



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**DELINEAMENTO PROTEÔMICO DO FLUIDO LACRIMAL DE EQUINOS**

**ANA RAQUEL DE ARAÚJO FERREIRA**

**TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASÍLIA/DF  
NOVEMBRO DE 2018**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**DELINEAMENTO PROTEÔMICO DO FLUIDO LACRIMAL DE EQUINOS**

**ANA RAQUEL DE ARAÚJO FERREIRA**

**ORIENTADORA: PAULA GALERA DINIZ**

**CO-ORIENTADOR: WAGNER FONTES**

**TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**PUBLICAÇÃO: 205D/ 2018**

**BRASÍLIA/DF  
NOVEMBRO DE 2018**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**DELINEAMENTO PROTEÔMICO DO FLUIDO LACRIMAL DE EQUINOS**

**ANA RAQUEL DE ARAÚJO FERREIRA**

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO  
DO GRAU DE DOUTORA EM CIÊNCIAS  
ANIMAIS.**

**APROVADA POR:**

---

**Paula Diniz Galera, Dra. (Universidade de Brasília).  
(ORIENTADORA)**

---

**Maria Regina Catai Chalita, Dra. (Universidade de Brasília – Faculdade de Medicina).  
(EXAMINADORA INTERNA)**

---

**Francislete Rodrigues de Melo, Dra. (Centro de Ensino Unificado de Brasília - UniCEUB).  
(EXAMINADORA EXTERNA)**

---

**Alexandre de Lima Andrade , Dr. (Universidade Estadual Paulista – UNESP Araçatuba).  
(EXAMINADOR EXTERNO)**

**BRASÍLIA/DF, 23 de novembro de 2018**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

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.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e seu orientador reservam para si os direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta dissertação pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor ou de seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

## FICHA CATALOGRÁFICA

dF383d	de Araújo Ferreira, Ana Raquel DELINEAMENTO PROTEÔMICO DO FLUIDO LACRIMAL DE EQUINOS / Ana Raquel de Araújo Ferreira; orientador Paula Diniz Galera; co-orientador Wagner Fontes. -- Brasília, 2018. 89 p.
	Tese (Doutorado - Mestrado em Ciência Animal) -- Universidade de Brasília, 2018.
	1. Cavalo. 2. Delineamento proteômico. 3. Lágrima. I. Diniz Galera, Paula , orient. II. Fontes, Wagner, co orient. III. Título.

## EPÍGRAFE

*Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o Céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe.*

*Leonardo da Vinci*

## DEDICATÓRIA

Dedico esta tese *in memoriam* a minha querida mãe Zilma Carvalho de A. Ferreira e minha irmã Leonília Maria, que sempre apostaram no meu sucesso. Ofereço também ao meu amado pai, Benedito Genésio Ferreira que através do seu exemplo, afeto e apoio moral e financeiro, me forneceu todo o suporte que foi de essencial importância na minha caminhada para que eu me tornasse a mulher e a profissional que eu sou hoje.

## AGRADECIMENTOS

Foram quatro anos de muito trabalho e empenho até chegar a um trabalho final para ser avaliado por uma banca de renomados professores doutores. O doutorado constituiu-se um grande desafio, não apenas no mérito da pesquisa, que por si só já foi por demais desafiadora, mas também por adentrar em uma nova Universidade, com novos profissionais e diferentes condutas de trabalho; uma cidade nova, a falta de amigos nos primeiros momentos de Brasília e o medo, tudo foi bem difícil, mas vejo que valeu a pena. Cresci e melhorei, como pessoa e profissional!

Nesse caminho houve a participação de muitas pessoas e instituições que foram de fundamental importância na concepção desta pesquisa.

Primeiramente agradeço a minha orientadora de doutorado, professora Paula Diniz Galera, por, mesmo não me conhecendo, ter acreditado no meu potencial e aceitado me orientar; me passando ensinamentos, dicas, orientações, debates e correções que fizeram com que eu pudesse me formar uma pesquisadora na área de oftalmologia veterinária; e por hoje considerá-la uma amiga.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto, possibilitando a aquisição de materiais fundamentais à pesquisa.

Ao 1º Regimento de Cavalaria de Guarda do Exército Brasileiro (RCG), com sede em Brasília por disponibilizar os animais que participaram do trabalho, nas pessoas do Coronel Meirione, Tenente Renan e Cabo Lucas que foram de fundamental importância na seleção, separação e contenção dos cavalos para coleta do material de pesquisa.

Ao Hospital Veterinário de pequenos animais da UnB, em especial ao Setor de Oftalmologia Veterinária, por oferecer um ambiente rico em oportunidades, debates e boas amizades que permitiram aprimorar o conhecimento no vasto ramo da oftalmologia veterinária; obrigada Rafaela Ribon Tozzete, Rose Araújo, Clarissa de Carvalho e Ana Carolina Rodarte.

Agradeço a minha amiga Gabriela Souza que me ajudou da forma mais linda que ela poderia; “me deu tempo para escrever”!

Ao laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas (LBQP) do Instituto de Biologia da UnB, por fornecer as instalações e equipamentos necessários para as análises das proteínas lacrimais;

Ao meu querido Co-orientador, professor Wagner Fontes, sem o qual nada seria possível, pois me forneceu todo o suporte para conseguir dar prosseguimento e finalizar este árduo trabalho, não somente na forma de ensinamentos, mas através de estímulo, paciência e carinho nos momentos mais pesados da pesquisa; o meu mais sincero agradecimento!

A equipe do LBQP, nas pessoas de Arthur Pontes, que me auxiliou e ensinou a realizar o processamento das amostras, e dos professores Mariana de Souza Castro, Marcelo Valle de Sousa e Carlos André Ornelas Ricart.

A Bruno Ceolin, pessoa maravilhosa que tive a sorte de encontrar no meio do curso de doutorado e que agora tenho a honra de ser casada; obrigada pelo carinho e compreensão, e por fornecer o ambiente e condições necessárias para que eu conseguisse redigir este trabalho.

À minha família, que sempre torceu pelo meu sucesso e que sente orgulho desta minha conquista;

Por fim, a todos que diretamente ou indiretamente, participaram desta conquista.

Muito obrigada!

## ÍNDICE

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA .....	01
Introdução .....	02
Problemática e relevância .....	04
Objetivos .....	05
Revisão de literatura .....	06
Fluido lacrimal .....	06
Composição do fluido lacrimal .....	07
Coleta e armazenamento do fluido lacrimal .....	09
Espectrometria de Massa (MS) e Análise do Fluido lacrimal .....	10
Referências Bibliográficas .....	15
 CAPÍTULO 2 - PERFIL QUALITATIVO DAS PROTEÍNAS CONTIDAS NO FLUIDO LACRIMAL DE EQUINOS ( <i>Equus caballus</i> ) .....	 19
Resumo .....	20
Abstract .....	21
Introdução .....	22
Material e Métodos .....	24
Resultados .....	31
Discussão .....	33
Conclusão .....	37
Referências bibliográficas.....	38
 CAPÍTULO 3 - ANÁLISE COMPARATIVA DO PROTEOMA LACRIMAL DE CAVALOS .....	 41
Resumo .....	42
Abstract .....	43
Introdução .....	44
Material e Métodos .....	46
Resultados .....	52
Discussão .....	59
Conclusão .....	65
Referências bibliográficas.....	66
 CAPÍTULO 4 - CULTURA E SENSIBILIDADE BACTERIANA DA CONJUNTIVA OCULAR DE EQUINOS DE BRASÍLIA, BRASIL .....	 70
Bacterial culture and antibiotic sensitivity from the ocular conjunctiva of horses .....	70
Abstract .....	71
Resumo .....	71
Introduction .....	72
Materials and Methods .....	73
Results and discussion .....	75
Conclusion .....	82
References .....	83
 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	 89

## RESUMO GERAL

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, um tecido, um certo tipo celular, ou um fluido biológico, como a lágrima. O fluido lacrimal pré corneal é considerado uma amostra ideal para diagnóstico rápido pela sua relativa pureza e coleta não invasiva, sem necessidade de contenção química dos animais. Com o aprimoramento da espectrometria de massa foi possível demonstrar com mais clareza que mudança no perfil proteico lacrimal reflete alterações oculares e sistêmicas, mas em animais domésticos poucos estudos foram realizados nesse sentido. Afim de realizar a análise qualitativa e comparativa do proteoma da lagrima de equinos, selecionou-se cavalos saudáveis e sem alterações oftálmicas, provenientes do 1º Regimento de Cavalaria de Guarda do Exército Brasileiro com sede em Brasília – DF, da raça brasileiro de hipismo, de ambos os sexos e dentro de duas faixas etárias. Para tal, 80 µL do filme lacrimal foi coletado a partir do menisco lateral inferior de um ou ambos os olhos, com auxílio de um tubo microcapilar de vidro graduado. Para descrição do proteoma lacrimal, os cavalos foram divididos em cinco grupos de oito indivíduos; e para a análise comparativa das proteínas lacrimais, os animais foram distribuídos em 16 grupos de dois indivíduos. Nos dois experimentos, os indivíduos foram agrupados com características homogêneas quanto ao gênero e faixa etária. As amostras lacrimais receberam processamento semelhante até serem injetadas no sistema cromatográfico do espectrômetro de massa, Orbitrap. As proteínas foram identificadas e agrupadas a partir dos seus termos GO (ontologia gênica), em componente celular, processo biológico e função molecular as quais fazem parte, com mapeamento de 1.990 proteínas no fluido lacrimal de cavalos. No experimento comparativo foi possível diferenciar os animais em relação ao sexo e idade, ou ambos, de acordo com a regulação das proteínas lacrimais, com 54 proteínas sendo reguladas pelo sexo, oito proteínas reguladas pela idade e onze reguladas pela interação de ambos os fatores, sexo e idade. O padrão proteico da lágrima de equinos foi descrito pela primeira vez e poderá ser utilizado como fonte de referência para estudos da lágrima resultante de alterações oculares e sistêmicas desta espécie animal.

**Palavras-chave:** lágrima, proteína, perfil, cavalo

## ABSTRACT

Proteome is the protein profile of a set of proteins expressed at any given time, and proteomics is the proteome analysis of an organ, a tissue, a certain cell type, or a biological fluid, such as tear. The pre corneal lacrimal fluid is considered an ideal sample for rapid diagnosis due to its relative purity and non-invasive collection, without the need for chemical containment of the animals. With the advent of mass spectrometry, it was possible to more clearly demonstrate that changes in the lacrimal protein profile reflect ocular and systemic alterations, but in domestic animals few studies have been done in this sense. In order to perform the qualitative and comparative analysis of the tear protein proteolysis of horses, healthy horses with no ophthalmic alterations were selected from the 1st Army Cavalry Regiment of the Brazilian Army based in Brasilia, Federal District, Brazil. both sexes and within two age groups. To that end, 80 µl of the tear film was collected from the lower lateral meniscus of one or both eyes, using a graduated glass microcapillary. For the description of the lacrimal proteome, the horses were divided into five groups of eight individuals; and for the comparative analysis of lacrimal proteins, the animals were distributed in 16 groups of two individuals. In both experiments, individuals were grouped with homogeneous characteristics regarding gender and age group. The lacrimal samples received similar processing until they were injected into the chromatographic system of the Orbitrap mass spectrometer. Proteins were identified and grouped according to their GO terms (gene ontology), in cellular component, biological process and molecular function which are part, with mapping of 1,990 proteins in lacrimal fluid of horses. In the comparative experiment it was possible to differentiate the animals in relation to sex and age, or both, according to the regulation of the lacrimal proteins, with 54 proteins being regulated by sex, eight proteins regulated by age and eleven regulated by the interaction of both factors, sex and age. The equine tear protein pattern was first described and could be used as a reference source for tear studies resulting from ocular and systemic alterations of this animal species.

**Keywords:** tear, protein, profile, horse

## LISTA DE FIGURAS

<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>Pág.</b>
Figura 1. Comparação da concentração proteica na lágrima e no plasma humano, demonstrando a grande diferença entre os dois compartimentos.	09
<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>Pág.</b>
Figura 1. Esquema do agrupamento dos animais em <i>pools</i> para análise descritiva do proteoma lacrimal.	26
Figura 2. Fluxograma do processamento das amostras para análise descritiva do proteoma lacrimal de equinos.	28
Figura 3. Análise por ontologia gênica das proteínas identificadas no fluido lacrimal de cavalos hípidos. Separação das proteínas lacrimais de acordo com o Processo Biológico que participam.	32
Figura 4. Análise por ontologia gênica das proteínas identificadas no fluido lacrimal de cavalos hípidos. Separação das proteínas lacrimais de acordo com o Componente Celular ao qual faz parte, e a Função Biológica que desempenha.	33
<b>CAPÍTULO 3</b>	<b>Pág.</b>
Figura 1. Esquema de agrupamento dos cavalos para análise comparativa do proteoma lacrimal.	48
Figura 2. Fluxograma do processamento das amostras para análise comparativa do proteoma lacrimal de equinos.	50
Figura 3. Análises de PCA. Proteínas identificadas (em cinza) e o posicionamento de cada amostra (pontos coloridos). As cores indicam as condições e os pontos da mesma cor indicam replicatas. Em A, análise quanto ao fator sexo. Azul = machos, Roxo = fêmeas. Em B, análise quanto ao fator idade. Azul = 4 a 9 anos Roxo = 10 a 15 anos. Em C, ANOVA dos dois fatores. Azul= fêmeas de 4 a 9 anos, Roxo = fêmeas de 10 a 15 anos, Laranja = machos de 4 a 9 anos Verde = machos de 10 a 15 anos.	58

- Figura 4. VIP *scores* das proteínas lacrimais de cavalo que melhor discriminam entre as condições. Em A, análise quanto ao fator sexo, sendo Grupo 1 = fêmea e Grupo 2 = macho. Em B, análise quanto ao fator idade, sendo Grupo 0 = 4-9 anos e Grupo 1 = 10-15 anos. Em C, análise das proteínas significantes para interação dos dois fatores, sexo e idade, sendo Grupo 0 = fêmeas de 4 a 9 anos, Grupo 1 = fêmeas de 10 a 15 anos, Grupo 2 = machos de 4 a 9 anos e Grupo 3 = machos de 10 a 15 anos. 59
- Figura 5. PLS-DA 3D mostrando agrupamento de replicatas e diferenciação entre condições. Em A, análise quanto ao fator sexo, sendo Grupo 0 = fêmeas e Grupo 1 = machos. Em B, análise quanto ao fator idade, Grupo 0 = 4-9 anos e Grupo 1 = 10-15 anos. Em C, análise das proteínas considerando ambos fatores, sexo e idade, sendo Grupo 0 = fêmeas de 4 a 9 anos, Grupo 1 = fêmeas de 10 a 15 anos, Grupo 2 = machos de 4 a 9 anos e Grupo 3 = machos de 10 a 15 anos. 59

**LISTA DE TABELAS**

<b>CAPÍTULO 3</b>		<b>Pág.</b>
Tabela 1.	Listagem das 13 proteínas lacrimais identificadas em cavalos que são reguladas pelo fator idade. A idade dos animais foi dividida em duas faixas etárias, de 4-9 anos e de 10-15 anos.	53
Tabela 2.	Listagem das 24 proteínas lacrimais identificadas em cavalos saudáveis e sem alteração oftálmica, que são reguladas pelo sexo feminino.	55
Tabela 3.	Listagem das 30 proteínas lacrimais identificadas em cavalos saudáveis e sem alteração oftálmica, que são reguladas pelo sexo masculino.	56
Tabela 4.	Listagem das 11 proteínas lacrimais identificadas em cavalos saudáveis e sem alteração oftálmica, que são reguladas pela interação dos fatores, idade e sexo.	57
<b>CAPÍTULO 4</b>		
Tabela 1.	Bacteria isolated from the conjunctival fornix of healthy equine eyes, living in Brasília.	77
Tabela 2.	Culture and antibiogram of bacteria isolated from the conjunctival fornix of healthy equine eyes, living in Brasília.	81

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

ACN: acetonitrila

AcOH: ácido acético

AGC: ganho automático controle

BH: brasileiro de hipismo

CID: colisão induzida por dissociação

DDA: aquisição dependente de dados

DDT: ditiotretol

EN: elastase neutrofílica

ESMS: espectrometria de massa com ionização por eletropulverização

FLPC: filme lacrimal pré-corneal

IAA: iodoacetamida

IL: interleucina

LYZ: lisozima

LCN -1: lipocalina 1

LFN: lactoferrina

m/z: massa/carga

MALD-TOF-MS/MS:

MMP: metaloproteinase

MS: espectrometria de massa

NH<sub>4</sub>AcO: acetato de amônio

PTM: modificação pós-traducional

RCG: Regiemnto de Cavalaria de Guarda

RPLC-MS/MS: cromatofrafia líquida de fase reversa /espectrometria de massa

SDS: duodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE:

sIgA: imunoglobulina secretória A

TEAB: trietilamina bicarbonato

TFA: ácido trifluoroacético

TIMP: inibidor tecidual de metaloproteinases

TNF: fator de necrose tumoral

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA**

## INTRODUÇÃO

A lágrima envolve a camada epitelial da córnea e forma a interface entre a superfície ocular e o ar (ZHOU et al., 2007). Também reconhecida como filme lacrimal ou fluido pré-corneal (FLPC), a lágrima é atualmente descrita como uma dupla camada, formada por uma faixa interna mucoaquosa e uma faixa externa composta por lipídeos, que se relacionam entre si (WILLCOX, et al., 2017). A camada lipídica contém lipídeos polares e não polares intercalados com proteínas; a camada média aquosa é composta por proteínas e eletrólitos; e a camada interna formada por mucina que conecta o filme lacrimal às células epiteliais da superfície ocular (ZHOU e BEUERMAN, 2012).

As proteínas presentes no filme lacrimal desempenham um importante papel na manutenção da superfície ocular, protegendo-a contra patógenos e modulando seu processo de cicatrização (ZHOU et al., 2003; ZHOU et al., 2007). A lisozima, lactoferrina, lipocalina, lacritina, albumina e imunoglobulinas são as proteínas predominantes no filme lacrimal de humanos, e representam mais de 90% da composição proteica total (ZHOU et al., 2006, ZHOU e BEUERMAN, 2012,). O perfil proteico difere entre humanos e outras espécies animais, mas algumas dessas proteínas também foram identificadas no filme lacrimal de animais domésticos e silvestres (SHAMSI et al., 2011). Campos et al. (2008) identificaram lactoferrina e lisozima no filme lacrimal de cães, porém em menor concentração em relação ao filme lacrimal de humanos; ovelhas, vacas, camelos e coelhos, também exibem lactoferrina e lisozima em seu filme lacrimal (ZHOU, et al., 2003; SHAMSI et al., 2011). Proteína semelhante à lipocalina foi identificada em coelho, coala, cão e gato (HEMSLEY et al., 2000; ZHOU et al., 2003, CAMPOS et al., 2008), e lipofilina, que havia sido identificada somente em humanos e coelhos (ZHOU et al., 2003; AZZAROLO et al., 2004), foi relatada no fluido lacrimal de camelos (SHAMSI et al., 2011).

Alteração na expressão dessas proteínas estão relacionadas com distúrbios sistêmicos e oculares, sugerindo que a análise proteômica do filme lacrimal pode ser uma ferramenta não invasiva, importante no diagnóstico e monitoramento de doenças (de SOUZA et al., 2006; CAMPOS et al., 2008; HOHENSTEIN-BLAUL et al., 2013). A utilização do filme lacrimal, contudo, representava um grande desafio, tendo em vista a pequena quantidade de fluido

disponível, e a baixa concentração de proteínas em relação ao plasma (ZHOU et al., 2003, LI et al., 2005). No entanto, com o aprimoramento da espectrometria de massa (MS) com ionização por eletropulverização (*electrospray* - *ESMS*), foi possível analisar o fluido lacrimal com maior sensibilidade e resolução utilizando-se tecnologias proteômicas de alto rendimento. Por meio desta ferramenta estudos foram conduzidos para caracterizar o proteoma lacrimal humano (LI et al., 2005; ZHOU et al., 2006; de SOUZA et al., 2006), com mais de 1500 proteínas identificadas até o momento (ZHOU et al., 2012).

Alterações no perfil proteico lacrimal foram identificadas em algumas condições locais e sistêmicas de humanos, incluindo glaucoma, olho seco, diabetes mellitus e câncer (HOHENSTEINBLAU et al., 2013, HAGAN et al., 2016). Em outras espécies animais, o perfil proteico normal do fluido lacrimal permanece pouco elucidado (SHAMSI et al., 2011), mas alterações na composição e concentração de algumas proteínas já foram identificadas na lágrima de cães, coelhos e cavalos com lesão corneal (ZHOU et al., 2003; OLLIVIER et al., 2004; COUTURE et al., 2006), e em coals com conjuntivite (HEMSLEY et al., 2000). Campos et al. (2008) verificaram também mudanças no padrão proteico do fluido lacrimal de cães portadores de diferentes tipos de câncer e, recentemente Winiarczyk et al. (2015), identificaram 125 proteínas no fluido lacrimal de cães saudáveis, por meio da espectrometria de massa,

Tais achados demonstram a relevância do estudo proteômico do fluido lacrimal e revelam a necessidade de novas pesquisas com o intuito de elucidar o real auxílio das proteínas lacrimais na avaliação da superfície ocular, bem como na saúde geral de animais domésticos.

## **PROBLEMÁTICA E RELEVÂNCIA**

O fluido lacrimal é coletado de forma simples e não invasiva, e mudanças na sua composição proteica podem refletir alterações sistêmicas e oculares relevantes. Apesar da lágrima representar uma importante fonte diagnóstica, a pequena quantidade de material disponível para análise e a menor concentração de proteína em relação ao plasma, tornavam a sua utilização um desafio. Porém, com o aprimoramento da espectrometria de massa, ampliou-se a busca por novos marcadores e possibilitou a identificação de proteínas que podem desempenhar um importante papel no surgimento e na progressão de doenças.

Em humanos, o proteoma lacrimal está sendo extensivamente pesquisado e utilizado no diagnóstico, prognóstico e tratamento de desordens, oculares e sistêmicas. Entretanto, em outras espécies animais poucas pesquisas foram conduzidas nesse sentido, especialmente no âmbito da oftalmologia veterinária.

Ademais, o reconhecimento do padrão proteico lacrimal normal é o primeiro passo para reconhecer alterações em sua composição e, assim, utilizá-lo futuramente como marcadores biológicos em animais domésticos.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral:**

O objetivo geral deste trabalho foi realizar o estudo proteômico do fluido lacrimal de cavalos por meio da espectrometria de massa.

### **Objetivos específicos:**

- a) Descrever as proteínas contidas no filme lacrimal de cavalos do RCG – Brasília-DF. (Experimento 1 – Proteoma lacrimal descritivo)
- b) Comparar a expressão proteica lacrimal dos referidos cavalos, em relação ao sexo e faixa etária. (Experimento 2 – Proteoma lacrimal comparativo).

## REVISÃO DE LITERATURA

### Fluido Lacrimal

A lágrima fornece uma superfície opticamente regular, necessária à refração da luz na retina, além de possuir outras funções, como lubrificação das pálpebras, conjuntiva e córnea; proteção contra patógenos e agentes químicos nocivos, e transporte e fornecimento de oxigênio e nutrientes a córnea avascular (OHASHI et al., 2006; MCDERMOTT, 2013).

A estreita faixa de lágrima (3-40 $\mu$ m) era classicamente dividida em três camadas, uma lipídica externa, que contém lipídios polares e apolares intercalados com proteínas; uma camada média aquosa, constituindo a secção mais espessa e volumosa do filme lacrimal; e uma camada interna de mucina, que conecta o FLPC às células epiteliais da superfície corneal (ZHOU & BEUERMAN, 2012). O consenso atual, entretanto, defende que o fluido lacrimal pré-corneal se comporta como uma única unidade funcional dinâmica, com diferentes compartimentos; considerando as camadas aquosa e de mucina, uma faixa única de gel mucoaquosa, intimamente relacionadas (WILLCOX, et al., 2017)

O extrato lipídico é secretado pelas glândulas de meibomio; confere estabilidade e distribuição uniforme do FLPC sobre a córnea, prevenindo a rápida evaporação da porção aquosa da lágrima. A porção aquosa do filme lacrimal de humanos é composta por 98,2% de água e 1,8% por sólidos, com as proteínas constituindo a maior parte desse soluto. As glândulas lacrimais acessórias e principal, são responsáveis pela produção do componente aquoso, que é formado por uma complexa mistura de íons, pequenas moléculas, glicoproteínas e proteínas, incluindo enzimas e imunoglobulinas. Cabe à porção aquosa, a hidratação e nutrição da córnea, além de facilitar a troca de oxigênio atmosférico com a mesma. A camada de mucina, constituída por mucoproteínas, imunoglobulinas, uréia, sais, glicose, leucócitos, detritos celulares e enzimas, é secretada principalmente pelas células caliciformes (células secretórias apócrinas) localizadas na conjuntiva palpebral, mas o epitélio corneal e conjuntival também contribuem para a formação da camada mucosa (OHASHI et al., 2006; JACOB & HAM, 2008; ZHOU & BEUERMAN, 2012). As mucoproteínas são moléculas bipolares que se assemelham a um gel e prendem a

porção aquosa do FLPC (hidrofílico e lipofóbico) ao epitélio superficial da córnea (lipofílico e hidrofóbico). O muco ocular lubrifica e hidrata as células epiteliais, reduz a tensão superficial e aumenta a estabilidade do filme lacrimal (WILLCOX, et., 2017). A camada mucoaquosa participa, ainda, da defesa corneal, pois bactérias e corpos estranhos podem ser mantidos dentro das mucoproteínas, e expostos à ação de imunoglobulinas (IgA) e lisozima (OLLIVIER, 2004; DAVIDSON & KUONEN, 2004).

### **Composição Proteica do Filme Lacrimal**

Proteômica é o estudo do perfil proteico, ou proteoma, de um órgão, um tecido, um certo tipo celular, ou um fluido biológico como a lágrima, em uma determinada condição, ou comparando diferentes abundâncias proteicas dentro de duas ou mais situações selecionadas. Tais condições podem incluir situações de homeostase, doenças, ou resposta a tratamentos (JAY & GILLIES, 2012; SOARES et al., 2012).

As proteínas presentes no FLPC desempenham um importante papel na manutenção da superfície ocular, protegendo-a contra patógenos e modulando seu processo de cicatrização (OLLIVIER, 2004; OLLIVIER et al., 2004; MCDERMOTT, 2013). Esforços para caracterizar a composição lacrimal estão continuamente em desenvolvimento, pois alterações na expressão dessas proteínas relacionam-se com desordens sistêmicas e oculares, sugerindo que a análise proteômica do filme lacrimal possa ser uma ferramenta não invasiva, importante no monitoramento de desordens oculares e sistêmicas, em seres humanos (ZHOU et al., 2003; de SOUZA et al., 2006; ZHOU et al., 2007; HOHENSTEIN-BLAUL et al., 2013;), e em outras espécies animais (CAMPOS et al., 2008; WINIARCZYK et al., 2015).

As proteínas lacrimais podem ser classificadas de diferentes formas, conforme a origem, abundância e/ou ontologia gênica. De acordo com sua origem são divididas em: I - células caliciformes; este grupo inclui as proteínas de maior abundância, como lisozima, lactoferrina, imunoglobulina secretória A (sIgA), lipocalina-1, lipofilina e proteína rica em prolina, dentre outras; II – proteínas liberadas de células e/ou tecido ocular, em virtude de uma secreção normal ou por dano celular; III – proteínas provenientes de secreções anormais, liberadas de tecidos doentes, podendo ser utilizadas como biomarcadores, e IV – proteínas exógenas, quando se originam de fontes externas, como microrganismos, que liberam material no fluido lacrimal. De acordo com a abundância, são classificadas em proteínas maiores, ou mais abundantes (mg/ml a  $\mu\text{g/ml}$ ); proteínas intermediárias ( $\mu\text{g/mL}$  a  $\text{ng/mL}$ ), secretadas de células da superfície ocular; e proteínas de baixa abundância ( $\text{ng/mL}$  a  $\text{pg/mL}$ ), como citocinas e fatores de crescimento (ZHOU

& BEUERMAN, 2012). As proteínas lacrimais podem ainda ser categorizadas a partir de sua ontologia gênica, de acordo com o compartimento celular, processo biológico e função molecular ao qual fazem parte (de SOUZA et al., 2006; ZHOU et al., 2012).

O proteoma lacrimal não é simplesmente o reflexo do proteoma plasmático, de modo que a concentração de muitas proteínas difere entre esses dois compartimentos (figura 1). Pelo menos uma parte dessa diferença se deve ao fato da lágrima desempenhar na superfície ocular a função de proteção contra patógenos, e de fato participar do sistema de defesa inato do olho (SACK, et al., 2002; MCDERMOTT, 2013). A lisozima e a lactoferrina, por exemplo, são bem reconhecidas pela sua atividade antimicrobiana na superfície ocular, e assim estão em maior concentração na lágrima do que no plasma (ZHOU & BEUERMAN, 2012).

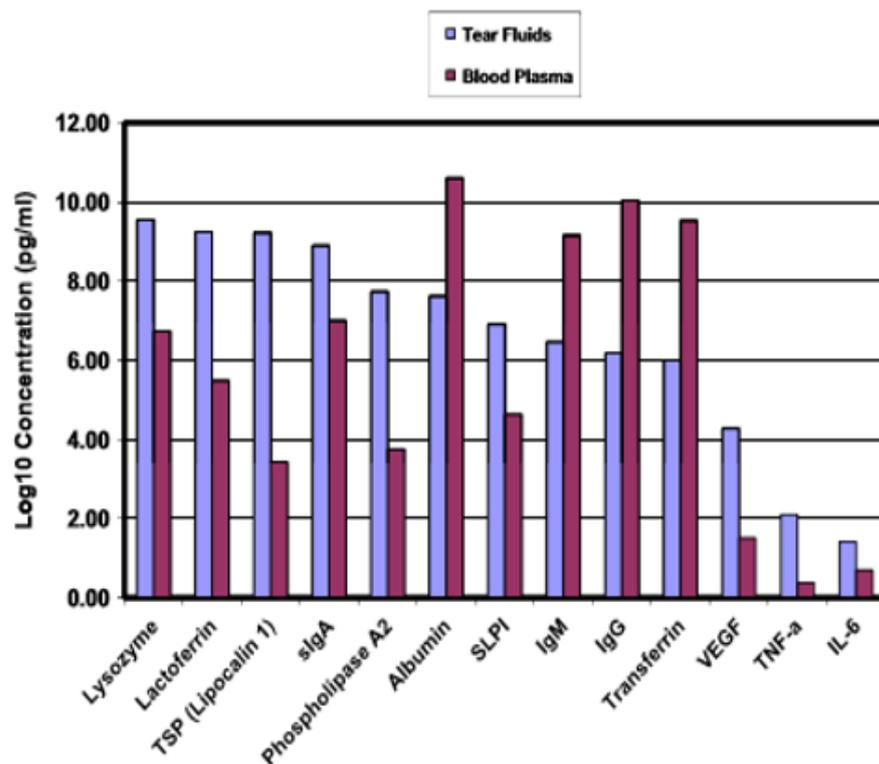


Figura 1. Comparação da concentração proteica na lágrima e no plasma humano de indivíduos saudáveis, demonstrando a grande diferença entre os dois compartimentos (Fonte: ZHOU & BEUERMAN, 2012).

De fato, a atividade antimicrobiana é uma função biológica importante e é desempenhada pelas proteínas lacrimais mais abundantes, como lisozima, lactoferrina, lipocalina e sIgA, que são capazes de destruir bactérias gram-positivas e gram-negativas (NASH et al., 2006). A lisozima é secretada pelas glândulas lacrimais principal e acessórias, representa de 20 a

30% do total de proteínas presentes no fluido lacrimal de humanos; a lactoferrina também compõe 20 a 30% da concentração proteica lacrimal, é secretada pelas células acinares da glândula lacrimal, e faz parte do sistema de defesa inato, agindo contra um amplo espectro de microrganismos gram-positivos e gram-negativos, além de fungos, leveduras, vírus e parasitas. A lactoferrina se liga reversivelmente a dois átomos de ferro, esgotando assim o ferro essencial para o metabolismo e crescimento bacteriano (DAVIDSON & KUONEN, 2004; GARCIA-MONTOYA et al., 2012). A sIgA é o anticorpo mais abundante no fluido lacrimal, produzido por plasmócitos que residem nas glândulas lacrimais principal e acessórias, e na conjuntiva ocular e inibe a aderência de bactérias na superfície do olho (JOHANSEN & KAETZEL, 2011).

### **Coleta e armazenamento do Fluido Lacrimal**

A lágrima é coletada de forma fácil e não invasiva, mas o método de coleta empregado pode influenciar na proporção e quantidade de proteínas em amostras individuais de lágrima (GREEN-CHUCH et al., 2008). Os dois métodos rotineiramente utilizados para obtenção do fluido lacrimal são a tira do Teste Lacrimal de Schirmer e o tubo microcapilar de vidro (ZHOU et al., 2006; ZHOU et al., 2012, FARIAS et al., 2013). Posa et al. (2013) testaram ainda uma terceira forma de coleta por meio de uma esponja cirúrgica, e verificaram que não houve diferença entre este método de coleta comparativamente ao tubo microcapilar na determinação do padrão proteico lacrimal, em olhos de pessoas portadoras de “olho seco” e saudáveis. Sebbag, et al. (2018) também testaram a coleta do fluido lacrimal de cães e gatos com esponjas cirúrgicas de celulose e tiras de papel do teste lacrimal de Schirmer, e verificaram que o total de proteína lacrimal foi estatisticamente menor ao se utilizar a fita de Schirmer, mas com este teste houve menor variabilidade na concentração das proteínas, pois o volume de lágrima coletado era constante (20 mm), enquanto com as esponjas houve maior variação no volume lacrimal coletado, gerando uma relação inversa entre o volume coletado e a concentração proteica lacrimal.

Do ponto de vista científico, a utilização de capilares de vidro é o melhor método de coleta do FLPC, excetuando-se a obtenção da lágrima de pacientes que cursam com “olho seco”, onde o volume lacrimal é escasso, tornando a coleta demorada e difícil. Nesses casos, a utilização da fita do Teste Lacrimal de Schirmer é mais indicada (ZHOU et al., 2012a). Em cães (CAMPOS et al., 2008), gatos (PETZNICK et al. 2011), coelhos (ZHOU et al., 2003; ZHOU et al., 2007) e cavalos (STRUBBE et al., 2000; OLLIVIER et al., 2004), a coleta lacrimal é realizada através de tubos microcapilares, sem necessidade de contenção química.

A concentração total de proteínas, varia ainda com o tipo de lágrima coletada (basal, reflexa, emocional e de olhos fechados), e o teste proteico utilizado (POSA et al., 2013; WILLCOX et al., 2017). Em gatos, a lágrima coletada por microcapilar, após instilação de 10  $\mu$ l de solução salina nos olhos, obteve uma menor concentração de proteína total, em relação à lágrima coletada sem o uso da salina, mas facilitou a coleta e reduziu o estresse do animal (PETZNICK et al., 2011).

O fluido lacrimal contém várias enzimas e hidrolases, e sua apropriada estocagem é necessária para prevenir perdas da amostra e comprometimento dos resultados (ZHOU et al., 2012). A concentração total de proteína decresce significativamente mantendo-se a amostra lacrimal por 4 a 8 horas em temperatura ambiente, com perda de até 70 a 80% da concentração proteica original, caso este período alcance 16 horas. Em contrapartida, a redução na temperatura de acondicionamento aumenta proporcionalmente o tempo de armazenamento, de modo que, a amostra lacrimal pode ser armazenada por uma semana a 4°C, por dois meses a – 20°C, e por mais de quatro meses a – 70°C, sem perdas proteicas significativas (SITARAMMA et al., 1998). Ainda assim, mesmo que mínima, há mensalmente uma pequena perda proteica quando a lágrima é estocada a – 80°C (BJERRUM & PRAUSE, 1994).

### **Espectrometria de Massa (EM) e Análise Proteica do Fluido Lacrimal**

A utilização do filme lacrimal representava um grande desafio, tendo em vista a pequena quantidade de fluido disponível e a baixa concentração de proteínas, comparativamente ao plasma (ZHOU et al., 2003, LI et al., 2005). Antes do advento da espectrometria de massa (MS), na década de 90, a habilidade para estudar um grande número de proteínas em uma amostra biológica complexa, como a lágrima, era bastante limitada.

Resumidamente, a análise por EM consiste na geração de íons com base em compostos (orgânicos ou inorgânicos) por meio de um método de ionização apropriado. Em seguida, os íons são separados por meio de sua relação massa–carga ( $m/z$ ) em um analisador de massas e detectados qualitativamente e/ou quantitativamente por meio de um detector, o qual “conta” os íons. A magnitude do sinal elétrico em função da razão  $m/z$  é convertida por um processador de dados, o qual gera o espectro de massas correspondente (GROSS, 2004). A possibilidade de automação aliada à rapidez das análises permite que grande número de amostras seja analisado em curto período de tempo (segundos ou minutos para cada amostra).

Inicialmente a aplicação da EM estava restrita à análise de gases, de substâncias voláteis e de substâncias termicamente estáveis, pois as primeiras técnicas de ionização

empregadas (ionização por elétrons e ionização química) são processos nos quais o analíto é primeiramente vaporizado e a ionização só ocorre quando a molécula está na fase gasosa. Essa restrição impossibilitava a análise de biomoléculas, como proteínas, carboidratos e lipídeos, as quais não são voláteis e se degradam em alta temperatura de vaporização (KINTER e SCHERMAN, 2000).

O desenvolvimento de técnicas de ionização mais brandas causou uma revolução na extensão das aplicações de EM, e atualmente esta é a técnica de escolha para identificação de proteínas e para estudo de modificações proteicas pós-traducionais (PTM) em diferentes condições fisiológicas. Essas técnicas foram principalmente as de ionização por *electrospray* – ESI (FENN et al., 1989, 1990) e ionização e dessorção a laser assistida por matriz – MALDI (KARAS e HILLENKAMP, 1988).

O termo “ionização branda” significa que os íons formados possuem baixa energia interna, o que permite a observação de espécies iônicas moleculares com pouca ou nenhuma fragmentação. As técnicas de ionização branda permitiram, portanto, a produção de íons com base em compostos de alta massa molecular e não-voláteis, estendendo a aplicação da EM a todos os tipos de moléculas (SOARES et al., 2012).

Em estudos proteômicos por meio de MS, dois tipos de estratégias podem ser aplicadas à identificação de proteínas: o estudo de proteínas inteiras (proteômica “*top-down*”), ou o estudo de peptídios obtidos através da digestão enzimática de proteínas (proteômica “*bottom-up*”). Além disso, pode-se abordar proteínas com alterações pós-traducionais (PTM), como glicosilação, sulfatação e fosforilação (JACOB & HAM, 2008).

Assim, com o aprimoramento da EM, foi possível analisar o fluido lacrimal com maior sensibilidade e resolução, e por meio dessa tecnologia estudos foram conduzidos para caracterizar o proteoma lacrimal humano, uma vez que desordens sistêmicas e oculares podem alterar o padrão proteico lacrimal (LI et al., 2005; ZHOU et al., 2006; de SOUZA et al., 2006; WINIARCZYK et al., 2015; HAGAN et al., 2016). Para melhor compreensão do processo patológico é essencial obter informações detalhadas acerca de tais proteínas, de modo que a composição proteica do fluido lacrimal possa ser utilizada como uma ferramenta diagnóstica e prognóstica de várias desordens (HOHENSTEIN-BLAUL et al., 2013).

Na medicina humana, alterações no padrão proteico lacrimal vêm sendo exaustivamente estudadas em desordens oculares, e algumas das pesquisas neste sentido estão elencadas a seguir.

Zhou, et al. (2009), ao estudarem indivíduos portadores de “olho seco”, por meio de análises de proteômica do tipo *shotgun*, utilizando um equipamento de 2D-nanoLC – MS/MS

para a análise de amostras marcadas com iTRAQ, detectaram que seis proteínas lacrimais aumentaram de concentração e quatro tiveram seus níveis reduzidos, correlacionando-se a severidade da condição clínica do olho seco com alterações no *status* proteico de três proteínas, que são associadas com inflamação:  $\alpha$ -1 glicoproteína ácida, calgranulina A (S100 A8) e calgranulina B (S100 A9). Em outro estudo que comparou indivíduos com “olho seco” evaporativo e indivíduos controle sem alterações oftálmicas, por meio do proteoma lacrimal, verificou-se que indivíduos com “olho seco” podem ser mais predispostos à infecções oftálmicas devido à redução nos níveis de lactoferrina, lipocalina-1 e lisozima, que são proteínas lacrimais com importante função antimicrobiana (SACK et al., 2002). Mais recentemente, um painel de cinco biomarcadores, S100A6, anexina A1 (ANXA1), anexina A11 (ANXA11), cistatina – S (CST4) e proteína de ativação fosfolipase – A2 (PLAA), foi utilizado para discriminar com alta sensibilidade ( $\geq 94,3\%$ ) e especificidade ( $\geq 97,6\%$ ), entre indivíduos controle daqueles com olho seco (SORIA et al., 2013).

Em pacientes humanos com ceratocone, os níveis de IL-6, TNF- $\alpha$  e MMP-9 estão elevados em comparação ao grupo controle. IL-6 e TNF- $\alpha$  também estavam elevados em olhos com ceratocone subclínico, em pacientes diagnosticados com ceratocone unilateral, sugerindo que a progressão desta desordem pode estar envolvida com um evento inflamatório crônico (LEMA & DURAN, 2005; LEMA et al., 2009).

Estudos proteômicos também foram conduzidos para o acompanhamento de olhos que recebem medicação anti-glaucomatosa, uma vez que a utilização desses fármacos a longo prazo pode alterar a superfície ocular. O conservante cloreto de benzalcônio adicionado em colírios possui efeitos tóxicos sobre as células da superfície ocular, com alteração no perfil proteômico lacrimal, cujos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$  estão elevados (MALVITTE et al., 2007). Comparando-se os níveis de IL-1 $\beta$  lacrimal em usuários de timolol com e sem conservante, verificou-se elevação da IL-1 $\beta$  em relação aos valores basais nos indivíduos que receberam a medicação com conservante (MANNI et al., 2005). Posteriormente, Lopilly et al. (2012) ao investigarem os efeitos do uso de análogos de prostaglandinas (latanoprost) com conservante benzalcônio no proteoma lacrimal, verificaram uma elevação nos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, MMP-1, MMP-3 e MMP-9, com redução de TIMP-1 e TIMP-2; sabidamente, o desbalanceamento destas proteinases e de seus inibidores pode aumentar o risco de degradação da superfície ocular.

Estes são apenas alguns exemplos dos inúmeros estudos foram conduzidos na oftalmologia humana, com o objetivo de desvendar o perfil proteômico lacrimal, por meio da EM, a fim de identificar biomarcadores para diagnóstico, prognóstico e acompanhamento de

desordens oculares. Na medicina veterinária, entretanto, o fluido lacrimal ainda foi pouco estudado através da EM, e muito das pesquisas realizadas com animais é com o intuito de compreender as alterações que ocorrem em humanos. Nesse sentido, Zhou et al. (2003), utilizando a lágrima de coelhos ceratectomizados, demonstraram através da técnica LC/ESI-MS, alterações no padrão proteico lacrimal ao longo do processo de cicatrização corneal, com a lisozima oito vezes mais elevada após 24 horas do ferimento na córnea, quando comparada a olhos saudáveis. O retorno ao valor de referência se dá três dias após o procedimento. Tal proteína é abundante no fluido lacrimal de humanos, mas é escassamente identificada na lágrima de coelhos em condições normais (ZHOU & BEUERMAN, 2012).

Os níveis lacrimais das defensinas NP-1 e NP-2, também se elevaram no fluido lacrimal de coelhos após abrasão corneal, retornando a valores basais após a cicatrização. Tal elevação durante o processo de cicatrização sugere que esses peptídios atuem na defesa da córnea contra microrganismos, até que ocorra o restabelecimento da barreira epitelial (ZHOU et al., 2007). O mesmo foi observado no fluido lacrimal de humanos após cirurgia de córnea, onde houve elevação de  $\alpha$ -defensinas (HNP-1, HNP-2 e HNP-3), que retornaram aos valores basais após a cicatrização, corroborando a possível propriedade antimicrobiana dessas proteínas (ZHOU et al., 2004).

Além de tentar identificar biomarcadores para diversas condições oculares, esforços estão voltados para delinear o perfil proteico do fluido lacrimal de humanos saudáveis e sem alterações oftálmicas. Nesse sentido, Souza et al. (2006) identificaram 491 proteínas no fluido lacrimal humano usando uma abordagem de digestão em gel/em solução, seguida de LC/MS – LTQ-FT e LC/MS – LTQ-Orbitrap, com 64 das proteínas identificadas, sendo proteases ou inibidores de proteases, e 18 sendo enzimas antioxidantes. Posteriormente, foram identificadas 1.543 proteínas lacrimais por meio de EM, classificando-as de acordo com seus termos GO em componentes celulares (citoplasma, núcleo, extracelular, citoesqueleto e lisossomo), processos biológicos dos quais participam e funções moleculares que desempenham. Este proteoma lacrimal foi comparado ao proteoma identificado no plasma, na glândula lacrimal e na córnea de humanos, verificando semelhanças proteicas entre estes diferentes compartimentos (ZHOU et al., 2012).

Em outras espécies animais, o perfil proteico do fluido lacrimal normal permanece pouco elucidado (SHAMSI et al., 2011). Alteração na composição e concentração de algumas proteínas foram identificadas na lágrima de cães, coelhos e cavalos com lesão corneal (ZHOU et al., 2003; OLLIVIER et al., 2004; COUTURE et al., 2006), e em coalas com conjuntivite (HEMSLEY, et al., 2000). CAMPOS et al. (2008), também identificaram mudanças

no padrão proteico do fluido lacrimal de cães com diferentes tipos de câncer. O perfil proteico lacrimal normal foi descrito apenas em cães, identificando 17 bandas distintas de proteínas através de eletroforese 1D – SDS- PAGE, seguida de EM (MALD-TOF-MS/MS), com a identificação de 125 proteínas lacrimais, sendo 25 delas comuns a cães e humanos (WINIARCZYK et al., 2015).

Tais achados demonstram a relevância do estudo proteômico do fluido lacrimal e revelam a necessidade de novas pesquisas com o intuito de elucidar o real auxílio das proteínas lacrimais na avaliação da superfície ocular, bem como na saúde geral de animais domésticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZZAROLO, A. M., BREW, K., KOTA, S. et al. Presence of tear lipocalin and other major proteins in lacrimal fluid of rabbits. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 138, p. 111–117, 2004.

BJERRUM, K. B. & PRAUSE, J. U. Collection and concentration of tear proteins studied by SDS gel electrophoresis. Presentation of a new method with special reference to dry eye patients. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, v. 232, n. 7, p. 402-405, 1994.

CAMPOS, C. F., COLE, N., DYK, D. V., WALSH, B. J., et al. Proteomic analysis of dog tears for potential cancer markers. *Research in Veterinary Science*, v. 85, p. 349-352, 2008.

COUTURE, S., DOUCET, M., MOREAU, M., CARRIER, M. Topical effect of various agents on gelatinase activity in the tear film of normal dogs. *Veterinary Ophthalmology*, v.9, n. 3, p. 157-164, 2006.

DAVIDSON, H. J., & AND KUONEN, V. J. The tear film and ocular mucins. *Veterinary Ophthalmology*, v. 7, n. 2, p. 71-77, 2004.

DE SOUZA, G., GODOY, L. M. F., MANN, M. Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors. *Genome Biology*, v. 7, 2006.

GARCÍA-MONTOYA, I., A., SIQUEIROS-CENDON, T., ARÉVALO-GALLEGOS, S., et al. Lactoferrin a multiple a bioactive protein: an overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1820, n 3., p. 226–236, 2012.

GREEM-CHURCH, K. B., NICHOLS, K. K., KLEINHOLZ, N. M. et al. Investigation of the human tear fil proteome using multiple proteomic approaches, v. 14, p. 459-470, 2008.

- HAE-YOUNG, L. P., LOPILLY, P., JIE, H. K., et al. Effect of prostaglandin analogues on tear proteomics and expression of cytokines and matrix metalloproteinases in the conjunctiva and cornea. *Experimental Eye Research*, v. 94, p. 13- 21, 2012.
- HAGAN, S., MARTIN, E., SALAMANCA, A. E. Tear fluid biomarkers in ocular and systemic disease: potential use for predictive, preventive and personalised medicine. *The EPMA Journal*, v. 7, n. 15, 2016.
- HEMSLEY, S., COLE, N., CANFIELD, P., et al. Protein microanalysis of animal tears. *Research in Veterinary Science*, v. 68, p. 207-209, 2000.
- HOHENSTEIN-BLAU, N. T., FUNKE, S., GRUS, F. H. Tears as a source of biomarkers for ocular and systemic diseases. *Experimental Eye Research*, v. 117, p. 126-137, 2013.
- JACOB, J. T. & HAM, B. Compositional profiling and biomarker identification of tear film. *Clinical Science*, v. 6, n. 4, p. 175-185, 2008.
- JAY, N., L. & GILLIES, M. Proteomic analysis of ophthalmic disease. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, v. 40, p. 755-763, 2012.
- JOHANSEN, F., E. & KAETZEL, C. S. Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor and IgA transport: new advances in environmental factors that stimulate pIgR expression and its role in mucosal immunity. *Mucosal Immunology*, v. 4, n. 6. 2011. doi: 10.1038/mi.2011.37
- KARAS, M. & HILLENKAMP. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry*, v. 60, n. 20., 2299-2301, 1988. doi:10.1021/ac00171a028
- LEMA, I., DURÁN, J. A. Inflammatory Molecules in the Tears of Patients with Keratoconus. *Ophthalmology*, v.112, n. 4, p. 654-659, 2005. doi: 10.1016/j.ophttha.2004.11.050
- LEMA, I., SOBRINO, T., DURÁN, J. A. et al. Subclinical keratoconus and inflammatory molecules from tears. *British Journal of Ophthalmology*, v. 93, p. 820-824, 2009.
- LI, N., WANG, N., ZHENG, J., LIU, X. M. et al. Characterization of Human Tear Proteome Using Multiple Proteomic Analysis Techniques. *Journal of Proteome Research*, v. 4, p. 2052-2061, 2005.
- MALVITTE, L., MONTANGE, T., VEJUX, A., et al. Measurement of inflammatory cytokines by multicytokine assay in tears of patients with glaucoma topically treated with chronic drugs. *Br Journal Ophthalmol*, v. 91, p. 29–32, 2007.
- MCDERMOTT, A., M. Antimicrobial compounds in tears. *Experimental Eye Research*, v. 117, p. 53-61, 2013.

OHASHI, Y., DIGRU, M., TSUBOTA, K. Laboratory findings in tear fluid analysis. *Clinica Chimica Acta*, v. 369, n. 1, p. 17-28, 2006.

OLLIVIER, F. J. The precorneal tear film in horses: its importance and disorders. *Veterinary Clinics Equine Practice*, v. 20, p. 301-318, 2004.

OLLIVIER, F. J., BROOKS, D. E., VAN SETTEN, G. B. et al. Profiles of metalloproteinase activity in equine tear fluid during corneal healing in 10 horses with ulcerative keratitis. *Veterinary Ophthalmology*, v. 7, n. 6, p. 397-405, 2004.

PARK, H., L., KIM, J. H., LEE, K. M., et al. Effect of prostaglandin analogues on tear proteomics and expression of cytokines and matrix metalloproteinases in the conjunctiva and cornea. *Experimental Eye Research*, v. 94, n. 1, p. 13-21, 2012

PETZNICK, A., EVANS, M., D., M., MADIGAN, M. C., et al. A comparison of basal and eye-flush tears for the analysis of cat tear proteins. *Acta Ophthalmologica*, v. 89, p. 75-81, 2011.

POSA, A., BRAUER, L., SCHICHT, M., et al. Schirmer strip vs. capillary tube method: Non-invasive methods of obtaining proteins from tear fluid. *Annals of Anatomy*, 2013.

PRAKASH, A., AHMAD, S., SARRACINO, D., et al. Comprehensive Peptide Searching Workflow to Maximize Protein Identifications. Thermo Scientific Poster Note 3 • PN HUPO13\_POS-02-041\_APrakash\_E 09/13S, 2013.

SACK, R. A., NUNES, I., BEATON, A., et al. Host-Defense Mechanism of the Ocular Surfaces. *Bioscience Reports*, v. 21, n. 4, p. 563-580, 2002

SEBBAG, L.; MCDOWELL, E. M.; HEPNER, P. M., et al. Effect of tear collection on lacrimal total protein content in dogs and cats: a comparison between Schirmer strips and ophthalmic sponges. *BMC Veterinary Research*, v.14, n. 61, p. 1-7, 2018.

SHAMSI, F. A., CHEN, Z., LIANG, J., LI, K., et al. Analysis and Comparison of Proteomic Profiles of Tear Fluid from Human, Cow, Sheep, and Camel Eyes. *Biochemistry and Molecular Biology*, v. 52, n. 12, p. 9156-9165, 2011. doi: 10.1167/iovs.11-8301

SITARAMAMMA, T., SHIVAJI, S., RAO, G., N. Effect of storage on protein concentration of tear sample. *Current Eye Research*, v. 17, n. 10, p. 1027-1035, 1998. Acessível em:

SORIA, J., DURÁN, J. A., ETXEBARRIA, 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 Proteomics*, v. 78, p. 29-112, 2013. doi: 10.1016/j.jprot.2012.11.017

- STRUBBLE, D. T., BROOKS, D. E., SCHULTZ, G. S., et al. Evaluation of the film proteinases in horses with ulcerative keratitis. *Veterinary Ophthalmology*, v. 3, p. 111-119, 2000.
- WILLCOX, M. D. P.; ARGÜESO, P.; GEORGIEV, G. A., et al. TFOS DEWS II Tear Film Report, v. 15, n. 3, p. 366-403, 2017.
- WINIARCZYK, M., WINIARCZYK, D., BANACH, T., et al. Dog Tear Film Proteome In-Depth Analysis. *Plos One*, v. 23, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0144242
- ZHOU, L. & BEUERMAN, R. W. Tear analysis in ocular surface diseases. *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 31, n. 6, p. 527-550, 2012. doi: 10.1016/j.preteyeres.2012.06.002
- ZHOU, L., BEUERMAN, R. W., CHAN, C. M., et al. Identification of Tear Fluid Biomarkers in Dry Eye Syndrome Using iTRAQ Quantitative Proteomics. *Journal of Proteome Research*, v. 8, p. 4889–4905, 2009.
- ZHOU, L., BEUERMAN, R. W., FOO, Y., et al. Characterisation of Human Tear Proteins Using High-resolution Mass Spectrometry. *Annals Academy of Medicine Singapore*, v. 35, n. 6, p. 400-407, 2006.
- ZHOU, L., BEUERMAN, R., W., HUANG, L. et al. Proteomic analysis of rabbit tear fluid: Defensin levels after an experimental corneal wound are correlated to wound closure. *Proteomics*, v. 7, n. 17, p. 3194-3206, 2007.
- ZHOU, L., BEURMAN, R. W., BARATHI, A., TAN, D. Analysis of rabbit tear proteins by high-pressure liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 17, n. 5, p. 401-412, 2003.
- ZHOU, L., HUANG, L. Q., BEUERMAN, R. W., et al. Proteomic analysis of human tears: defensin expression after ocular surface surgery. *Journal Proteome Research*, v. 3, n. 3, p. 410-416, 2004.
- ZHOU, L., ZHAO, S. Z., KOH, S. K., et al. In-depth analysis of the human tear proteome. *Journal of Proteomics*, v. 75, p. 3877-3885, 2012.

## **CAPÍTULO 2**

### **PERFIL QUALITATIVO DAS PROTEÍNAS DA LÁGRIMA DE EQUINOS**

*(Equus caballus)*

## RESUMO

Mudanças na composição proteica do fluido lacrimal podem refletir alterações sistêmicas e oculares relevantes. Em animais domésticos, entretanto, poucas pesquisas foram conduzidas nesse sentido. Objetivou-se descrever o perfil proteico do fluido lacrimal de cavalos (*Equus caballus*) considerados saudáveis. Coletaram-se 80µL da lágrima de 40 animais adultos (80 olhos), da raça Brasileiro de Hipismo, provenientes do 1º Regimento de Cavalaria de Guarda do Exército Brasileiro com sede em Brasília – DF. Para descrição das proteínas lacrimais, os cavalos foram divididos em cinco grupos de oito indivíduos, homogêneos quanto ao sexo, raça, coloração da pelagem e faixa etária. Após o processamento das amostras, a determinação do perfil proteico foi realizada através da espectrometria de massa (LTQ Orbitrap™/ Hybrid FT Mass Spectrometer). As proteínas foram identificadas a partir dos seus termos GO (ontologia gênica) e da participação em vias, por meio do programa Blast 2GO. Os termos GO foram analisados e novamente agrupados utilizando o programa REVIGO. Para validação e aprofundamento do conhecimento das interações entre as proteínas identificadas, foram utilizados os programas String e EnrichNet. Foram identificadas 1.990 proteínas no fluido lacrimal dos equinos, que foram agrupadas de acordo com o componente celular, processo biológico e função molecular as quais fazem parte, com 3.883 termos identificados. Descreve-se, de forma inédita, o padrão proteico da lágrima de equinos, que poderá ser utilizado como fonte de referência para estudos da lágrima resultante de alterações oculares e sistêmicas desta espécie animal.

**Palavras-chave:** lágrima, proteína, equino

## ABSTRACT

Changes in the lacrimal fluid's protein composition may reflect relevant systemic and ocular changes. In domestic animals, however, little research was done in this regard. The objective of this study was to describe the protein profile of lacrimal fluid of horses (*Equus caballus*) considered to be healthy. 80µL of the tear of 40 adult animals (80 eyes), of the Brazilian Horse Riding breed, were collected from the 1st Cavalry Regiment of the Brazilian Army based in Brasília - DF. To describe the lacrimal proteins, the horses were divided into five groups of eight individuals, homogenous regarding gender, race, coat color and age group. After the samples were processed, the protein profile was determined by mass spectrometry (Orbitrap™ / Hybrid FT Mass Spectrometry). Proteins were identified from their GO (gene ontology) terms and participation in pathways, through the Blast 2GO program. The GO terms were analyzed and reassembled using the REVIGO program. For the validation and deepening of the knowledge of the interactions among the proteins identified, the programs String and EnrichNet were used. A total of 1,990 proteins were identified in the lacrimal fluid of equines, which were grouped according to the cellular component, biological process and molecular function, with 3,883 terms identified. The protein pattern of the tear of horses is described in an unprecedented way, which can be used as a reference source for tear studies resulting from ocular and systemic alterations of this animal species.

**Keywords:** tear, protein, equine

## INTRODUÇÃO

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, um tecido, um certo tipo celular, ou um fluido biológico, como a lágrima (COTTRELL, 2011). Os estudos proteômicos tem sido delineados na busca por biomarcadores, a fim de se estabelecer um diagnóstico precoce ou monitorar a progressão de desordens oculares e sistêmicas (PETZNICK et al., 2013; JAYASRI et al., 2014). Diferentes doenças sistêmicas repercutem em manifestações oculares conforme observado em pesquisas anteriores, comparando-se o fluido lacrimal de indivíduos doentes e saudáveis (ZHOU et al., 2007; CAMPOS et al., 2008; SORIA et al., 2013; KALLÓ et al., 2016).

A lágrima é considerada uma amostra ideal para diagnóstico rápido, dada sua relativa pureza (se comparada ao sangue e urina) e de colheita não invasiva. Entretanto, até a década de 90 a utilização do filme lacrimal representava um grande desafio, em decorrência da pequena quantidade de fluido disponível, e da baixa concentração de proteínas em relação ao plasma (ZHOU et al., 2003, LI et al., 2005). Com o aprimoramento da espectrometria de massa (EM) e o desenvolvimento de técnicas de ionização mais brandas, houve uma revolução na extensão das aplicações da EM, sendo atualmente a técnica de eleição para identificar proteínas em amostras biológicas complexas (ZHOU et al., 2012; WINIARCZYK et al., 2015; HAGAN et al., 2016; SORIA et al., 2017).

Alterações no perfil proteômico da lágrima foram identificadas em algumas condições locais e sistêmicas do homem (HOHENSTEINBLAU et al., 2013, HAGAN et al., 2016), indicando um caminho para estudos deste fluido em animais, ainda pouco elucidados (SHAMSI et al., 2011). A composição e a concentração de algumas proteínas já foram identificadas na lágrima de animais domésticos e silvestres com desordens oftálmicas (HEMSLEY et al., 2000; ZHOU et al., 2003; OLLIVIER et al., 2004; COUTURE et al., 2006) e de cães portadores de diferentes tipos de câncer (CAMPOS et al., 2008), embora com metodologia diferente da EM. No âmbito da oftalmologia veterinária há apenas um estudo que identificou o padrão proteômico da lágrima de

cães por meio da espectrometria de massa, com 125 proteínas lacrimais identificadas. (WINIARCZYK et al., 2015).

Tais achados demonstram a relevância do estudo proteômico do fluido lacrimal e revelam a necessidade de novas pesquisas com o intuito de elucidar o real auxílio das proteínas lacrimais na avaliação da superfície ocular em animais. Em cavalos, assim como em outras espécies, não há relatos de pesquisa do perfil do proteoma lacrimal, afim de descrever quais proteínas seriam naturalmente identificadas na lágrima de indivíduos saudáveis, e a partir daí iniciar a busca por marcadores de desordens oftálmicas e quem sabe, no futuro, de alterações sistêmicas, como já ocorre na medicina humana.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Uso de Animais da Universidade de Brasília (protocolo n° 153838/2014) e realizado de acordo com os princípios éticos da ARVO (*Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research*).

### Seleção dos Animais

Foram selecionados 100 cavalos (*Equus caballus*) adultos (de 4 a 15 anos), machos e fêmeas, da raça Brasileiro de Hipismo, sem alterações clínicas e oftálmicas, provenientes do 1º Regimento de Cavalaria de Guarda do Exército Brasileiro com sede em Brasília - DF. Para avaliação oftálmica os cavalos foram mantidos em estação e contidos fisicamente, sem necessidade de tranquilização química para realização dos testes oftálmicos de rotina, quais sejam: teste lacrimal de Schirmer (Teste de Schirmer®, Ophthalmos, São Paulo, Brazil), Fluoresceína (Fluoresceína strips®, Ophthalmos, São Paulo, Brazil), Tonometria (Tono Pen® XL, Medtronic, Flórida, EUA) e avaliação da superfície ocular através da biomicroscopia com lâmpada em fenda portátil (Portable Slit lamp SL-15®, Kowa, Califórnia, EUA).

Por meio de swabs estéreis, amostras provenientes da conjuntiva de ambos os olhos foram coletadas para análise microbiológica (cultura e antibiograma) – Artigo aceito para publicação na Revista Ciência Rural (Capítulo 4).

### Coleta do Fluido Lacrimal e Preparação das Amostras

A coleta do volume total de 80µL do filme lacrimal foi feita por capilaridade, com auxílio de um tubo microcapilar de vidro (25µL), a partir do menisco lateral inferior de um ou ambos os olhos, evitando-se tocar a córnea e a conjuntiva. O conteúdo do tubo microcapilar foi cuidadosamente depositado dentro de um microtubo de polipropileno (tipo eppendorf®) com

auxílio de uma seringa agulhada de três milímetros. Cada tubo continha, previamente, uma solução de 1:1 (v/v) (80µL) de um tampão inibidor de fosfatase (PhosStop – Roche) e protease (GE HealthCare). A amostra foi identificada e imediatamente acondicionada em nitrogênio líquido, até a chegada ao laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas do Instituto de Biologia - UnB.

Após a coleta, todas as amostras foram centrifugadas a 3000 g por 5 minutos, para remover debris celulares e muco; o sobrenadante foi transferido para outro tubo e armazenado a - 80°C, até a análise, que ocorreu cerca de 15 dias após a coleta. A mensuração da quantidade de proteínas foi feita por meio do Kit bioquímico 2D Quant Kit, de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida, as amostras foram secas a vácuo (SpeedVac - Savant®) e novamente acondicionadas a - 80°C.

Para análise descritiva do proteoma lacrimal foram feitos 5 *pools* com 8 indivíduos em cada. Os animais de quatro *pools* possuíam características homogêneas quanto ao sexo, raça e faixa etária. Todos os animais selecionados foram da raça Brasileiro de Hipismo (BH); as pelagens foram castanho ou alazão; e as faixas etárias foram duas: animais com idade entre 4 e 9 anos e entre 10 e 15 anos de vida. Um *pool* foi formado por animais com características diversas, incluindo cavalos mestiços – sem raça definida (SRD), de coloração baio, tordilho ou rosilho, mas dentro da faixa etária estabelecida previamente. Totalizando 5 pools e 40 animais (Figura 1).

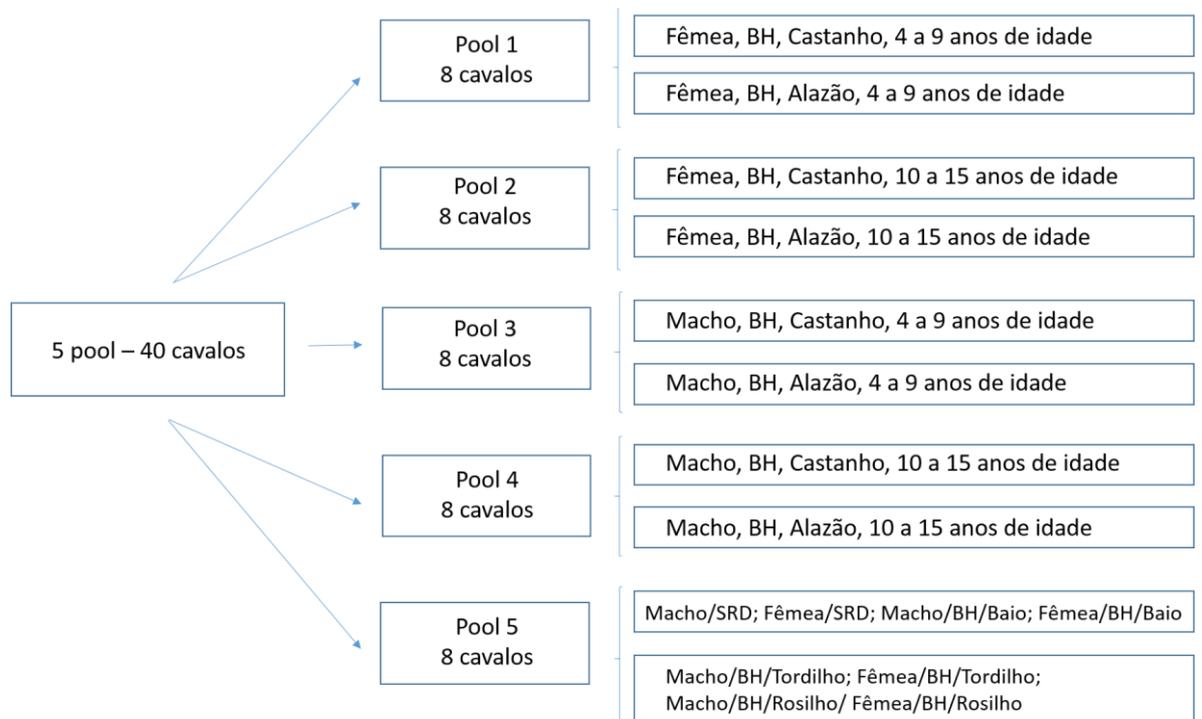


Figura 1 – Esquema do agrupamento dos animais em pools para análise descritiva do proteoma lacrimal.

### Digestão em Filtro (FASP)

Esta digestão em filtro seguiu o protocolo descrito anteriormente na literatura (WISNIEWSKI et al., 2009), mas com algumas alterações. Aqui, o fluido lacrimal foi ressuspenso em tampão de lise (LB) – SDS 4 % (p/v), TEAB 0,02 M e DTT 0,1 M (pH 7,9) em volume suficiente para obter 4 µg/µL de proteína em cada tubo. Em seguida, a concentração de proteína de cada “pool” foi mensurada com o *Qubit Protein Assay Kit* – Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. Após, alíquotas de 100 µg de proteína foram diluídas em 200 µL de tampão removedor de SDS – ureia 8 M e TEAB 0,02 M (pH 8,5) – e carregadas em três filtros Sartorius com um *cut-off* de 30 KDa. Em seguida, os filtros com as proteínas foram centrifugados a 10.000 g por 15 min; esse procedimento foi repetido com mais 200 µL de tampão removedor de SDS, para garantir que todo o detergente fosse retirado da amostra. Após, uma alíquota de tampão de alquilação – ureia 8 M, TEAB 0,02 M e IAA 0,05 M (pH 8,5) – foi carregada ao filtro; as amostras foram incubadas por 20 min no escuro e depois centrifugadas a 10.000 g por 15 min. Ato contínuo, os filtros foram limpos com 200 µL de tampão removedor de SDS; isso foi realizado para se retirar o excesso de IAA. Após a alquilação dos resíduos de cisteína, procedeu-se a troca de tampão carregando o filtro com 100 µL de tampão de digestão – TEAB 0,02 M (pH 7,9). Posteriormente, uma alíquota de 1 µg de tripsina (razão de 1:100 (p/p) entre amostra e tripsina) foi diluída em tampão de digestão, com esta solução sendo carregada no filtro. A digestão foi feita em um termomixer por 18 horas a 37 °C, em ambiente úmido. Após a digestão, 100 µL de água milliQ foram carregados no filtro, sendo o filtro centrifugado a 14.000 g por 20 min. A amostra de peptídios foi acidificada com TFA para parar a reação de digestão, e secas em SpeedVac.

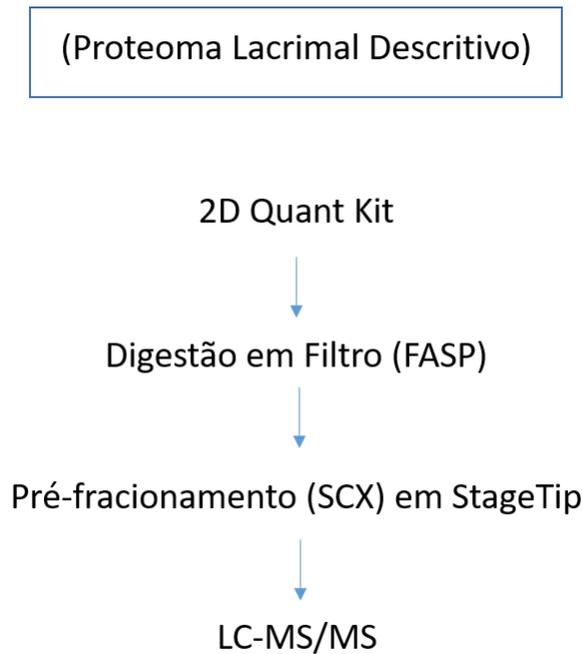


Figura 2 – Fluxograma do processamento das amostras para análise descritiva do proteoma lacrimal de equinos.

### **Pré-fracionamento por Troca Catiônica (SCX) em StageTip**

As *StageTips* foram montadas em laboratório de acordo com um protocolo descrito por Rappsilber et al. (2007). Inicialmente, as membranas de SCX foram recortadas utilizando agulhas com gauge de 18 (três discos) e 16 (quatro discos) com os discos sendo empilhados dentro de ponteiros T-200. Em seguida, as *StageTips* foram colocadas em anéis de plástico e inseridas dentro de microtubos de 2 mL. As ponteiros foram centrifugadas a 5.000 g para obter um melhor empacotamento das membranas, em seguida carregadas com 100  $\mu$ L de metanol 100 %, e novamente centrifugadas a 1.000 g por 3 min. Depois, foi adicionado 100  $\mu$ L de tampão B – ácido acético (AcOH) 0,5 % e acetonitrila (ACN) 80 %, centrifugando as ponteiros a 1.000 g por 3 min. Após essas etapas de ativação, as *StageTips* foram equilibradas com 100  $\mu$ L de tampão A – AcOH 0,5 %. Posteriormente, foi adicionado uma solução de 100  $\mu$ L de acetato de amônio ( $\text{NH}_4\text{AcO}$ ) 2 M, e as colunas foram centrifugadas a 1.000 g por 5 min. Em seguida, as colunas foram duas vezes lavadas com o tampão A e centrifugadas a 1.000 g por 3 min. Em seguida, 30  $\mu$ g de peptídios obtidos na etapa anterior (Digestão) foram carregados nas *StageTips* e as eluições foram feitas com tampões de eluição com concentrações crescentes de  $\text{NH}_4\text{AcO}$  – AcOH 0,5 %, ACN 20 % e  $\text{NH}_4\text{AcO}$  0,15-2 M. Ato contínuo, cada fração foi secada na SpeedVac, ressuspensa em TFA 0.1 % e injetadas no cromatógrafo acoplado ao espectrômetro de massas.

## **Espectrometria de Massa**

Cinco frações SCX foram analisadas por nano-RPLC-MS/MS composto por um cromatógrafo UPLC (Dionex Ultimate nano 3000) acoplado a um espectrômetro de massa (LTQ Orbitrap Elite). Um total de 2 µg da mistura de peptídios foram injetados em uma coluna de aprisionamento (trap-column) com 2cm x 100µm, contendo partículas de C18 5µm para concentração, em seguida os peptídios foram eluídos da trap-column para uma coluna analítica (32 cm x 75 µm, C18 3 µm). A eluição foi realizada em gradiente crescente de acetonitrila de 7 a 35% durante 155 min sob fluxo constante de 230 nL/min. Posteriormente os peptídios foram destinados à fonte de ionização do espectrômetro. As frações eluídas diretamente na fonte de ionização do espectrômetro de massa do tipo Orbitrap Elite foram analisadas em modo DDA (aquisição dependente de dados), gerando espectros MS1 no analisador Orbitrap (com resolução de 120.000 FWHM a 400m/z) entre as massas 350-1650 m/z. Para cada espectro MS1, foram definidos automaticamente os 20 íons mais intensos com cargas acima de dois e direcionados à fragmentação por CID (colisão induzida por dissociação) com o ganho automático controle (AGC) de  $1 \times 10^6$  e tempo de preenchimento máximo (máximo TI) de 120 ms. A configuração determinada para CID consistiu na: detecção por ion trap, janela de isolamento de 2.0 m/z em 20s, com AGC de  $5 \times 10^4$ , máximo TI de 100 ms, com energia de colisão normalizada em 35% e limiar para a seleção de 3000.

## **Identificação de proteínas**

Os espectros obtidos foram submetidos a um fluxo de análise de dados capaz de obter informações de 5 programas diferentes e complementares, consolidando a validação estatística de cada um deles. Inicialmente os arquivos foram submetidos ao software Peaks® 7.0 (Bioinformatics Solutions Inc.) sendo as sequências *de novo* de cada peptídio deduzidas a partir das informações de fragmentação e a busca realizada no banco de dados restrito a *Equus caballus* (Taxon ID = 9796) obtido a partir do banco de dados de proteínas do Uniprot em 9/nov/2016. Os parâmetros utilizados para pesquisas no banco de dados foram: tolerância de massa de precursores, 10 ppm; tolerância MS/MS de 0,5 Da; carbamidometilação foi selecionada como modificação fixa, oxidação de metionina e acetilação (proteína N-terminal) foram selecionadas como modificações variáveis. A enzima de digestão selecionada foi a tripsina e foram toleradas duas clivagens perdidas.

O número de proteínas e grupos de proteínas foi filtrado para taxa de descoberta falsa menor que 1% ( $FDR < 1\%$ ). Foi utilizado o módulo PTM do programa Peaks, que busca por modificações pós-traducionais em cada peptídeo com base nas informações contidas nos espectros de MSMS. As informações sobre as PTMs encontradas com maior frequência foram utilizadas para definição dos parâmetros de busca dos programas Proteome Discoverer 2.1 (Thermo Scientific, USA), X!TANDEM e OMSSA.

Para o *Proteome Discoverer* foi utilizado um fluxo de trabalho similar ao descrito por Prakash (2013), com modificações. Primeiramente foram utilizados 8 nós de busca utilizando o mesmo banco de *Equus caballus* do Uniprot, utilizando até duas clivagens perdidas, tolerância de precursor de 5 ppm e de fragmentos de 0.5 Da, diferindo entre si quanto às modificações pós-traducionais (a saber: acetilação de K; carboximetilação de D, E, H, K; deamidação de N, Q; desidratação de S, T; hidroxilação de Y, D, K, N, P; oxidação de M; piro-GLU a partir de Q no amino-terminal), sendo sete deles do tipo Sequest e 1 do tipo MS-Amanda. Os resultados obtidos da combinação desses oito nós foram avaliados quanto à validade estatística ( $FDR < 1\%$ ) e os espectros que não foram significativamente identificados foram submetidos a uma nova interação de busca, utilizando os mesmos parâmetros dos 8 nós, porém desta vez com base no banco de *Equus caballus* do NCBI obtido em 15/nov/2016. A combinação de todos esses resultados foi exportada no formato PEPXML para posterior consolidação pelo programa Peaks.

Para os programas X!TANDEM e OMSSA foram utilizados os seguintes parâmetros de busca: banco de dados de *Equus caballus* obtido a partir do banco gerado pelo programa *Peaks*, na análise inicial, já com as sequências *decoy* invertidas, as cinco modificações pós-traducionais mais frequentes detectadas pelo Peaks (enumeradas acima), 2 clivagens perdidas, tolerância para MS = 0.01 Da, e para MSMS = 0.5 Da.

Os dados de buscas dos cinco algoritmos utilizados pelos programas Peaks, *Sequest*, MS-Amanda, X!TANDEM e OMSSA foram consolidados utilizando-se o módulo *InChorus* do programa *Peaks*, que forneceu a primeira lista de proteínas identificadas.

Com o objetivo de aprofundar a cobertura do proteoma de lágrima de cavalos, os peptídeos que foram sequenciados pelo programa *Peaks*, porém cuja sequência não foi detectada por nenhum dos programas combinados anteriormente, foram submetidos a uma nova etapa de busca tolerante a erros utilizando-se o programa *PepExplorer* 2.0 com os seguintes parâmetros: Banco de dados NCBI (o mesmo utilizado pelo *Proteome Discoverer*), *MinIdentity* = 0.65, *Peptide size* = 6. A lista de proteínas obtida a partir do *PepExplorer* foi comparada à lista obtida com os programas da etapa anterior e as redundâncias foram combinadas, avaliando-se cada peptídeo.

## **Classificação e agrupamento de proteínas**

As proteínas foram agrupadas a partir dos seus termos GO e da participação em vias, utilizando-se o programa Blast 2GO. Os termos GO foram analisados e novamente agrupados utilizando o programa REVIGO. Para validação e aprofundamento do conhecimento das interações entre as proteínas identificadas, foram utilizados os programas String e EnrichNet, respectivamente.

## RESULTADOS

Foram identificadas 1.990 proteínas no fluido lacrimal dos equinos. As mesmas foram classificadas de acordo com seus termos GO (ontologia gênica), quais sejam, componente celular, processo biológico e função molecular, com 3.883 termos identificados (Figura 3 e 4). Participam do processo biológico 8.943 termos; fazem parte do componente celular 6.437 termos, e desempenham função molecular 5.529 termos.

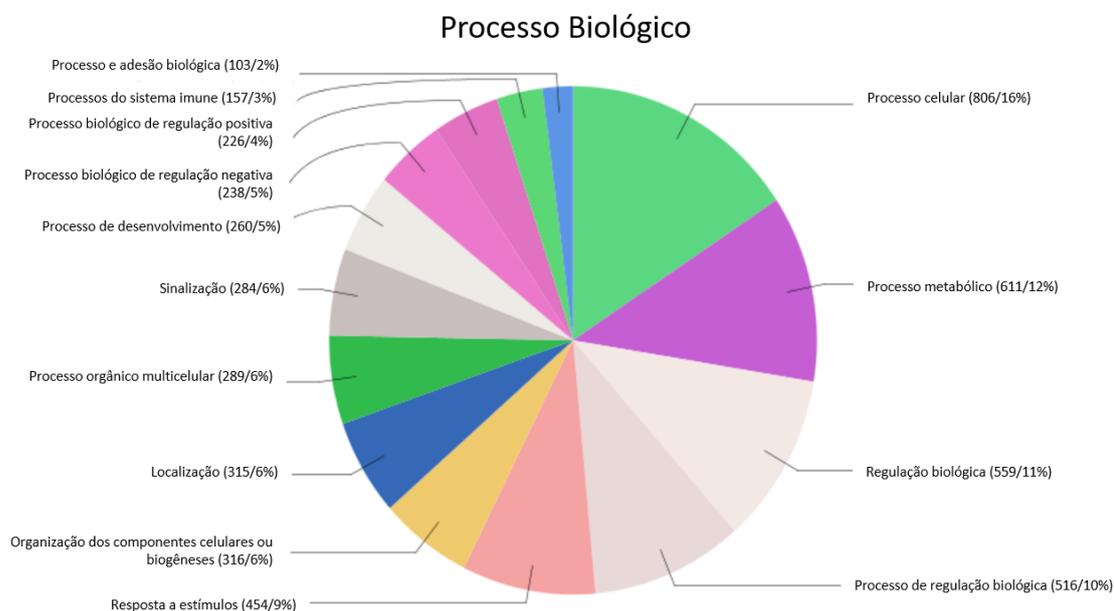


Figura 3. Análise por ontologia gênica das proteínas identificadas no fluido lacrimal de cavalos hígidos. Separação das proteínas lacrimais de acordo com o Processo Biológico que participam.

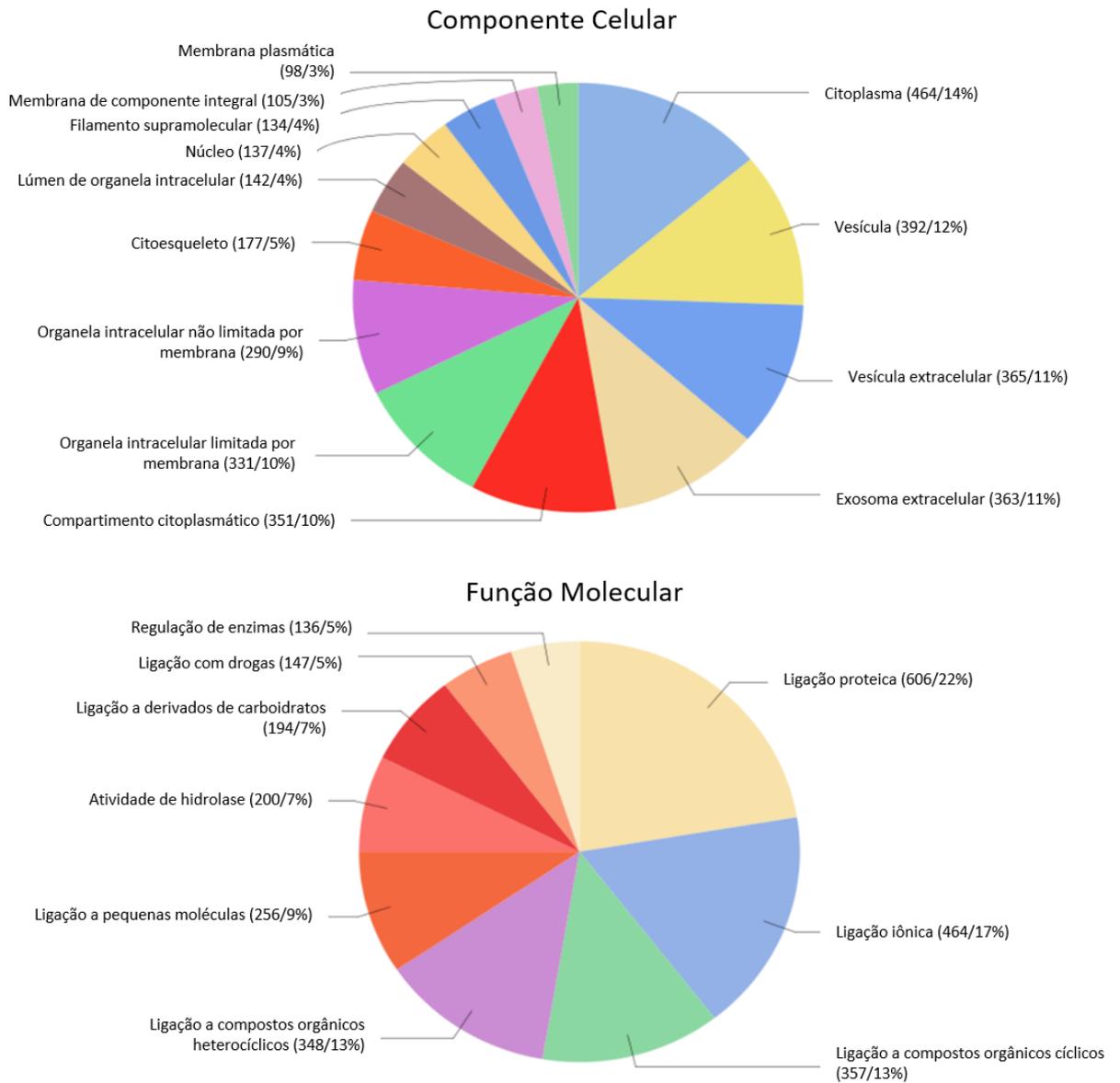


Figura 4. Análise por ontologia gênica das proteínas identificadas no fluido lacrimal de cavalos hígidos. Separação das proteínas lacrimais de acordo com o Componente Celular ao qual faz parte, e a Função Biológica que desempenha.

## DISCUSSÃO

Diversas técnicas qualitativas e quantitativas já foram utilizadas com o intuito de pesquisar as proteínas contidas no fluido lacrimal de humanos e outras espécies animais, incluindo eletroforese, ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e técnicas de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (ZHOU et al., 2007; SHANSI et al., 2011; TSUJI & KAWAZU, 2012). Em equinos, Strubbe, et al. (2000) e Olivier, et al. (2004) utilizaram zimografia para mensurar a atividade proteolítica no filme lacrimal de cavalos com e sem ceratite ulcerativa. Recentemente outros métodos analíticos capazes de avaliar, com alta precisão e sensibilidade, amostras tão pequenas quanto microlitros de material, começaram a ser empregados para mapear o perfil proteico lacrimal, e incluem tecnologias baseadas em espectrometria de massa (EM) (SORIA, et al., 2013; KALLÓ, et al., 2016). No corrente trabalho a proteômica empregada foi do tipo “*bottom-up*”, com a obtenção dos peptídeos através de digestão enzimática das proteínas com tripsina. Após pré-fractionamento por troca catiônica, cinco frações SCX foram analisadas por nano-RPLC-MS/MS composto por um cromatógrafo UPLC acoplado a um espectrômetro de massa (LTQ Orbitrap Elite).

Inicialmente, apesar dos esforços para identificar e catalogar as proteínas presentes na lágrima, na medicina humana, apenas um número limitado era descrito pela literatura. Li, et al. (2005) identificaram 54 proteínas através da combinação de diferentes abordagens proteômicas; Souza, et al. (2006) descreveram 491 proteínas lacrimais por meio de eletroforese associada a tecnologia baseada em EM, e com a evolução tecnológica, Zhou, et al. (2012) conseguiram mapear 1.543 proteínas lacrimais, utilizando somente EM. No âmbito da oftalmologia veterinária, somente um trabalho, até o momento, mapeou o perfil do proteoma lacrimal; Winiarczyk, et al. (2015) analisaram as proteínas lacrimais de cães sem desordens oculares e descreveram 125 proteínas através da associação de eletroforese, separando proteínas intactas em 17 bandas, e após digestão em tripsina, foi analisado por MALD-TOF-MS/MS para caracterizar os componentes proteicos em cada fração.

No presente estudo, mapeamos 1.990 proteínas no fluido lacrimal de cavalos. O número relativamente baixo de proteínas identificado anteriormente, em comparação com outros fluidos corporais, provavelmente se deve à sensibilidade limitada dos métodos empregados, bem como o desafio da composição do proteoma lacrimal, no qual três proteínas (lipocalina, lisozima e lactoferrina) correspondem a aproximadamente 80% da concentração total de proteínas.

Uma das principais funções biológicas desempenhadas pelas proteínas lacrimais é a atividade contra microrganismos patogênicos, pois a superfície ocular está em íntimo contato com o meio ambiente. Nós detectamos várias proteínas que possuem sabidamente atividade antimicrobiana, dentre elas, lisozima, lactoferrina, lipocalina, inúmeras imonoglobulinas, inibidor de elastase neutrofílica, proteínas S100 e mucinas.

Segundo Ollivier (2004), a córnea de cavalos manifesta o mais severo grau de ulceração associado a colagenólise estromal vista em animais. Isto se deve principalmente a presença de várias enzimas proteolíticas, ou proteinases, que agem sobre o colágeno, proteoglicanos e outros componentes da matriz extra-celular. Mas a degradação excessiva do tecido saudável é prevenida por inibidores naturais de proteinases, principalmente inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) e de serinoproteinases (SERPIN), além de macroglobulina- $\alpha$ 2, um inibidor inespecífico de proteinase. (TWINNING, 1994; HIBBITS *et al.*, 1999).

Nesse sentido, no fluido lacrimal dos animais desta pesquisa identificamos oito membros da superfamília de inibidores de serinoproteinase, quais sejam: inibidor da elastase neutrofílica (SERPINB1), inibidor de peptidase-11 (SERPINB4), inibidor de peptidase-5 (SERPINB5), inibidor de peptidase-6 (SERPINB6), inibidor de peptidase-10 (SERPINB10),  $\alpha$ -1 antiproteinase (SERPINA12),  $\alpha$ -2 antiplasmina (SERPINF2), e inibidor de serina peptidase tipo Kazal (SPINK9);  $\alpha$ -2 macroglobulina também foi mapeada, mas TIMPs não foram identificados.

Adicionalmente, além das proteinases serem produzidas por células inflamatórias e epiteliais da córnea, elas também são produzidas e liberadas por microrganismos, como bactérias e fungos. *Pseudomonas aeruginosa* é considerada uma das bactérias gram-negativas mais devastadoras em olhos equinos com úlceras corneais, justamente por sua capacidade de liberação de MMP e consequente degradação estromal (SAUER *et al.* 2003; KELLER & HENDRIX, 2005; WADA *et al.* 2010), enquanto *Aspergillus spp.* que já demonstrou produzir serinoproteinases, é o agente fúngico descrito como o principal causador de ceratomiose em equinos (GOPINATHAN, *et al.*, 2001; BROOKS, *et al.*, 2013; WADA, *et al.*, 2013; TOZZETTI, 2018). A identificação de inibidores de proteinases no fluido lacrimal dos cavalos, demonstra a importância dessas proteínas na manutenção da superfície ocular, pois um

desequilíbrio entre elas, sejam endógenas ou exógenas, e seus inibidores, em favor das proteinases, provoca degradação patológica do colágeno estromal e proteoglicanos da córnea, levando à ulceração persistente ou “melting” corneal (OLIVIER *et al.*, 2007).

Nos também encontramos a metaloproteinase – 9 (MMP-9) ou gelatinase-B, que apesar de ser considerada a primeira protease a ser sintetizada e secretada por células epiteliais e neutrófilos polimorfonucleados após lesão corneal, é tida como indetectável em córneas saudáveis (SIVAK e FINI, 2002; OLLIVIER, *et al.*, 2007; HOLOPAINEN *et al.*, 2011).

As S100 são proteínas de ligação ao cálcio, exclusivamente expressas em vertebrados, e composta por 24 membros. Oito integrantes dessa família foram identificados no presente trabalho: S100 não classificada, S100A2, S100A4, S100A6, S100A7, S100A8, S100A11 e S100A12. S100A6 fez parte de um painel de cinco biomarcadores identificados por Soria, *et al.* (2013), que diferenciaram com alta sensibilidade e especificidade indivíduos controle daqueles com olho seco. Em doenças oculares inflamatórias como olho seco, disfunção das glândulas de meibômio, pterígio e vascularização corneal os níveis de S100A8 estavam elevados, sugerindo o papel dessa proteína na ativação do sistema imunológico inato do olho (DONATO, *et al.*, 2013). A proteína S100A7 (psoriasina), é um peptídeo antimicrobiano da pele, que segundo Glasser *et al.* (2005) e Garreis, *et al.* (2011) destrói a *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na superfície ocular de humanos.

Essas informações são importantes para oftalmologia equina, pois *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, são importantes colonizadores da superfície ocular de cavalos. *S. aureus* fazem parte da microflora conjuntival normal, e por isso são os agentes mais frequentemente isolados da conjuntiva ocular de equídeos sem alterações oftálmicas (VIDAL *et al.*, 2010; FOTI *et al.*, 2013; TAMARZADEH & ARAGHI-SOOREH, 2014; FERREIRA, *et al.*, 2017), enquanto a *P. aeruginosa*, como já mencionado anteriormente, pode ser devastadora em olhos equinos com ceratite ulcerativa (SAUER *et al.* 2003; KELLER & HENDRIX, 2005; WADA *et al.* 2010; WADA *et al.* 2010). Até o momento nenhuma pesquisa havia identificado proteínas S100 no fluido lacrimal de animais, portanto ainda não se conhece o papel dessas proteínas na superfície ocular de equinos; acredita-se que também participem do processo de defesa e homeostasia da superfície ocular.

Identificamos MUC5AC e MUC16, como Souza, *et al.* (2006); Zhou, *et al.* (2012), mapearam MUC5AC, dentre outras mucinas, mas não MUC16. Recentemente três métodos diferentes de coleta lacrimal foram testados também em pacientes humanos para determinar as concentrações de MUC5AC e MUC16, justamente por desempenharem atividades essenciais para

manutenção da superfície ocular (ABLAMOWICZ & NICHOLS, 2017). Existem as mucinas que são diretamente secretadas na lágrima, que o caso da MUC5AC formadora de gel, produzidas pelas células caliciformes da conjuntiva, com a principal função de lubrificar a superfície ocular, eliminar patógenos e detritos; e existe as mucinas associadas a membrana do glicocálix (MUC1, MUC4, MUC16), que fornecem uma superfície hidrofílica para aderência lacrimal. A MUC16 tem o maior papel na manutenção da barreira epitelial do glicocálix (MCDERMOTT, 2013; WILLCOX, et al., 2018).

A laterina é uma proteína surfactante, originalmente descrita na década de 80, abundante no suor de cavalos, sendo a provável reponsável pela formação de espuma observada sobre o corpo de equídeos durante exercício físico vigoroso (BEELEY et al., 1986). Ela é produzida e armazenada nas glândulas sudoríparas da pele, e segundo McDonald, et al. (2009), também é sintetizada nas glândulas salivares. Acredita-se que a laterina presente no suor dos equinos desempenhe o papel de molhar os pelos e pele, permitindo a rápida translocação e disseminação do suor na superfície da pele oleosa, realizando um eficiente resfriamento evaporativo nesta espécie. A presença da laterina na saliva equina, onde também forma espuma, é mais intrigante, todavia, suas propriedades umectantes podem ajudar na mastigação e na penetração enzimática e processamento da dieta vegetal fibrosa (MCDONALD et al., 2009; VANCE et., 2013). Descrevemos neste trabalho pela primeira vez esta proteína surfactante no fluido lacrimal de cavalos, assim sua função na superfície ocular não é conhecida, mas por ser formada por longas cadeias carbônicas hidrofóbicas com um grupo hidrofílico em uma de suas extremidades, pode-se inferir que a laterina interaja tanto com substâncias polares, como água, quanto apolares, como patógenos, atuando na superfície ocular e defendendo-a de microorganismos.

## CONCLUSÃO

Esta pesquisa representa o mapeamento proteômico lacrimal mais abrangente na medicina veterinária descrito até o momento, com 1.990 proteínas identificadas, filtradas para taxa de descoberta falsa menor que 1% ( $FDR < 1\%$ ). O perfil proteômico lacrimal de cavalos foi obtido através da associação de um adequado processamento da amostra lacrimal, juntamente com a utilização do mais recente espectrômetro de massa-Orbitrap, aliado a pesquisa em cinco bancos de dados de proteínas diferentes e complementares.

A lista abrangente de proteínas deste estudo representa o primeiro perfil proteômico lacrimal de cavalos e pode ser usada como referência em estudos futuros na busca por biomarcadores oculares e sistêmicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANNA F. ABLAMOWICZ, A. F. & NICHOLS, J. J. Concentrations of MUC16 and MUC5AC using three tear collection methods. *Molecular Vision*, n. 23, p. 529-537, 2017.

BEELEY, J. G., EASON, R. & SNOW, D. H. Isolation and characterization of latherin, a surface-active protein from horse sweat. *Biochemical Journal*, v. 235, p. 645-650, 1986.

COTTRELL, J. S. Protein identification using MS/MS data. *Journal of Proteomics*, v. 74, n. 6, p. 1842-1851, 2011.

COUTURE, S., DOUCET, M., MOREAU, M., CARRIER, M. Topical effect of various agents on gelatinase activity in the tear film of normal dogs. *Veterinary Ophthalmology*, v.9, n. 3, p. 157-164, 2006. doi: 10.1111/j.1463-5224.2006.00457.x

SOUZA, G., GODOY, L. M. F., MANN, M. Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors. *Genome Biology*, v. 7, 2006. doi:10.1186/gb-2006-7-8-r72

HAGAN, S., MARTIN, E., SALAMANCA, A. E. Tear fluid biomarkers in ocular and systemic disease: potential use for predictive, preventive and personalised medicine. *The EPMA Journal*, v. 7, n. 15, 2016. doi: 10.1186/s13167-016-0065-3

HEMSLEY, S., COLE, N., CANFIELD, P., et al. Protein microanalysis of animal tears. *Research in Veterinary Science*, v. 68, p. 207-209, 2000.

JAYASRI, K., PADMAJA, K., PRASAD, P. E. Proteomics in Animal Health and Production. *Journal of agriculture and Veterinary Science*, v. 7, n. 4, 2014.

- KALLÒ, G., EMRI, M., VARGA, Z., 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. DOI:10.1371/journal.pone.0158000
- LI, N., WANG, N., ZHENG, J., LIU, X. M. et al. Characterization of Human Tear Proteome Using Multiple Proteomic Analysis Techniques. *Journal of Proteome Research*, v. 4, p. 2052-2061, 2005.
- OLLIVIER, F. J. The precorneal tear film in horses: its importance and disorders. *Veterinary Clinics Equine Practice*, v. 20, p. 301-318, 2004. doi: 10.1016/j.cveq.2004.04.008
- PETZNICK, A., EVANS, M., D., M., MADIGAN, M. C., et al. A comparison of basal and eye-flush tears for the analysis of cat tears proteins. *Acta Ophthalmologica*, v. 89, p. 75-81, 2011. DOI: 10.1111/j.1755-3768.2010.02082.x
- SHAMSI, F. A., CHEN, Z., LIANG, J., LI, K., et al. Analysis and Comparison of Proteomic Profiles of Tear Fluid from Human, Cow, Sheep, and Camel Eyes. *Biochemistry and Molecular Biology*, v. 52, n. 12, p. 9156-9165, 2011. doi: 10.1167/iovs.11-8301
- SORIA, J., ACERA, A., LLOVES, J., M., 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.
- WILLCOX, M. D. P.; ARGÜESO, P.; GEORGIEV, G. A., et al. TFOS DEWS II Tear Film Report, v. 15, n. 3, p. 366-403, 2017.
- WINIARCZYK, M., WINIARCZYK, D., BANACH, T., et al. Dog Tear Film Proteome In-Depth Analysis. *Plos One*, v. 23, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0144242
- ZHOU, L., BEUERMAN, R. W., FOO, Y., et al. Characterisation of Human Tear Proteins Using High-resolution Mass Spectrometry. *Annals Academy of Medicine Singapore*, v. 35, n. 6, p. 400-407, 2006.
- ZHOU, L., BEUERMAN, R., W. Tear analysis in ocular surface diseases. *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 31, p. 527-550, 2012.
- ZHOU, L., BEURMAN, R. W., BARATHI, A., TAN, D. Analysis of rabbit tear proteins by high-pressure liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 17, n. 5, p. 401-412, 2003. doi: 10.1002/rcm.925

ZHOU, L., BEURMAN, R. W., BARATHI, A., TAN, D. Analysis of rabbit tear proteins by high-pressure liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 17, n. 5, p. 401-412, 2003. doi: 10.1002/rcm.925

ZHOU, L., ZHAO, S. Z., KOH, S. K., et al. In-depth analysis of the human tear proteome. *Journal of Proteomics*, v. 75, p. 3877-3885, 2012. doi:10.1016/j.jprot.2012.04.053

BROOKS, D. E., PLUMMER, C. E., MANGAN, B. G., et al. Equine subepithelial keratomycosis. *Veterinary Ophthalmology*, n. 16, v. 26, p. 93-96, 2013.

WADA, S., HOBO, S., ODE, H., et al. Equine keratomycosis in Japan. *Veterinary Ophthalmology*, n. 16, p. 1-9, 2013.

MCDONALD, R. E., FLEMING, R. I., BEELEY, J. G., et al. Latherin: A Surfactant Protein of Horse Sweat and Saliva. *Plos One*, v. 4, n. 5, 2009.

GOPINATHAN, U., RAMAKRISHNA, T., WILLCOX, M., et al. Enzymatic, Clinical and Histologic Evaluation of Corneal Tissues in Experimental Fungal Keratitis in Rabbits. *Experimental Eye Research*, v. 72, p. 433-442, 2001.

## **CAPÍTULO 3**

### **ANÁLISE COMPARATIVA DO PROTEOMA LACRIMAL DE CAVALOS**

## RESUMO

Pesquisas que visam identificar e descrever as proteínas contidas no filme lacrimal pré-corneano estão em contínuo avanço no âmbito da oftalmologia humana, na busca por marcadores para desordens oculares e sistêmicas. O proteoma lacrimal pode ser delineado em uma determinada condição, ou comparando diferentes abundâncias proteicas dentro de duas ou mais situações. Afim de realizar a análise comparativa do perfil proteico lacrimal de cavalos (*Equus caballus*), selecionou-se 32 indivíduos hípidos, da raça brasileiro de hipismo, de ambos os sexos e de diferentes idades. Para tal, 80 µl do filme lacrimal foi coletado a partir do menisco lateral inferior de um ou ambos os olhos, com auxílio de um microcapilar de vidro graduado. Os animais foram divididos em 16 grupos de dois indivíduos, com características uniformes quanto ao gênero e a faixa etária. As amostras lacrimais passaram por processo de digestão em tripsina e dessalinização antes de serem injetadas no sistema cromatográfico do espectrometro de massa, Orbitrap. Foram identificadas oito proteínas reguladas pela idade e 54 proteínas reguladas pelo sexo; destas, 24 foram reguladas pelo sexo feminino e 30 foram reguladas pelo sexo masculino. Onze proteínas foram reguladas pela interação de ambos os fatores, sexo e idade. Lisozima (LYZ), lactoferrina (LTF) e lipocalina-1 (LCN-1) foram identificadas no fluido lacrimal dos equinos, com regulação positiva em machos, e as proteínas S100A8, S100A7 e mucina-5AC (MUC5AC) foram reguladas em fêmeas. A proteína inibidora de elastase neutrofílica (SERPINB1) e inibidora de serina protease foram reguladas pela idade.  $\alpha$ -2-HS-glicoproteína e S100A11, foram reguladas pelos dois fatores, idade e sexo. As proteínas lacrimais identificadas estão relacionadas com processos de defesa e manutenção da saúde ocular, inferindo que esses constituintes estão em maiores concentrações no fluido lacrimal desses animais. Ademais, exibiram diferentes perfis, variando com a idade e com o sexo do indivíduo. Tal informação, pode no futuro auxiliar no diagnóstico de doenças e apontar possíveis biomarcadores.

**Palavras-chave:** equino, sexo, idade, proteína, lágrima

## ABSTRACT

Researches aimed at identifying and describing the proteins contained in the precorneal tear film are in continuous advancement within the scope of human ophthalmology, in the search for markers for ocular and systemic disorders. The lacrimal proteome can be delineated in a given condition, or by comparing different protein abundances within two or more situations. In order to perform the comparative analysis of the lacrimal protein profile of horses (*Equus caballus*), we selected 32 healthy individuals, of the Brazilian race of equestrianism, of both sexes and of different ages. To that end, 80  $\mu$ l of the tear film was collected from the lower lateral meniscus of one or both eyes, using a graduated glass microcapillary. The animals were divided into 16 groups of two individuals, with uniform characteristics regarding gender and age group. Lacrimal samples underwent trypsin digestion and desalting before being injected into the mass spectrometer Orbitrap chromatographic system. Eight age-regulated proteins and 54 sex-regulated proteins were identified; of these, 24 were regulated by the female sex and 30 were regulated by the male sex. Eleven proteins were regulated by the interaction of both factors, sex and age. Lysozyme (LYZ), lactoferrin (LTF) and lipocalin-1 (LCN-1) were identified in the lacrimal fluid of horses, with positive regulation in males, and the S100A8, S100A7 and mucin-5AC (MUC5AC) proteins were regulated in females. Neutrophil elastase inhibitor protein (SERPINB1) and serine protease inhibitor were age-regulated.  $\alpha$ -2-HS-glycoprotein and S100A11, were regulated by the two factors, age and sex. The lacrimal proteins identified are related to the defense and maintenance of ocular health, inferring that these constituents are in higher concentrations in the lacrimal fluid of these animals. In addition, they exhibited different profiles, varying with the age and sex of the individual. Such information may in the future assist in the diagnosis of diseases and point out possible biomarkers.

**Keywords:** equine, sex, age, protein, tear

## INTRODUÇÃO

As células epiteliais da superfície ocular são recobertas por uma fina camada de fluido, o filme lacrimal pré-corneal, que constitui a primeira barreira de defesa do olho (ZHOU & BEUERMAN, 2012). A lágrima como é comumente conhecida, é produzida e secretada por componentes da superfície ocular, fornecendo uma cobertura opticamente regular, necessária à refração da luz na retina, além de desempenhar funções de lubrificação das pálpebras, conjuntiva e córnea; proteção contra patógenos e agentes químicos nocivos, e fornecimento de oxigênio e nutrientes à córnea avascular (OHASHI et al., 2006; MCDERMOTT, 2013).

O perfil proteico da lágrima, ou proteoma lacrimal, não é simplesmente o reflexo do proteoma plasmático, de tal modo que a concentração de muitas proteínas difere entre esses dois compartimentos. Em parte, essa diferença se deve ao fato da lágrima desempenhar na superfície ocular a função de proteção contra microrganismos, e de fato participar do sistema de defesa inato do olho (ZHOU & BEUERMAN, 2012).

Esforços para caracterizar a composição lacrimal estão continuamente em desenvolvimento, pois alterações na expressão das proteínas lacrimais relacionam-se com distúrbios sistêmicos e oculares, em seres humanos e nas espécies animais (DE SOUZA et al., 2006; ZHOU et al., 2007; CAMPOS et al., 2008; HOHENSTEIN-BLAUL et al., 2013; WINIARCZYK et al., 2015).

A análise proteica pode ser realizada em uma determinada condição, ou comparando diferentes abundâncias proteicas dentro de duas ou mais situações selecionadas. Estudos prévios demonstraram variações biológicas na concentração de algumas proteínas lacrimais em humanos saudáveis, em relação ao sexo e a idade. Ananthi et al. (2011) identificaram sete proteínas lacrimais que diferiram entre indivíduos do sexo feminino e masculino, indicando que o perfil proteico lacrimal difere em relação ao sexo, principalmente para proteínas envolvidas na defesa imunológica local. A concentração lacrimal de lisozima e lactoferrina, que são bem

reconhecidas pela sua atividade antimicrobiana na superfície ocular, diminuiu com o avançar da idade (MACKIE & SEAL, 1986), e o fator de crescimento epidermal (ECG), apresentou níveis significativamente maiores nos homens quando comparado a mulheres, mas não apresentou correlação com a idade (NAVA et al., 1997). Já o fator de crescimento ligado a insulina (IGF) reduziu significativamente seus níveis lacrimais com o avançar da idade e se correlacionou com os sinais de olho seco em humanos (PATEL, et al., 2018).

Tais achados sugerem a possibilidade de diferenças na capacidade de defesa contra infecções no segmento anterior dos olhos em indivíduos saudáveis, de diferentes idades e gêneros (MACKIE & SEAL, 1986; NAVA et al., 1997; ANANTHI et a., 2011). Até o momento não há descrição do proteoma lacrimal de animais domésticos, tampouco diferenciação entre machos e fêmeas, e em diferentes faixas etárias. Em nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que visou demonstrar proteínas lacrimais reguladas pelo sexo e idade na espécie equina.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Uso de Animais da Universidade de Brasília (protocolo n°153838/2014) e realizado de acordo com os princípios éticos da ARVO (*Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research*).

### Seleção dos Animais

Foram selecionados 100 cavalos (*Equus caballus*) adultos (de 4 a 15 anos), machos e fêmeas, da raça brasileiro de hipismo, sem alterações clínicas e oftálmicas, provenientes do 1º Regimento de Cavalaria de Guarda do Exército Brasileiro com sede em Brasília - DF. Os cavalos foram mantidos em estação e contidos fisicamente, sem necessidade de tranquilização química para realização dos testes oftálmicos de rotina, quais sejam: teste lacrimal de Schirmer (Teste de Schirmer®, Ophthalmos, São Paulo, Brazil), Fluoresceína (Fluoresceína strips®, Ophthalmos, São Paulo, Brazil), Tonometria (Tono Pen® XL, Medtronic, Flórida, EUA) e avaliação da superfície ocular através da biomicroscopia com lâmpada em fenda portátil (Portable Slit lamp SL-15®, Kowa, Califórnia, EUA).

Por meio de swabs estéreis, amostras provenientes da conjuntiva de ambos os olhos foram coletadas para análise microbiológica (cultura e antibiograma) – Artigo aceito para publicação na Revista Ciência Rural (Apêndice 1).

### Coleta do Fluido Lacrimal e Preparação das Amostras (Experimento 1 e 2)

A coleta do volume total de 80 µl do filme lacrimal foi feita por capilaridade, com auxílio de um tubo microcapilar de vidro (25µL), a partir do menisco lateral inferior de um ou ambos os olhos, evitando-se tocar a córnea e a conjuntiva. O conteúdo do tubo microcapilar foi cuidadosamente depositado dentro de um microtubo tipo *ependorf* com auxílio de uma seringa

agulhada de três milímetros. Cada tubo continha, previamente, uma solução de 1:1 (80 µl) de um tampão inibidor de fosfatase (PhosStop – Roche) e protease (GE HeathCare). A amostra foi identificada e imediatamente acondicionada em nitrogênio líquido, até a chegada ao laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas do Instituto de Biologia - UnB.

Após a coleta, todas as amostras foram centrifugadas a 3000 x g por 5 minutos, para remover debris celulares e mucos; o sobrenadante foi transferido para outro tubo e armazenado a -80°C, até a análise. A mensuração da quantidade de proteínas foi feita por meio do Kit bioquímico 2D Quant Kit, de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida, as amostras foram secas a vácuo (SpeedVac - Savant®) e novamente acondicionadas a -80°C.

Para análise comparativa do proteoma lacrimal, 32 cavalos foram divididos em 16 grupos de dois indivíduos. Cada dois grupos continham animais com o mesmo conjunto de características quanto ao sexo, faixa etária (a mesma utilizada no experimento 1) e coloração da pelagem; todos da raça Brasileiro de Hipismo (BH) (Figura 1).

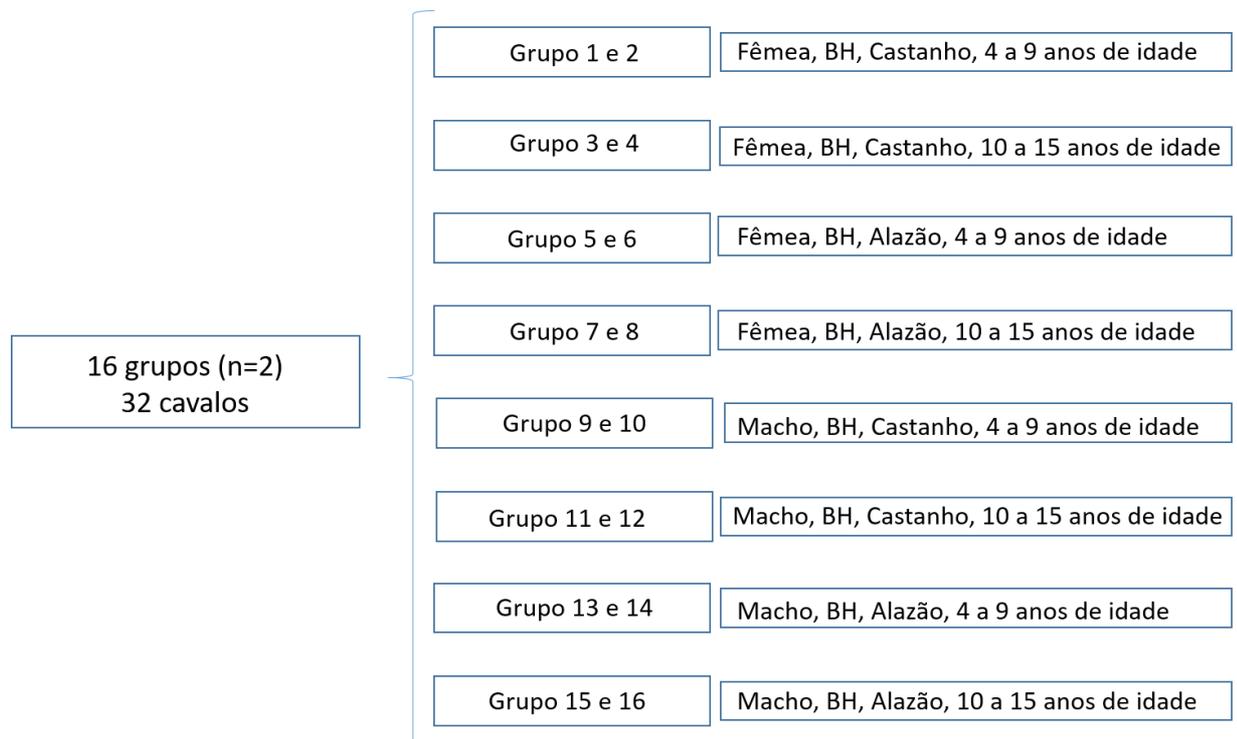


Figura 1 – Esquema de agrupamento dos cavalos para análise comparativa do proteoma lacrimal.

### **Digestão em Filtro (FASP)**

Esta digestão em filtro seguiu o protocolo descrito anteriormente na literatura (WISNIEWSKI et al., 2009), mas com algumas alterações. Aqui, o fluido lacrimal foi ressuspenso em tampão de lise (LB) – SDS 4 % (p/v), TEAB 0,02 M e DTT 0,1 M (pH 7,9) em volume suficiente para obter 4 µg/µl de proteína em cada tubo. Em seguida, a concentração de proteína de cada “pool” foi mensurada com o *Qubit Protein Assay Kit* – Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. Após, alíquotas de 100 µg de proteína foram diluídas em 200 µL de tampão removedor de SDS – ureia 8 M e TEAB 0,02 M (pH 8,5) – e carregadas em três filtros Sartorius com um *cut-off* de 30 KDa. Em seguida, os filtros com as proteínas foram centrifugados a 10.000 g por 15 min; esse procedimento foi repetido com mais 200 µL de tampão removedor de SDS, para garantir que todo o detergente fosse retirado da amostra. Após, uma alíquota de tampão de alquilação – ureia 8 M, TEAB 0,02 M e IAA 0,05 M (pH 8,5) – foi carregada no filtro; as amostras foram incubadas por 20 min no escuro e depois centrifugadas a 10.000 g por 15 min. Novamente, os filtros foram limpos com 200 µL de tampão removedor de SDS; isso foi realizado para se retirar o excesso de IAA. Após a alquilação dos resíduos de cisteína, procedeu-se a troca de tampão carregando o filtro com 100 µL de tampão de digestão – TEAB 0,02 M (pH 7,9). Posteriormente, uma alíquota de 1 µg de tripsina (razão de 1:100 entre amostra e tripsina) foi diluída em tampão de digestão, com esta solução sendo carregada no filtro. A digestão foi feita em um termomixer por 18 horas a 37 °C, em ambiente úmido. Após a digestão, 100 µL de água milliQ foram carregados no filtro, sendo o filtro centrifugado a 14.000 g por 20 min. A amostra de peptídios foi acidificada com TFA para parar a reação de digestão, e secas em SpeedVac.

*A metodologia para o processamento das amostras nos experimentos 1 e 2 seguiu idêntica até este passo, de digestão no filtro (FASP). A partir daí as amostras de cada experimento foram trabalhadas de forma particular até injeção no espectrômetro de massa (LTQ Orbitrap Elite), conforme explica o fluxograma a baixo (Figura 2).*

(Proteoma Lacrimal Comparativo)

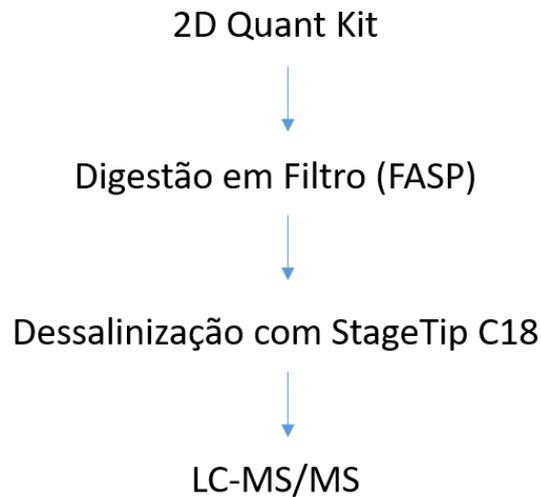


Figura 2 – Fluxograma do processamento das amostras para análise comparativa do proteoma lacrimal de equinos.

### Dessalinização em StageTip de C<sub>18</sub>

As StageTips foram feitas no laboratório de acordo com um protocolo já descrito na literatura (RAPPSILBER et al., 2007). Primeiramente, as membranas Empore de C<sub>18</sub> foram recortadas utilizando agulhas com gauge de 18 (três discos) e 16 (quatro discos), sendo os discos empilhadas dentro de ponteiras *low-binding* T-200. Em seguida, as ponteiras foram colocadas em anéis de plástico e introduzidas dentro de microtubos, os quais foram centrifugados a 5.000 g para homogeneizar o empacotamento das membranas. Depois, a resina de C<sub>18</sub> foi ativada com 100 µL de metanol 100% e posteriormente com uma solução de ácido acético 0.5% e ACN 80%. O equilíbrio da coluna foi realizado com uma solução de ácido acético 0.5%. As amostras provenientes da etapa de digestão estavam secas e foram ressuspensas em TFA 1%, foram introduzidas na coluna e centrifugadas a 900 g por 3 min. Após esse passo, as amostras foram lavadas com uma solução de ácido acético 0.5%, sendo eluídas no mesmo microtubo com concentrações crescentes de ACN de 25, 50, 80 e 100%. Por último, as amostras foram secas na speedvac, ressuspensas em TFA 0,1% e dosadas com o *Qubit Protein Assay Kit*, antes de serem injetadas no cromatógrafo acoplado ao espectrômetro de massas.

## **Análise por LC-MS-MS**

A análise cromatográfica e de espectrometria de massas foi realizada como descrito por Arshib, et al. (2017), com adaptações descritas resumidamente a seguir.

### **Cromatografia**

Os peptídios obtidos foram injetados em sistema cromatográfico (Dionex Ultimate 3000 RSLCnano UPLC, Thermo, USA), configurado com coluna de aprisionamento (*trap column*) de 3 cm x 100  $\mu\text{m}$  contendo partículas de C18 5  $\mu\text{m}$ , 120Å (ReprosilPur, Dr. Maich GmbH), conectada em série à coluna analítica de 24 cm x 75  $\mu\text{m}$  contendo partículas de C18 3  $\mu\text{m}$ , 120 Å (ReprosilPur, Dr. Maich GmbH). As amostras foram injetadas de forma a se obter 1 $\mu\text{g}$  na coluna, submetidas a gradiente linear de eluição entre solventes A (ácido fórmico 0,1% em água) e B (ácido fórmico 0,1% em acetonitrila) de 2% B a 35% B durante 155 min.

### **Espectrometria de Massa**

As frações separadas no sistema cromatográfico foram eluídas diretamente na fonte de ionização de um espectrômetro de massas Orbitrap Elite (Thermo, USA), configurado para operar em modo DDA (data dependent acquisition), sendo que os espectros de MS1 foram adquiridos no analisador orbitrap, com resolução de 120000 e faixa de m/z entre 300 e 1650. Os 20 íons mais intensos, acima do limite de intensidade de 3000 foram fragmentados, gerando espectros de MS2, no analisador ion trap por CID. A reanálise de íons já fragmentados foi inibida por exclusão dinâmica, favorecendo a identificação de peptídios menos abundantes.

### **Análise quantitativa**

Os espectros foram analisados com auxílio do programa *Progenesis QI for Proteomics* (Waters, USA), com o qual foi realizado o alinhamento dos cromatogramas, a quantificação por área dos picos extraídos (*XIC – extracted ion chromatogram*), normalização e análise estatística (ANOVA) dos eventos de MS1. Os eventos significativamente diferentes (p-valor <0,05) tiveram seus espectros de MS2 submetidos à identificação utilizando-se o programa *Peaks*, com os mesmos parâmetros descritos no tópico anterior. Após a inferência de proteínas, a quantificação foi refinada considerando a média dos peptídios atribuídos a cada proteína e foi

realizada a análise estatística em nível de proteínas, sendo consideradas reguladas as proteínas que apresentaram ANOVA p-valor  $<0.05$ . Foi realizado o teste de ANOVA de duas vias, sendo considerados sexo e idade como parâmetros, de forma a se avaliar a interferência entre os fatores na abundância das proteínas. Tais proteínas foram submetidas à análise multivariada de PCA e agrupamento em *clusters* de acordo com os perfis de abundância relativa.

## RESULTADOS

Considerando o parâmetro idade, foram identificadas oito proteínas (Tabela 1). Quanto ao sexo, foram identificadas 54 proteínas, sendo 24 proteínas em fêmeas (Tabela 2) e 30 em machos (Tabela 3). Onze proteínas foram identificadas quando foi considerado a interação de ambos os parâmetros, sexo e idade (Tabela 4).

Tais proteínas permitiram o agrupamento de replicatas e distinção entre condições, conforme ilustra a Figura 3.

Tabela 1. Listagem das oito proteínas lacrimais identificadas em cavalos que são reguladas pelo fator idade. A idade dos animais foi dividida em duas faixas etárias, F1 (4-9 anos) e F2 (10-15 anos)

<b>N.</b>	<b>N. de acesso</b>	<b>Gene</b>	<b>Proteína</b>	<b>Maior média</b>	<b>Menor média</b>	<b>Função biológica</b>
1	GI 338713575		Inibidor de serina protease	F2	F1	Resposta imune
2	F6Q3V7	DST	Proteína não caracterizada	F2	F1	
3	GI 953848624		Carboxil esterase	F2	F1	
4	P05619	SERPINB1	Inibidor de elastase leucocítica	F1	F2	Resposta imune
5	F7BLE3		Proteína não caracterizada	F2	F1	
6	F6W3M5	PKM	Proteína quinase	F2	F1	
7	F6ZI08	TSPAN1	Tetraspanim	F2	F1	
8	GI 723943356		Imunoglobulina de cadeia leve	F2	F1	

Das 24 proteínas lacrimais identificadas nas fêmeas, onze relacionam-se com o processo de defesa da superfície ocular, contando com quatro imunoglobulinas, três proteínas da família S100, mucina (MUC5AC), maior alérgeno Equino 1,  $\alpha$ -fibrinogenio (FGA) e  $\alpha$ -2-glicoproteína-1 (AZGP1); oito delas não foram caracterizadas. Das 30 proteínas identificadas em machos, oito também estão relacionadas com processo de defesa ocular, sendo duas imunoglobulinas, lactoferrina (LTF),  $\alpha$ 2-HS-glicoproteína (AHSG), lizosima C (LYZ), proteína inibitória de fosfolipase A2 (ANXA1) e lipocalina-1 (LCN1); 17 delas foram caracterizadas (Tabela 3). As demais proteínas não possuem registros de função direta na superfície ocular, até o momento.

Tabela 2. Listagem das 24 proteínas lacrimais identificadas em cavalos saudáveis e sem alteração oftálmica, que são reguladas pelo fator sexo feminino

<b>N.</b>	<b>N. de acesso</b>	<b>Gene</b>	<b>Proteína</b>	<b>Função biológica</b>
1	H9GZQ9		Proteína não caracterizada	
2	F6VEX2	THOC5	Proteína não caracterizada	
3	H9GZV1		Proteína não caracterizada	
4	F6T784	DNAH5	Proteína não caracterizada	
5	F6TRJ2	GABRR2	Proteína não caracterizada	
6	F6RM82	S100	Proteína S100	Resposta imune
7	F6SN37	LOC100061699	Proteína não caracterizada	
8	GI 300387688		immunoglobulin lambda light chain V-J region, partial	
9	F6YYI3	S100A8	Proteína S100-A8	Resposta imune
10	GI 723943356		immunoglobulin lambda light chain variable region, partial	
11	F6Q6X3	CORO1A	Coronina	
12	H9GZT5		Proteína não caracterizada	
13	GI 1008836172		immunoglobulin lambda light chain variable region, partial	
14	GI 723943347		immunoglobulin lambda light chain variable region, partial	
15	F6RUZ6	FGA	$\alpha$ -Fibrinogênio	Resposta de defesa
16	F6R7J2	IDH1	Proteína não caracterizada	
17	F6Z5J0	FHDC1	Proteína não caracterizada	
18	F6QC83	MUC5AC	Mucina-5AC	Resposta de defesa
19	GI 32331167		$\alpha$ -imunoglobulina	
20	GI 953882377		PREDICTED: N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	
21	F7CAB8	AZGP1*	Proteína não caracterizada	
22	F7A2U2	CDC42	Proteína não caracterizada	
23	Q14ST5	S100A7	Proteína 100-A7	Resposta imune
24	Q95182		Alérgeno Maior Equ c 1	

Tabela 3. Listagem das 30 proteínas lacrimais identificadas em cavalos saudáveis e sem alteração oftálmica, que são reguladas pelo sexo masculino

<b>N.</b>	<b>N. de acesso</b>	<b>Gene</b>	<b>Proteína</b>	<b>Função biológica</b>
1	F7CU94	LYZ	Lisozima C	Resposta de defesa
2	F6ZI35		Proteína não caracterizada	
3	P02062	HBB	$\beta$ -hemoglobina	Transporte de O <sub>2</sub>
4	F7A103	SYNE1	Proteína não caracterizada	
5	F6WF42	LOC100629895	Proteína não caracterizada	
6	F7DY03	DGKZ	Diacilglicerol quinase	
7	O77811	LTF	Lactotransferrina	Resposta de defesa e imune
8	GI 300387044		immunoglobulin kappa light chain V-J region, partial	
9	F6S777	CBFA2T3	Proteína não caracterizada	
10	GI 356494351		immunoglobulin lambda light chain constant region, partial	
11	Q8HZM6	ANXA1	Proteína inibitória de fosfolipase A2	Resposta imune e inflamatória
12	F7CAC5		Proteína não caracterizada	
13	F7CGD4	PTK2B	Proteína não caracterizada	
14	F7BND9	S100A11	Proteína S100-A11	Resposta imune
15	F7CPJ5	LOC100053601	Proteína não caracterizada	
16	F7CSL8	LOC100065191	Proteína não caracterizada	
17	F6SIN1	DNAJC21	Proteína não caracterizada	
18	F7CDS5	TRIO	Proteína não caracterizada	
19	F6SVT0	SYDE2	Proteína não caracterizada	
20	F6UA46	ADH6	Proteína não caracterizada	
21	F6WYR4	EHBP1	Proteína não caracterizada	
22	GI 723943344		Proteína não caracterizada	
23	F6R2K0	FLG	Proteína não caracterizada	
24	GI 338710647	RFX6	Proteína de ligação com DNA	
25	F6ZAU5	UNC79	Proteína não caracterizada	
26	GI 545179443		PREDICTED: WAP four-disulfide core domain protein 2-like [OS=Equus caballus]	
27	F6WIP4	LCN1	Lipocalina-1	Resposta imune
28	F7C450	AHSG	Proteína não caracterizada	
29	GI 953848624		Proteína não caracterizada	
30	F7C450	AHSG	$\alpha$ -2-HS-glicoproteína	Resposta inflamatória

Tabela 4. Listagem das 11 proteínas lacrimais identificadas em cavalos saudáveis e sem alteração oftálmica, que são reguladas pelos fatores sexo (F=fêmea/ M=macho) e idade

<b>N.</b>	<b>N. de acesso</b>	<b>Gene</b>	<b>Proteína</b>	<b>Maior média</b>	<b>Menor média</b>	<b>Função biológica</b>
1	GI 953891633		PREDICTED: odorant-binding protein-like	F 4-9	F 10-15	
2	F7BND9	S100A11	Proteína S100-A11	F 4-9	F 10-15	Resposta imune
3	F7A103	SYNE1	Proteína não caracterizada	M 10-15	F 10-15	
4	F7CDS5	TRIO	Proteína não caracterizada	F 4-9	F 10-15	
5	F7AS76	ASIC3	Proteína não caracterizada	F 4-9	M 4-9	
6	GI 953851776		Imunoglobulina polimérica	F 4-9	F 10-15	
7	P60708	ACTB	Actina citoplasmática-1	F 4-9	F 10-15	
8	F7C959	ENO3	Enolase 3	M 4-9	F 4-9	
9	GI 300387714		Imunoglobulina de cadeia leve	M 4-9	F 4-9	
10	F7C450	AHSG	$\alpha$ -2-HS-glicoproteína	M 4-9	F 4-9	Resposta inflamatória
11	H9GZS6		Proteína não caracterizada	M 4-9	F 4-9	

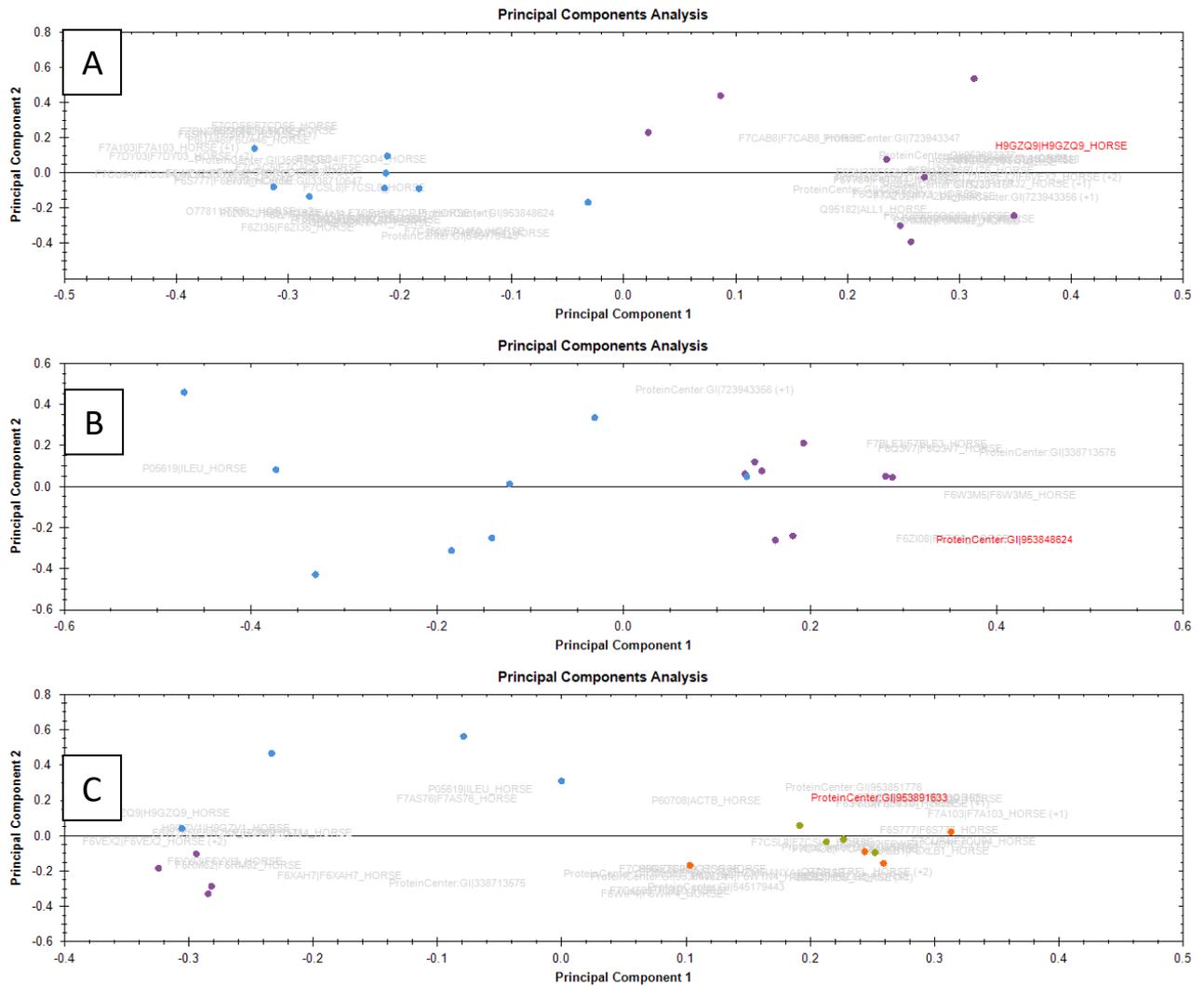


Figura 3. Análises de PCA, em cinza indicando cada proteína, pontos coloridos indicam o posicionamento de cada amostra, sendo que as cores indicam as condições e os pontos da mesma cor indicam replicatas. Em A, análise quanto ao parâmetro sexo. Azul = machos, Roxo = fêmeas. Em B, análise quanto ao parâmetro idade. Azul = 4 a 9 anos, Roxo = 10 a 15 anos. Em C, ANOVA dos dois parâmetros. Azul= fêmeas de 4 a 9 anos, Roxo = fêmeas de 10 a 15 anos, Laranja = machos de 4 a 9 anos Verde = machos de 10 a 15 anos.

Por se tratar de um elevado número de proteínas foi considerado adequado a correção dos resultados estatísticos em função de análises múltiplas. Dessa forma foi realizada uma segunda etapa de análise estatística utilizando-se a plataforma MetaboAnalyst. Foi realizada a correção por FDR dos resultados de ANOVA, bem como os testes *post-hoc* para definição das condições em que cada proteína encontra-se significativamente regulada. Foi também incrementada a análise multivariada de forma a se obterem os *Variable Importance Projection scores (VIP-scores)*, indicando as proteínas que melhor discriminam entre as condições (Figura 6)

e *Sparse PLS discriminant analysis* (sPLS-DA) como forma de aprimorar, em relação à análise de PCA, a detecção de grupos de proteínas diferencialmente abundante, mostrado na Figura 7.

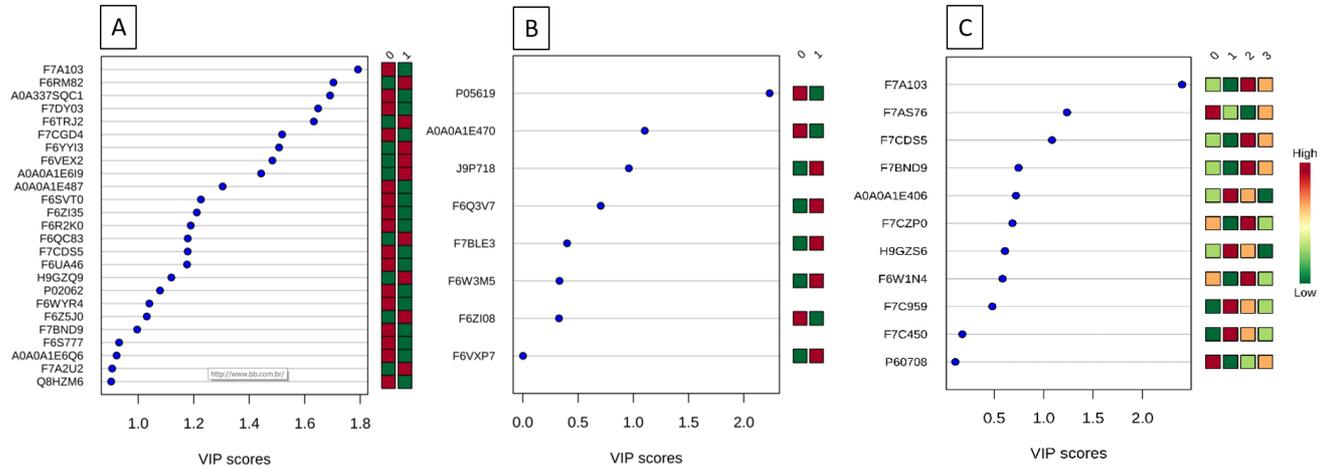


Figura 4. VIP scores das proteínas lacrimais de cavalo que melhor discriminam entre as condições. Em A, análise quanto ao parâmetro sexo, sendo Grupo 1 = fêmea e Grupo 2 = macho. Em B, análise quanto ao parâmetro idade, sendo Grupo 0 = 4-9 anos e Grupo 1 = 10-15 anos. Em C, análise das proteínas significantes para interação dos parâmetro fatores, sexo e idade, sendo Grupo 0 = fêmeas de 4 a 9 anos, Grupo 1 = fêmeas de 10 a 15 anos, Grupo 2 = machos de 4 a 9 anos e Grupo 3 = machos de 10 a 15 anos.

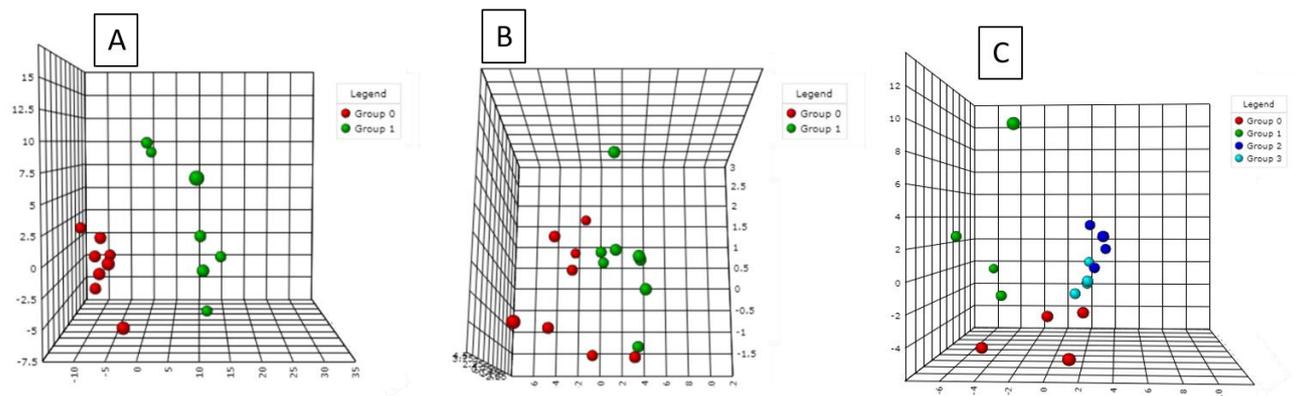


Figura 5. PLS-DA 3D mostrando agrupamento de replicatas e diferenciação entre condições. Em A, análise quanto ao parâmetro sexo, sendo Grupo 0 = fêmeas e Grupo 1 = machos. Em B, análise quanto ao parâmetro idade, Grupo 0 = 4-9 anos e Grupo 1 = 10-15 anos. Em C, análise das proteínas considerando ambos parâmetros, sexo e idade, sendo Grupo 0 = fêmeas de 4 a 9 anos, Grupo 1 = fêmeas de 10 a 15 anos, Grupo 2 = machos de 4 a 9 anos e Grupo 3 = machos de 10 a 15 anos.

## DISCUSSÃO

A superfície ocular está exposta aos microrganismos presentes no meio ambiente, mas raramente se torna colonizada ou infectada por eles, devido às defesas oculares especialmente fornecidas pelos constituintes do filme lacrimal. Em equinos, a presença de tais constituintes com ação antimicrobiana têm especial importância, tendo em vista que essa espécie é suscetível a lesões corneais, uma vez que possuem olhos proeminentes e sujeitos a traumas, aliado a atividade física que desenvolvem e ao ambiente onde vivem (PISANI et al. 1997; WADA et al. 2010).

Nesse sentido, uma das mais importantes funções biológicas desempenhadas pelas proteínas presentes no filme lacrimal consiste na atividade de defesa contra microrganismos. Tal função é desempenhada principalmente pelas proteínas mais abundantes da lágrima: lisozima (LYZ), lactoferrina (LTF), imunoglobulina A secretória (sIgA) e lipocalina 1 (LCN-1). São proteínas classicamente reconhecidas na lágrima humana, representando cerca de 90% do total de proteínas lacrimais (NASH et al., 2006; ZHOU & BEUERMAN, 2012; ZHOU et al., 2012, RUSCIANO, et., 2018). Campos et al. (2008) identificaram lactoferrina e lisozima no filme lacrimal de cães saudáveis e portadores de algum tipo de câncer, mas não encontraram diferença entre os grupos com relação a estas proteínas. Shamsi et al. (2011) também observaram as mesmas proteínas na lágrima de ovelhas, vacas e camelos, sem distúrbios oftálmicos nem sistêmicos. Até o momento essas proteínas ainda não haviam sido descritas, via EM, no fluido lacrimal de cavalos, nem tão pouco relacionadas com o sexo e faixa etária desses indivíduos.

A concentração de lisozima (LYZ) na lágrima é mais alta do que em qualquer outro fluido corporal, o que lhe confere a capacidade de agir como um agente antimicrobiano contra bactérias gram-positivas e gram-negativas na superfície ocular, exibindo ainda propriedades antifúngicas, graças a sua capacidade de quitinase (DAVIDSON & KUONEN, 2004). Ibrahim et al. (2001) confirmaram a ação enzimática da lisozima contra bactérias gram-positivas, especificamente *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*; importante achado, uma vez que tais agentes são os mais frequentemente isolados da conjuntiva ocular de equídeos sem alterações oftálmicas (VIDAL et al., 2010; FOTI et al., 2013; TAMARZADEH & ARAGHI-SOOREH,

2014). O mesmo fora verificado por Ferreira et al., (2017), onde tais gêneros representaram 43% e 13% do total de agentes isolados da conjuntiva ocular de cavalos saudáveis.

Nesta pesquisa, lisozima e lactoferrina foram identificadas no fluido lacrimal dos cavalos machos, sem contudo, relacionar-se com a idade dos indivíduos. Segundo Seal et al., (1986) a LYZ decresce com a idade e está em menores concentrações no fluido lacrimal de pacientes humanos portadores de olho seco. O mesmo foi descrito por Mackie & Seal, (1986), pois observaram que tanto LTF quanto a LYZ tiveram suas concentrações lacrimais reduzidas com o avançar da idade; achado que pode influenciar no surgimento de infecções oculares em pacientes idosos. Opostamente, Kijlstra et al. (1983) não relataram influência da idade ou do sexo na concentração lacrimal de LTF. Ananthi et al. (2011), assim como observado no presente estudo, verificaram que a quantidade de LTF difere entre machos e fêmeas, mas para tais autores a LTF exibiu maiores quantidades no fluido lacrimal de pacientes humanos do sexo feminino, ao passo que nos cavalos a LTF foi identificada em indivíduos do sexo masculino. Tal achado reflete a semelhança no perfil proteico lacrimal de humanos e outras espécies animais, mas, contudo, demonstra que tais proteínas são expressas e reguladas de forma diferente, relacionando-se possivelmente ao ambiente ao qual são expostas.

A lipocalina-1 (LCN-1) é uma proteína ácida, considerada específica da lágrima, e representa cerca de 10 a 20% do total das proteínas que compõem o fluido lacrimal (REDL, et al. 1992). A origem e concentração da LCN-1 na lágrima pode refletir a importante função desta proteína na superfície ocular (KIJLSTRA & KUIZENGA, 1994). Nos equinos aqui estudados a LCN-1 foi regulada pelo sexo, com regulação positiva em machos. Ananthi et al. (2011) também revelaram a LCN-1 diferenciando os gêneros em humanos, porém com regulação positiva em indivíduos do sexo feminino. Acredita-se que deficiências na concentração de LCN-1 podem estar relacionadas com a precipitação da lágrima, resultando em formação de muco e ruptura da estabilidade do filme lacrimal (GLASGOW, et al., 1995), o que deixaria a córnea exposta aos antígenos ambientais e mais susceptível a lesões. Tendo em vista que os equinos são susceptíveis a lesões corneais, a presença balanceada das proteínas lacrimais com atividade antimicrobiana é de vital importância na manutenção da saúde ocular desses animais.

A LCN-1 é considerada ainda uma proteína inibidora de protease no fluido lacrimal; ela é uma cisteína protease e auxilia na proteção da superfície ocular contra proteases de origem microbiana (MCDERMOTT, 2013). O inibidor de elastase leucocítica (SERPINB1) e a  $\alpha$ 2-HS-glicoproteína (AHSG) também são definidas como proteinases lacrimais (DE SOUZA et al., 2006), e foram identificadas no fluido lacrimal dos cavalos do corrente trabalho, com regulação positiva nos indivíduos do sexo feminino.

Proteínases são enzimas hidrolíticas, que existem na forma latente, tornando-se ativas durante a inflamação, podendo ser produzidas pela córnea e/ou por células inflamatórias (FINI e GIRARD, 1990). A elastase leucocítica, também conhecida como elastase neutrofílica (EN), é uma serina protease, e junto com as metaloproteinases (MMP) formam as duas principais famílias de proteínases predominantes no processo de lesão e restauração da córnea em cães e cavalos (OLLIVIER, et al., 2004; CARTER, et al., 2007).

Ollivier et al. (2007) relataram que a atividade proteolítica no filme lacrimal é significativamente maior em córneas lesionadas, em relação a olhos saudáveis e contralaterais de cavalos. Nesse sentido, Strubble et al. (2000), identificaram EN no fluido lacrimal de cavalos, e relataram um aumento significativo desta proteínase nos olhos de indivíduos com ceratite ulcerativa, quando comparado ao olho contralateral (sem alteração), assim como em olhos de outros cavalos saudáveis; para tais autores, a idade não influenciou na concentração de EN no fluido lacrimal de animais saudáveis. Na presente pesquisa a EN não foi identificada no fluido lacrimal dos cavalos, mas seu inibidor sim, e apresentou regulação positiva em indivíduos jovens (4 a 10 anos). Esta diferença na regulação da SERPINB1 no fluido lacrimal dos cavalos, entre as faixas etárias estudadas, pode relacionar-se indiretamente com a redução da atividade do epitélio corneal com o avançar da idade, o que pode diminuir a produção e liberação da EN, com consequente redução na expressão do seu inibidor. Uma possível redução na atividade leucocítica da superfície ocular com o avançar da idade também pode corroborar com tal fenômeno (MASHAGHI, et al., 2017). A identificação do inibidor da elastase neutrofílica (SERPINB1) no fluido lacrimal de cavalos sem alterações oftálmicas é um achado interessante, já que a córnea de equinos manifesta o mais severo grau de ulceração associado a colagenólise estromal vista em animais, devido justamente a presença de enzimas proteolíticas na superfície ocular desta espécie (OLLIVIER, 2004).

A proteína Alergena maior equina faz parte da família das lipocalinas, e está envolvida na resposta alérgica, representando provavelmente o principal alérgeno para indivíduos sensíveis a cavalos (LASCOMBE, et al., 2000). Winiarczyk et al. (2015), identificaram pela primeira vez a proteína alérgica maior canina no fluido lacrimal de cães; no corrente estudo a proteína alérgica maior equina também foi verificada no fluido lacrimal de cavalos, mas até o momento não se sabe ao certo o papel desta proteína na superfície ocular, mas possivelmente está relacionada a resposta imune ocular.

A anexina (ANXA1) ou inibidor de fosfolipase A2 foi identificada no fluido lacrimal dos equinos estudados, demonstrando regulação positiva em indivíduos do sexo masculino. Trata-se de uma proteína anti-inflamatória endógena, que se liga ao cálcio e

fosfolipídeos, com a principal propriedade de inibir a síntese de eicosanoides e fosfolipídeos (PLA2) induzidos por glicocorticoides, auxiliando na resolução da inflamação (PERRETTI, M., & D'ACQUISTO, F. 2009). É indetectável no plasma, mas já foi identificada em células e tecidos de pulmão, medula óssea e líquido seminal. Pesquisadores já demonstraram a ação inibitória da ANXA1 sobre células de neoplasias pulmonares e prostáticas em humanos (CROXTALL et al., 1993; HSIANG et al., 2006) e, mais recentemente, no fluido lacrimal (também de humanos).

Soria et al., (2013), identificaram por meio de ES um painel de cinco biomarcadores, dentre eles a ANXA1, que podem ser utilizados para discriminar com alta sensibilidade ( $\geq 94,3\%$ ) e especificidade ( $\geq 97,6\%$ ), indivíduos controle daqueles com olho seco. Ainda não havia sido identificado ANXA1 no fluido lacrimal de nenhum animal doméstico; logo, sua presença na lágrima de cavalos requer pesquisas adicionais, mas infere-se que a presença desta proteína tenha relação com a regulação de processos inflamatórios oculares em equinos.

Na oftalmologia veterinária nenhuma pesquisa havia identificado mucina-5AC (MUC5AC) no fluido lacrimal de animais e nem sua expressão testada na discriminação de indivíduos quanto ao sexo e idade. No presente estudo, MUC-5AC foi pela primeira vez descrita no fluido lacrimal de cavalos, e positivamente regulada em éguas. Até o momento vinte genes codificadores de mucina foram identificados em humanos, mas somente sete deles desempenham atividades na superfície ocular (OHASHI, et al., 2006). MUC-5AC é uma mucina formadora de gel, secretada pelas células caliciformes presentes na conjuntiva palpebral, mas células epiteliais das glândulas lacrimais e dos ductos nasolacrimais também contribuem para a secreção dessa proteína (ZHOU & BEUERMAN, 2012). Acredita-se que MUC5-AC exerça um importante papel na manutenção da estabilidade do filme lacrimal pré-corneano, atuando como um agente de limpeza, envolvendo detritos, sujidades e patógenos; removendo-os do olho pelo ducto nasolacrimal, e assim prevenindo a aderência de microrganismos nas células epiteliais da superfície ocular.

Em humanos verificou-se a redução na concentração de mucina-5AC em pacientes portadores de “olho seco”, com conseqüente ressecamento corneal (MANTELLI & ARGUESO, 2008); adicionalmente, Lin et al. (2011) demonstraram diminuição no número de células conjuntivais produtoras de MUC-5AC em ratos com “olho seco” induzido por administração de cloreto de benzalcônio, um clássico conservante utilizado em preparações oftálmicas. Em equinos, a ceratoconjuntivite seca (CCS) ou “olho seco”, é considerada uma alteração oftálmica relativamente rara, mas já foi relatada após trauma com fratura do osso estilo-hióideo e ruptura da inervação parassimpática da glândula lacrimal, via nervo facial (SPURLOCK, et al., 1989). Spiess et al. (1989) também relatam um caso de CCS devido inflamação

granulomatosa eosinofílica das glândulas lacrimais, secundária a migração parasitária (*Thelazia lachrymalis*); intoxicação por alfarroba, uso de sulfonamidas, e agentes anestésicos e pré-anestésicos, já foram elencadas como possíveis causas de CCS em cavalos (OLLIVIER, 2004). Entretanto, a pesquisa por esta proteína não foi realizada nestes estudos, afim de inferir se MUC5-AC exerceria algum papel nesses cavalos portadores de CCS.

As S100 são proteínas de ligação ao cálcio, exclusivamente expressas em vertebrados, e composta por 24 membros. Quatro integrantes dessa família foram identificados no presente trabalho: S100 não classificada, S100A7, S100A8 e S100A11. Destas, as três primeiras proteínas exibiram regulação positiva para o sexo feminino, e a S100A11 foi regulada pelos fatores idade e sexo conjuntamente, com regulação positiva em indivíduos do sexo feminino e mais jovens (idade entre 4 e 9 anos). Em humanos, a proteína S100A8, também denominada de calgranulina A, está envolvida na regulação de neutrófilos, quimiotaxia e inflamação, relacionadas a doenças da superfície ocular, como olho seco, disfunção das glândulas de meibômio, pterígio e neovascularização corneana. Nestas doenças oculares inflamatórias os níveis de S100A8 estavam elevados, sugerindo o papel dessa proteína na ativação do sistema imunológico inato do olho (DONATO, et al., 2013). Deng et al. (2013) demonstraram ainda a atividade antimicrobiana da S100A8/A9, que foram positivamente reguladas por *Pseudomonas aeruginosa* presentes em ceratites bacterianas; essas proteínas promoveram na córnea inflamada infiltração de polimorfonucleares, expressão de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e proteína macrofágica inflamatória-2 (MIP-2). S100A8/A9 podem também ter efeitos antimicrobianos e mediar a morte de *P. aeruginosa* via ação direta dos macrófagos.

A proteína S100A7 (psoriasina), é um peptídeo antimicrobiano da pele, que segundo Glasser et al. (2005), também destrói *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, e assim como a S100A8, possuem um importante papel na imunidade inata da superfície ocular. Estudo desenvolvido por Garreis, et al. (2011), demonstrou que a psoriasina é constitutivamente expressa na córnea, conjuntiva, ductos nasolacrimais, e glândulas lacrimal e de meibômio; e que sobrenadantes de *S. aureus* e *Haemophilus influenzae*, mas não de *E. coli*, foram capazes de aumentar a expressão do mRNA da S100A7, em culturas epiteliais de córnea humana.

Por fim, tais informações tornam-se importantes no tocante à oftalmologia equina, uma vez que esses referidos patógenos, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, são importantes colonizadores da superfície ocular de cavalos. *S. aureus* são microrganismos gram-positivos que fazem parte da microflora conjuntival, e por isso são os agentes mais frequentemente isolados da conjuntiva ocular de equídeos sem alterações oftálmicas (VIDAL et al., 2010; FOTI et

al., 2013; TAMARZADEH & ARAGHI-SOOREH, 2014; FERREIRA, et al., 2017), enquanto a *P. aeruginosa* é considerada uma das bactérias gram-negativas mais devastadoras em olhos equinos com úlceras corneais (SAUER et al. 2003; KELLER & HENDRIX, 2005; WADA et al. 2010; WADA et al. 2010). Então, a identificação de proteínas S100 no fluido lacrimal de cavalos, juntamente com as outras proteínas acima relatadas, reforça que assim como em humanos, onde as pesquisas no ramo da proteômica lacrimal já estão bastante avançadas, a lágrima de equinos também é possivelmente constituída principalmente por proteínas relacionadas com a defesa e manutenção da saúde ocular.

## CONCLUSÃO

A maioria das proteínas lacrimais identificadas nos cavalos, que discriminaram os indivíduos de acordo com o gênero e idade, estão relacionadas aos processos de defesa e manutenção dos olhos, inferindo que esses constituintes lacrimais estão em maiores concentrações no fluido lacrimal desses animais, e que desempenham importantes funções na superfície ocular. A lisozima (LYZ), lactoferrina (LTF) e lipocalina-1 (LCN-1) que são proteínas lacrimais abundantes, classicamente descritas no fluido lacrimal de humanos, foram também descritas na lágrima de equinos, diferenciando-os quanto ao gênero. A proteína inibidora de elastase neutrofílica (SERPIMB1) foi pela primeira vez descrita no fluido lacrimal de cavalos, contituindo-se em um importante achado, já que a elastase neutrofílica (EN) é uma das principais proteinases presentes na superfície ocular dessa espécie. Outras proteínas relacionadas a defesa da superfície ocular, como proteína inibidora de fosfolipase A2 (ANXA1), proteínas S100, mucina-5AC (MUC-5AC) e  $\alpha$ -2-HS-glicoproteína (AHSG), foram igualmente descritas pela primeira vez no fluido lacrimal pré-corneano de cavalos. Assim, alterações na qualidade e quantidade desses componentes lacrimais pode implicar em danos a saúde da superfíe ocular.

Adicionalmente, as proteínas encontradas na lágrima dos cavalos exibiram agrupamentos distitintos, demonstrando claramente a diferença de gêneros e de faixas etárias de acordo com as proteínas lacrimais identificadas. Então, pode-se afirmar que as proteínas contidas no fluido lacrimal de cavalos revela diferentes perfis, variando de acordo com a idade e com o sexo do indivíduo. Tal informação, pode no futuro auxiliar no diagnóstico de doenças e apontar possíveis biomarcadores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANANTHI, S., SANTHOSH, R. S., NILA, M. V., et al. Comparative proteomics of human male and female tears by two-dimensional electrophoresis. *Experimental Eye Research*, v. 92, p. 454 – 463, 2011.

ARSHID, S., TAHIR, M., FONTES, B., DE SOUZA MONTERO, E.F., et al., High performance mass spectrometry based proteomics reveals enzyme and signaling pathway regulation in neutrophils during the early stage of surgical trauma. *Proteomics - Clinical Applications*, n. 11, 2017.

CAMPOS, C. F., COLE, N., DYK, D. V., WALSH, B. J., et al. Proteomic analysis of dog tears for potential cancer markers. *Research in Veterinary Science*, v. 85, p. 349-352, 2008.

CHRISTMAS, P., CALLAWAY, J., FALLON, J., JONES, J., HAIGLER, H. T. Selective secretion of annexin 1, a protein without a signal sequence, by the human prostate gland. *J. Biol. Chem.* n. 266, p. 2499–2507, 1991.

CROXTALL, J., FLOWER, R., PERRETTI, M. The role of lipocortin 1 in the regulation of A549 cell proliferation and leukocyte migration. *J. Lipid. Mediat.*n. 6, p. 295–302, 1993.

DE SOUZA, G., GODOY, L. M. F., MANN, M. Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors. *Genome Biology*, v. 7, 2006.

DENG, Q., SUN, M., YANG, K., et al. MRP8/14 enhances corneal susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* Infection by amplifying inflammatory responses. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, n. 54, p. 1227-1234, 2013.

DONATO, R., CANNON, B. R., SORCI, G., RIUZZI, F., HSU, K., WEBER, D. J., GECZY, C. L. Functions of S100 Proteins. *Current Molecular Medicine*, n. 13, p. 24-57, 2013.

GARREIS, F., GOTTSCHALT, M., SCHLORF, T., et al. Expression and regulation of antimicrobial peptide psoriasin (S100A7) at the ocular surface and in the lacrimal apparatus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, n. 52, p. 4914-4922, 2011.

- GLASER, R., HARDER, J., LANGE, H., et al. Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat Immunol*, n. 6, p. 57-64, 2005.
- GLASGOW, B. J., ABDURAGIMOV, A. R., FARAHBAKHS, Z. T., FAULL, K. F., HUBBELL, W. L. Tear lipocalins bind a broad array of lipid ligands. *Curr Eye Res*, n. 14, p. 363-372, 1995.
- HOHENSTEIN-BLAU, N. T., FUNKE, S., GRUS, F. H. Tears as a source of biomarkers for ocular and systemic diseases. *Experimental Eye Research*, v. 117, p. 126-137, 2013.
- HSIANG, C. H., TUNODA, T., WHANG, Y. E., TYSON, D. R., AND ORNSTEIN, D. K. The impact of altered annexin I protein levels on apoptosis and signal transduction pathways in prostate cancer cells. *Prostate*, n. 66, p. 1413–1424, 2006.
- IBRAHIM, H. R., MATSUZAKI, T., AOKI, T. Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of catalytic function. *FEBS*, v. 506, p. 27-32, 2001.
- KIJLSTRA, A., JEURISSEN, S. H. M. and KONING, K. M. Lactoferrin levels in normal human tears. *British Journal of Ophthalmology*, n. 67, p. 199-202, 1983.
- KIJLSTRA, A., KUIZENGA, A. Analysis and function of the human tear proteins. *Adv. Exp. Med. Biol*, n. 350, p. 299-308 1994.
- MACKIE, I. A., SEAL, D. V. Confirmatory tests for the dry eye of Sjogren's syndrome. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, v. 61, p. 220 – 223, 1986.
- MANTELLI, F., ARGUESO, P. Functions of ocular surface mucins in health and disease. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, n. 8, p. 477-483, 2008.
- MASHAGHI, A., HONG, J., CHAUHAN, S. K., & DANA, R. Ageing and ocular surface immunity. *British Journal of Ophthalmology*, v. 101, n. 1, p. 1–5, 2016.
- MCDERMOTT, A., M. Antimicrobial compounds in tears. *Experimental Eye Research*, v. 117, p. 53-61, 2013.
- MICERA, A., DI ZAZZO, A., ESPOSITO, G., et al. Age-Related Changes to Human Tear Composition. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v.59, n. 5, p.2024-2031, 2018.
- NAVA, A., BARTON, K., MONROY, D. C., PFLUGFELDER, S. C., et al.. The effects of age, gender, and fluid dynamics on the concentration of tear film epidermal growth factor. *Cornea*, v.16, p. 430 – 438, 1997.
- OHASHI, Y., DIGRU, M., TSUBOTA, K. Laboratory findings in tear fluid analysis. *Clinica Chimica Acta*, v. 369, n. 1, p. 17-28, 2006.

- PATEL, R., ZHU, M., & ROBERTSON, D. M. Shifting the IGF-axis: An age-related decline in human tear IGF-1 correlates with clinical signs of dry eye. *Growth Hormone & IGF Research*, v. 40, p. 69–73, 2018.
- PERRETTI, M., D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* n. 9, v. 1., p. 62-70, 2009.
- PISANI, E. H. R.; BARROS, P. S. M.; ÁVILA, F. A. Microbiota conjuntival normal de equinos. *Braz. J. vet. Res. Anim. Sei.*, v. 34, n 5. p. 261-265, 1997.
- RAPPSILBER, J., MANN, M., ISHIHAMA, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nature Protocols*, v. 2, n. 8, p. 1896 – 1906, 2007.
- REDL, B., HOLZFEIND, P., LOTTSPREICH, F. cDNA cloning and sequencing reveals human tear prealbumin to be a member of the lipophilic-ligand carrier protein superfamily. *Journal Biol Chem*, n. 1992; 267:20282– 7.
- RUSCIANO, D., PEZZINO, S., OLIVIERI, M., et al. Age-Related Dry Eye Lactoferrin and Lactobionic Acid. *Ophthalmic Research*, v. 60, n. 2, p. 94–99, 2018.
- SCHOENWALD, R. D., VIDVAUNS, S., WURSTER, D. E., BARFKNECHT, C. F. The role of tear proteins in tear film stability in the dry eye patient and in the rabbit. *Adv Exp Med Biol*, n. 438, p. 391-400, 1998.
- SEAL, D. V., MCGILL, J. I., MACKIE, I. A., LIAKOS, G. M., JACOBS, P., GOULDING, N. J. Bacteriology and tear protein profiles of the dry eye. *Br J Ophthalmol*, n. 70, p. 122-125, 1986.
- SPIESS, B. M., WILCOCK, B. P., PHYSICK-SHEARD, P. W. Eosinophilic granulomatous dacryoadenitis causing bilateral keratoconjunctivitis sicca in a horse. *Equine Veterinary Journal*, n. 21, p. 226-228, 1989.
- SPURLOCK, S. L., SPURLOCK, G. H., WISE, M. Keratoconjunctivitis sicca associated with fracture of the stylohyoid bone in a horse. *J Am Vet Med Assoc*, n. 194, p. 258-259, 1989.
- WADA, S. et al. Ulcerative keratitis in throughbred racehorses in Japan from 1997 to 2008. *Veterinary Ophthalmology*, v.13, p.99-105, 2010.
- WINIARCZYK, M., WINIARCZYK, D., BANACH, T., et al. Dog Tear Film Proteome In-Depth Analysis. *Plos One*, v. 23, 2015. DOI:10.1371/journal.pone.0144242
- ZHIRONG, L., XIAOCHEN, L., TONG, Z., YIHUI, W., LI, B., HUI, H., ZUGUO, L. A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalkonium chloride. *Molecular Vision*, n. 17, p. 257-264, 2011.

ZHOU, L., BEUERMAN, R., W. Tear analysis in ocular surface diseases. *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 31, p. 527-550, 2012.

ZHOU, L., BEUERMAN, R., W., HUANG, L. et al. Proteomic analysis of rabbit tear fluid: Defensin levels after an experimental corneal wound are correlated to wound closure. *Proteomics*, v. 7, n. 17, p. 3194-3206, 2007.

## **CAPÍTULO 4**

### **CULTURA E SENSIBILIDADE BACTERIANA DA CONJUNTIVA OCULAR DE EQUINOS DE BRASÍLIA, BRASIL**

*\*Este capítulo refere-se a trabalho concluído, e publicado na Revista Ciência Rural, Santa Maria, v.47, n. 6, 2017.*

*\* O manuscrito encontra-se nas normas da Revista.*

<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160753>

## **Bacterial culture and antibiotic sensitivity from the ocular conjunctiva of horses**

### **Cultura e sensibilidade bacteriana da conjuntiva ocular de equinos**

**(Original Article)**

#### **ABSTRACT**

The aim was to identify the conjunctival bacterial flora of healthy horses in Brasilia (Distrito Federal, Brazil), and to evaluate the antimicrobial susceptibility of the strains isolated. We examined 200 eyes of 100 healthy adult horses without any eye problems, belonging to the 1st Regiment of the Cavalry Guard (RCG) of the Brazilian Army in Brasilia. The samples were collected from the inferior conjunctival fornix of both eyes. The drug sensitivity test was performed with the antibiotics gentamicin (10 µg), tobramycin (10 µg), chloramphenicol (30 µg) and ciprofloxacin (5 µg). Of the 200 samples collected, 131 (65.5%) were considered positive for bacterial growth. A total of 208 bacterial strains belonging to 19 genera were isolated, where there was prevalence of gram-positive bacteria (65%), with *Staphylococcus* sp. being the species of greatest incidence. It was observed that 94, 85, 81 and 68% of the isolates were sensitive to ciprofloxacin, gentamicin, chloramphenicol and tobramycin, respectively. These results can guide the empirical selection antimicrobial therapy for infections of the ocular surface of horses, pending the identification of the etiologic agent.

**Key words:** eye, horse, bacterial flora, antibiogram.

#### **RESUMO**

Objetivou-se identificar a flora bacteriana conjuntival de cavalos saudáveis, residentes de Brasília (Distrito Federal – Brasil), e avaliar a susceptibilidade antimicrobiana das cepas isoladas. Foram avaliados 200 olhos de 100 equinos hígidos, adultos, saudáveis e sem alterações oculares, provenientes do 1º Regimento de Cavalaria de Guarda (RCG) do Exército de Brasília. As amostras foram coletadas do fórnix conjuntival inferior de ambos os olhos. O teste de sensibilidade foi realizado para os antimicrobianos: gentamicina (10 mcg), tobramicina (10 mcg),

cloranfenicol (30 mcg) e ciprofoxacino (5 mcg). Das 200 amostras coletadas, 131 (65,5%) foram consideradas positivas para o crescimento bacteriano. Um total de 208 bactérias pertencentes a 19 gêneros foram isoladas, verificando-se prevalência de bactérias gram-positivas (65%), sendo *Staphylococcus sp*, a espécie de maior incidência. Foi observado que 94%, 85%, 81% e 68% das bactérias isoladas foram sensíveis ao ciprofloxacino, à gentamicina, ao cloranfenicol e à tobramicina, respectivamente. Tais resultados podem direcionar a escolha empírica da terapêutica antimicrobiana nas afecções da superfície ocular de equinos, enquanto se aguarda a identificação do agente etiológico.

**Palavras-chave:** olho, cavalo, flora bacteriana, antibiograma

## INTRODUCTION

The ocular surface is naturally inhabited by microorganisms that constitute its normal microflora. In different animal species, including horses (ANDREW et al., 2003; JOHNS et al., 2011), mules (TAMARZADEH & ARAGHI-SOOREH, 2014), donkeys (FOTI et al., 2013), sheep (BONELLI et al., 2014), dogs (PRADO et al., 2005) and rabbits (ORIÁ et al., 2014), the bacterial population often isolated from healthy eyes is composed of gram-positive bacteria, although strains of methicillin-resistant *Staphylococcus* (MRS) and gram negative strains, both with pathogenic potential, have also been identified (SANTOS et al., 2009; JOHNS et al., 2011; ORIÁ et al., 2013; WILLCOX, 2013; MOUNEY et al., 2013).

The corneal epithelium represents the first barrier to eye infections between the microbiota of the skin and ocular surface, which is reinforced by the mechanical action of the eyelids and the antimicrobial components of the pre-corneal lacrimal film (DONG et al., 2011, MCDERMOTT, 2013). Resident bacteria on the surface of healthy eyes also have the function of maintaining the integrity of the cornea, where they prevent the adherence and colonization of pathogens in the corneal epithelium (SACK et al., 2001).

Some eye infections, however, can be caused by resident microorganisms, which become potentially pathogenic after their virulence is increased by external factors, such as trauma, stress, aging and reduction in commensal microbiota (COGEN et al. 2008; DONG et al., 2011; WILLCOX, 2013). Horses are probably more susceptible to corneal lesions, compared to other species, since they have bulging eyes susceptible to trauma associated with their physical activity and the environment where they live (PISANI et al., 1997; WADA et al., 2010).

Injury to the cornea, invaded by resident, pathogenic or potentially pathogenic microorganisms, leads to keratitis or infected corneal ulcers, which can be difficult to treat and can result in vision loss (MOORE et al. 1988; KUDORA et al., 2015). Knowledge of the eye microflora of healthy horses allows us to establish a suitable antimicrobial therapy, which can be modified after obtaining the results of sensitivity tests, thereby reducing the development of antibiotic-resistant strains (SAUER et al., 2003; KELLER & HENDRIX, 2005; TAMARZADEH & ARAGHI-SOOREH, 2014). Accordingly, the aim of this study was to determine the conjunctival bacterial flora of healthy horses in Brasilia (Distrito Federal – Brazil), and to evaluate the antimicrobial susceptibility of the strains isolated.

## **MATERIALS AND METHODS**

The horses were randomly selected. We evaluated both eyes of 100 healthy horses, without any ocular or previous systemic alterations, adults (between 4 and 15 years old) 60 males and 40 females. Of these, 92 were of the Brasileiro de Hipismo breed and the others of different breeds; the horses belonged to the 1st Regiment of the Cavalry Guard (RCG) of the Brazilian Army in Brasilia. All the horses were placed in similar individual bars, covered, with water and hay, and belonged to the same Regiment, located in the city of Brasília.

For inclusion in this study, all animals were subjected to a routine ophthalmic examination, by a veterinarian in the area of ophthalmology, which was done on the same day as the collection of the samples for microbiological analysis.

The samples from the ocular conjunctiva for microbiological examination were collected with a sterile swab in the inferior conjunctival fornix of both eyes, avoiding touching the eyelashes or eyelids, and were placed test tubes with Stuart transport medium, which were sent to the Microbiology Laboratory of the University of Brasilia (UnB). The collections were done between the months of February and June, when the temperature was 16 to 25°C and the mean relative humidity was 73%, according to the Brazilian Institute of Space Studies (Instituto Nacional of Pesquisas Espaciais, INPE).

The samples were seeded in Petri dishes containing sterile 5% sheep blood agar culture medium, and incubated at 37°C for 48 hours, under aerobic conditions. The plates that did not show bacterial growth within the incubation period were considered negative. After growth, the colonies were subjected to identification according to Gram staining and the use of biochemical tests of oxidation/fermentation glucose (OF), catalase, oxidase, KOH, gelatin and urea.

The test for sensitivity to antibiotics was performed for all bacteria isolated using the disk diffusion assay. Each bacterial strain was inoculated in Mueller Hinton broth and incubated for 24 h. The bacterial suspension was seeded on the surface of a Muller Hinton agar plate, using sterile swabs, and paper disks impregnated with antibiotics were placed on the agar: gentamicin (10 µg), tobramycin (10 µg), chloramphenicol (30 µg) and ciprofloxacin (5 µg). The plates were incubated for 24 h in an incubator, and growth inhibition around each disk was then analyzed, classifying the bacteria as sensitive, intermediate or resistant to the antibiotic. The criteria for the choice of antimicrobials tested were based on the active principles most frequently used in the ophthalmic routine of horses in the Federal District, in addition, topical gentamicin and chloramphenicol are the antibiotics indicated for the preventive treatment of corneal ulcers in horses (SAUER et al., 2003; WADA et al., 2010; JOHNS et al., 2011), with chloramphenicol being still effective against strains of MRS, an emerging infection among equines (KUDORA et al., 2015).

## RESULTS AND DISCUSSION

In the literature, there is a variation of 52% to almost 100% with respect to the frequency of bacteria isolated from the ocular conjunctiva of horses without eye problems (VIDAL et al., 2010; JOHNS et al., 2011; FOTI et al., 2013; TAMARZADEH & ARAGHI-SOOREH, 2014). Such discrepancy has been attributed to the ambient temperature and management to which the animal is subjected (PISANI et al., 1997; JOHNS et al., 2011), although some authors have not identified any significant difference in the number or types of microorganisms isolated during different seasons of the year (ANDREW et al., 2003). Of the 200 samples collected in the present study, 131 (65.5%) showed bacterial growth (Table 1).

A total of 19 genera, of which 8 comprised gram-positive bacteria and 11 gram-negative bacteria, were identified in this study (Table 1). The gram-positive bacteria displayed a predominance of 86.54% among the strains isolated, in accordance with findings for a series of domestic and wild animals (PRADO et al., 2005; SANTOS et al., 2009; SPINELLI et al., 2010; BONELLI et al., 2014; ORIÁ et al., 2014).

*Staphylococcus* sp. and *Bacillus* sp. are gram-positive microorganisms that make up part of the conjunctival microflora and are therefore the most frequent bacteria isolated from the ocular conjunctiva of horses without ophthalmic problems (VIDAL et al., 2010; FOTI et al., 2013; TAMARZADEH & ARAGHI-SOOREH, 2014); this was also found in the present study, where these genera represented 43 and 13% of the total strains isolated, respectively (Table 1). ANDREW et al. (2003), however, identified *Corynebacterium* as the most important genus in the ocular conjunctiva of healthy horses, followed by *Staphylococcus* and *Bacillus*. In the presents study, *Corynebacterium* sp. was the fourth most common microorganism isolated, which has also been demonstrated in the eyes of dogs (PRADO et al., 2005), sheep (BONELLI et al., 2014) and humans (DONG et al., 2011) without eye problems, but at a lower prevalence as that observed in our animals.

Table 1 - Bacteria isolated from the conjunctival fornix of healthy equine eyes, living in Brasília.

<b>Bacteria</b>	<b>Cocci/Bacilli</b>	<b>Gram stain</b>	<b>No. of isolates</b>	<b>% of isolates</b>
<i>Staphylococcus</i> sp.	Cocci	Positive	90	43.26
<i>Bacillus</i> sp.	Bacilli	Positive	27	12.98
<i>Rhodococcus equi</i>	Cocci	Positive	27	12.98
<i>Corynebacterium</i> sp.	Bacilli	Positive	25	12.01
<i>Actinomyces</i> sp.	Cocci	Positive	5	2.4
<i>Micrococcus</i> sp.	Cocci	Positive	3	1.44
<i>Listeria</i> sp	Bacilli	Positive	2	0.96
<i>Streptococcus</i> sp.	Cocci	Positive	1	0.48
<i>Proteus mirabilis</i>	Bacilli	Negative	8	3.84
<i>Pasteurella</i> sp.	Cocci	Negative	7	3.36
<i>Flavobacterium</i> sp.	Bacilli	Negative	4	1.92
<i>Francisella tularenses</i>	Bacilli	Negative	2	0.96
<i>Acinetobacter</i> sp.	Cocci	Negative	1	0.48
<i>Campylobacter</i> sp.	Bacilli	Negative	1	0.48
<i>Enterobacter gergovial</i>	Bacilli	Negative	1	0.48
<i>Enterobacteriace</i>	Bacilli	Negative	1	0.48
<i>Haemophylus</i> sp.	Bacilli	Negative	1	0.48
<i>Serratia liquefaciens</i>	Bacilli	Negative	1	0.48
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Bacilli	Negative	1	0.48
Total isolates			208	100
Absent			69	

Although staphylococcus are commensal bacteria in horses, some strains have acquired a greater pathogen potential by expressing a gene called *mec*, which encodes a binding protein to an altered penicilin, making the use of all beta-lactam antimicrobials used in veterinary

medicine ineffective (MADDOX et al., 2015; VAN SPIJK et al., 2016). Colonization or infections specifically caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), has become a serious condition in equines, and a complex concern among animals, people and public health (TIROSH-LEVY et al., 2015, MADDOX et al., 2015, VAN SPIJK et al., 2016). In horses several sites of MRSA infection have been reported, including skin, respiratory, urinary and reproductive tract (VAN SPIJK et al., 2016). MRSA-infected keratitis has been described in humans (ONGs et al., 2013) and dog (TAGIMA et al., 2013), and recently in a race mare resulting in a fatal condition (KURODA et al., 2015).

Methicillin-resistant *Staphylococcus* (MRS), however, are rarely isolated from healthy animals, but in those hospitalized, the prevalence is much higher (KURODA et al., 2016). In this sense, TIROSH-LEVY et al. (2015) evaluated 206 healthy horses and 84 hospitalized horses, and observed that staphylococcus colonized 3.8% of healthy horses, and 50.6% of hospitalized horses, and from these, MRS was isolated from 21.6% of the sick horses, but not from any healthy horse. In the present study, the search for MRS strains was not performed, but according to the researches published so far, healthy horses that have not undergone any recent surgical procedures and that are not under antibiotic treatment, are not predisposed to MRS infections.

ANDREW et al. (2003) identified *Rhodococcus equi* in the horse conjunctiva in five samples, representing only 0.2% of the total isolates. In our work, this bacterium was found in 27 samples, where it accounted for 12.98% of the isolates identified. *Rhodococcus equi* and *Corynebacterium* sp. are opportunistic bacteria, belonging to the family *Mycolata*, and widely distributed in the environment, where they can be isolated from soil, rocks, feces and intestine of sick and healthy animals. The optimal temperature for their development is about 30°C, and the summer provides the climatic conditions that promote the multiplication of these microorganisms

(KREWER et al., 2008), which can explain the high prevalence of these microorganisms in the present study and their absence in other reported studies.

Although *Bacillus*, *Rhodococcus equi* and *Corynebacterium* are common inhabitants of the healthy conjunctival flora and protect the eyes against invasive microorganisms, some of these can act as opportunistic pathogenic strains, causing damage to the ocular system, mainly when the corneal epithelium is injured, which can be aggravated by the presence of gram-negative microorganisms (ANDREW et al., 2003).

Of the 11 genera of gram-negative bacteria identified, six belonged to the family *Enterobacteriaceae*, where the strain *Proteus mirabilis* was the most often isolated, representing 28.57% of all gram-negative bacteria isolated. Similar findings were respectively reported by SANTOS et al. (2009) and FOTI et al. (2013) in studies with dogs and horses with healthy eyes. JOHNS et al. (2011), meanwhile, found the genus *Acinetobacter* as the most representative for the group of gram-negative bacteria, and did not identify *Proteus mirabilis* in their study. In accordance with these authors, we found a high prevalence of *Acinetobacter sp.*, probably due to the contamination of the environment around the horse's skin, besides being considered part of the normal microflora of the human skin.

*Pseudomonas spp.* is a gram-negative bacillus, considered as one of the most virulent pathogens of the cornea, with a prevalence between 6 and 14% among the microorganisms identified in corneal ulcers of horses (SAUER et al. 2003; KELLER & HENDRIX, 2005; WADA et al. 2010; WADA et al. 2010). As expected, this genus was not isolated in the present study, although it was previously identified in the eyes of horses without ophthalmic problems (ANDREW et al. 2003; VIDAL et al. 2010; JOHNS et al. 2011).

A low prevalence of potential pathogens, such as *Streptococcus sp.* and strains of the family *Enterobacteriaceae*, such as *Enterobacteriace* and *Serratia sp.* were identified here, and previously isolated in horses with and without ocular pathologies (KELLER & HENDRIX, 2003;

ANDREW et al., 2003; JOHNS et al., 2011; TAMARZADEH & ARAGHI-SOOREH, 2014). Both *Streptococcus* and *Serratia* are commensal microorganisms of the ocular conjunctiva of horses, but can become pathogenic and trigger diseases when colonizing wounds (SAUER et al., 2003; VIDAL et al., 2010).

Corneal infections and endophthalmitis caused by *Streptococcus* are not uncommon in horses and can be devastating (BROOKS et al., 2000). It is believed that *Serratia* sp. has the capacity to release proteases, resulting in liquefactive necrosis and corneal perforation (LYERLY et al., 1981). Since pathogenic bacteria are present in the environment, the low isolation of these microorganisms on the eye surface of horses in this study suggests that the normal flora can control or suppress colonization by pathogens.

Lesions on the ocular surface, with the formation of ulcerative keratitis, are frequent in horses, due to their anatomic particularities and activity (WADA et al., 2010; KURODA et al., 2015) and the immediate use of antibiotics is recommended to prevent the establishment of infections. Sensitivity to antibiotics among the pathogens that often affect the ocular system of horses, however, tends to change over time and can vary with geographic location, and with the type of strain that affects the animal (SAUER et al., 2003; TIROSH-LEVY et al., 2015).

Antibiotics indicated for the preventive treatment of ulcers of the cornea in horses include topical gentamicin and chloramphenicol (SAUER et al., 2003; WADA et al., 2010; JOHNS et al., 2011). According to Matthews (2009), gentamicin is effective against gram-positive (cocci) and gram-negative (cocci and bacilli) bacteria, while chloramphenicol is active only against gram-positive cocci. This was apparent in the present study, where the majority of the strains identified were gram-positive cocci, and these antimicrobials exhibited an efficacy of 85 and 81% against the bacterial isolates, respectively (Table 2). The same was not observed by Tamarzadeh & Araghi-Sooreh (2014), reporting *Staphylococcus*, *Bacillus*, and *Corynebacterium* as the bacteria most often identified, with low efficacy of gentamicin and chloramphenicol.

Table 2 - Culture and antibiogram of bacteria isolated from the conjunctival fornix of healthy equine eyes, living in Brasília.

<b>Bacterium</b>	<b>No. of Isolates</b>	<b>Gentamicin</b>	<b>Tobramycin</b>	<b>Chloramphenicol</b>	<b>Ciprofloxacin</b>
<i>Staphylococcus</i> sp.	90	85.55%	76.66%	85.55%	96.66%
<i>Bacillus</i> sp.	27	81.48%	70.37%	77.77%	92.59%
<i>Rhodococcus equi</i>	27	92.59%	51.85%	85.18%	92.59%
<i>Corenybacterium</i> sp.	25	84%	72%	88%	100%
<i>Proteus mirabilis</i>	8	100%	87.50%	75%	100%
<i>Pasteurella</i> sp.	7	57.14%	28.57%	71.42%	71.42%
<i>Actinomyces</i> sp.	5	100%	60%	40%	100%
<i>Flavobacterium</i> sp.	4	25%	25%	25%	25%
<i>Micrococcus</i> sp.	3	66.66%	66.66%	66.66%	100%
<i>Listeria</i> sp.	2	100%	100%	50%	100%
<i>Francisella tularensis</i>	2	100%	50%	50%	100%
<i>Acinetobacter</i> sp.	1	100%	100%	100%	100%
<i>Campylobacter</i> sp.	1	100%	0%	100%	100%
<i>Enterobacter gergovial</i>	1	100%	0%	100%	100%
<i>Enterobacteriace</i>	1	100%	0%	100%	100%
<i>Haemophilus</i> sp.	1	100%	100%	100%	100%
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	Inconclusive	Inconclusive	Inconclusive	Inconclusive
<i>Streptococcus</i> sp.	1	100%	100%	100%	100%
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	100%	100%	100%	100%
Total percentage of sensitive isolates	208	84.61%	68.26%	80.76%	93.75%

Keller & Hendrix (2003) demonstrated a similar effectiveness as in our study, finding 78% of bacterial strains sensitive to gentamicin and chloramphenicol. These authors, along with Wada et al. (2010), found that chloramphenicol was efficacious against all *Streptococcus* sp. isolates, which are gram-positive cocci, but not against *Pseudomonas*, while gentamicin was effective against both types of bacteria, corroborating the findings of Matthews (2009). In addition, chloramphenicol was effective against MRSA that contaminated keratitis in horses (KURODA et al., 2015) and dog (TAGIMA et al., 2013). Despite the evident activity of gentamicin, resistance among microorganisms associated with keratitis in horses has been increasingly reported, as found for *Streptococcus* sp. and *Pseudomonas* sp. (SAUER et al., 2003), and *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin (MRSA) (KURODA et al., 2015). Additionally, it is known that gentamicin is toxic to cells of the corneal epithelium and possibly affects wound healing, thus calling for its use with caution and only when necessary (HENDRIX et al., 2001).

Tobramycin was the least effective antibiotic against the bacteria identified, showing activity against 68% of the isolates, similar to Keller & Hendrix (2003) studies, finding that only 41% of the microorganisms isolated were sensitive to tobramycin, despite showing high activity against *Pseudomonas* sp. Wada et al. (2010) observed 88% efficacy with the use of tobramycin, but most of the bacterial isolates were *Pseudomonas* sp. In these two studies, tobramycin was ineffective against *Streptococcus* sp. Tobramycin has shown to be equally ineffective against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), isolated from ulcerative keratitis in animals (TAGIMA et al., 2013; KURODA et al., 2015). Such findings justify the prescription of this antibiotic in infections by gram-negative bacilli. Accordingly, the low bacterial sensitivity to tobramycin was expected, since the majority of the strains isolated here were gram-positive.

Ciprofloxacin belongs to fluoroquinolones class, which a broad spectrum of activity against gram-positive and gram-negative organisms, and anaerobic microorganisms as well (SILVA & HOLLENBACH, 2010), explaining its effectiveness in the present study, as observed by Keller & Hendrix (2003), and also by Sauer et al. (2003) and Wada et al. (2010), but with the use of other fluoroquinolones. Ciprofloxacin should be reserved for severe cases, or infections where bacterial susceptibility is confirmed (SILVA and HOLLENBACH, 2010; WADA et al., 2010), because besides having a broad antimicrobial activity, it is known that its use inhibits the migration of epithelial cells in the cornea, which can compromise wound healing (HENDRIX et al., 2001).

## **CONCLUSION**

The treatment for ocular bacterial infections is often initiated prior to the identification of the causative pathogen and before the antimicrobial susceptibility test been available. Thus, the choice of medications rests on drugs that historically demonstrated effectiveness *in vivo* and *in vitro*, against a broad spectrum of possible microorganisms. Nevertheless, more and more resistant microorganisms to commonly used drugs are isolated, such as MRSA, with a probable zoonotic potential.

The identification of the normal microflora of the ocular conjunctiva from horses, and their sensitivity to the antimicrobials used in the current study is important because it helps the clinicians to find the correct course of prophylactic treatment in case of corneal ulcer, until the results of the culture and antibiogram are available, which can take days, and consequently result in vision loss, especially if appropriate antimicrobial treatment is delayed, and/or performed with inappropriate antibiotics.

## **BIOETHICS AND BIOSSECURITY COMMITTEE**

The study was submitted to and approved by the **Committee of Ethics and Use of Animals** of the University of Brasilia (protocol No. 153838/2014), and in accordance with the

ethics principles of ARVO (Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research).

## REFERENCES

ANDREW, S. E. et al. Seasonal effects on the aerobic bacterial and fungal conjunctival flora of normal thoroughbred brood mares in Florida. **Veterinary Ophthalmology** v.6, n.1, p.45-50, 2003. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1463-5224.2003.00265.x>>. Accessed: Feb. 20, 2016. doi: 10.1046/j.1463-5224.2003.00265.x

BONELLI, F. et al. Conjunctival bacterial and fungal flora in clinically normal sheep. **Veterinary Record**, v.1, n.1, p.1-4, 2014. Available from: <<http://vetrecordopen.bmj.com/content/1/1/e000017.full.pdf+html>>. Accessed: Feb. 20, 2016. doi: 10.1136/vropen-2013-000017.

BROOKS, D. E. et al. Ulcerative keratitis caused by beta-hemolytic *Streptococcus equi* in 11 horses. **Veterinary Ophthalmology**, v.3, n.2-3. p.121-125, 2000. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1463-5224.2000.3230121.x>>. Accessed: Mar. 10, 2016. doi: 10.1046/j.1463-5224.2000.3230121.x.

COGEN, A. L. et al. Skin microbiota: a source of disease or defense? **Br. J. Dermatol**, v.158, n.3, p.442-455, 2008. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2746716/pdf/nihms91877.pdf>>. Accessed: Mar. 10, 2016. doi:10.1111/j.1365-2133.2008.08437.x.

DONG, Q. et al. Diversity of bacteria at healthy human conjunctiva. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.52, n.8, p.5408-5413, 2011. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3176057/pdf/z7g5408.pdf>>. Accessed: Feb. 22, 2016. doi:10.1167/iovs.10-6939.

FOTI, M. et al. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the microbial flora from the conjunctiva of healthy donkeys from Sicily (Italy). **Veterinary**

**Ophthalmology**, v.16, n.2, p.89-92, 2013. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-5224.2012.01028.x>>. Accessed: Feb. 22, 2016. doi:10.1111/j.1463-5224.2012.01028.x.

HENDRIX, D. V. H. et al. Effects of antibiotics on morphologic characteristics and migration of canine corneal epithelial cells in tissue culture. **Am. J. of Vet. Res.**, v.62, n.10, p.1664-1669, 2001.

Accessed: Mar. 12, 2016. Online. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11592337>>. JOHNS, I. C. et al. Conjunctival bacterial and

fungal flora in healthy horses in the UK. **Veterinary Ophthalmology**, v.14, n.3, p.195-199, 2011.

Available from < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-5224.2010.00867.x>>. Accessed: Mar. 15, 2016. doi: 10.1111/j.1463-5224.2010.00867.x

KELLER, R. L.; HENDRIX, D. V. H. Bacterial isolates and antimicrobial susceptibilities in equine bacterial ulcerative keratitis. **Equine Veterinary Journal**, v.37, n. 3, p. 207-211, 2005.

Available from: <<http://dx.doi.org/10.2746/0425164054530731>>. Accessed: Feb. 22, 2016. doi: 10.2746/0425164054530731.

KREWER, C. C. et al. *Rhodococcus equi*. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.75, n.4, p.533-545, 2008.

Accessed: Feb. 22, 2016. Online. Available from: <[http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v75\\_4/krewer.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v75_4/krewer.pdf)>.

KURODA, T. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ulcerative keratitis in a Thoroughbred racehorse. **Journal Equine Science**, v. 26, n. 13, p. 95-98, 2015. Available from:

<<http://doi.org/sci-hub.cc/10.1294/jes.26.95>>. Accessed: Oct. 25, 2016. doi: 10.1294/jes.26.95.

KURODA, T. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonisation and infection in Thoroughbred racehorses and veterinarians in Japan. **Veterinary Record**, v. 7, n. 19, 2016.

Available from: <<http://www.veterinaryrecord.bmj.com>>. Accessed: Oct. 25, 2016. doi: 10.1136/vr.103576.

LYERLY, D. et al. Characterization of rabbit corneal damage produced by *Serratia* keratitis and by *Serratia* protease. **Infect Immun**, v.33, n.3, p.33:927-932, 1981. Accessed: Mar. 12, 2016. Online. Available from: <<http://iai.asm.org/content/33/3/927.long>>.

MADDOX, T. W. et al. Antimicrobial resistance in bacteria from horses: Epidemiology of antimicrobial resistance. **Equine Veterinary Journal**, v.47, n. 6, p. 756-765, 2015. Accessed: Oct. 25, 2016. doi: 10.1111/evj.12471.

MATTHEWS A. G. Ophthalmic antimicrobial therapy in the horse. **Equine Veterinary Education**, v.21, n.5, p.271-289, 2009. Available from: <<http://dx.doi.org/10.2746/095777308X334266>>. Accessed: Feb. 20, 2016. doi: 10.2746/095777308X334266

MCDERMOTT, A. M. et al. Antimicrobial compounds in tears. **Exp Eye Res**, v. 117, p. 53-61, 2013. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3844110/pdf/nihms508402.pdf>>. Accessed: Mar. 10, 2016. doi: 10.1016/j.exer.2013.07.014

MOUNEY, M. C. et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. in the conjunctival sac of healthy dogs. **Veterinary Ophthalmology**, p. 1-4, 2015. Accessed: Nov. 06, 2016. doi:10.1111/vop.12130

ONG, S. J. et al. *Staphylococcus aureus* keratitis: a review of hospital cases. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1-6, 2013. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0080119>>. Accessed: Nov. 06, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0080119

ORÍÁ, A. P. et al. Conjunctival flora, Schirmer's tear test, intraocular pressure, and conjunctival cytology in neotropical primates from Salvador, Brazil. **J Med Primatol**, v.42, n.6, p.287-292, 2013. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1111/jmp.12059>>. Accessed: Feb. 20, 2016. doi: 10.1111/jmp.12059

- ORÍÁ, A. P. et al. Tear production, intraocular pressure and conjunctival microbiota, cytology and histology of New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Pesq. Vet. Bras**, v.34, n.10, p.1024-1028, 2014. Available from: <<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v34n10/16.pdf>>. Accessed: Mar. 10, 2016. doi: 10.1590/S0100-736X2014001000016
- PISANI, E. H. R. et al. Microbiota conjuntival normal de equinos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.34, n.5, p.261-265, 1997. Accessed: Mar. 12, 2016. Online. Available from: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/bjvras/article/download/2890/2127>>.
- PRADO, M. R. et al. Survey of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Fortaleza, Ceará, Brazil. **Veterinary Ophthalmology**, v.8, n.1, p.33-37, 2005. Available from: <<http://dx.doi.org/http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-5224.2005.04061.x>>. Accessed: Mar. 12, 2016. doi: 10.1111/j.1463-5224.2005.04061.x.
- SANTOS, L. G. F. et al. Microbiota conjuntival de cães hígidos e com afecções oftálmicas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.37, n.2, p.65-169, 2009. Accessed: Mar. 10, 2016. Online. Available from: <<http://www.ufrgs.br/actavet/37-2/art826.pdf>>.
- SACK, R. A. et al. Host-defense mechanism of the ocular surfaces. **Bioscience Reports**, v.21, n.4, p. 463-480, 2002. Available from: <<http://www.bioscirep.org/content/21/4/463.full-text.pdf>>. Accessed: Mar. 12, 2016. doi: 10.1023/A:1017943826684.
- SAUER, P. et al. Changes in antibiotic resistance in equine bacterial ulcerative keratitis (1991-2000): 65 horses. **Veterinary Ophthalmology**, v.6, n.4, p.309-313, 2003. Available from: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1463-5224.2003.00312.x/full>>. Accessed: Mar. 12, 2016. doi: 10.1111/j.1463-5224.2003.00312.x.
- SILVA, J. M.B. & HOLLENBACH, C. B. Fluoroquinolonas x Resistência bacteriana na Medicina Veterinária. **Arq. Inst. Biol**, v.77, n.2, p.363-369, 2010. Accessed: Mar. 10, 2016. Online. Available from: <[http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v77\\_2/silva1.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v77_2/silva1.pdf)>.

SPINELLI, T. C. et al. Normal aerobic bacterial conjunctival flora in the Crab-eating raccoon (*Procyon cancrivorus*) and Coati (*Nasua nasua*) housed in captivity in Pernambuco e Paraíba (Northeast, Brazil). **Veterinary Ophthalmology**, v.13, Suppl., p.134-136, 2010. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-5224.2009.00728.x>>. Accessed: Mar. 10, 2016. doi: 10.1111/j.1463-5224.2009.00728.x.

TAJIMA, K. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* keratitis in a dog. **Veterinary Ophthalmology**, v. 16, p. 240–243, 2013. Accessed: Nov. 06, 2016 doi:10.1111/j.1463-5224.2012.01066.x

TAMARZADEH, A.; ARAGUI-SOOREH, A. Bacterial flora of the conjunctiva in healthy mules. **Reveu Méd.Vét**, v.165, p.334-337, 2014. Accessed: Mar. 10, 2016. Online. Available from: <[http://www.revmedvet.com/2014/RMV165\\_334\\_337.pdf](http://www.revmedvet.com/2014/RMV165_334_337.pdf)>.

TIROSH-LEVY. S. Prevalence and risk factors for colonization with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococci* species in hospitalized and farm horses in Israel. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 122, p. 135-144, 2015. Accessed: Oct. 25, 2016. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.09.007>>. doi: 10.1016/j.prevetmed.2015.09.007.

VAN SPIJK. J. N. A retrospective analysis of antimicrobial resistance in bacterial pathogens in an equine hospital (2012-2015). **Schweiz Arch Tierheilkd**, v. 158, n. 6, p. 433-442, 2016. Accessed: Oct. 25, 2016. doi: 10.17236/sat00068.

VIDAL, G. H et al. Localización de *Serratia marcescens* em perfil bacteriológico y fúngico de la conjuntiva de caballos clínicamente sanos en Monterrey, Nuevo León, México. **Vet. Méx**, v.41, n.4, p. 239-249, 2010. Accessed: Mar. 12, 2016. Online. Available from: <<http://www.scielo.org.mx/pdf/vetmex/v41n4/v41n4a1.pdf>>.

WADA, S. et al. Ulcerative keratitis in throughbred racehorses in Japan from 1997 to 2008. **Veterinary Ophthalmology**, v.13, p.99-105, 2010. Available from:

<<http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-5224.2010.00767.x>>. Accessed: Feb. 22, 2016. doi: 10.1111/j.1463-5224.2010.00767.x.

WILLCOX, M. D. P. Review of resistance of ocular isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *staphylococci* from keratitis to ciprofloxacin, gentamicin and cephalosporins. **Clinical and Experimental Optometry**, v.94, n.2, p.161-168, 2011. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1444-0938.2010.00536.x>>. Accessed: Feb. 22, 2016. doi: 10.1111/j.1444-0938.2010.00536.x.

WILLCOX, M. D. P. Characterization of the normal microbiota of the ocular surface. **Experimental Eye Research**, v.117, p. 99-105, 2013. Available from <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2013.06.003>>. Accessed: Mar. 10, 2016. doi: 10.1016/j.exer.2013.06.003.

**Acknowledgments** to DROGAVET – Brasília, DF, for the Schirmer tear test and fluorescein strips.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise do fluido lacrimal tem demonstrado ser promissora não somente na avaliação da superfície ocular, mas também na busca por marcadores biológicos de desordens sistêmicas. No entanto, proteômica baseada em espectrometria de massa, que é a tecnologia capaz de mapear com a especificidade necessária as proteínas lacrimais, demanda utilização de aparelhos e insumos onerosos, e profissionais capazes de processar e manusear corretamente os equipamentos; isso aliado a falta de dados em bancos de proteínas de animais domésticos, torna trabalhosa a busca e caracterização das proteínas lacrimais. Deste modo, estudos em proteômica lacrimal baseada em EM ainda está restrita a poucos centros de pesquisa, e vinculados a trabalhos científicos experimentais.