrospray* (ESI) e a Ionização e Dessorção a Laser assistida por Matriz (MALDI), tendo a função de transformar macromoléculas em íons de forma a preservar a estrutura polipeptídica e transferir os analitos para a fase gasosa (TANAKA et al., 1988; FENN et al., 1989; AEBERSOLD; MANN, 2003).

O analisador de massa é a parte do EM que tem como função básica separar os íons formados de acordo com suas relações m/z (EL-ANEED et al., 2009). Diversos modelos de analisadores de massas existem, seguindo três diferentes princípios básicos: 1) separação baseada no tempo de voo (TOF); 2) separação por campos elétricos gerados por hastes metálicas (Quadrupolo); 3) separação pela ejeção seletiva de íons de um campo de aprisionamento de íons tridimensional (ARDREY, 2003). Estes analisadores podem ser usados de maneira independente ou acoplados entre si, dando origem a equipamentos classificados como híbridos, os quais fazem uso das vantagens inerentes a cada analisador (CANTU et al., 2008).

Para sequenciamento dos peptídeos podem ser realizadas duas etapas do EM (EM/EM), em que uma delas é usada para isolar o íon de interesse e a outra é usada para estabelecer uma relação entre este íon de interesse isolado e outros íons que foram gerados a partir da sua decomposição induzida (MCLAFFERTY, 1981; AQUINO NETO et al., 2003). Com os espectros gerados ao final do processo de EM é feita a reconstrução do peptídeo fragmentado através de softwares de bioinformática aplicados à proteômica, gerando os dados com as prováveis proteínas contidas na amostra e o grau de confiança de acordo com o número de peptídeos identificados na sequência (HEIN et al., 2013; ZHANG et al., 2013).

As proteínas mais predominantes do FL de humanos, já descritas, são: lisozima, lactoferrina, lipocalina, lacritina, albumina e imunoglobulinas. Representam em torno de 90% da composição proteica total (ZHOU; BEUERMAN, 2012). Várias proteínas de alta abundância foram relatadas no FL

de animais. A lisozima foi descrita como presente em amostras de ovelhas, cabras, lhamas, bovinos, cavalos, cães e coelhos (GIONFRIDDO et al., 2000a; PINARD et al., 2003). Lipocalinas lacrimais homólogas foram detectadas em ratos, porcos, cães, hamsters e coelhos (REDL, 2000; AZZAROLO et al., 2004). Lipofilinas foram relatadas apenas em lágrimas de seres humanos e coelhos (AZZAROLO et al., 2004). Lactoferrina, IgA, transferrina, ceruloplasmina, 1-antitripsina, 1-amilase, 2-macroglobulina e proteases foram descritas no FL de lhamas e bovinos (GIONFRIDDO et al., 2000b).

Apesar dos estudos acima relatados, a análise proteômica de FL de animais ainda é pouco explorada (SHAMASI et al., 2011), pois as pesquisas, em sua maioria, têm como objetivo principal compreender as alterações que ocorrem em humanos. O elevado valor para se ter os equipamentos necessários para realizar análises proteômicas é fator importante limitante. Além disso, nenhum trabalho acerca do proteoma do FL de felinos domésticos foi publicado até o momento. Dessa forma, estudos a esse respeito se fazem necessários para o melhor entendimento do FL em gatos domésticos, auxiliando, assim, futuras pesquisas a respeito de afecções oculares e sistêmicas em felinos e modalidades de tratamento para essas.

5 CAPÍTULO I

TESTE DA CRISTALIZAÇÃO LACRIMAL EM FELINOS

Este capítulo será apresentado em formato de artigo científico que foi submetido ao periódico internacional *Acta Veterinaria Scandinavica* (AVS), ISSN: 1751-0147, de Qualis Capes B1 no Quadriênio 2013 – 2016, fator de impacto 1.509 e é um periódico da *Springer Nature*. As normas da revista se encontram no Anexo A.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Padronizar e descrever a técnica do TCL em felinos domésticos hígidos;
- II. Avaliar o padrão de formação dos cristais;
- III. Verificar o enquadramento e reprodutibilidade do TLC das amostras de felinos com as escalas propostas por Rolando (1984) e Masmali e colaboradores (2014).

1 5.2 Artigo Científico

2 The use of tear ferning test in cats for evaluation of ocular surface

3 Jéssica Fontes Veloso^{1*}, Arianne Pontes Oriá², Ana Cláudia Santos Raposo², Ariane
4 Jesus Lacerda², Cláudia Vital Borges Silva³, Larissa Ferreira Lima³, Renata Santiago
5 Alberto Carlos³

6 ¹ Department of Veterinary Medicine, Federal University of Western Bahia, Barra, BA,
7 Brazil. ² School of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Bahia,
8 Salvador, BA, Brazil. ³ Department of Agrarian and Environmental Sciences, Santa Cruz
9 State University, Ilheus, BA, Brazil.

10 *Corresponding author:

11 Jéssica F Veloso – jessica.veloso@ufob.edu.br

12 Abstract

13 **Background:** The tear film is a trilaminar fluid composed mainly of lipids, electrolytes,
14 proteins and water. It is responsible for lubrication, nutrition and protection against
15 microbial and toxic agents. Disruption of any these components may weaken the ocular
16 surface, making it more susceptible to disease. Increasing evidence suggests that
17 qualitative tear film deficiencies are an important predisposing factor or cause of some of
18 the most common and challenging ocular diseases in cats, including conjunctivitis,
19 corneal ulcer, spontaneous chronic corneal epithelial defects (SCCED), pigmentary
20 keratitis, corneal sequestrum and dry eye syndrome. The aim of this study was to describe
21 the tear ferning test in healthy cats and to compare the results by using two grading scales
22 for humans. Tear samples were collected using Schirmer tear test (STT) strips from 60
23 healthy cats, and, after centrifuging the strips to obtain the samples, the aliquot was placed
24 on clean microscope glass until it dried and the tear ferning patterns were observed under

25 a polarized light microscope and classified according to the Rolando and Masmali grading
26 scales.

27 **Results:** Ferning patterns in the lower grades showed full crystallization with high
28 density, without gaps between the ferns and branches, forming several nuclei that were
29 easily distinguished. According to the Rolando scale, 50% (60/120), 46.6% (56/120) and
30 3.4% (4/120) of eyes showed type I, II and III patterns, respectively. According to the
31 Masmali scale, 15% (18/120), 56.6% (68/120 eyes) and 28.4% (34/120) of eyes showed
32 grade 0, 1 and 2 patterns, respectively. No difference was observed between the right and
33 left eyes for both Rolando ($P=0.225$) and Masmali ($P=0.683$) scales.

34 **Conclusions:** The tear ferning test is a qualitative test that can be used in cats as a
35 complementary evaluation of the ocular surface. While the Rolando scale showed an
36 increased prevalence of types I and II, the Masmali scale showed an increased prevalence
37 of grades 1 and 2. This can be attributed to the species-specific differences between
38 human and feline tear film. So Masmali grade 2 can be considered a normal tear pattern
39 for the species, because all the cats used in study were clinically healthy. For this reason,
40 future complementary studies are necessary for comparing healthy eyes and eyes with
41 different ocular surface disease in cats. Both scales can be feasible options for grading
42 tear crystallization in cats, but as Rolando scale included 96.6% of the samples in the 2
43 types that are considered normal for humans, we think that this scale seemed to be more
44 precise to classify crystallization pattern in cats. The crystallization patterns observed in
45 this study can form the basis for standardizing ocular surface parameters in cats.

46 **Keywords:** Ferning pattern; Ocular surface disease; Tear film; Qualitative test.

47 **Background**

48 Tear film (TF) is a viscous and complex trilaminar fluid composed mainly of lipids,
49 electrolytes, proteins and water [1]. Normal TF dynamics require adequate tear

50 production, tear retention on the ocular surface and balanced tear drainage. The TF is
51 responsible for lubrication, nutrition and protection against microbial and toxic agents
52 [2]. Disruption of TF dynamics can lead to dry eye or the ocular surface can become more
53 susceptible to the onset of diseases [3–5].

54 Different tools can be used to evaluate the ocular surface [6]. Schirmer tear test-1
55 (STT-1) is considered the gold standard method for measuring tear production; however,
56 it does not measure tear quality [7]. The tear ferning test (TFT) is a qualitative test
57 developed for humans, and it has become a useful diagnostic tool in tear ferning research.
58 Various ferning patterns can be observed as a result of tear crystallization after
59 evaporation of lacrimal samples, and these patterns depend mostly on TF composition
60 [8]. In addition, tear crystallization may be affected by humidity and temperature [9,10].
61 Therefore, changes in ferning patterns are believed to reflect possible changes in both
62 composition and stability of the TF [10].

63 In humans, Rolando suggested the first grading scale for the TFT, wherein types I and
64 II indicated normal TFs, while types III and IV indicated abnormal TFs [9]. Thereafter,
65 Masmali developed a TFT grading scale for humans, with the aim of addressing the gaps
66 in previous classification systems. According to this scale, TFs with grades 0 and 1 were
67 considered normal, while those with grades 2, 3 and 4 were considered abnormal [10].

68 In addition to humans [6,10,11], the Rolando and Masmali grading scales have been
69 applied in horses [12], dogs [13,14], camels [11] and capuchin monkeys [15]. Although
70 no record in the veterinary medicine literature documents the use of a grading scale
71 specifically for animals, previous studies have successfully used the human grading scales
72 in some animal species, thus showing that the TFT is a feasible and complementary test
73 that is simple and inexpensive for ocular surface assessment [12,13].

74 Increasing evidence suggests that qualitative TF deficiencies are an important cofactor
75 or cause of some of the most common and challenging ocular diseases in cats, including
76 conjunctivitis, corneal ulcer, spontaneous chronic corneal epithelial defects (SCCED),
77 pigmentary keratitis, corneal sequestrum and dry eye syndrome [16–21]. Despite this, the
78 TFT has not yet been performed in cats, even though it is already considered a
79 complementary diagnostic tool in ocular surface research. Therefore, this lack of applied
80 research on tear ferning in cats justifies an investigation of the application of the two TFT
81 grading scales in healthy cats to understand the potential role of tear deficiency and the
82 value of tear testing in cats.

83 **Methods**

84 *Animals*

85 The study included 60 mixed breed cats (120 eyes). 33 of them were females (55.0%)
86 and 27 were males (45.0%), aged between 1 and 8 years (mean 2.5 ± 1.86 years), with no
87 complaint of illness. Additionally, they had to be vaccinated, without systemic or ocular
88 signs of disease, without any history of ocular secretion or injury and with STT-1 values
89 within the normal range for the species. The animals also had normal, complete blood
90 counts and biochemical test results, including those for urea, creatinine, alanine
91 aminotransferase and alkaline phosphatase. Moreover, all animals tested negative for
92 feline coronavirus, feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus.

93 Before data collection, the STT-1 (Schirmer Tear Test; Ophthalmos) was performed
94 and used as a screening method to measure tear production. The median value and
95 interquartile range (median \pm S-IQR) was 20 ± 7 mm/min, and the 95%-confidence
96 intervals (CI) was between 18.4 and 19.8 mm/min.

97 Evaluations of the ocular adnexa and anterior segment were performed using a slit-
98 lamp biomicroscope (Vision Class II BL IIIB/YZ30T; Ramos Mejia). Intraocular

99 pressure (IOP) was measured using a rebound tonometer (Icare tonometer; Icare Finland
100 Oy); For IOP the median \pm S-IQR value was 22 ± 6 mmHg, and the CI was between 22.3
101 and 24.1 mmHg. The ocular surface was evaluated using fluorescein dyes (Fluorescein
102 test; Ophthalmos), TF breakup time (TFBT) (range 5–9 s) and lissamine green (Lissamine
103 green test; Ophthalmos). The IOP, fluorescein, TFBT and lissamine green tests were
104 performed after tear sampling to avoid any interference with tear crystallization. All data
105 were collected in a room in which the temperature and humidity were controlled.

106 This study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the
107 Use of Animals from the State University of Santa Cruz (protocol no. 003/17). All
108 procedures were conducted in accordance with the Association for Research in Vision
109 and Ophthalmology's (ARVO) Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and
110 Vision Research and NIH statement.

111 ***Sample collection and TFT***

112 Tear samples were collected between 8:00 a.m. and 11:30 a.m., first from the right eye
113 and then the left eye. Once the tear wetted 30 mm on the Schirmer strips, which were the
114 same ones used for STT-1, the strips were immediately placed in a 0.5 ml microtube
115 (Protein LoBind Tubes; Eppendorf) and conditioned in a thermal box until centrifugation.
116 Immediately before centrifugation, the bottom of the 0.5 ml microtube was punctured and
117 it was inserted into a larger 2.0 ml microcentrifuge tube (Protein LoBind Tubes;
118 Eppendorf) for extracting the tear fluid as previously described by Oria et al.¹³ The tear
119 fluid was obtained through centrifugation (25.830 g for 10 min at 4 °C) of the Schirmer
120 strips (Schirmer Tear Test; Ophthalmos).

121 During sample collection and processing, the temperature and humidity ranged from
122 20.9 to 27.1 °C and 42% to 62%, respectively. A teardrop of approximately 2 μ l was
123 deposited on a glass slide, at the center of a circle made previously and the tear ferning

124 time (ie, from tear deposition until drying) was measured using a digital timer. After
125 complete drying, the slides were evaluated under a 10x magnification polarized light
126 microscope with a camera (Microscope Scope A.1/AX10 Axion Cam ICc5; Zeiss). The
127 acquired images were classified and the formation of branches, angulations and zones of
128 transitions were evaluated according to the proposed scales of Rolando et al and Masmali
129 et al [9,10].

130 The images of the ferning patterns were classified by three separate masked
131 evaluators', A, B and C, from the Veterinary Ophthalmology Research Group of the
132 School of Veterinary Medicine and Zootechny of Federal University of Bahia. All the
133 evaluators had knowledge of and expertise in the use of the scales. The final grading was
134 assigned on the basis of agreement between the classifications of at least two of the three
135 evaluators. Tear ferning patterns were classified according to the Rolando grading scale
136 (types I, II, III and IV) and according to the Masmali grading scale (grades 0, 1, 2, 3 and
137 4).

138 *Statistical analysis*

139 Statistical analysis was conducted using IBM SPSS Statistics for Windows, Version
140 22.0 (IBM Corp.), and the R Software for Windows, Version 3.6.1 with package irr was
141 used for Cohen's kappa coefficient (k). The level of significance was set at 5% ($P < 0.05$)
142 and CI at 95%. The Shapiro–Wilk test was used to test data normality of the TFT values.
143 Wilcoxon test was used for comparison of the same variables between eyes on each scale.
144 The Mann Whitney test was used to compare classification (both scales) with sex. Age
145 was correlated with the classifications obtained through the Spearman test. Cohen's kappa
146 coefficient was used to verify the agreement among the evaluators' in each scale.

147 **Results**

148 Crystallization occurred in the tear samples of all animals submitted to the test, with
 149 an average time of 14.6 ± 4.3 mins. The crystallization patterns that received lower grades
 150 showed full crystallization with high density, without gaps between the ferns and
 151 branches, forming several nuclei that were easily distinguished. The branches showed
 152 medium length and were thin, with well-defined primary and secondary ramifications. As
 153 the grade increased, the nuclei lost definition, gaps were observed between the branches
 154 and, sometimes, coarse crystals were formed. Nevertheless, crystallization was observed
 155 even in the higher grades.

156 As described in methodology, after the ferning, the images were classified by
 157 resemblance to Rolando scale (Figure 1a,b,c) and Masmali scale (Figure 1d,e,f). The
 158 results obtained for each grading scale are expressed in table 1.

159 **Table 1.** Grading results for Rolando scale and Masmali scale for tear ferning in healthy
 160 cats.

Scale	Classification	Results
Rolando	I	60 (50%)
	II	56 (46.6%)
	III	4 (3.4%)
	IV	0
		120 (100%)
Masmali	0	18 (15%)
	1	68 (56.6%)
	2	34 (28.4%)
	3	0
	4	0
	120 (100%)	

161 The obtained classifications did not show a normal distribution ($P < 0.001$). The
 162 Wilcoxon test revealed no difference between the right and left eyes for both Rolando

163 ($P=0.225$) and Masmali ($P=0.683$) scales. The median \pm S-IQR value for the Rolando
 164 scale was 2 ± 0.5 and the CI was between 1.47 and 1.77. For the Masmali scale, the
 165 median \pm S-IQR value was 1 ± 0.5 and the CI was between 1.0 and 1.62. No differences
 166 were found in relation to sex and there was no correlation between the scores obtained
 167 and the age of the study animals. The Kappa coefficient of agreement obtained for each
 168 pair of evaluators' for the Rolando and Masmali scales are presented in table 2. All
 169 concordances were significant ($P<0.05$), except for the comparison between evaluators'
 170 A and B for the Rolando scale. The evaluators' B and C had strong agreement in their
 171 classifications of both scales.

172 **Table 2.** Cohen's kappa agreement coefficient and P -value among the evaluators' (A, B
 173 and C) for tear crystallization of cats according to Rolando and Masmali scales.

Evaluator	Evaluator	Rolando scale		Masmali scale	
		k	P -value	k	P -value
A	B	0.038*	0.615•	0.141**	0.038
A	C	0.17**	0.018	0.199**	0.004
B	C	0.537***	<0.001	0.617****	0

174 *poor correlation; **slight correlation; ***moderate correlation; ****strong correlation;
 175 • $P>0.05$, therefore not significant.

176 Discussion

177 Qualitative test of the TF is of great importance in animals that are affected by ocular
 178 surface disease and is complementary to quantitative assessment of tear production, as
 179 the latter does not guarantee a TF of good quality [20]. In this study, we have shown that
 180 the TFT can be easily and safely performed in cats and has promising potential to be
 181 considered in the future as a valuable research tool in veterinary ophthalmology, as
 182 already reported by other authors [11–14]. Nevertheless, no other study to date has
 183 performed the TFT in cats.

184 STT strips were used to collect the tear samples for the TFT, because previous studies
185 have shown that these strips minimize conjunctival lesions that may modify the
186 crystallization pattern; moreover, studies recommend that the tear collection technique
187 used in cats should be minimally invasive [13,22]. Furthermore, this technique can be
188 used without necessitating further manipulation of the eye. The STT strip is made of soft,
189 absorbent and malleable paper, thereby minimizing reflex tearing or damage to the cornea
190 and adjacent structures during tear collection. In contrast, tear collection with capillary
191 microtube can lead to eye damage caused by voluntary and involuntary movements of
192 cats, as they were not sedated in this study [5,22,23]. This is especially important if more
193 than one test is performed during the same examination, as the manipulation of cats' eyes
194 can lead to exfoliation of conjunctival cells and/or release of TF components that are not
195 normally expressed. Therefore, STT-1 tear sample collection was performed before any
196 other clinical and ophthalmic tests [24].

197 In this study, the authors observed differences when comparing feline TF samples to
198 the descriptions of TF made for other species. The differences observed included
199 branching pattern density when compared to humans [6,10,11], dogs [13,14], capuchin
200 monkeys [15] and horses [12]; crystals arrangement when confronting with descriptions
201 of horses [12], capuchin monkeys [15] and dogs [13,14]; and nuclei visibility when
202 compared to all species previously mentioned [6,10–15] plus camels [11] . All these
203 pattern differences can be attributed to variations in tear composition [10], sampling
204 method [25], temperature and humidity [26].

205 Types I and II of the Rolando scale were observed in 96.6% of the evaluated animals,
206 and grades 0 and 1 of the Masmali scale were observed in 71.6%; these findings were
207 similar to those of previous studies on other animals and healthy humans [10–13,27].
208 However, the pattern with the second highest frequency the Masmali scale (28.4% in

209 grade 2) is considered unhealthy in humans [10]. Raposo et al. [15] attributed the high
210 frequency of Masmali grade 2 (72.7%) in lacrimal film of capuchin monkeys samples to
211 species-specific characteristics, since all the animals were also healthy. Under these
212 circumstances, the occurrence of grade 2 patterns in the cats evaluated in the present study
213 is likely to be a standard of normality for cats, since the animals were clinically healthy,
214 and no statistical difference was observed regarding gender or age.

215 Another explanation for the TF patterns observed in this study could be the osmolarity
216 of feline tears, which is higher than that of human tears. Electrolyte concentration has
217 already been reported as a cause of changes in crystallization patterns [14,20,28].
218 Although tear osmolarity was not assessed in this study, it could be a possible explanation
219 for the observed patterns, and hence, more research is warranted on this aspect.

220 The lack of strong agreement among evaluators' suggests that observation of crystal's
221 morphology details is observer-dependent and so indicates that this assessment requires
222 training and harmonization between different examiners. Therefore, the adoption of the
223 two scales aimed to minimize the subjectivity of the test in cat samples. A similar
224 observation has already been made in TFT studies for other species, such as dogs [13]
225 and capuchin monkeys [15], and as happened in these studies we suggest that the adoption
226 of a species-specific scale can be a way to enhance pattern classification. It is worth noting
227 that the TFT is described as a complementary test to other methods [9,10,20,25,26], and
228 will certainly contribute to better understanding of the ocular surface in all species.

229 Aqueous tear deficiency ("Dry Eye Syndrome") is seldom reported in cats [21], and
230 none of the cats in this study showed signs of ocular disease, including ocular surface
231 disease. Therefore, these findings suggest that Rolando types I and II and Masmali grades
232 0, 1 and 2 reflect normal TFT results in cats. While the results of most cats fell within
233 types I and II of Rolando scale the grades 1 and 2 of Masmali scale, this can be attributed

234 to the species-specific differences between human and feline tear film. Masmali grade 2
235 can be considered a normal tear pattern for the species, because cats studied were
236 clinically healthy. For this reason, future complementary studies are necessary in
237 comparing healthy eyes with different ocular surface disease in cats. Both scales can be
238 feasible options for grading tear crystallization in cats, but as Rolando scale included
239 96.6% of the samples in the 2 types that are considered normal for humans, we think that
240 this scale seemed to be more precise to classify crystallization pattern in cats. The
241 crystallization patterns observed in this study can form the basis for standardizing the
242 TFT of domestic cats.

243 **Conclusions**

244 The TFT is a feasible, inexpensive and low-risk test in cats. Our findings revealed high
245 prevalence of the type I pattern according to the Rolando scale and of the grade 1 and 2
246 pattern according to the Masmali scale. These findings suggest that the TFT can be used
247 as a complementary test for evaluating the ocular surface of cats and can provide insights
248 into qualitative deficiencies of TF. We believe these findings will enhance our
249 understanding of qualitative tear film disease and aid the design of prospective, case-
250 controlled studies to better define the TFT results in various feline ocular diseases, such
251 as conjunctivitis, corneal ulcer, SCCED, pigmentary keratitis, corneal sequestrum and dry
252 eye syndrome.

253 **Declarations**

254 **Authors' contributions**

255 All authors contributed in designing the study. JFV, CVBS and LFL sampled from
256 animals, and JFV performed the tear ferning test. All authors contributed in interpretation
257 of data. JFV was the major contributor in writing the manuscript with contribution from

258 all authors. Further revisions of manuscript were done by RSAC, APO, ACSR and AJL.
259 JFV submitted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

260 **Acknowledgements**

261 We would like to thank the State University of Santa Cruz (UESC) for offering
262 development conditions for this research, such as availability of laboratories and
263 equipment. Also, would like to thank Editage (www.editage.com), Ford Hotchkiss
264 Anderson Harvey and Tatiani Vitor Harvey for English language editing, and Anaiá da
265 Paixão Sevá for the statistical consultancy.

266 **Competing interests**

267 The authors declare that they have no competing interests.

268 **Availability of data and materials**

269 The datasets used and/or analysed during the current study are available from the
270 corresponding author on reasonable request.

271 **Consent for publication**

272 Not applicable.

273 **Ethics approval**

274 This study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Use
275 of Animals from the State University of Santa Cruz (protocol no. 003/17). All procedures
276 were conducted in accordance with the Association for Research in Vision and
277 Ophthalmology's (ARVO) Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision
278 Research and NIH statement.

279 **Prior publication**

280 Data have not been published previously.

281 **Funding**

282 This study was (co-) funded by the Faculty of Veterinary Medicine, State University of
283 Santa Cruz, Foundation for Research Support of the State of Bahia, and by the
284 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil - Finance Code
285 001.

286 **References**

- 287 1 Zhou L, Beuerman RW. Tear analysis in ocular surface diseases. *Prog Retin Eye Res.*
288 2012;31:527–550.
- 289 2 Georgiev GA, Eftimov P, Yokoi N. Structure-function relationship of tear film lipid
290 layer: a contemporary perspective. *Exp Eye Res.* 2017;163:17–28.
- 291 3 Lemp MA, Crews LA, Bron AJ, et al. Distribution of aqueous-deficient and
292 evaporative dry eye in a clinic-based patient cohort: a retrospective study. *Cornea.*
293 2012;31:472–478.
- 294 4 Kanda T, Shimizu Y, Hanazono C, et al. Effect of intramuscular administration of
295 medetomidine and xylazine on tear flow measured by the Schirmer tear test I in
296 healthy cats. *J Feline Med Surg.* 2018;21:788-792.
- 297 5 Sebbag L, Pesavento PA, Carrasco SE, et al. Feline dry eye syndrome of presumed
298 neurogenic origin: a case report. *J Feline Med Surg.* 2018;4:1–7.
- 299 6 Alanazi SA, Aldawood MA, Badawood YS, et al. A comparative study of the quality
300 of nonstimulated and stimulated tears in normal eye male subjects using the tear
301 ferning test. *Clin Opto.* 2019;3:65-71.
- 302 7 Aftab G, Rajaei SM, Faghihi H. Comparison of the Schirmer tear test I values after
303 placement in ventral and dorsal conjunctival fornices in healthy cats. *J Feline Med*
304 *Surg.* 2018;20:1169–1172.

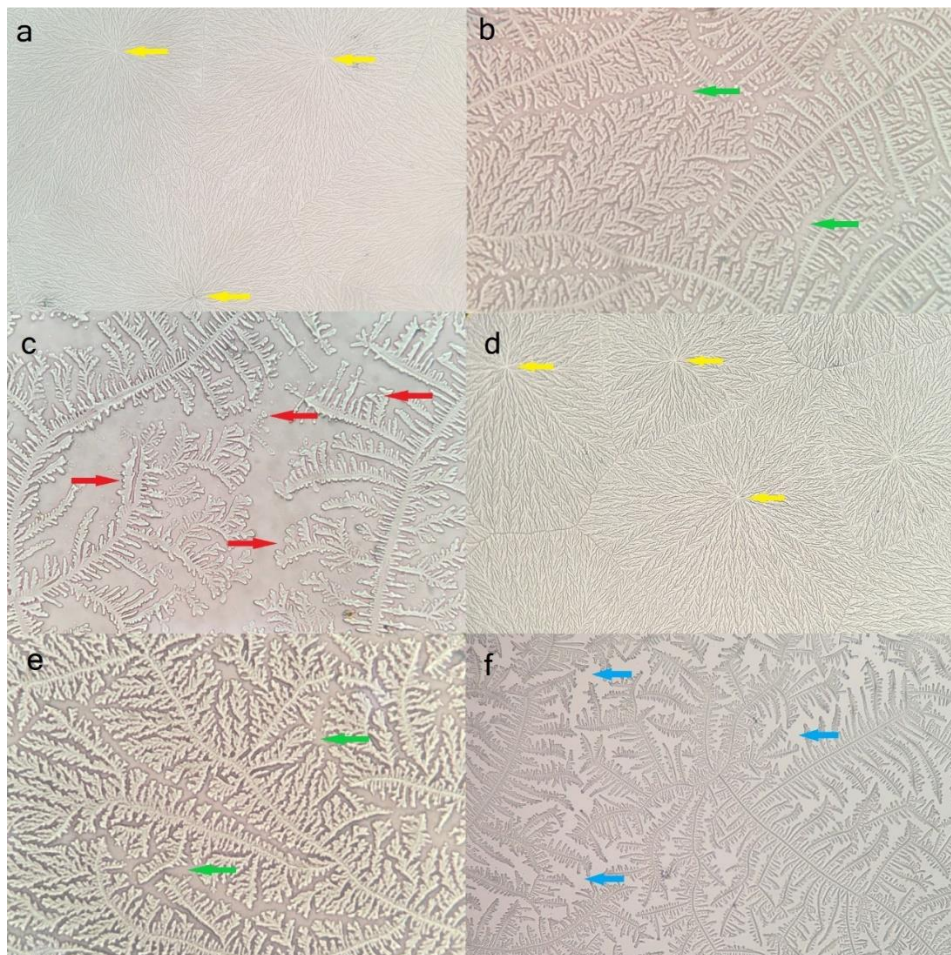
- 305 8 Norn M. Ferning in conjunctival-cytologic preparations: crystallization in stained
306 semiquantitative pipette samples of conjunctival fluid. *Acta Ophthal.* 1987;65:118–
307 122.
- 308 9 Rolando M. Tear mucus ferning test in normal and keratoconjunctivitis sicca eyes.
309 *Chib Inter J Ophthamol.* 1984;2:32–41.
- 310 10 Masmali AM, Purslow C, Murphy PJ. The tear ferning test: a simple clinical
311 technique to evaluate the ocular tear film. *Clin Exp Optom.* 2014;97:399–406.
- 312 11 Masmali AM, Fagehi RA, El-Naggar AH, et al. Structure and microanalysis of tear
313 film ferning of camel tears, human tears, and Refresh Plus. *Mol Vis.* 2018;24:305–
314 314.
- 315 12 Silva LR, Gouveia AF, Fátima CJT, et al. Tear ferning test in horses and its correlation
316 with ocular surface evaluation. *Vet Ophthal.* 2016;19:117–123.
- 317 13 Oriá AP, Raposo ACS, Araújo NLLC, et al. Tear ferning test in healthy dogs. *Vet*
318 *Ophthal.* 2017;21:391–398.
- 319 14 Williams D, Hewitt H. Tear ferning in normal dogs and dogs with keratoconjunctivitis
320 sicca. *Open Vet Jour.* 2017;7:268–272.
- 321 15 Raposo ACS, Portela RD, Masmali AM, et al. Evaluation of lacrimal production,
322 osmolarity, crystallization, proteomic profile, and biochemistry of capuchin monkeys
323 tear film. *J Med Primatol.* 2018;47:371–378.
- 324 16 Moore CP. Qualitative tear film disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*
325 1999;20:565–581.
- 326 17 Grahn BH, Storey ES. Lacrimostimulants and lacrimomimetics, *Vet Clin Small An.*
327 2004;34:739-753.
- 328 18 Tomlinson A, Khanal S. Assessment of tear film dynamics: quantification approach.
329 *Ocul Surf.* 2005;3:81–95.

- 330 19 Lim CC, Reilly CM, Thomasy SM, et al. Effects of feline herpesvirus type 1 on tear
331 film break-up time, Schirmer tear test results, and conjunctival goblet cell density in
332 experimentally infected cats. *Am J Vet Res.* 2009;70:394–403.
- 333 20 Sebbag L, Kass PH, Maggs DJ. Reference values, intertest correlations, and test-retest
334 repeatability of selected tear film tests in healthy cats. *J Amer Vet Med Assoc.*
335 2015;246:426–435.
- 336 21 Uhl LK, Saito A, Iwashita H, et al. Clinical features of cats with aqueous tear
337 deficiency: a retrospective case series of 10 patients (17 eyes). *J Feline Med Surg.*
338 2018;21:944–950.
- 339 22 Sebbag L, McDowell EM, Hepner PM, et al. Effect of tear collection on lacrimal total
340 protein content in dogs and cats: a comparison between Schirmer strips and
341 ophthalmic sponges. *BMC Vet Research.* 2018;14:61–68.
- 342 23 Posa A, Bräuer L, Schicht M, et al. Schirmer strip vs. capillary tube method: Non-
343 invasive methods of obtaining proteins from tear fluid. *Annals Anat - Anatom Anzeig.*
344 2013;195:137–142.
- 345 24 Stiles J, Kimmitt B. Eye examination in the cat. *J Feline Med and Surg.* 2016;18:702–
346 711.
- 347 25 Horwath J, Ettinger K, Bachernegg M, et al. Ocular ferning test: effect of temperature
348 and humidity on tear ferning patterns. *Ophthalmol.* 2001;215:102-107.
- 349 26 Masmali AM, Al-Bahlal JM, El-Hiti GA, et al. Repeatability and diurnal variation of
350 tear ferning test. *Eye Contact Lens.* 2015;41:262–267.
- 351 27 Chen L, Zhou L, Chan EC, et al. Characterization of the human tear metabolome by
352 LC-MS/MS. *J Proteome Res.* 2011;10:4876–4882.
- 353 28 Davis K, Townsend W. Tear-film osmolarity in normal cats and cats with
354 conjunctivitis. *Vet Ophthal.* 2011;14:54–59.

355 **FIGURE LEGENDS**

356 Figure 1. Examples of tear ferning patterns in cats according to the Rolando (a,b,c) and
 357 Masmali (d,e,f) grading scales. Type I representation: dendritic fern growth is uniform,
 358 nuclei (yellow arrows) are easily distinguished and no gaps are seen between the
 359 branches. (b) Type II: small spaces (green arrows) begin to appear between the branches
 360 and the ferns are thicker. (c) Type III: incomplete crystallization process; coarse crystals
 361 (red arrows) are formed in single and small size, and branches are rare. (d) Grade 0
 362 representation: full crystallization without gaps between the ferns and branches, and
 363 nuclei well demarcated. (e) Grade 1: branch density is decreased and small spaces appear
 364 between them. (f) Grade 2: small branches—sometimes thick and large—with clear gaps
 365 between the ferns (blue arrows), and nuclei not visible.

366 Note the similarity between panel (a) and (d); between (b) and (e); Besides panel (b) is
 367 closer to (e), similarity between (b) and (f) can be noticed as well. And is important to
 368 note that (c) is not closer do (f), showing that probably Rolando Type I seems like
 369 Masmali grade 0; Rolando type II seems like Masmali grades 1 and 2.



370

6 CAPÍTULO II

PROTEÔMICA DO FILME LACRIMAL DE FELINOS DOMÉSTICOS

6.1 INTRODUÇÃO

O fluido lacrimal (FL) é complexo e viscoso composto por três camadas que formam em conjunto uma interface entre a córnea e o ar (SLATTER, 2008; SAMUELSON, 2013). A superfície ocular (SO) é protegida pelo FL sendo, portanto, considerada a primeira resistência do sistema de defesa ocular (CHOY et al. 2001; DAVIDSON; KUONEN, 2004). Acredita-se que as proteínas presentes no FL desempenham um papel importante na manutenção da SO saudável através da modulação de processos de cicatrização, bem como defesa direta contra patógenos (ZHOU et al., 2003; ZHOU et al., 2007).

Alterações na expressão de proteínas lacrimais estão associadas a doenças sistêmicas e oculares. Dessa forma, sua avaliação vem sendo amplamente explorada na medicina humana como uma ferramenta não invasiva para descoberta de biomarcadores moleculares para diagnóstico e prognóstico de diversas doenças (DE SOUZA et al., 2006; CAMPOS et al., 2008; HOHENSTEIN-BLAUL et al., 2013). Amostras de animais também começaram a ser exploradas devido à proximidade de algumas espécies com os seres humanos, que muitas vezes vivem no mesmo ambiente, sob as mesmas circunstâncias (SHAMSI et al., 2011; ZHOU; BEUERMAN, 2012).

O proteoma é o perfil proteico de um conjunto de proteínas expressas em um dado momento e proteômica é a análise do proteoma de um órgão, tecido, tipo celular ou fluido biológico, como a lágrima (COTTRELL, 2011). Diversas técnicas de proteômica têm sido utilizadas em estudos sobre o FL, entretanto, foi com o surgimento da espectrometria de massas (EM) e o desenvolvimento de técnicas de ionização mais brandas, que houve uma revolução na extensão das aplicações da EM, sendo atualmente a técnica de eleição para identificar proteínas em amostras biológicas complexas, como o FL (ZHOU et al., 2012; WINIARCZYK et al., 2015; HAGAN et al., 2016; SORIA et al., 2017).

Alterações na expressão de proteínas do FL foram descritas em alguns estudos com seres humanos quando em condições patológicas locais e sistêmicas (HOHENSTEINBLAU et al., 2013, HAGAN et al., 2016). Kuo et al. (2019) conseguiram comprovar, através da proteômica de FL, que pacientes humanos com síndrome do olho seco, mesmo em tratamento considerado eficaz, possuem perfil de expressão de proteínas diferentes de indivíduos sem a

síndrome. Além disso, com esta metodologia também foi possível identificar um pequeno subgrupo de proteínas no FL que são afetadas no processo de envelhecimento de humanos, muitas inclusive estando relacionadas com inflamação (NÄTTINEN et al., 2019). A proteômica também tem demonstrado que o FL é uma importante fonte de potenciais biomarcadores para doenças como alzheimer (KALLO et al., 2016; KENNY et al., 2019) e esclerose múltipla, inclusive sendo sugerido seu uso para teste de triagem antes de avançar para técnicas diagnósticas mais invasivas (SALVISBERG et al., 2014).

A medicina veterinária ainda carece de estudos proteômicos do FL em animais com algum tipo de doença. Dentre os poucos estudos realizados (SHAMSI et al., 2011), já foram identificadas diferenças na composição e concentração de algumas proteínas do FL de cães, coelhos e cavalos com lesão em córnea (HEMSLEY et al., 2000; ZHOU et al., 2003; OLLIVIER et al., 2004; COUTURE et al., 2006). Diferentes tipos de câncer também incitaram mudanças no padrão proteico do FL de cães, sendo este estudo bastante referenciado em estudos posteriores do proteoma da lágrima em seres humanos com câncer (CAMPOS et al., 2008). Além disso, a comparação de amostra lacrimal de coalas hígidos com os acometidos por conjuntivite causada por infecção por Clamídia, mostrou diferença na intensidade da expressão de proteínas através da análise em cromatografia por exclusão molecular (HEMSLEY et al., 2000).

Outro exemplo, foi o estudo conduzido com coelhos ceratectomizados, o qual demonstrou que houve aumento da lisozima em oito vezes após 24 horas da lesão na córnea comparada a olhos saudáveis, retornando ao seu padrão normal três dias após o procedimento (ZHOU; BEUERMAN, 2012). Além dos seres humanos, apenas cães e equinos já tiveram seu padrão proteico do FL descrito por proteômica em indivíduos saudáveis, sendo identificadas 125 proteínas na espécie canina (WINIARCZYK et al., 2015) e 1990 proteínas na espécie equina (FERREIRA, 2018).

Tais achados demonstram a relevância do estudo proteômico do FL de felinos domésticos, e revelam a necessidade de novas pesquisas com o intuito de elucidar o real auxílio das proteínas lacrimais na avaliação da SO. Cabe ressaltar que a espécie felina também está intimamente presente no ambiente em que tanto cães quanto seres humanos vivem.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Identificar e descrever as proteínas do filme lacrimal de felinos hígidos por meio de espectrometria de massas associada a gel bidimensional.

6.3 MATERIAL E MÉTODOS

6.3.1 Considerações Éticas

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) sob os números 003/17 (anexo B) e 024/15 (anexo C), bem como seguiu as normas da Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia (ARVO).

6.3.2 Animais

Fizeram parte deste estudo 12 (doze) gatos domésticos (*Felis catus*), de raça mista, de ambos os sexos, entre 7 (sete) e 9 (nove) meses de idade, vivendo em ambiente controlado, caracterizado por gaiolas individuais de tamanho aproximado 1,5 m², durante o período de 6 (seis) meses.

6.3.3 Critérios de Inclusão

Como critério de inclusão foram consignados animais negativos para *Toxoplasma gondii*, FIV/FeLV e Coronavírus, além de constatação de higidez após os exames realizados. A triagem incluiu a realização de exame físico, sorologia para FIV/FeLV, *Toxoplasma gondii* e Coronavírus, hemograma, bioquímica sérica composta por dosagens de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama glutamil transferase (GGT), bilirrubinas, ureia e creatinina sérica. No exame oftálmico foi preconizado exames quantitativos como TLS-1 e PIO, além de qualitativos incluindo teste da cristalização lacrimal (TCL) e constatação de higidez de superfície ocular através de corantes. Os animais selecionados também foram previamente castrados e imunizados contra as principais doenças infecciosas dos felinos e receberam tratamento para controle de endoparasitas e ectoparasitas.

6.3.4 Semiotécnica Oftálmica

Procedeu-se a semiotécnica oftálmica de rotina iniciando com avaliação dos anexos oftálmicos, segmento anterior e posterior, avaliação da pressão intraocular (PIO) com tonômetro de rebote (TONOVET Icare®) na calibração de cão, utilizando o desvio padrão $\leq 1,0$, seguido do TLS-1 (Ophthalmos, São Paulo, Brasil), TCL para análise de cristais, onde considerou-se FL de qualidade normal os que tiverem classificação de tipos I e II segundo a escala de Rolando (1984), e, por fim, para constatação da higidez da superfície ocular, foram utilizados

corantes de fluoresceína (Ophthalmos, São Paulo, Brasil) (Figura 5) e lissamina verde (Ophthalmos, São Paulo, Brasil).

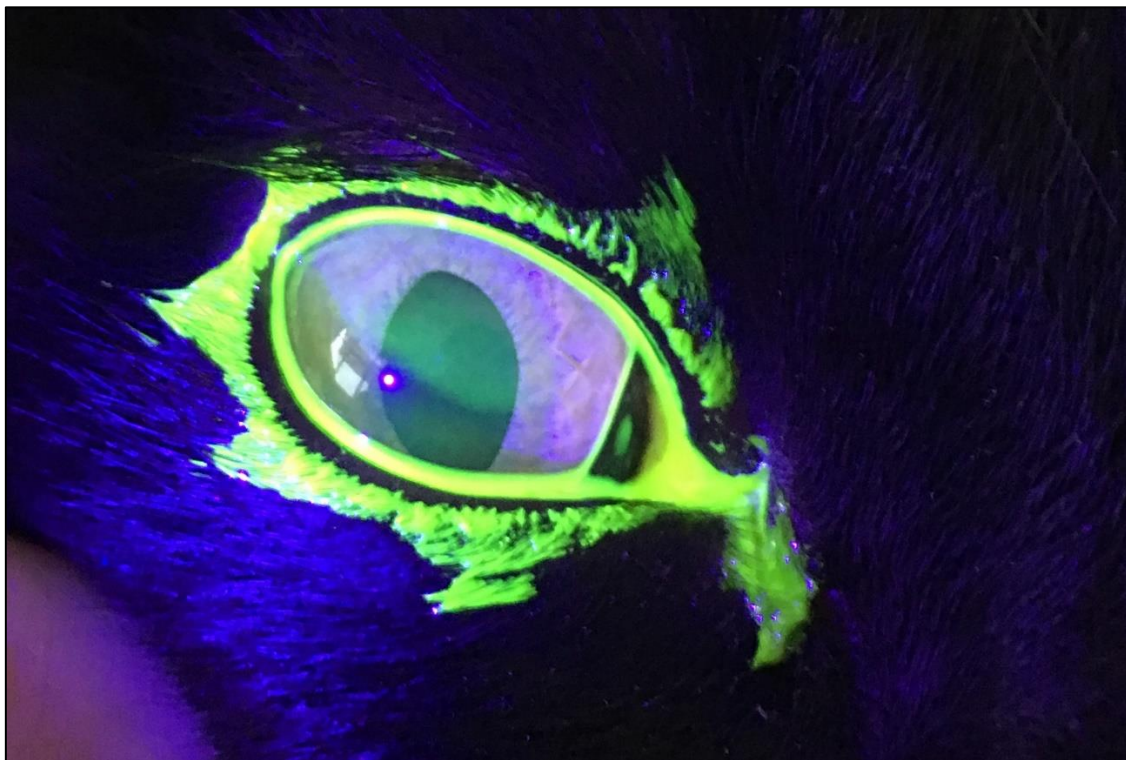


Figura 5. Superfície ocular de um dos felinos do estudo, sendo corada por fluoresceína sódica e visualizada com luz de cobalto, constatando higidez por ausência de corante impregnado na córnea. Fonte: arquivo pessoal.

6.3.5 Sorologia para FIV e FeLV

As amostras de soros dos indivíduos do estudo foram testados por imunocromatografia de fluxo lateral unidirecional através do kit comercial FIV Ac/FeLV Ag Test Kit (ALERE/BIONOTE) (anexo D) e o resultado interpretado de acordo com as recomendações do fabricante.

6.3.6 Sorologia para *Toxoplasma gondii*

Para a pesquisa de anticorpos contra IgM e IgG de *T.gondii* foi utilizada Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (anexo E), desenvolvida de acordo com descrição de Pinto et al. (2009).

6.3.7 Sorologia para Coronavirus

A detecção de anticorpos anti-coronavírus foi realizada através da utilização do kit de ensaio de imunofluorescência *Feline Infectious Peritonitis Virus IFA Antibody Kit* (FullerLaboratories) (anexo F), reconhecendo o título de anticorpos de classe IgG.

6.3.8 Coleta da lágrima e quantificação

Para a coleta da lágrima foi utilizado o TLS-1. Para tanto, a tira de papel padronizada (com entalhe de 5 mm) (Ophthalmos, São Paulo, Brasil) foi inserida no saco conjuntival ventral de ambos os olhos e o comprimento da porção umedecida foi medido por escala milimétrica após o tempo protocolado (60 segundos) (Figura 6). Imediatamente, as tiras umedecidas foram colocadas em microtubos de 0,5 ml (Protein LoBind Tubes; Eppendorf), o fundo do microtubo foi cortado com lâmina de bisturi estéril e ele foi inserido em um microtubo maior de 2,0 ml (Protein LoBind Tubes; Eppendorf) para extrair a lágrima, conforme descrito por Oriá et al. 2018. Os microtubos foram acondicionados em caixas térmicas por até no máximo 2 horas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada à temperatura de -4°C , para evitar evaporação, durante 10 minutos a 15000 xg, e acondicionadas em microtubos de 1,5mL em formato de *pools* referente a amostra dos 12 (doze) animais. A amostra foi mantida congelada em triplicada, à temperatura de -20°C , até o preparo de proteína para 2D-SDS/PAGE.



Figura 6. Animal contido e sendo realizada a técnica de coleta de amostra lacrimal através do TLS-1. Fonte: arquivo pessoal.

6.3.9 Quantificação das proteínas da amostra lacrimal pelo método de Bradford (1976)

As amostras de lágrima foram descongeladas e submetidas à quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976) com leitura a 595 nm, utilizando albumina do soro bovino (BSA) como padrão.

6.3.10 Remoção de sal da amostra lacrimal e quantificação da amostra pelo método de 2D Quant Kit

A remoção de sal da amostra foi necessária com intuito de evitar influência a focalização isoeétrica, tornando assim a amostra mais pura. Para tanto, 150 µL da amostra foram misturadas a 150 µL de TCA a 20% em tubos plásticos, armazenados durante 10 minutos em gelo e centrifugados durante 5 minutos sob a velocidade máxima da centrífuga até a formação do pellet. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com 200 µL de acetona 100%. Em seguida, o precipitado foi lavado com 200 µL de acetona 80%. Nas lavagens foi utilizado centrifugação por 5 min a 14.000 rpm. Posteriormente, o sobrenadante foi removido com o auxílio de pipetas e os tubos secaram sob a temperatura ambiente e após foi ressuscitado em 200 µL de tampão de reidratação (urea a 7 mol.L⁻¹, tiourea a 2 mol.L⁻¹, CHAPS a 2% e azul de bromofenol a 0.002%). Em seguida, as proteínas foram quantificadas com 2D Quant Kit (GeHealthCare), de acordo com as recomendações do fabricante.

6.3.11 Primeira dimensão: focalização isoeétrica

Uma massa de 150 µg de proteína, em um volume de 250 µL de tampão de reidratação contendo dithiothreitol (DTT) e 1,25 µL de anfólito foi utilizada na focalização isoeétrica. Esta solução foi depositada no suporte de porcelana (*Strip holder*) e acima foi inserida a tira de gel desidratado de 13 cm, com gradiente de pH imobilizado 3 a 10 NL (pH 3-10NL, 130 × 3 × 0.5 mm; GE Healthcare, Immobiline™ Dry-Strip), e, adicionado 1 mL de óleo *Drystrip*; o suporte foi fechado e inserido no focalizador. O protocolo seguido para isoeletrofocalização, no Ethan IPGphor III (GE Healthcare), foi: 12 h (overnight) à 20°C para hidratação do gel; 1 h a 500 Vh, 1 h e 4 min a 1000 Vh, 2 h e 30 min a 8000 Vh e 22 min a 8000 Vh à 20°C da focalização propriamente dita, totalizando 17 h e 15 min.

6.3.12 Segunda dimensão: eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Após a focalização isoeétrica, as tiras do gel foram tratadas por 15 minutos com 7 mL de tampão de equilíbrio (ureia 6 mol L⁻¹, SDS 2%, glicerol 30%, Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹, pH 8.8) contendo 0,21g de DTT 1%), seguido de 15 minutos novamente em 7 mL, em cada tubo, de tampão de equilíbrio contendo 175 g de iodoacetamida a 2,5%). Finalmente, as tiras foram colocadas por 15 minutos em 7 mL de tampão de corrida 1X (Tris, 0,025 mol L⁻¹, Glicina 0,19 mol L⁻¹, SDS 0.1%, pH 8.3). Nas três etapas as tiras de gel foram mantidas sob agitação lenta.

As tiras já equilibradas foram aplicadas no topo do gel de poliacrilamida 12,5% em sistema de eletroforese vertical (SE 600 Ruby – GE Healthcare), e do lado esquerdo foi colocado o marcador de peso molecular (GE Healthcare – 14 a 97 kDa) em um pedaço de papel filtro. Em seguida, foram selados com agarose (25 mmol L⁻¹ de Tris base, 192 mmol L⁻¹ de glicina, 0.1 % de SDS, 0.5 % de agarose, 0.002 % de azul de bromofenol). A corrida foi realizada com a corrente elétrica de 45 mA por 15 minutos, 120 mA por 30 minutos e 150 mA em uma fonte BioRad Power Pac 3000. A temperatura foi mantida por volta de 11 °C durante toda a corrida. Nesta etapa, cada cadeia polipeptídica migrou em função da sua *m/z* e a corrida foi interrompida quando o azul de bromofenol atingiu o final do gel.

6.3.13 Visualização dos *spots* e análise de imagens

Após a corrida que teve duração média de 4 horas, o gel foi colocado por 1 hora em tampão de fixação (40% álcool e 10% ácido acético), e depois o tampão foi substituído por uma solução corante de azul de comassie (8% de sulfato de amônio, 0,8% de ácido fosfórico, 0,08% de Coomassie Brilliant Blue G-250 e 20% de metanol) por 24 horas sob agitação. Posteriormente, o gel foi acondicionado com água destilada em agitação por 5 dias para remover o excesso do corante.

Após a lavagem, o gel foi escaneado utilizando o programa LabScanner (Amersham Bioscience) e analisado para detecção de *spots* usando o software ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare). Esta análise foi feita com uma combinação de detecção automática dos *spots* pelo software e detecção manual.

6.3.14 Extração de peptídeos em gel e análise por espectrometria de massas

Os 90 *spots* visualizados foram excisados, tripsinados e analisados por espectrometria de massas. Esta etapa consistiu em recortar do gel com auxílio de lâmina de bisturi estéril os fragmentos, colocá-los em microtubos separados e identificados, lavar durante 24 horas com 200 μL de 25 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 em 50 % de ACN (pH 8) e agitar em vórtex durante 10 minutos. Em seguida, foram lavados com 200 μL de água Milli-Q para retirar o excesso da solução anterior e então submetê-los a desidratação em 100 μL de acetonitrila (ACN) a 100% por 10 minutos em temperatura ambiente. Após este passo, o sobrenadante foi descartado e os microtubos com as amostras foram submetidos a secagem no Concentrator 5301 (Eppendorf) por aproximadamente 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 5 μL de solução gelada de tripsina Gold (25 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ - Promega) e manteve-se os microtubos em gelo por 10 minutos. Após esse tempo adicionou-se aproximadamente 20 μL de NH_4HCO_3 (25 mmol L^{-1}). Os *spots* contendo tripsina foram incubados por 16 horas em estufa a 37 °C. Por fim, o sobrenadante dos tubos foram coletados e transferidos para novos tubos e os peptídeos foram re-extraídos com 50 μL de acetonitrila 50 % contendo ácido fórmico a 5 %, sob agitação durante 30 minutos em termomix Thermo Finemixer (SH2000-DX). O volume de cada amostra foi reduzido no Speed Vac até atingir aproximadamente 10 – 15 μL .

Os fragmentos proteicos foram aplicados ao cromatógrafo líquido UPLC nanoAcquity (Waters, Milford, MA) acoplado ao espectrômetro de massas ESI-Q-TOF Micromass (Waters, Milford, MA). A sequência dos resíduos de aminoácidos (AA) foram encontradas a partir da busca no *Swiss-Prot* (UniPrtoKB, <https://www.uniprot.org/>), utilizando do banco de dados existente 9685 – *Felis catus* (Cat) (*Felis silvestris catus*) no software ProteinLynx Global server 4.2 (Rain Waters).

6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos últimos anos o FL tornou-se um material intensamente explorado em estudos de proteômica devido a sua facilidade em obtenção e manuseio quando comparado com outros fluidos corporais (WINIARCZYK et al., 2015). Nesse sentido, pesquisas direcionadas para a avaliação proteômica do FL são crescentes, tanto na medicina humana, quanto na veterinária. Entretanto, esse trabalho é pioneiro em descrever as proteínas presentes no FL de felinos domésticos.

A partir da coleta e processamento das lágrimas dos animais incluídos nessa pesquisa, o volume do *pool* extraído de FL dos doze felinos hígidos do estudo foi 200 μ L. A maior limitação da proteômica de FL ainda está no pequeno volume normalmente disponível após coleta (ZHOU et al., 2003). Para tal, métodos analíticos baseados em espectrometria de massa (EM) têm sido capazes de avaliar com alta precisão e sensibilidade amostras complexas de volume pequeno para mapeamento do perfil proteico do FL (DONG, ZHANG, 2014; KALLÓ, et al., 2016), conforme comprovado com nosso estudo.

No presente trabalho a metodologia escolhida para separação das proteínas do FL de felinos seguida de EM associada a cromatografia líquida possibilitou a identificação de 40 (quarenta) sequências de resíduos de AA. No total, 90 *spots* foram detectados com o software Image Master 2D Platinum (Figura 7), excisados do gel, tratados com tripsina e submetidos à identificação das proteínas, no entanto, somente 40 deles foram identificados (numeração do *spot* marcada na figura 7), as demais não corresponderam a peptídeos. Técnicas das mais diversas têm sido utilizadas para separar as proteínas contidas no FL de seres humanos e várias espécies animais, incluindo ELISA (GRUS et al., 2001), eletroforese (WINIARCZYK et al., 2015) e cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (HEMSLEY et al., 2000; ZHOU et al., 2007; SHAMSI et al., 2011). Hemsley et al. (2000) testaram a extração de proteínas, sem identificação dos peptídeos, de amostra de FL de gatos, coalas, ratos, camundongos, cães e seres humanos com cromatografia por exclusão do tamanho (SE-HPLC) e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), chegando à conclusão de que a técnica de SDS-PAGE tem melhor desempenho.

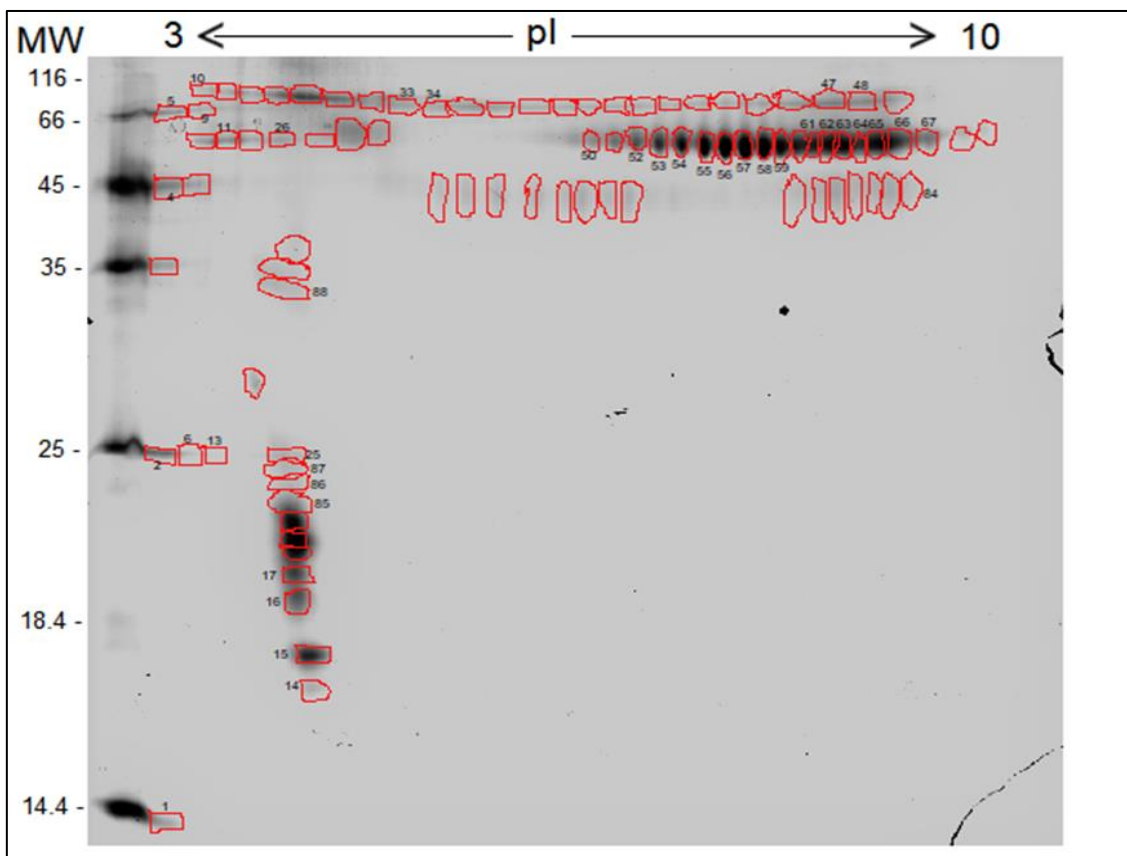


Figura 7. Mapa proteico no gel bidimensional de amostra de FL de felinos, escaneado e apresentando 90 *spots* identificados. Destes, os numerados, corresponderam aos peptídeos identificados por espectrometria de massas. Fonte: arquivo pessoal.

Foram identificadas nos 40 *spots* um total de 16 proteínas diferentes e algumas homólogas (Tabela 2). Das proteínas descritas neste estudo, grande parte da sua cadeia de AA foi identificada pelo EM. A lactotransferrina, albumina sérica, as lipocalinas alérgicas e a queratina já haviam sido descritas em outros estudos de FL, sendo esta última considerada como contaminante. Três proteínas (anidrase carbônica II, o receptor polimérico de imunoglobulina e a fosfoglicerato quinase) já haviam sido descritas em estruturas do sistema lacrimal, que não o FL. E, oito proteínas, dentre elas o receptor de apelina, a proteína secretória relacionada ao C1q/TNF, três proteínas quinase dependentes, aciltransferase, α -1,4 glucano fosforilase e o domínio de repetição WD-1, estão sendo descritas pela primeira vez através dos resultados deste estudo. O quadro 1 apresenta a proteína Lactotransferrina que teve 45 peptídeos reconhecidos no *spot* 66, o que garantiu 100% de probabilidade de realmente se tratar dessa proteína. Os AA marcados de cor vermelha no quadro 1 são as cadeias reconhecidas pelo EM.

Tabela 2. Peptídeos identificados no experimento em amostra de FL de felinos hígidos.

Spot	Proteína identificada	Número de acesso no NCBI	Nome do Gene	Ponto isoelétrico	Probabilidade (%)	Sequências reconhecidas	Função molecular	Referência
1	Apelin receptor	M3X9N6_FELCA	APLNR	7,7913	99,32	2	Modifica atividade celular ao se ligar a apelina	ESMAEILI et al., 2019; MEHRI et al., 2019
2	Carbonic anhydrase 2	M3W3J4_FELCA	CA2	7,0276	100	9	Catálise reversível da hidratação do bicarbonato e desidratação do ácido carbônico	TASHIAN, 1992; SUGIURA et al., 2010
4	Serum albumin	A0A2I2U7Y0_FELCA	ALB	5,1687	83,14	5	Antioxidante	RUNSTROM et al., 2013; SEBBAG et al., 2018
5	Alpha 1 4 glucan phosphorylase	A0A337SC59_FELCA	PYGM	8,5646	62,24	33	Catalise da formação e glicoproteínas	UBIPARIP et al., 2018
6	Phosphoglycerate kinase	A0A337SHN8_FELCA	PGK1	7,9065	79,49	5	Interação com ATP	CHEN et al., 2019
9	Alpha 1 4 glucan phosphorylase	A0A337SC59_FELCA	PYGM	8,5646	62,31	27	Catalise da formação e glicoproteínas	UBIPARIP et al., 2018
10	WD repeat domain 1	M3WEW2_FELCA	WDR1	6,1917	81,97	5	Ligante de actina	NEER et al., 1994; SMITH et al., 1999
11	Lactotransferrin	M3WKU0_FELCA	LTF	7,6575	59,97	24	Proteína de ligação, multifuncional	ALHALWANI et al., 2019
13	C1q and TNF related 7	A0A2I2V388_FELCA	C1QTNF7	5,1962	85,26	2	Paráloga da adiponectina	SCHERER, 2006

14	Fel d 7 allergen	E5D2Z5_FELCA	LOC100533977	4,6666	94,62	15	Ligação a pequenas moléculas hidrofóbicas e a IgE	APOSTOLOVIC et al., 2016; BONNET et al., 2018
15	Fel d 7 allergen	E5D2Z5_FELCA	LOC100533977	4,6666	80,18	15	Idem anterior	Idem anterior
16	Allergen Fel d 4	ALL4_FELCA	N/A	4,7216	99,99	7	Idem anterior	Idem anterior
17	Allergen Fel d 4	ALL4_FELCA	N/A	4,7216	99,9	5	Idem anterior	Idem anterior
25	CDK5 regulatory subunit associated protein 3	A0A337SKT3_FELCA	CDK5RAP3	4,717	42,32	3	Ligação à proteína quinase	NIGG, 1995
26	Polymeric immunoglobulin receptor	M3W5Z6_FELCA	PIGR	5,4053	100	10	Ligação a IgA e IgM	KAETZEL et al., 2005
33	Lactotransferrin	M3WKU0_FELCA	LTF	7,6575	86,26	22	Proteína de ligação multifuncional	ALHALWANI et al., 2019
34	Serine/Threonine protein kinase *	M3X4V1_FELCA	TRY50791.1	9,9902	35,85	3	Fosforilação de serina ou treonina	CROSS et al., 2000
47	Lactotransferrin	M3WKU0_FELCA	LTF	7,6575	54,38	20	Proteína de ligação multifuncional	ALHALWANI et al., 2019
48	Lactotransferrin	M3WKU0_FELCA	LTF	7,6575	50,57	21	Idem anterior	Idem anterior
50	Lactotransferrin	M3WKU0_FELCA	LTF	7,6575	50,57	17	Idem anterior	Idem anterior
52	Lactotransferrin	A0A2I2V3V6_FELCA	LTF	7,7844	50,22	29	Idem anterior	Idem anterior
53	Lactotransferrin	M3WKU0_FELCA	LTF	7,6575	72,83	30	Idem anterior	Idem anterior
54	Lactotransferrin	M3WKU0_FELCA	LTF	7,6575	72,01	30	Idem anterior	Idem anterior
55	Lactotransferrin	M3WKU0_FELCA	LTF	7,6575	100	44	Idem anterior	Idem anterior
56	Lactotransferrin	M3WKU0_FELCA	LTF	7,6575	100	41	Idem anterior	Idem anterior
57	Lactotransferrin	M3WKU0_FELCA	LTF	7,6575	100	37	Idem anterior	Idem anterior
58	Lactotransferrin	M3WKU0_FELCA	LTF	7,6575	59,77	35	Idem anterior	Idem anterior
59	Lactotransferrin	M3WKU0_FELCA	LTF	7,6575	81,42	33	Idem anterior	Idem anterior
61	Lactotransferrin	M3WKU0_FELCA	LTF	7,6575	98,63	40	Idem anterior	Idem anterior
62	Lactotransferrin	M3WKU0_FELCA	LTF	7,6575	100	36	Idem anterior	Idem anterior

63	Lactotransferrin	M3WKU0_FELCA	LTF	7,6575	100	38	Idem anterior	Idem anterior
64	Lactotransferrin	M3WKU0_FELCA	LTF	7,6575	100	40	Idem anterior	Idem anterior
65	Lactotransferrin	M3WKU0_FELCA	LTF	7,6575	100	42	Idem anterior	Idem anterior
66	Lactotransferrin	M3WKU0_FELCA	LTF	7,7675	100	45	Idem anterior	Idem anterior
67	Lactotransferrin	M3WKU0_FELCA	LTF	7,6575	50,04	33	Idem anterior	Idem anterior
84	WD repeat domain 1	M3WEW2_FELCA	WDR1	6,1917	91,53	5	Ligante de actina	NEER et al., 1994; SMITH et al., 1999
85	Acyltransferase *	A0A2I2U227_FELCA	LOC101098498	5,0149	62,29	7	Catalise da transferência dos grupos acil e biossíntese de fosfolípidos	WANG et al., 1997
86	Allergen Fel d 4	ALL4_FELCA	N/A	4,7216	78,38	8	Ligação a pequenas moléculas hidrofóbicas e a IgE	APOSTOLOVIC et al., 2016; BONNET et al., 2018
87	Keratin 77	M3XG51_FELCA	KRT77	6,8177	100	4	Proteína estrutural presente nas células epiteliais	BALASUBRAMANIAN et al., 2013
88	Wee1 like protein kinase	M3X956_FELCA	WEE1	6,1725	67,81	3	Regulação da replicação do DNA	CROSS et al., 2000

* Essas proteínas, segundo o UniProtKB, não foram ainda caracterizadas, entretanto, foram identificadas pelo BLAST.

Quadro 1. Proteína Lactotransferrina identificada pelo EM no estudo, marcado com os 45 peptídeos sequenciados na amostra lacrimal de felinos.

<p>MKLVFPALLFLGALGLCLGTPGRRVRWCTISQAEETKCTKFQQNMREVGGGPHVSCTRKNSRQECIQAIKANEADAVTLDGGLVFEAGLDP NKLRPVAAEVYGTQAEPQIHYYAVAIAKKGTNFQLNQLQGRKSCHTGLGRSAGWNIPMGLLRPFLNWAGPPEPLEKAAANFFSASCVP CADGKEYPNLCRLCAGTGENKCACSSREPYFGYAGAFKCLHEGGDVAFVRTTFESLPDKADQDKYELLCLNNTRKPVDAFKECHLAR IPSHAVVARSVDGKEDLIWELLNKAQEKFGKDKSPAFQLFGSPKDEKDLLFKDSALGFLRVPSKVDSGLYLGFNYLTAIQGLRETAAEVA ERRARVAWCAVGREERKCQQWSRASLGNVTCVSAPTGEDCIALVLKGEADALSLDGGLIVAGKCGLVPVLAENQKPQIPNNERCEDR RVEGYLAVAVVRKSDADITWNSLRGRKSCHTAVDRTAGWNIPMGLLFSQTGSCKFGEFFSKSCAPGSDPNSNLCALCIGDERGENKCV PNSSERYFGYTGAFRCLAEKAGDVAFVKDSTVLQNTNGGSSEAWAKDLRLEDFELLCLDGTRKPVKEAERCHLARAPNHGVVSREDKA QHLEQVLLQQQTHFGTNGDKCPSEFCLFRSKTKNLLFNDNTECLAKLQGKTTYEYLGSAYVTAVGNLRQCSTSPLLEACAFLRRSLIYSI RLFRKYVYGVPGVCPAPSWVNKVNINERGRRTS</p>		
<i>m/z</i>	Charge	Sequência identificada
676,8118	2	(R)WCTISQAEETK(C)
606,7921	2	(K)CTKFQQNMR(E)
599,7859	2	(R)EVGGPHV SCTR (K)
495,2571	2	(R)QECIQAIK(A)
1158,582	2	(K)ANEADAVTLDGGLVFEAGLDPNK(L)
953,5125	3	(K)LRPVAAEVYGTQAEPQIHYYAVAIK(K)
752,4033	2	(K)KGTFQLNQLQGR(K)
688,358	2	(K)GTNFQLNQLQGR(K)
964,1492	3	(R)SAGWNIPMGLLRPFLNWAGPPEPLEK(A)
969,5044	3	(R)SAGWNIPMGLLRPFLNWAGPPEPLEK(A)
886,8823	2	(K)AAANFFSASCVP CADGK (E)
902,3945	3	(K)AAANFFSASCVP CADGKEYPNLCR (L)
625,3025	2	(R)EPYFGYAGAFK(C)
708,8408	2	(K)CLHEGGDVA FVR (H)
637,3289	2	(R)HTTVFESLPDK(A)

610,9614	3	(R)HTTVFESLPDKADQDK(Y)
879,9634	2	(R)SVDGKEDLIWELLNK(A)
711,3681	2	(K)DKSPAFQLFGSPK(D)
589,8185	2	(K)SPAFQLFGSPK(D)
775,91	2	(K)SPAFQLFGSPKDEK(D)
504,2765	2	(K)DEKDLLFK(D)
747,9136	2	(K)DLLFKDSALGFLR(V)
439,7322	2	(K)DSALGFLR(V)
1050,561	2	(K)VDSGLYLGFNYLTAIQGLR(E)
566,2904	2	(R)ETAAEVAERR(A)
459,7357	2	(R)VAWCAVGR(E)
731,3471	2	(R)VAWCAVGREEER(K)
874,954	2	(K)GEADALSLDGGLIYVAGK(C)
759,3902	3	(K)CGLVPVLAENQKPQIPNNER(C)
666,3967	2	(R)RVEGYLAVAVVR(K)
588,329	2	(R)VEGYLAVAVVR(K)
703,3606	2	(R)KSDADITWNSLR(G)
1034,491	2	(R)TAGWNIPMGLLFSQTGSCK(F)
1042,491	2	(R)TAGWNIPMGLLFSQTGSCK(F)
431,2106	2	(K)FGEFFSK(S)
907,7326	3	(K)SCAPGSDPNSNLCALCIGDERGENK(C)
541,2599	2	(R)YFGYTGAFR(C)
403,7233	2	(K)AGDVAFVK(D)
932,9309	2	(K)DSTVLQNTNGGSSEAWAK(D)
790,8806	2	(R)LEDFELLCLDGTR(K)
691,8529	4	(R)EDKAQHLEQVLLQQQTHFGTNGDK(C)
798,0686	3	(K)AQHLEQVLLQQQTHFGTNGDK(C)
715,84	2	(K)CPSEFCLFRSK(T)
776,3742	2	(K)NLLFNDNTECLAK(L)
1054,015	2	(K)TTYEEYLGSAVYVAVGNLR(Q)

Legenda: Em vermelho peptídeos sequenciados pela EM; em preto parte da proteína Lactotransferrina que não foi sequenciada no estudo.

As proteínas identificadas no presente estudo, em sua grande maioria, tem ligação direta com funções do FL, sejam elas no desenvolvimento e metabolismo celular, até mesmo na atuação da defesa imune inata do sistema lacrimal.

A lactotransferrina (*lactotransferrin*) foi identificada no FL de gatos domésticos em 20 *spots*, sendo, portanto, o peptídeo identificado em maior número de *spots* neste estudo (Figura 8). Este achado corrobora com a literatura que cita presença frequentemente da proteína em questão no FL de seres humanos (DOR et al., 2018), cavalos (FERREIRA, 2018), coalas (HEMSLEY et al., 2000) e cães (HEMSLEY et al., 2000; CAMPOS et al., 2007). Ela é uma proteína de ligação multifuncional (ALHALWANI et al., 2019), produzida pelas células acinares das glândulas lacrimais principais e acessórias, com ação antimicrobiana e anti-inflamatória, portanto, desempenha papel importante na imunidade inata e ajuda a manter homeostase da SO (HANSTOCK et al., 2019). Sua ação antimicrobiana se dá pois a lactotransferrina inibe a via clássica de ativação do complemento e se liga ao ferro livre nas lágrimas, reduzindo a disponibilidade do ferro requerido para o crescimento bacteriano (BALASUBRAMANIAN et al., 2011; HANSTOCK et al., 2019). A identificação desta proteína no FL é considerado um biomarcador promissor no diagnóstico da síndrome de Sjögren, doença autoimune que causa síndrome do olho seco em humanos (VERSURA et al., 2018).

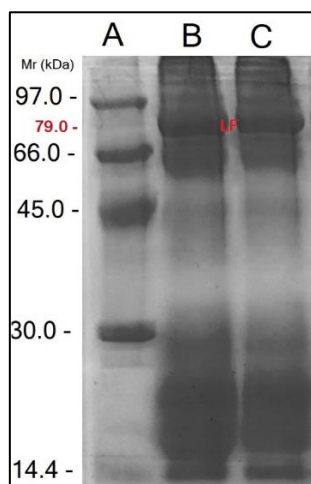


Figura 8. Perfil eletroforético do fluido lacrimal de gatos revelados em SDS-PAGE corado com azul brilhante de comassie. Coluna (A) é o marcador molecular; (B) *pool* de amostra de felinos; e (C) repetição do *pool*. As bandas de peptídeos foram identificadas combinando suas migrações com as dos padrões de peso molecular e em vermelho está demarcado a lactotransferrina (LF) que possui 79 kDa. Fonte: arquivo pessoal.

No *spot* 1 foi identificado o receptor de apelina (*apelin receptor*) que é um peptídeo que ativa e estimula a função da apelina após ligar-se a ela. Ele é expresso em células e tecidos diversos, tais como coração, vasos sanguíneos e adipócitos (ESMAEILI et al., 2019; MEHRI et al., 2019). A apelina, por sua vez, pertence à família das adipoquinas, que correspondem a um grupo de hormônios e citocinas com ação pró-inflamatória (STANSFIELD et al., 2014). Em nenhuma espécie esta proteína foi identificada no FL. Traçando uma extensão para a sua função no sistema ocular, sugere-se que ela seja importante para a formação dos vasos que nutrem esse órgão, bem como pode estar presente no componente lipídico do FL.

Outro receptor também identificado foi o receptor polimérico de imunoglobulina (*polymeric immunoglobulin receptor*) no *spot* 26, que consiste em um receptor de domínio transmembrana, expresso em diversas células epiteliais secretórias, tais como salivar, lacrimal e mamária. Ele se liga às imunoglobulinas IgA e IgM (KAETZEL et al., 2005), sendo que a IgA está presente no FL de forma abundante. É importante para a resposta imune inata de mucosas (FEDORCHUCK et al., 2019; NIU et al., 2019). A presença desse receptor já foi relatada por pesquisadores nas células acinares da glândula lacrimal de ratos e do homem (EVANS et al., 2008; HAYAKAWA et al., 2013), porém não diretamente em amostras de FL de nenhuma espécie.

A proteína relacionada ao C1q/TNF (*C1q and TNF related 7*) identificada no *spot* 13, é considerada uma proteína secretória que pertence à mesma família da adiponectina, ambas secretadas pelo tecido adiposo (SCHERER, 2006). Fazem parte desta família as C1q/TNF 1 a 10, e, embora as funções metabólicas da adiponectina sejam bem caracterizadas (KADOWAKI et al., 2006), os processos fisiológicos regulados pelas C1q/TNF estão apenas começando a ser explorados. Sabe-se que a C1q/TNF 3 exerce influência no metabolismo energético e na sensibilidade à insulina (KON et al., 2019). Possivelmente, ela seja secretada na camada lipídica do FL, mas até o momento também não foi descrita no FL de nenhuma outra espécie.

Outro componente encontrado na lágrima dos felinos avaliados, no *spot* 2, foi a anidrase carbônica II (*carbonic anhydrase 2*), uma metaloenzima importante para a morfogênese do epitélio, respiração celular, equilíbrio acidobásico, transporte de íons e reabsorção óssea (TASHIAN, 1989; TASHIAN,

1992). A expressão dessa enzima no aparelho ocular já foi descrita na glândula lacrimal, glândula da terceira pálpebra e glândula tarsal de cães. Acredita-se que a função básica nesse caso seja a manutenção equilibrada dos níveis de bicarbonato para regular o pH no FL e proteger o epitélio da córnea contra agressões externas (SUGIURA et al., 2010). Isso é confirmado por Saito e colaboradores (2001) ao descreverem que a remoção da glândula da terceira pálpebra em cães gerou uma alcalinização do pH lacrimal dos indivíduos do estudo. Apesar disso, não havia sido encontrada no FL de nenhuma espécie, e sugere-se que em felinos a ação desta proteína pode ser semelhante à de cães.

Com relação à albumina sérica (*serum albumin*) identificada no FL dos gatos no *spot* 4, é uma das proteínas frequentemente relatadas no FL de seres humanos (RUNSTROM et al., 2013; DOR et al., 2018) e de cães (WINIARCZYK et al., 2015). Ela é eliminada dentro da lágrima a partir dos capilares da conjuntiva, exercendo fundamental importância para a defesa antimicrobiana local (RUNSTROM et al., 2013), além de agir como antioxidante promovendo melhora na cicatrização de lesões oculares (SEBBAG et al., 2018), e como marcador da ausência de integridade da barreira hemato-ocular (BALASUBRAMANIAN et al., 2011). Tem grande potencial para ser usada como biomarcador de doenças tanto oftálmicas quanto sistêmicas, uma vez que esta proteína pode derivar do vazamento do plasma dos vasos conjuntivais, se misturando ao FL na SO (RUNSTROM et al., 2013). Um estudo realizado em cães com úlcera de córnea, uveíte e glaucoma, mostrou que os níveis de albumina lacrimal eram até 14,9 vezes superiores nos olhos lesionados que os hígidos contralaterais (SEBBAG et al., 2019). Portanto, sugere-se que a presença de albumina sérica no FL dos felinos esteja também relacionada com a função de auxiliar na cicatrização de lesões em SO.

A α -1,4 glucano fosforilase (*α -1,4 glucan phosphorylase*), identificada nos *spots* 5 e 9, é uma enzima que catalisa a ligação de carboidratos a proteínas e lipídeos, formando as glicoproteínas, importante para a adesão e sinalização celular, bem como para o enovelamento proteico (UBIPARIP et al., 2018). Ela ainda não havia sido identificada no FL de nenhuma espécie até o momento. Nesse sentido, sugere-se que auxilie na composição das glicoproteínas que compõem o FL e são secretadas pelas células caliciformes.

Outra proteína encontrada foi a fosfoglicerato quinase (*phosphoglycerate kinase*) no *spot* 6, esta é uma enzima importante para a glicólise metabólica (CHEN et al., 2019) e, dessa forma, para o metabolismo das células que compõem o aparelho lacrimal. Ainda não foi identificada no FL, entretanto, é frequentemente estudada em pacientes humanos com ceratocone, pois é identificada em amostras do epitélio corneano através da proteômica (JOSEPH, et al., 2011).

A aciltransferase (*acyltransferase*) é uma enzima que foi identificada no *spot* 85 desta análise de FL dos gatos, e possui papel importante no metabolismo das lipoproteínas plasmáticas, como o colesterol (WANG et al., 1997) e outras lipoproteínas que podem ser encontradas no FL. Ela não foi descrita em nenhuma amostra de lágrima até o presente momento. O domínio de repetição WD-1 (*WD repeat domain 1*) foi identificado nos *spots* 10 e 84, e, por sua vez, é uma proteína citoplasmática codificada pelo gene WDR1 (LI, ROBERTS, 2001), cujas funções conhecidas são transdução de sinal, síntese e processamento de RNA, montagem de cromatina, montagem do citoesqueleto, controle do ciclo celular e participação do processo de apoptose celular (NEER et al., 1994; SMITH et al., 1999). Assim, sua ação no sistema lacrimal de felinos pode estar associada ao crescimento e estrutura das células que o compõem. Não há relatos na literatura da presença desta proteína em FL.

Outra proteína identificada no FL de felinos, que pode ter função similar à do domínio de repetição WD-1 no que diz respeito ao crescimento celular, é a proteína quinase dependente de ciclina 5 (CDK5) associada à proteína 3 (*CDK5 regulatory subunit associated protein 3*). Esta proteína foi identificada no *spot* 25, e é uma unidade reguladora e ligadora da proteína quinase, responsável por controlar o ciclo celular, desde o crescimento e diferenciação até a apoptose celular (NIGG, 1995). Além disso, Rosales e Lee (2006) afirmam que a CDK5 também desempenha papel na adesão, migração e diferenciação de células epiteliais da lente e da córnea. Dessa forma, pode auxiliar na cicatrização de lesões em córnea, pois estimula a adesão das células epiteliais corneanas umas nas outras quando diante de uma lesão (GAO et al., 2004).

Ainda nesse contexto, foram identificadas mais duas proteínas quinase: a serina-treonina (*serine/threonine protein kinase*) no *spot* 34 e a Wee1 (*wee1 like protein kinase*) no *spot* 88. A primeira, é enzima fosforiladora de aminoácidos

que são utilizados na síntese proteica, com grande importância para a transdução de sinais, regulação da diferenciação, proliferação e apoptose celular (CROSS et al., 2000). A Wee1, também pertence à família das serina/treonina quinases, e é responsável por regular a fase G2 do ciclo celular, prevenindo a mitose das células que sofreram mutação, evitando, assim, a replicação do DNA (HU et al., 2018). Ambas proteínas quinase relatadas no FL de gatos ainda não foram identificadas em nenhuma outra espécie até então estudada.

As lipocalinas alérgicas Fel d 7 (*Fel d 7 allergen*) e Fel d 4 (*Allergen Fel d 4*) foram identificadas em 5 *spots*. Fazem parte da família das lipocalinas, que são frequentemente relatadas no FL de seres humanos como proteínas que se ligam a lipídios (DART, 2011; WILLCOX, 2019). Esta classe específica de lipocalinas alérgicas só foi anteriormente descrita em FL de cães, como uma das proteínas mais abundantes (WINIARCZYK et al., 2015). As Fel d 7 e Fel d 4 são pequenas, produzidas no fígado ou nas glândulas secretoras e compõem dois dos dez alérgenos felinos encontrados nos fluidos e secreções corpóreas desses, responsáveis pelas reações alérgicas (APOSTOLOVIC et al., 2016; BONNET et al., 2018; SMITH et al., 2004). Embora a saliva seja a secreção corpórea mais associada à liberação desses alérgenos para incitar a reação alérgica (MATA et al., 1992), como a lágrima também consiste em um dos fluidos secretados pelo organismo, fica claro entender a razão de se ter encontrado essas lipocalinas no FL dos gatos avaliados.

Foi encontrada, ainda, queratina (*keratin*) no *spot* 87 das amostras avaliadas. Nesse caso, sugere-se que possa ter ocorrido contaminação das comissuras oculares, que contém queratinócitos, na amostra de lágrima que foi coletada. A queratina é uma proteína filamentosa das células epiteliais que confere às porções do corpo que a contém elasticidade, rigidez e impermeabilidade à água, e foi encontrada ocasionalmente no FL de seres humanos (BALASUBRAMANIAN et al., 2013).

6.5 CONCLUSÃO

É possível concluir que a maioria das proteínas identificadas possuem funções importantes nos processos de defesa e manutenção da homeostase da SO, inferindo que estes peptídeos estejam em maiores concentrações no FL de felinos. A presença de lactotransferrina em 20 diferentes *spots*, uma proteína comumente descrita em amostra lacrimal de seres humanos, bem como cães e cavalos, demonstra sua importância quando nota-se sua alta frequência e dispersão no gel.

Este estudo descreve pela primeira vez, oito proteínas no FL de felinos, que também nunca foram descritas em análise proteômica de amostras do aparelho lacrimal de qualquer outra espécie. Isso mostra a relevância de próximos estudos utilizando estes resultados como base, para possibilitar elucidar o papel do FL em circunstâncias fisiológicas e patológicas que possam vir a acometer indivíduos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O TCL em felinos pode ser reproduzido de forma fácil quando portando em mãos os equipamentos necessários, como: fita de Schirmer, centrífuga, lâmina microscópica e microscópio. O teste é de fácil execução, entretanto ainda são necessárias mais pesquisas quanto à avaliação do padrão de cristais em diversas patologias oftálmicas da espécie. É um teste que pode ser incluído na rotina clínica de médicos veterinários como um exame qualitativo adicional. Diferentemente dos cães e dos seres humanos, em que possuem a síndrome do olho seco bem definida, alguns autores sugerem que a espécie felina não desenvolve essa patologia. Como o padrão de cristal da lágrima muda drasticamente quando na presença de síndrome de olho seco, são necessários mais experimentos com a população felina, buscando identificar a real existência ou não desta patologia oftálmica e de qual forma ela afetaria o padrão do cristal, uma vez que neste estudo trazemos a descrição do padrão de cristalização do FL de felinos hígidos pela primeira vez.

A lágrima, em ambos experimentos executados nessa pesquisa, se mostrou de grande valia para fins de pesquisa. A coleta através da fita de Schirmer se mostrou eficaz e passível de ser executada na espécie, além de ser rápida e não ter demonstrado sinais de esfoliação de conjuntiva durante a coleta com posterior contaminação da amostra por células epiteliais.

Apesar do volume de amostra ser pequeno após coleta, a técnica escolhida para executar a análise proteômica se mostrou eficaz por sobrepor essa dificuldade. Conforme outros autores e aos resultados encontrados nesse experimento, a EM associada a ULPC apresentou alta sensibilidade na identificação de peptídeos. Em mais de um peptídeo encontrado no FL de felinos foi possível evidenciar que a técnica utilizada identificou grande quantidade de sequência de aminoácidos, garantindo alta precisão dos resultados.

Nota-se também que das 16 proteínas identificadas quando confrontadas com o banco de dados, três importantes proteínas já foram descritas em FL de outras espécies (lactotransferrina, albumina sérica e as lipocalinas alérgenas) e outras três (anidrase carbônica II, o receptor polimérico de imunoglobulina e a fosfoglicerato quinase) já foram descritas em amostras provenientes de outras estruturas do aparelho lacrimal, inclusive dos seres humanos, e estão intimamente relacionadas aos processos de defesa e manutenção da

homeostase da superfície ocular. Entretanto, oito proteínas descritas no nosso estudo não foram descritas em nenhuma amostra de FL nem de qualquer estrutura do aparelho lacrimal de outras espécies, trazendo então grande relevância para a literatura, são elas: oreceptor de apelina, a proteína secretória relacionada ao C1q/TNF, três proteínas quinase dependentes, aciltransferase, α -1,4 glucano fosforilase e o domínio de repetição WD-1. Mais estudos proteômicos devem ser realizados em amostras de FL de felinos hígidos e portadores de afecções, uma vez que esta pesquisa mostra pela primeira vez a identificação de proteínas importantes. Dessa forma, comparativos com expressão de proteínas do FL de outras espécies ou de seres humanos, podem trazer no futuro grande auxílio na prevenção, diagnóstico, prognóstico bem como tratamento de doenças oftálmicas e até mesmo sistêmicas.

REFERÊNCIAS

1. ACERA, A. et al. Changes in tear protein profile in keratoconus disease. **Eye**, v. 25, p. 1225-1233, 2011.
2. ADASZEK, L. et al. Application the mass spectrometry MALDI-TOF technique for detection of babesia canis infection in dogs. **Parasitology Research**, v. 113, p. 4293–4295, 2014.
3. AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, p.198, 2003.
4. APOSTOLOVIC, D., et al. The cat lipocalin Fel d 7 and its cross-reactivity with the dog lipocalin Can F1. **Allergy**, v. 71, p. 1490-1495, 2016.
5. AQUINO NETO, F.R.; NUNES, D.S.S. Cromatografia: Princípios e Técnicas Afins, Editora Interciência, 1ª ed., 2003.
6. ARDREY, R.E. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction. Wiley: Huddersfield, 1ª ed., 2003.
7. ARGUESO, P., et al. MUC16 mucin is expressed by the human ocular surface epithelia and carries H185 carbohydrate epitope. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, p. 2487-2495, 2003.
8. ARN, P. H. Phenylketonuria (PKU). In: AMINOFF, M.J.; DAROFF, R.B. Encyclopedia of the Neurological Sciences. Oxford: Academic Press, 2ª ed., p. 887-889, 2014.
9. ASLHALWANI, A.Y., et al. Modification of lactoferrin by peroxyntirite reduces its antibacterial activity and changes protein structure. **Proteins**, v. 1, p. 1-9, 2019.
10. AZKARGORTA, M. et al. Human tear proteomics and peptidomics in ophthalmology: Toward the translation of proteomic biomarkers into clinical Practice. **Journal of Proteomics**, v. 150, p. 359-367, 2016.
11. AZZAROLO, A.M. et al. Presence of tear lipocalin and other major proteins in lacrimal fluid of rabbits. **Comparative Biochemistry and Physiology, Biochemistry & Molecular Biology**, v. 138, p. 111-117, 2004.
12. BALASUBRAMANIAN, S.A., et al. Levels of lactoferrin, secretory IgA and serum albumin in the tear film of people with keratoconus. **Experimental Eye Research**, v. 96, p. 132-137, 2011.

13. BALASUBRAMANIAN, S.A., et al. Preliminary identification of differentially expressed tear proteins in keratoconus. **Molecular vision**, v. 19, p. 2124-2134, 2013.
14. BANACH, T. et al. Applicability of 2D gel electrophoresis and liquid chromatography in proteomic analysis of urine using mass spectrometry MALDI-TOF. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 16, p. 587-592, 2013.
15. BARABINO, S., et al. Tear film and ocular surface tests in animal models of dry eye: uses and limitations. **Experimental Eye Research**, v. 79, p. 613-621, 2004.
16. BERGER, S. L.; KING, V. L. The fluctuation of tear production in the dog. **Journal American Animal Hospital Association**, v. 34, p. 79-83, 1998.
17. BONNET, B., et al. An update on molecular cat allergens: Fel d 1 and what else? Chapter 1: Fel d 1, the major cat allergen. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 14, p. 1-9, 2018.
18. BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
19. CAMPOS, C. F. et al. Proteomic analysis of dog tears for potential cancer markers. **Research in Veterinary Science**, v. 85, p. 349-352, 2008.
20. CANTU, M.D. et al. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, v. 31, p. 669-675, 2008.
21. CATHERMAN, A. D. et al. Top Down proteomics: Facts and perspectives. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 445, p. 683-693, 2014.
22. CHEN, L. et al. Characterization of the human tear metabolome by LC-MS/MS. **Journal of Proteome Research**, v. 10, p. 4876-4882, 2011.
23. CHEN, Z., et al. MicroRNA-450b-3p inhibits cell growth by targeting phosphoglycerate kinase 1 in hepatocellular carcinoma. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, p. 18805- 18815, 2019.
24. CHOY, C.K., et al. Water-soluble antioxidants in human tears: effect of the collection method. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 42, p. 3130–3134, 2001.

25. COLITZ, C.M.H. Doenças do sistema lacrimal. In: BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R. G. Manual Saunders: Clínica de pequenos animais. 3ª ed. São Paulo: Roca, p. 1416-1421, 2008.
26. COTTRELL, J.S. Protein identification using MS/MS data. **Journal of Proteomics**, v. 74, p. 1842-1851, 2011.
27. COUTURE, S., et al. Topical effect of various agents on gelatinase activity in the tear film of normal dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v.9, p. 157-164, 2006.
28. CRISPIN, S. The lacrimal system. In: PETERSEN-JONES, S.; CRISPIN, S. BSAVA manual of small animal ophthalmology. 2ª ed, England: BSAVA, p. 105-123, 2002.
29. CRISPIN, S.M. Tear-deficient and evaporative dry eye syndromes of the horse. **Veterinary Ophthalmology**, v. 3, p.87-92, 2000.
30. CROSS, T.G., et al. Serine/Threonine Protein Kinases and Apoptosis. **Experimental Cell Research**, v. 256, p. 34-41, 2000.
31. CULLEN, C.L., et al. Ulcerative keratitis associated with qualitative tear film abnormalities in cats. **Veterinary Ophthalmology**, v. 2, p. 197–204, 1999.
32. DART, D.A. Tear Lipocalin: structure and function. **The Ocular Surface**, v. 9, p. 126-138, 2011.
33. DAVIDSON, H.J., et al. Determination of protein concentrations and their molecular weight in tears from cats with normal corneas and cats with corneal sequestrum. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, p. 1756–1759, 1992.
34. DAVIDSON, H.J.; KUONEN, V.J. The tear film and ocular mucins. **Veterinary Ophthalmology**, v. 7, p. 71-77, 2004.
35. DAVIS, K.; TOWNSEND, W. Tear-film osmolarity in normal cats and cats with conjunctivitis. **Veterinary Ophthalmology**, v. 14, p. 54–59, 2011.
36. DE FREITAS CAMPOS, C., et al. Proteomic analysis of dog tears for potential cancer markers. **Research in Veterinary Science**, v. 85, p. 349–352, 2008.
37. DE SOUZA, G., et al. Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors. **Genome Biology**, v. 7, p. 1-11, 2006.

38. DONG, M.W.; ZHANG, K. Ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) in method development. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 63, p. 21-30, 2014.
39. DOR, M., et al. Investigation of the global protein content from healthy human tears, **Experimental Eye Research**, v. 179, p. 64-74, 2018.
40. DREYFUSS, J.L. et al. Altered hyaluronic acid content in tear fluid of patients with adenoviral conjunctivitis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, p. 455-462, 2015.
41. EL-ANEED, A., et al. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 44, p. 210-230, 2009.
42. EMIDIO, N.B., et al. Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações. **HU Revista**, v. 41, p.101-111, 2015.
43. ESMAEILI, S., et al. Apelin and stem cells: the role played in the cardiovascular system and energy metabolism. **Cell Biology International**, v. 43, p. 1332-1345, 2019.
44. EVANS, E., et al. Direct interaction between Rab3D and the polymeric immunoglobulin receptor and trafficking through regulated secretory vesicles in lacrimal gland acinar cells. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 294, p. 1-29, 2008.
45. EVANS, V., et al. Lacryglobin in human tears, a potential marker for cancer. **Journal of Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 29, p. 161–163, 2001.
46. FARIAS, E., et al. Comparison of two methods of tear sampling for protein quantification by Bradford method. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 261-264, 2013.
47. FEDORCHUK, C., et al. The *Escherichia coli* O157:H7 carbon starvation-inducible lipoprotein Slp contributes to initial adherence *in vitro* via the human polymeric immunoglobulin receptor. **PLoS One**, v. 14, p. 1-18, 2019.
48. FELBERG, S., et al. Reprodutibilidade na classificação do teste de cristalização do filme lacrimal em pacientes com síndrome de Sjogren. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 7, p. 228-33, 2008.
49. FENN, J. B., et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, p. 64-71, 1989.

50. FERREIRA, A.R.A. Delineamento proteômico do fluido lacrimal de cavalos. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2018, 90p. Tese de Doutorado.
51. FOULKES, G.N. The Correlation Between the tear film Lipid Layer and Dry eye Disease. **Survey of Ophthalmology**, v. 52, p. 369-374, 2007.
52. GAO, C.Y., et al. Cdk5 regulates activation and localization of Src during corneal epithelial wound closure. **Journal of Cell Science**, v. 117, p. 4089–4098, 2004.
53. GELATT, K.N., et al. *Veterinary Ophthalmology*, 5^a Ed., John Wiley & Sons Inc: Oxford, 2170p, 2013.
54. GIONFRIDDO, J.R., et al. Comparison of tear proteins of llamas and cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, p. 1289-1293, 2000b.
55. GIONFRIDDO, J.R., et al. Detection of lysozyme in llama, sheep, and cattle tears. **American Journal of Veterinary Research**, v.61, p.1294-1297, 2000a.
56. GORG, A., et al. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, p. 3665-3685, 2004.
57. GRAHN, B.H.; STOREY, E.S. Lacrimostimulants and lacrimomimetics, **Veterinary Clinical Small Animal**, v. 34, p. 739-753, 2004.
58. GRUS, F.H., et al. Analysis of tear protein patterns of dry-eye patients using fluorescent staining dyes and two-dimensional quantification algorithms. **Electrophoresis**, v. 22, p.1845-1850, 2001.
59. HAGAN, S., et al. Tear fluid biomarkers in ocular and systemic disease: potential use for predictive, preventive and personalised medicine. **The EPMA Journal**, v. 7, p.1-20, 2016.
60. HAMRAH, P., et al. Optimizing evaluation of Lissamine Green parameters for ocular surface staining. **Eye**, v. 25, p. 1429–1434, 2011.
61. HANSTOCK. H.G., et al. Tear Lactoferrin and Lysozyme as Clinically Relevant Biomarkers of Mucosal Immune Competence. **Frontiers in Immunology**, v.10, p. 1-11, 2019.
62. HAYAKAWA, E., et al. Peptidomic analysis of human reflex tear fluid. **Peptides**, v. 42, p. 63–69, 2013.

63. HEIN, M. Y. et al. Chapter 1 - Proteomic Analysis of Cellular Systems. In: WALHOUT, A.J.M., et al. Handbook of Systems Biology. 1^a ed., San Diego: Academic Press, p. 3-25, 2013.
64. HEMSLEY, S., et al. Protein microanalysis of animal tears. **Research in Veterinary Science**, v. 68, p. 207-209, 2000.
65. HERBER, S., et al. Changes in the tear protein patterns of diabetic patients using two-dimensional electrophoresis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 506, p.623–626, 2002.
66. HOHENSTEIN-BLAU, N.T., et al. Tears as a source of biomarkers for ocular and systemic diseases. **Experimental Eye Research**, v. 117, p. 126-137, 2013.
67. INATOMI, T., et al. Expression of secretory mucin genes by human conjunctival epithelia. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 37, p. 1684–1692, 1996.
68. JANSSEN, P.T.; VAN BIJSTERVELD, O.P. Comparison of electrophoretic techniques for the analysis of human tear fluid proteins. **Clinica Chimica Acta**, v. 114, p. 207-218, 1981.
69. JOHNSON, B.W., et al. Effects of inflammation and aqueous tear film deficiency on conjunctival morphology and ocular mucus composition in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, p. 820–824, 1990.
70. JOO, W.A., et al. Development of an effective sample preparation method for the proteome analysis of body fluids using 2-D gel electrophoresis. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 67, p. 1574-1577, 2003.
71. JOSEPH, R. et al. Differential epithelial and stromal protein profiles in keratoconus and normal human corneas. **Experimental Eye Research**, v. 92, p. 282-298, 2011.
72. KADOWAKI, T., et al. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, p. 1784–1792, 2006.
73. KAETZEL, C.S. The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. **Immunological Reviews**, v. 206, p. 83–99, 2005.

74. KALLÒ, G., et al. Changes in the Chemical Barrier Composition of Tears in Alzheimer's Disease Reveal Potential Tear Diagnostic Biomarkers. **Plos One**, v. 21, p., 1 – 14, 2016.
75. KATSAFADOU, A.I., et al. Applied Proteomics in Companion Animal Medicine. **Current Proteomics**, v.13, p.165-171, 2016.
76. KENNEDY, M.A., et al. Evaluation of antibodies against feline coronavirus 7b protein for diagnosis of feline infectious peritonitis in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 69, p. 1179–1182, 2008.
77. KENNY, A., et al. Proteins and microRNAs are differentially expressed in tear fluid from patients with Alzheimer's disease. **Scientific Reports**, v.9, p. 1-14, 2019.
78. KIJLSTRA, A., et al. Gel electrophoresis of human tears reveals various forms of tear lactoferrin. **Current Eye Research**, v. 8, p. 581-588, 1989.
79. KITSON, F.G., et al. Gas Chromatography and Mass Spectrometry - A Practical Guide, 1^a Ed., Academic: London, 632p., 1996.
80. KOCH, S. A.; SYKES, J. Keratoconjunctivitis sicca. In: RIIS, R.C. Small animal ophthalmology secrets, 1^a Ed., Philadelphia: Hanley & Belfus, p. 57-60, 2002.
81. KON, M., et al. Effects of a single bout of high-intensity interval exercise on C1q/TNF-related proteins. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 44, p. 47-51, 2019.
82. KUO, M.T., et al. Tear Proteomics Approach to Monitoring Sjögren Syndrome or Dry Eye Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20., p. 1-17, 2019.
83. LEMBACH, M., et al. Effect of external ocular surgery and mode of post-operative care on plasminogen, plasmin, angiostatins and a2-macroglobulin in tears. **Current eye research**, v. 22, p. 286-294, 2001.
84. LEMP, M.A.; BLACKMAN, H.J. Ocular surface defense mechanisms. **Annals of Ophthalmology**, v. 92, p. 61–63, 1981.
85. LI, B., et al. Tear proteomic analysis of Sjogren syndrome patients with dry eye syndrome by two-dimensional-nano-liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1-6, 2014.

86. LI, D.; ROBERTS, R. WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, p. 2085-2097, 2001.
87. LI, N., et al. Characterization of Human Tear Proteome Using Multiple Proteomic Analysis Techniques. **Journal of Proteome Research**, v. 4, p. 2052-2061, 2005.
88. LIM, C.C., et al. Effects of feline herpesvirus type 1 on tear film break-up time, Schirmer tear test results, and conjunctival goblet cell density in experimentally infected cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 70, p. 394–403, 2009.
89. LIM, C.C.; CULLEN, C.L. Schirmer tear test values and tear film break-up times in cats with conjunctivitis. **Veterinary Ophthalmology**, v. 8, p. 305–310, 2005.
90. MANTELLI, F., et al. The Cellular Mechanisms of Dry Eye: from pathogenesis to Treatment. **Journal of cellular Physiology**, v. 228, p. 2253-2256, 2013.
91. MASMALI, A.M., et al. Development of a new grading scale for tear ferning. **Contact Lens and Anterior Eye**, v. 37, p. 178-184, 2014.
92. MASMALI, A.M., et al. Structure and microanalysis of tear film ferning of camel tears, human tears, and Refresh Plus. **Molecular Vision**, v. 24, p. 305–314, 2018.
93. MATA, P., et al. Fel d 1 allergen: skin and or saliva? **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 69, p. 321-322, 1992.
94. MCCRACKEN, T.O., et al. Color atlas of small animal anatomy: the essentials, 1^a ed., Iowa: Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
95. MCKENZIE, R.W., et al. Quantification of MUC2 and MUC5AC transcripts in human conjunctiva. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 41, p. 710-708, 2000.
96. MCLAFFERTY, F. Tandem mass spectrometry. **Science**, v. 214, p. 280-287, 1981.
97. MEHRI, K., et al. Effect of troxerutin on apelin-13, apelin receptors (APJ), and ovarian histological changes in the offspring of high-fat diet fed rats. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 22, p. 22:637-642, 2019.

98. MILLER, P.E. Lacrimal system. In: MAGGS, D.J., et al. Slatter's fundamentals of veterinary ophthalmology. 5^a Ed., St. Louis: Elsevier Saunders, p. 165-183, 2013.
99. MOORE, C.P. Qualitative tear film disease. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 20, p. 565–581, 1999.
100. MOORE, C.P., et al. Density and distribution of canine conjunctival goblet cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 28, p. 1925-1932, 1987.
101. NÄTTINEN, J.J., et al. Age-associated changes in human tear proteome. **Clinical Proteomics**, v. 16, p. 1-11, 2019.
102. NEER, E.J., et al. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. **Nature**, v. 371, p. 297–300, 1994.
103. NIGG, E.A. Cyclin-dependent protein kinases, key regulators of the eukaryotic cell cycle. **BioEssays**, v. 17, p. 471-480, 1995.
104. NIU, G.J., et al. The polymeric immunoglobulin receptor-like protein from *Marsupenaeus japonicus* is a receptor for White spot syndrome virus infection. **PLOS Pathogens**, v. 15, p. 1-28, 2019.
105. OHASHI, Y., et al. Laboratory findings in tear fluid analysis. **Clinica Chimica Acta**, v. 369, p. 17-28, 2006.
106. OLLIVIER, F. J., et al. Profiles of metalloproteinase activity in equine tear fluid during corneal healing in 10 horses with ulcerative keratitis. **Veterinary Ophthalmology**, v. 7, p. 397-405, 2004.
107. OLLIVIER, F.J., et al. Ophthalmic examination and diagnostics. Part 1: The eye examination and diagnostic procedures. In: GELATT, K.N. Veterinary Ophthalmology. 4^a Ed. Ames: Blackwell Publishing, p. 438-483, 2007.
108. ORIÁ, A.P., et al. Tear ferning test in healthy dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v. 21, p. 391–398, 2018.
109. PENG, C.C., et al. Evaporation-driven instability of the pre corneal tear film. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 206, p. 250-264, 2013.
110. PFLUGFELDER, S.C., et al. Detection of sialomucin complex (MUC4) in human ocular surface epithelium and tear fluid. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 125, p. 323–336, 2000.

111. PICCIONE, G., et al. Daily rhythm of tears production in normal dog maintained under different Light/Dark cycles. **Research in Veterinary Science**, v. 86, p. 521-524, 2009.
112. PINARD, C.L., et al. Evaluation of lysozyme and lactoferrin in lacrimal and other ocular glands of bison and cattle and in tears of bison. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, p. 104-108, 2003.
113. PINTO, L.D., et al. Soroepidemiologia de *Toxoplasma gondii* em gatos domiciliados atendidos em clínicas particulares de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, p. 2464-2469, 2009.
114. POSA, A., et al. Schirmer strip vs. capillary tube method: non-invasive methods of obtaining proteins from tear fluid. **Annals of Anatomy**, v. 195, p. 137-142, 2013.
115. RAPOSO, A.C.S., et al. Evaluation of lacrimal production, osmolarity, crystallization, proteomic profile, and biochemistry of capuchin monkeys tear film. **Journal of Medical Primatology**, v. 47, p. 1-8, 2018.
116. REDL, B. Human tear lipocalin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1482, p. 241-248, 2000.
117. ROLANDO, M. Tear mucus ferning test in normal and keratoconjunctivitis sicca eyes. **Chibret International Journal Ophthalmology**, v. 2, p. 32-41, 1984.
118. ROSALES, J.L.; LEE, K.Y. Extraneuronal roles of cyclin-dependent kinase 5. **BioEssays**, v. 28, p. 1023-1034, 2006.
119. RUNSTROM, G., et al. The fall and rise of tear albumin levels: a multifactorial phenomenon. **The Ocular Surface**, v. 11, p. 165–180, 2013.
120. SAITO, A. et al. The effect of third eyelid gland removal on the surface of dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v. 4, p. 13–18, 2001.
121. SAITO, A.; KOTANI, T. Estimation of lacrimal level and testing methods on normal beagle. **Veterinary Ophthalmology**, v. 4, p. 7-11, 2001.
122. SALVISBERG, C., et al. Exploring the human tear fluid: discovery of new biomarkers in multiple sclerosis. **PROTEOMICS - Clinical Applications**, v. 8, p. 185–194, 2014.
123. SAMUELSON, D.A. Ophthalmic Anatomy In: *Veterinary Ophthalmology 5^a Ed.* Philadelphia: Blackwell Publishers, p. 58-60, 2013.

124. SCHERER, P.E. From Lipid Storage Compartment to Endocrine Organ. **Diabetes**, v. 55, p. 1537–1545, 2006.
125. SEBBAG, L., et al. Effect of tear collection on lacrimal total protein content in dogs and cats: a comparison between Schirmer strips and ophthalmic sponges. **BMC Vet Research**, v. 14, p. 61-68, 2018.
126. SEBBAG, L., et al. Histamine-induced conjunctivitis and breakdown of blood–tear barrier in dogs: a model for ocular pharmacology and therapeutics. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 1-11, 2019.
127. SEBBAG, L., et al. Reference values, intertest correlations, and test-retest repeatability of selected tear film tests in healthy cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 246, p. 426-435, 2015.
128. SHAMSI, F.A., et al. Analysis and Comparison of Proteomic Profiles of Tear Fluid from Human, Cow, Sheep, and Camel Eyes. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 52, p. 9156-9165, 2011.
129. SILVA, L.R., et al. Tear ferning test in horses and its correlation with ocular surface evaluation. **Veterinary Ophthalmology**, v. 19, p. 117-123, 2016.
130. SLATTER, D. Fundamentals of Ophthalmology Veterinary. 3^a Ed., W.B. Saunders Company, 478p, 2008.
131. SMITH, T.F., et al. The WD repeat: a common architecture for diverse functions. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 24, p. 181–185, 1999.
132. SMITH, W., et al. Fel d 4, a cat lipocalin allergen. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 34, p. 1732-1738, 2004.
133. SORIA, J., et al. Tear proteome analysis in ocular surface diseases using label-free LC-MS/MS and multiplexed microarray biomarker validation. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1 -15, 2017.
134. SORIA, J., et al. Tear proteome and protein network analyses reveal a novel pentamer panel for tear film characterization in dry eye and meibomian gland dysfunction. **Journal of Proteomics**, v. 78, p. 94-112, 2013.
135. STANSFIELD, W.E., et al. The Pathophysiology of Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. In: Cellular and Molecular Pathobiology of Cardiovascular Disease. 1^a Ed., San Diego: Elsevier, 338p., 2014.
136. SUGIURA, Y., et al. Immunohistolocalization and Gene Expression of the Carbonic Anhydrase Isoenzymes (CA-II and CA-III) in Glands Associated

- with the Canine Lacrimal Apparatus. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 39, p. 1-6, 2010.
137. TANAKA, K., et al. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 2, p. 151-153, 1988.
138. TASHIAN, R.E. Genetics of the mammalian carbonic anhydrases. **Advances in genetics**, v. 30, p. 321–356, 1992.
139. TASHIAN, R.E. The carbonic anhydrases: widening perspectives on their evolution, expression and function. **BioEssays**, v. 10, p.186–192, 1989.
140. THOMASY, S.M., et al. Evaluation of orally administered famciclovir in cats experimentally infected with feline herpesvirus type-1. **American Journal of Veterinary Research**, v. 72, p. 85–95, 2011.
141. TOMLINSON, A.; KHANAL, S. Assessment of tear film dynamics: quantification approach. **The Ocular Surface**, v. 3, p. 81-95, 2005.
142. TSUBOTA, K.; TSENG, S.C.G. Anatomy and Physiology of Ocular Surface. In: *Ocular Surface Diseases: Medical and Surgical Management*, 1^a Ed., New York: Springer-Verlag, p. 3-15, 2001.
143. UBIPARIP, Z., et al. Thermostable alpha-glucan phosphorylases: characteristics and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 1-16, 2018.
144. UHL, L.K., et al. Clinical features of cats with aqueous tear deficiency: a retrospective case series of 10 patients (17 eyes). **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 21, p. 944-950, 2018.
145. VAN HAERINGEN, N.J. Clinical biochemistry of tears. **Survey of Ophthalmology**, v. 26, p. 84–96, 1981.
146. VERSURA, P. et al. Predictive role of tear protein expression in the early diagnosis of Sjögren's syndrome. **Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine**, v. 55, p. 561-570, 2018.
147. WANG, J., et al. Cloning and in vitro expression of rat lecithin:cholesterol acyltransferase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1346, p. 207-211, 1997.
148. WILLCOX, M.D.P. Tearfilm, contact lenses and tear biomarkers. **Clinical and Experimental Optometry**, v. 102, p. 350-363, 2019.

149. WINIARCZYK, M., et al. Dog Tear Film Proteome In-Depth Analysis. **PLoS One**, v. 10, p. 1-15, 2015.
150. WOODWARD, A.M.; ARGUESO, P. Expression analysis of the transmembrane mucin MUC20 in human corneal and conjunctival epithelia. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 55, p. 6132–6138, 2014.
151. WU, K.; ZHANG, Y. Clinical application of tear proteomics: presente and prospects. **PROTEOMICS - Clinical Applications**, v. 1, p. 972–982, 2007.
152. YANQIU, H.U., et al. Pharmacophore modeling, multiple docking, and molecular dynamics studies on Wee1 kinase inhibitors, **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 37, p.2703-2715, 2019.
153. YU, D.F., et al. MUC19 expression in human ocular surface and lacrimal gland and its alteration in Sjogren syndrome patients. **Experimental Eye Research**, v. 86, p. 403–411, 2008.
154. ZHANG, Y., et al. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. **Chemical Reviews**, v. 113, p. 2343-2394, 2013.
155. ZHAO, Z., et al. Tear lipocalin is the predominant phosphoprotein in human tear fluid. **Experimental Eye Research**, v.90, p.344-349, 2010.
156. ZHOU, L., et al. Analysis of rabbit tear proteins by high-pressure liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 17, p. 401-412, 2003.
157. ZHOU, L., et al. Characterisation of human tear proteins using high-resolution mass spectrometry. **ANNALS Academy of Medicine Singapore**, v. 35, p. 400-407, 2006.
158. ZHOU, L., et al. In-depth analysis of the human tear proteome. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 3877-3885, 2012.
159. ZHOU, L., et al. Proteomic analysis of rabbit tear fluid: defensin levels after an experimental corneal wound are correlated to wound closure. **Proteomics**, v. 7, p. 3194-3206, 2007.
160. ZHOU, L.; BEUERMAN, R.W. Tear analysis in ocular surface diseases. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 31, p. 527-550, 2012.
161. ZHOU, L.; BEUERMAN, R.W. The power of tears: how tear proteomics research could revolutionize the clinic. **Expert Review of Proteomics**, v.14, p. 189-191, 2017.

ANEXO A

a. Normas da revista AVS – Research article

b. Criteria

Research articles are welcomed within all areas of veterinary medicine. As an international research journal, manuscripts are welcomed from all parts of the world. Priority is given to studies of interest to a broader group of veterinarians/researchers. As *Acta Veterinaria Scandinavica* is also the official research journal of the Nordic countries, we also welcome studies of particular relevance to northern Europe or the Arctic region, including Canada and Alaska.

Studies should have been done thoroughly using high ethical standards. Experimental studies must be accompanied with a statement confirming approval from the appropriate body and must have been done using criteria according to international guidelines, at least equivalent to requirements in the European Union. Studies of relevance only for regions outside northern Europe or the Arctic region are generally not considered. We expect that manuscripts are prepared in detail according to journal requirements and written in a concise fluent scientific English. We also recommend that recently published articles are viewed to see journal lay-out, in particular how figures and tables are displayed.

c. Preparing your manuscript

The information below details the section headings that you should include in your manuscript and what information should be within each section. Please note that your manuscript must include a 'Declarations' section including all of the subheadings (please see below for more information).

d. Title page

The title page should:

- present a title that includes, if appropriate, the study design
- list the full names and institutional addresses for all authors
 - if a collaboration group should be listed as an author, please list the Group name as an author. If you would like the names of the individual members of the Group to be searchable through their individual PubMed records, please include this information in the “Acknowledgements” section in accordance with the instructions below
- indicate the corresponding author

e. Abstract

The Abstract should not exceed 350 words. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract. The abstract must include the following separate sections:

- **Background:** the context and purpose of the study
- **Results:** the main findings
- **Conclusions:** a brief summary and potential implications

f. Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

g. Background

The Background section should explain the background to the study, its aims, a summary of the existing literature and why this study was necessary.

h. Results

This should include the findings of the study including, if appropriate, results of statistical analysis which must be included either in the text or as tables and figures.

i. Discussion

For research articles this section should discuss the implications of the findings in context of existing research and highlight limitations of the study. For study protocols and methodology manuscripts this section should include a discussion of any practical or operational issues involved in performing the study and any issues not covered in other sections.

j. Conclusions

This should state clearly the main conclusions and provide an explanation of the importance and relevance of the study to the field.

k. Methods

The methods section should include:

- the aim, design and setting of the study
- the characteristics of participants or description of materials
- a clear description of all processes, interventions and comparisons. Generic names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses
- the type of statistical analysis used, including a power calculation if appropriate

I. List of abbreviations

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations can be provided.

m. Declarations

All manuscripts must contain the following sections under the heading 'Declarations':

- Ethics approval and consent to participate
- Consent for publication
- Availability of data and materials
- Competing interests
- Funding
- Authors' contributions
- Acknowledgements
- Authors' information (optional)

Please see below for details on the information to be included in these sections. If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

n. Ethics approval and consent to participate

Manuscripts reporting studies involving human participants, human data or human tissue must:

- include a statement on ethics approval and consent (even where the need for approval was waived)
- include the name of the ethics committee that approved the study and the committee's reference number if appropriate

Studies involving animals must include a statement on ethics approval and for experimental studies involving client-owned animals, authors must also include a statement on informed consent from the client or owner. If your manuscript does not report on or involve the use of any animal or human data or tissue, please state "Not applicable" in this section.

o. Consent for publication

If your manuscript contains any individual person's data in any form (including any individual details, images or videos), consent for publication must be obtained from that person, or in the case of children, their parent or legal guardian. All presentations of case reports must have consent for publication.

You can use your institutional consent form or our consent form if you prefer. You should not send the form to us on submission, but we may request to see a copy at any stage (including after publication). See our editorial policies for more information on consent for publication. If your manuscript does not contain data from any individual person, please state “Not applicable” in this section.

p. Availability of data and materials

All manuscripts must include an ‘Availability of data and materials’ statement. Data availability statements should include information on where data supporting the results reported in the article can be found including, where applicable, hyperlinks to publicly archived datasets analysed or generated during the study. By data we mean the minimal dataset that would be necessary to interpret, replicate and build upon the findings reported in the article. We recognise it is not always possible to share research data publicly, for instance when individual privacy could be compromised, and in such instances data availability should still be stated in the manuscript along with any conditions for access.

Data availability statements can take one of the following forms (or a combination of more than one if required for multiple datasets):

- The datasets generated and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS]
- The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.
- All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].
- The datasets generated and/or analysed during the current study are not publicly available due [REASON WHY DATA ARE NOT PUBLIC] but are available from the corresponding author on reasonable request.
- Data sharing is not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.
- The data that support the findings of this study are available from [third party name] but restrictions apply to the availability of these data, which were used under license for the current study, and so are not publicly available. Data are

however available from the authors upon reasonable request and with permission of [third party name].

- Not applicable. If your manuscript does not contain any data, please state 'Not applicable' in this section.

More examples of template data availability statements, which include examples of openly available and restricted access datasets, are available here. BioMed Central also requires that authors cite any publicly available data on which the conclusions of the paper rely in the manuscript. Data citations should include a persistent identifier (such as a DOI) and should ideally be included in the reference list. Citations of datasets, when they appear in the reference list, should include the minimum information recommended by DataCite and follow journal style. Dataset identifiers including DOIs should be expressed as full URLs. For example:

Hao Z, AghaKouchak A, Nakhjiri N, Farahmand A. Global integrated drought monitoring and prediction system (GIDMaPS) data sets. figshare. 2014. <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.853801>

With the corresponding text in the Availability of data and materials statement:

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS].^[Reference number]

If you wish to co-submit a data note describing your data to be published in [BMC Research Notes](#), you can do so by visiting our [submission portal](#). Data notes support [open data](#) and help authors to comply with funder policies on data sharing. Co-published data notes will be linked to the research article the data support ([example](#)).

q. Competing interests

All financial and non-financial competing interests must be declared in this section. See our editorial policies for a full explanation of competing interests. If you are unsure whether you or any of your co-authors have a competing interest please contact the editorial office. Please use the authors initials to refer to each authors' competing interests in this section. If you do not have any competing interests, please state "The authors declare that they have no competing interests" in this section.

r. Funding

All sources of funding for the research reported should be declared. The role of the funding body in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript should be declared.

s. Authors' contributions

The individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section. Guidance and criteria for authorship can be found in our editorial policies. Please use initials to refer to each author's contribution in this section, for example: "FC analyzed and interpreted the patient data regarding the hematological disease and the transplant. RH performed the histological examination of the kidney, and was a major contributor in writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript."

t. Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the article who does not meet the criteria for authorship including anyone who provided professional writing services or materials. Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section. See our editorial policies for a full explanation of acknowledgements and authorship criteria. If you do not have anyone to acknowledge, please write "Not applicable" in this section. Group authorship (for manuscripts involving a collaboration group): if you would like the names of the individual members of a collaboration Group to be searchable through their individual PubMed records, please ensure that the title of the collaboration Group is included on the title page and in the submission system and also include collaborating author names as the last paragraph of the "Acknowledgements" section. Please add authors in the format First Name, Middle initial(s) (optional), Last Name. You can add institution or country information for each author if you wish, but this should be consistent across all authors. Please note that individual names may not be present in the PubMed record at the time a published article is initially included in PubMed as it takes PubMed additional time to code this information.

u. Authors' information

This section is optional. You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include

details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

v. Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables. Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.

w. References

Examples of the Vancouver reference style are shown below. See our editorial policies for author guidance on good citation practice

Web links and URLs: All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, as well as the date the site was accessed, in the following format: The Mouse Tumor Biology Database. <http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>. Accessed 20 May 2013. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

x. Example reference style:

Article within a journal

Smith JJ. The world of science. *Am J Sci.* 1999;36:234-5.

Article within a journal (no page numbers)

Rohrmann S, Overvad K, Bueno-de-Mesquita HB, Jakobsen MU, Egeberg R, Tjønneland A, et al. Meat consumption and mortality - results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *BMC Medicine.* 2013;11:63.

Article within a journal by DOI

Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Dig J Mol Med.* 2000; doi:10.1007/s801090000086.

Article within a journal supplement

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. *Blood* 1979;59 Suppl 1:26-32.

Book chapter, or an article within a book

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. *International review of cytology*. London: Academic; 1980. p. 251-306.

OnlineFirst chapter in a series (without a volume designation but with a DOI)

Saito Y, Hyuga H. Rate equation approaches to amplification of enantiomeric excess and chiral symmetry breaking. *Top Curr Chem*. 2007. doi:10.1007/128_2006_108.

Complete book, authored

Blenkinsopp A, Paxton P. *Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness*. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

Online document

Doe J. Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. 1999. <http://www.rsc.org/dose/title> of subordinate document. Accessed 15 Jan 1999.

Online database

Healthwise Knowledgebase. *US Pharmacopeia*, Rockville. 1998. <http://www.healthwise.org>. Accessed 21 Sept 1998.

Supplementary material/private homepage

Doe J. Title of supplementary material. 2000. <http://www.privatehomepage.com>. Accessed 22 Feb 2000.

University site

Doe, J: Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html> (1999). Accessed 25 Dec 1999.

FTP site

Doe, J: Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt> (1999). Accessed 12 Nov 1999.

Organization site

ISSN International Centre: The ISSN register. <http://www.issn.org> (2006). Accessed 20 Feb 2007.

Dataset with persistent identifier

Zheng L-Y, Guo X-S, He B, Sun L-J, Peng Y, Dong S-S, et al. Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). GigaScience Database. 2011. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

ANEXO B

Certificado protocolo CEUA 003/17

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 003/17**, relativo ao projeto intitulado **Padronização do Teste da Cristalização da Lágrima (TCL) com comparação com o Teste Lacrimal de Schirmer 1 (TLS-1) e análise proteômica da lágrima de felinos domésticos hígidos**, da **Dra. Renata Santiago Alberto Carlos**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UESC)**. Este Protocolo foi aprovado dia 25/05/2017. Este certificado é válido por 02 (dois) anos, a partir da data de sua emissão.

Ilhéus, 26 de maio de 2017.

Rosana Maria de Oliveira Clark
Coordenadora CEUA-UESC

Rosana Maria de Oliveira Clark
Coordenadora da CEUA - UESC
Cad.: 73.509.169-3

ANEXO C

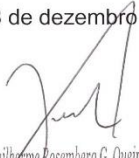
Certificado protocolo CEUA 024/15

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 024/15**, relativo ao projeto intitulado **Caracterização da resposta imune inata mediada por fagócitos em gatos naturalmente infectados pelo FIV, suplementados com nutracêuticos, e exposto a infecção experimental por Toxoplasma gondii**, do **Dr. Alexandre Dias Munhoz**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UESC)**. Este Protocolo foi aprovado dia 08/12/2015. Este certificado é válido por 03 (três) anos, a partir da data de sua emissão.

Ilhéus, 08 de dezembro de 2015.


Prof. Guilherme Rosenberg G. Queiroz
Presidente do CEUA - UESC
Câd.: 73.333.462-1

ANEXO D

Protocolo do teste rápido para FIV/FeLV

FIV Ac/FeLV Ag

Kit diagnóstico rápido

Alere FIV Ac/FeLV Ag Test Kit é um imunoenensaio cromatográfico para detecção qualitativa e simultânea dos anticorpos IgG do vírus da imunodeficiência Felina (FIV) e antígenos do vírus da Leucemia Felina (FeLV) no sangue total, soro ou plasma.

Indicações:

Vendas de filhotes: Utilizado como uma garantia de saúde do filhote comercializado.

Primeira consulta/Antes da vacinação: Auxilia no diagnóstico precoce e controle sanitário dos animais.

Animais recém adquiridos: Evita a disseminação da doença e/ou a transmissão para animais que já residem no ambiente.

Animais semi-domiciliados ou que tenham contato com outros animais errantes: Fazem parte de grupos de riscos e devem realizar o teste periodicamente.

Animais assintomáticos: Animais podem conviver anos com estas doenças sem apresentar nenhum sintoma, sendo assim recomendado o controle periódico.

Diagnóstico diferencial e sintomas inespecíficos: A FIV e a FeLV predisõem aos gatos acometidos várias doenças e quadros mórbidos. Estes retrovírus destroem as células de defesa do felino, proporcionando infecções secundárias como distúrbios intestinais, problemas neurológicos, anemias profundas, infecções na pele, micoses, gengivites, periodontites, otites e falência orgânica mais tardiamente. Animais que apresentam estes sintomas clínicos devem realizar diagnóstico para FIV e FeLV.

Uso em gatos: Visando a obtenção e/ou manutenção do status de livre de FIV/FeLV, é aconselhável que gatos tenham um programa para monitoramento da doença.

Procedimento



Interpretação



Registro MAPA: 9.691/2012.



Alere S.A.
Rua dos Pinheiros, 498 - 7º andar
Pinheiros - São Paulo - SP
Tel: 0800 11 33 82
e-mail: vet@alere.com.br | alere.com

ANEXO E

Protocolo da realização da RIFI para *T. gondii***1. Purificação do parasito para sensibilização das lâminas:**

- A. Transferir o sobrenadante da garrafa infectada para um tubo falcon.
- B. “Raspar” a garrafa de parasito com cell scraper e adicionar ao tubo falcon anterior.
- C. Passa todo o conteúdo na seringa com agulha 22g.
- D. Filtrar o conteúdo em filtro de seringa com poro de 5µm.
- E. Centrifugar a 1500 RPM, durante 10 minutos.
- F. Descartar o sobrenadante e ressuspender o conteúdo em PBS 1X.
- G. Centrifugar a 1500 RPM, 4°C, durante 10 minutos
- H. Ressuspender em PBS 1X.
- I. Descartar o sobrenadante e ressuspender o conteúdo em PBS 1X
- J. Centrifugar a 1500 RPM durante 10 minutos
- K. Descartar o sobrenadante, deixando aproximadamente 1mL.
- L. Transferir o conteúdo para um eppendorf.
- M. Centrifugar com PBS e contar os parasitos utilizando a câmara de Neubauer.
- N. Ajustar a concentração para 2500 taquizoítas/ µl.
- O. Pipetar 10 µl da solução em cada poço da lâmina previamente lavada e seca.
- P. Manter as lâminas em estufa a 37°C durante 30 minutos (até secagem total).
- Q. Imergir as lâminas em metanol por 5 minutos.
- R. Retirar o excesso de metanol e congelar as lâminas (-20°C) até o uso.

2. Detecção de anticorpos IgG anti- *T. gondii*:

- A. Retiras as lâminas sensibilizadas do congelador e aguardar até que fiquem em temperatura ambiente.
- B. Lavar em tampão PBS (pH 7,2) por imersão durante 5 minutos.
- C. Diluir o soro em PBS e pipetar 10 µl/poço
- D. Incubar em câmara úmida a 37°C durante 45 minutos.
- E. Lavar 3 vezes sucessivas com PBS, seguida por uma lavagem por imersão durante 5 minutos.
- F. Secar as lâminas em temperatura ambiente.
- G. Pipetar 10 µl/poço do conjugado anti-IgG felino Sigma (Anti-Cat IgG – F4262, Sigma-Aldrich ®) na diluição de 1:128

- H. Incubar em câmara úmida a 37°C durante 45 minutos, protegido da luz.
- I. Lavar como descrito nos itens 5.
- J. Remover o excesso de tampão de lavagem, cobrir a lâmina com glicerina tamponada e lamínula.
- K. Realizar a leitura em microscópio de fluorescência.

3. Detecção de anticorpos IgM anti- *T. gondii*:

- A. Retiras as lâminas sensibilizadas do congelador e aguardar até que fiquem em temperatura ambiente.
- B. Lavar em tampão PBS (pH 7,2) por imersão durante 5 minutos.
- C. Diluir o soro em PBS e pipetar 5 µl/poço
- D. Incubar em câmara úmida a 37°C durante 45 minutos.
- E. Lavar 3 vezes sucessivas com PBS, seguida por uma lavagem por imersão durante 5 minutos.
- F. Secar as lâminas em temperatura ambiente.
- G. Pipetar 5 µl/poço do conjugado Anti- Feline IgM – heavy chain specific – conjugado com isotiocianato de fluoresceína (VMRD).
- H. Incubar em câmara úmida a 37°C durante 45 minutos, protegido da luz.
- I. Lavar como descrito no item 5.
- J. Remover o excesso de tampão de lavagem, cobrir a lâmina com glicerina tamponada e lamínula.
- K. Realizar a leitura em microscópio de fluorescência.

ANEXO F

Protocolo da realização da RIFI para Coronavírus

O protocolo foi realizado de acordo com as instruções do fabricante do teste. Inicialmente todos os reagentes e soros a serem testados foram colocados à temperatura ambiente. Em seguida preparou-se uma diluição de rastreio 1:20, em Solução Salina Tamponada (PBS) para cada amostra dos soros dos animais, conforme KENNEDY et al (2008). Foram adicionados 15 μ do soro diluído em PBS em cada poço da lâmina. Nos testes realizados houve a presença do controle positivo e negativo. O controle positivo era proveniente de um soro felino reativo com títulos de 1:20 a 1:320 e para o controle negativo foi utilizado um soro não reativo, ambos cedidos pelo laboratório fabricante do teste. As lâminas foram colocadas em uma câmara úmida e incubadas por 30 minutos a $37^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Posteriormente foram lavadas com um fluxo suave de PBS por três vezes e adicionou-se o conjugado espécie específico marcado com isotiocianato de fluoresceína. As lâminas foram novamente incubadas em câmara de úmida por 30 minutos à $37^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, secas e preparadas com meio de montagem e lamínula para a leitura da reação em microscópio epifluorêscence em um aumento de 400 vezes.