

Dosagem de lisozima na lágrima humana

Marciano F. da Vila * & Igor Mimica Mimica **

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, vários trabalhos, onde se procurou realizar a dosagem de lisozima, têm demonstrado que a mesma se encontra diminuída numa série de patologias, onde podemos incluir a conjuntivite aguda, as iridociclites, o herpes simples, os estados de sub-nutrição, as conjuntivites químicas, a síndrome de Sjögren e a artrite reumatóide 1,7,14,16.

A partir dessas informações poder-se-ia indagar: a lisozima pode ser considerada um fator importante na prevenção e tratamento de determinadas enfermidades, principalmente as relacionadas com o segmento anterior do olho.

Nos resumos da literatura oftalmológica russa, há alguns artigos relatando a eficácia do seu uso no tratamento da conjuntivite e da úlcera de córnea 16. Numerosas análises de títulos da lisozima têm sido relatadas na literatura mundial 11. Os primeiros registros são de Covka e Prica em 1911. Fleming, em 1922, descobriu "um elemento marcadamente bacteriológico no muco nasal, que era capaz de destruir certas bactérias, particularmente o *Micrococcus lysodeikticus*, que ele chamou de lisozima".

A lisozima é uma enzima de cadeia longa e alto peso molecular, presente em todos os tecidos dos seres humanos. Promove a despolimerização do mucopolissacarídeo altamente polimerizado das bactérias. Isto significa que é uma enzima mucolítica, que transforma complicados mucóides em formas simples, liberando açúcar degradado, que se acredita ser uma exosamina. Esta quebra, que pode ocorrer tanto em bactérias vivas como mortas, ocorre por meio de hidrólise de substâncias mucóides dentro da membrana das bactérias 16.

O conteúdo protéico da lágrima é uma característica específica de cada espécie animal e a função da lisozima varia amplamente de uma espécie para outra. Ainda que a lisozima esteja presente na maioria dos tecidos e secreções animais, somente nos leucócitos, secreção nasal e lágrima sua concentração é suficientemente elevada para ser bactericida. A lisozima no fluido lacrimal é a única enzima que é secretada numa concentração constante, independentemente da taxa de secreção. Seria uma proteína in-

trínseca da lágrima, associada com a secreção ativa do fluido lacrimal primário no ácido 17.

OBSERVAÇÃO E MÉTODO

1. Material

- Meio de cultura: Eugonagar "BBL"
- Inóculo: *Micrococcus luteus*
- Círculos de papel de filtro com diâmetro de 6 mm, Whatman n.º 41
- Lisozima: Lysozyme Salt Free (Egg White) 11.700 UI/mcg Worthington Biochemical Corporation
- Colorímetro B.L. — "Spectronic 20" ou similar
- Pacientes: 95 estudantes do 1.º ano da F.C.M.S.C.-SP, turma de 1980, com faixa de idade variando de 17 a 22 anos.

2. Método

A. Elaboração das placas de Petri e curva padrão.

a. Placas de Petri com 20 ml de Eugonagar; este meio, onde é colocado o inóculo, é aquecido a 45.º e, posteriormente, refrigerado.

b. A cultura pura de *Micrococcus* foi diluída em solução fisiológica, numa leitura de 10% de transmitância no espectrofotômetro, num comprimento de onda de 570 Å. Acrescenta-se essa solução ao meio de cultura.

c. A lisozima foi diluída em tampão de fosfato pH6, em diluições finais que correspondem a 3.200, 1.600, 800, 400 e 200 mcg/ml.

d. Os discos de papel filtro, com 6 mm de diâmetro, são embebidos na solução de lisozima e colocados nas placas de Petri, devidamente preparadas, intercalando-se com a solução considerada padrão de 800 mcg/ml (Fig. 1).

e. Os halos de lise ou de inibição bacteriana são lidos no contador de colônias, medindo-se seu diâmetro através do método de Randall. A fim de se obter uma curva padrão, coloca-se as concentrações de lisozima em ordenada e, em abscissa, os valores dos halos.

B. Elaboração da Curva:

a. Foram realizados exames oftalmológicos completos dos pacientes, para descartar aqueles que possuíssem alguma doença,

* Adjunto Voluntário da F.C.M.S.C.S.P.

** Professor Pleno de Microbiologia e Imunologia da F.C.M.S.C.S.P.

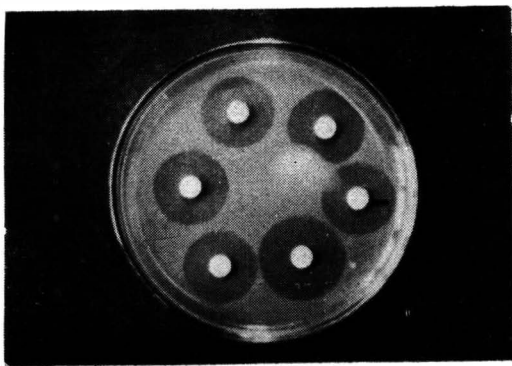


Fig. 1 — Filtro de papel, em meio de cultura com a presença de halos de lise.

ocular ou sistêmica, que pudesse de alguma forma influir na dosagem da lisozima.

b. A seguir, esses pacientes foram submetidos a colheita de lágrima, depositando-se o papel de filtro no terço lateral do fórnice inferior do olho direito, com a ajuda de uma pinça de dente, permanecendo ele depositado nessa região o tempo suficiente para que pudesse ser embebido pela lágrima. Não foi considerada neste procedimento a perda da lágrima pela evaporação, pois o seu valor não é significativo¹⁰ e também não foi determinado um tempo padrão para a permanência do papel de filtro no fórnice. A colheita foi realizada sempre pela mesma pessoa, no mesmo ambiente, nas mesmas condições e no mesmo horário.

c. O papel de filtro, já embebido pela lágrima, foi então depositado nas placas de Petri em número de três por placa, alternadamente com papel de filtro onde as concentrações de lisozima são conhecidas (800 mcg/ml). A seguir, as placas ficaram em estufa a 37°C durante 24 hs e posteriormente foram lidas, sempre pela mesma pessoa e pela técnica já anteriormente citada.

RESULTADOS

Através da concentração conhecida de lisozima em mcg/ml, determinamos o valor dos halos em mm, podendo desta maneira traçar o gráfico I.

Com o diâmetro das lises conhecido, foi feita a extrapolação dos dados para o gráfico padrão (gráfico I) e se encontrou a concentração correspondente ao material colhido dos pacientes.

Com os valores das concentrações de lisozima, foram feitas tabelas e gráficos que pudessem ajudar na compreensão dos dados obtidos. Assim Gráfico II, foram agrupados os dados das concentrações variando de 200 mcg/ml, a fim de dar uma idéia ampla das variações em percentagem.

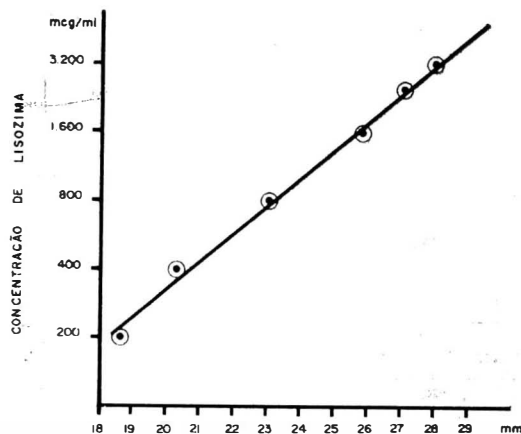


Gráfico I — Curva padrão da lise bacteriana medida em mm de halo com diferentes concentrações de lisozima.

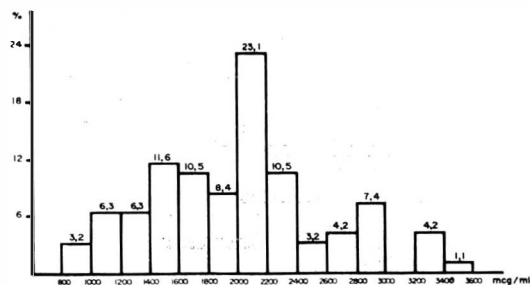


Gráfico II — Distribuição percentual das concentrações da lisozima na lágrima de estudantes do 1º ano da F.C.M.S.C.S.P. — 1980.

A seguir, foram calculados os valores médios da concentração de lisozima com o intervalo de confiança representado no Gráfico III.

COMENTARIOS

O método por nós desenvolvido foi baseado no de Bonavida e Sapse^{3,4}, por ser um método que se assemelha mais às nossas condições, tanto econômicas como materiais. Não foi nosso intuito fazer comparações com valores determinados por outros autores, uma vez que esses são encontrados em condições totalmente diversas das nossas.

A bactéria usada foi o *Micrococcus luteus*, porque, segundo o Manual Bergey², em sua oitava edição, cuja nomenclatura bacteriológica é aceita mundialmente, o *Micrococcus lysodeikticus* e a *Sarcina lutea* são agrupados numa mesma espécie: o *Micrococcus luteus*.

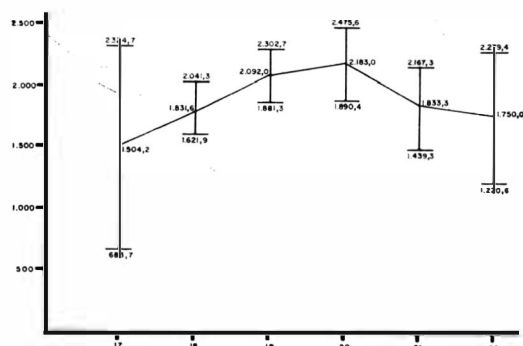


Gráfico III — Intervalo de confiança para valores médios da concentração de lisozima na lágrima, segundo a idade, em estudantes do 1.º ano da F.C.M.S.C.S.P. — 1980.

Com relação aos voluntários, não foram considerados os fatores sexo e uso de fumo, porque não são valores capazes de interferir consideravelmente na dosagem da lisozima¹⁴.

Os valores por nós encontrados só têm validade para a faixa etária situada entre os 17 e os 22 anos, uma vez que a idade é fator de real importância, pois a concentração da lisozima na lágrima diminui com o aumento da idade¹⁴. As concentrações por nós estabelecidas não condizem com essa afirmação, provavelmente por ser muito estreita a faixa etária utilizada.

Alguns dos pacientes usando lente de contato dura ou gelatinosa no estudo e análise da lisozima não mostraram diferença significativa entre eles.

CONCLUSÃO

A concentração média da lisozima na lágrima humana, dentro de uma faixa de idade variando de 17 a 22 anos, foi igual a $1.975,5 \pm 593,1$ mcg/ml. A concentração da lisozima que mais ocorre na faixa etária analisada está em torno dessa média, considerando-se todos os valores agrupados, isto é, considerando-se os usuários de lentes de contato.

Com relação aos usuários de lentes de contato, a média encontrada foi de $1.803 \pm 499,9$ mcg/ml, sendo portanto inferior aos dos não usuários de lentes de contato, cuja média foi de $1.996,6 \pm 604,2$ mcg/ml.

RESUMO

O intuito deste trabalho foi determinar a dosagem da lisozima na lágrima humana, sem fazer comparações com valores determinados por outros autores. Para isso, baseamo-nos no trabalho de Bonavida e Sapse (1968). A amostragem foi de 95 voluntários, com uma faixa etária variando de 17 a 22 anos de idade. A partir dos dados obtidos, chegamos à conclusão de que a média é de $1.975,5 \pm 593,1$ mcg/ml.

SUMMARY

The objective of this study was to determine the amount of lysozyme in human tears, without making comparisons with values determined by other authors. It was based on the work of Bonavida and Sapse (1968). The sample was from 95 volunteers with an age range varying from 17 to 22 years. Given the data gathered, we came to the conclusion that the average is 1975.5 ± 593.1 mcg/ml.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos R. Souza Dias na orientação da metodologia a ser desenvolvida na elaboração do trabalho. Ao Dr. Roberto M. Endo, na orientação geral do desenvolvimento do trabalho. A Dra. Marilda L. da Silva Guedes, na orientação da parte referente a bio-estatística. Ao Dr. Cássio G. Monteiro no auxílio da correção da parte ortográfica.

BIBLIOGRAFIA

1. AVISAR, R. et alii — Lysozyme content of tears in patients with Sjögren's Syndrome and Rheumatoid. Am. J. Ophthalmol. 87: 148-151, 1979.
2. BERGEY'S Manual of determinative bacteriology — 8.ª ed. — parte 14, p. 479 — The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1980.
3. BONAVIDA, B. & SAPSE, A. T. — Human Tear Lysozyme (I). Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 70: 951-962, 1967.
4. BONAVIDA, B. & SAPSE, A. T. — Human Tear Lysozyme (I,II). Am. J. Ophthalmol. 66: 70-80, 1968.
5. DE OLIVEIRA DIAS, G. — Doseamento da atividade de lisozima em produtos farmacêuticos. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 20: 207-209, 1978.
6. EL GAMMAL, M. Y. et alii — Estimation of tears lysozyme in some eye diseases. Bull. Ophth. Soc. Egypt., 64: 285-297, 1971.
7. EYLAN, E. et alii — Lysozyme tear level in patients with herpes simplex virus eye infection. Invest. Ophthalm. Visual SCI. 16: 850-853, 1977.
8. ETCHES, P. C. et alii — Lysozyme in tears of newborn babies. Arc. Dis. Child., 54: 218-221, 1979.
9. GIL DEL RIO, E. & BARONET, P. — Lentes de contacto. Editorial JIMS, Barcelona, Cap. 5: 93-94, 1979.
10. HYPER, T. J. — Uptake and loss of tears from filter paper discs employed in lysozyme tests. Br. J. Ophthalm. 63: 251-255, 1979.
11. MACKIE, I. A. & SEAL, D. V. — Quantitative tear lysozyme assay in units of activity per microlite. Brit. J. Ophthalm. 60: 70-74, 1976.
12. MC MURRAY, D. N. et alii — Effect of moderate malnutrition on concentrations of immunoglobulins and enzymes in tears and saliva of young Colombian children. Am. J. Clin. Nutr. 30 (12): 1944-1948, 1977.
13. MC EWEN, W. K. & KIMURA, S. J. — Electrophoresis of tears. Am. J. Ophthalmol. 39: 200-202, 1955 (parte 2).
14. OKAWADA, N. et alii — Effects of photochemical air pollution on the human eye concerning eye irritation, tear lysozyme and tear pH. Nogyo J. Med. SCI. 41 (1-4): 9-20, 1979.
15. PIETSCH, R. L. et alii — Human tear lysozyme variables. Arch. Ophth. 90: 94-96, 1973.
16. REGAN, E. — The lysozyme content of tears. Am. J. Ophthalmol. 33: 600-605, 1950.
17. VAN BIJSTERVELD, O. P. — Standardization of the lysozyme test for a commercially available medium. Arch. Ophthalmol. 91: 432-434, 1974.
18. VAN HAERINGER, N. J. et alii — Enzymatic studies in lacrimal secretion. Exp. Eye Res. 19 (2): 135-139, 1974.
19. — — — — — The origin of some enzymes in tear fluid determined by comparative investigation with two collection methods. Exp. Eye Res. 22: 267-272, 1976.