

Dosagem de lisozima na lágrima de recém-nascidos

Lysozyme concentration in tears of newborn babies

Marcos Wilson Sampaio⁽¹⁾

Milton Ruiz Alves⁽²⁾

Cecília Helena Silveira Correa⁽³⁾

Pedro Henrique Silveira Correa⁽⁴⁾

RESUMO

A concentração de lisozima lacrimal foi medida pelo método da lisoplaca em quarenta e sete recém-nascidos divididos em três grupos; vinte e dois de termo, onze de termo com baixo peso e catorze prematuros. A concentração de lisozima foi maior no grupo de termo comparando-se com o grupo de baixo peso e prematuros e seus valores aumentaram com peso e idade gestacional dos recém-nascidos.

Palavras-chave: Lisozima, Lágrima, Recém-nascido.

INTRODUÇÃO

Fleming, em 1922, comunicou a descoberta de “um elemento bacteriolítico notável” e de uma amostra de coccus gram-positivo, o *Micrococcus lysodeikticus*, que era particularmente sensível à sua ação. Por apresentar uma ação principalmente lítica denominou-a lisozima. Evidenciou, ainda, que estava presente em concentrações elevadas na clara do ovo, na lágrima humana, na saliva e nas secreções nasais e, em menor grau, no soro e nos leucócitos⁽¹²⁾.

Lisozima tem ação bacteriolítica despolimerizando os mucopolissacarídeos da parede celular. Além da função antibacteriana, não há nada definido a respeito de outras funções da lisozima no ser humano⁽¹¹⁾.

Condições que alteram a estrutura da conjuntiva e das glândulas lacrimais, como síndromes mucocutâneas ou tracoma, modificam o teor de lisozima lacrimal. Reduções desses níveis também são encontradas na ceratoconjuntivite seca, Síndrome de Sjögren, artrite reumatóide, lupus eritematoso, desnutrição proteica, infecções por herpes simples e conjuntivites bacterianas^(2,3,11,12,14).

A presença de secreção ocular é um achado comum em recém-nascidos e uma deficiência na atividade da lisozima poderia constituir-se em fator predisponente⁽⁶⁾. Lisozima tem sido escassamente avaliada em recém-nascidos.

O presente trabalho se propõe a avaliar a atividade da lisozima, através do método da lisoplaca, correlacionando sua concentração com peso e idade gestacional de recém-nascidos.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Casuística

Três grupos de recém-nascidos foram estudados: 22 de termo, 11 de termo com baixo peso e 14 prematuros (Tabela 1).

A idade gestacional foi calculada a partir da data da última menstruação referida pela mãe. As amostras foram colhidas de ambos os olhos não-infectados nas primeiras 24 horas após o nascimento. Os pacientes foram oriundos do Berçário da Associação Maternidade de São Paulo, tendo sido o material coletado com autorização da Diretoria Clínica e

Trabalho apresentado como Tema Livre no XXV Congresso Brasileiro de Oftalmologia e XVII Congresso Panamericano de Oftalmologia.

(1) Médico Assistente da Clínica Oftalmológica do Hospital das Clínicas da FMUSP.

(2) Médico Assistente Doutor da Clínica Oftalmológica do Hospital das Clínicas da FMUSP.

(3) Biomédica pela Escola Paulista de Medicina.

(4) Médico Responsável pelo Laboratório de Análises Clínicas da Associação Maternidade de São Paulo.

Endereço p/ Correspondência: Dr. Milton Ruiz Alves - R. Luiz Coelho, 308 - cjs. 15-16 - 01309 - S. Paulo - SP

TABELA 1
Características dos três grupos de recém-nascidos.

Recém-nascidos	Termo (22)	Prematuro (14)	Termo baixo peso (11)
Peso de nascimento (g)			
média	3.396,81	2.228,57	2.627,27
variação	2.850-4.370	1.300-3.020	2.100-2.800
Idade gestacional (semanas)			
média	39,63	34,50	38,54
variação	37-41	32-36	37-40

Chefia do Berçário, não tendo sido observada qualquer reação ou incômodo de nota nas crianças.

Material

- Meio de cultura: Eugonagar "BBL".
- Inóculo: *Micrococcus lysodeikticus* da Sigma Chemical Company lote 062F0250 com número de catálogo M-0128.
- Discos de papel de filtro Whatman número 41 com 6 mm de diâmetro.
- Lisozima: Lysozyme grade III from Chicken egg white da Sigma Chemical Company lote 024F8130 com número de catálogo L-7001.
- Espectrofotômetro tipo Coleman 20/A.

Métodos

Foi empregado o método da BONAVIDA & SAPSE⁽⁴⁾ modificado por VILA & MIMICA⁽¹⁷⁾. As placas de Petri foram elaboradas com 20 ml de Eugonagar aquecido a 45°C e depois refrigeradas. A cultura de *Micrococcus lysodeikticus* pura foi então diluída em solução fisiológica com leitura de 10% de transmitância no espectrofotômetro com comprimento de onda de 570Å, tendo sido a solução adicionada ao meio de cultura.

Para a realização da curva padrão foram empregadas diluições da lisozima em tampão de fosfato pH 6 em diluições de 3.200, 1.600, 1.000, 800, 500, 250, 120, 60 e 30 mcg/ml.

Os discos de papel de filtro de 6 mm foram embebidos nessas concentrações e colocados nas placas de Petri e estas permaneceram em estufa

a 37°C por 24 horas. Os halos de lise foram medidos com compasso confrontado com régua padrão. As concentrações conhecidas de lisozima foram colocadas em ordenadas e os valores dos halos obtidos em abscissas. Obtivemos, já corrigidos pela equação da reta da curva padrão, os seguintes valores (Tabela 2):

TABELA 2
Concentrações conhecidas de lisozima e valores dos halos já corrigidos pela equação da reta da curva padrão.

Concentração de lisozima (mcg/ml)	Halo de lise (mm)
30	11,62
60	11,79
120	12,11
250	12,80
500	14,23
800	15,89
1000	17,00
1600	20,32
3200	29,19

Os pacientes foram submetidos à colheita de lágrimas colocando-se os discos com ajuda de uma pinça estéril no fórnice inferior de ambos os olhos, permanecendo nesta posição até a sua umectação, sendo então retirados e colocados sobre uma folha de papel de filtro Whatman nº 41 por 30 segundos, visando obter uma

aceitável padronização de quantidade do material obtido^(5,8,12,13). Os discos com as amostras de lágrimas foram depositados sobre as placas de Petri em número de 4 por placa (2 olhos de 2 pacientes). A seguir, as placas permaneceram em estufa a 37°C por 24 horas, sendo depois medidos os halos de lise pela mesma pessoa com o auxílio de compasso confrontado com régua padrão.

Os resultados foram submetidos à análise numérico-estatística através de cálculos das médias e desvios-padrão e do coeficiente de correlação de Pearson.

RESULTADOS

A Tabela 3 apresenta os resultados das médias e desvios-padrão dos diâmetros de lise obtidos nos três grupos de recém-nascidos.

O diâmetro de lise foi maior entre os recém-nascidos de termo comparando-se com aqueles obtidos dos prematuros e dos de baixo peso ($p < 0,001$). A média do diâmetro de lise obtida entre os recém-nascidos de termo foi de 16,75 mm, o que correspondeu a uma concentração de lisozima de 930,18 mcg/ml.

A Figura 1 correlaciona o diâmetro da zona de lise e idade gestacional.

A concentração de lisozima cresceu com o aumento da idade gestacional dos recém-nascidos ($r=0,49$; $p < 0,001$).

A Figura 2 correlaciona o diâmetro de lise e peso dos recém-nascidos.

A concentração de lisozima cresceu com o aumento do peso dos recém-nascidos ($r=0,63$; $p < 0,001$).

TABELA 3
Médias e desvios-padrão dos diâmetros de lise nos três grupos de recém-nascidos.

Recém-nascidos	Termo	Prematuro	T. Baixo peso
Média de lise (mm)	16,75	15,04	15,50
Desvio-padrão	0,91	1,77	0,74

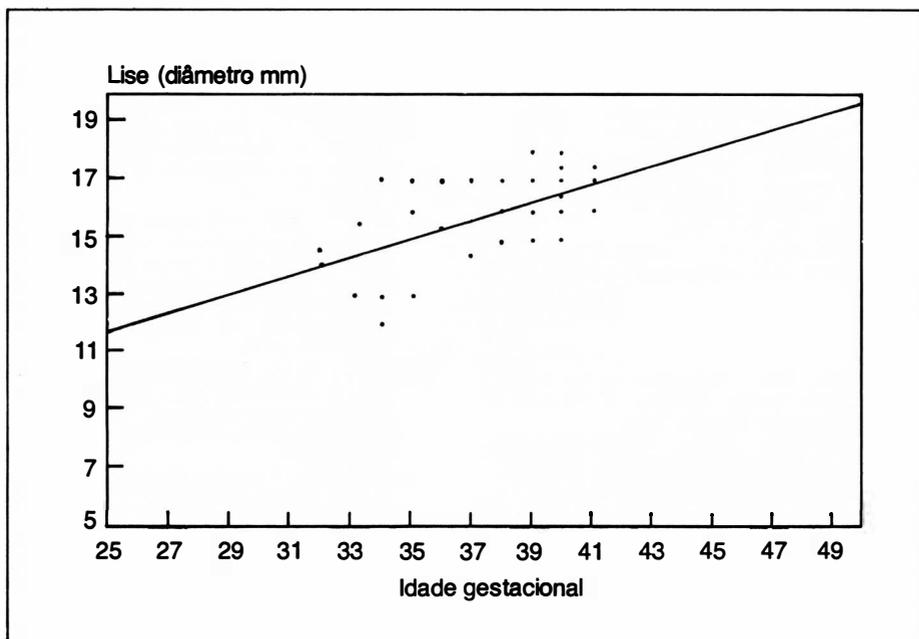


Figura 1 – Diâmetro da zona de lise e idade gestacional.

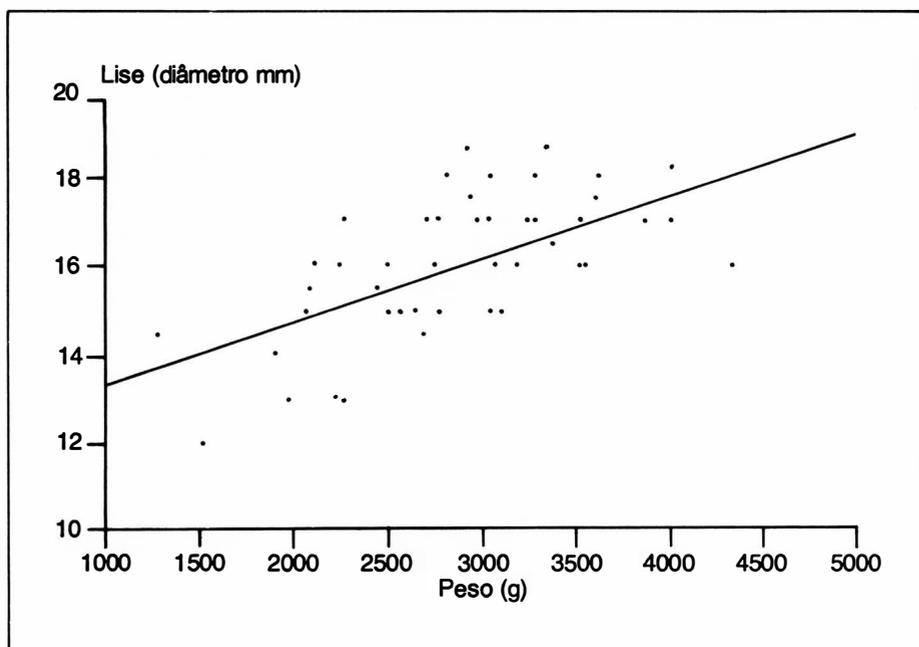


Figura 2 – Diâmetro de lise e peso dos recém-nascidos.

DISCUSSÃO

O filme lacrimal é, classicamente, descrito como sendo dividido em três camadas: mucosa, lipídica e aquosa.

A composição química da camada aquosa é complexa; ela contém água, eletrólitos, carboidratos, uréia, aminoácidos, lipídeos, enzimas, ceruloplasmina, lactoferrina, lisozima, betalina, imunoproteínas, etc. Cer-

ca de sessenta componentes já foram identificados no filme lacrimal. A glândula lacrimal secreta, no mínimo, vinte destes componentes, incluindo a lisozima^(9,11,15).

Os valores normais de dosagem de lisozima na lágrima de adultos referidos por BONAVIDA & SAPSE⁽⁴⁾ foram cerca de 1.700 mcg/ml e de 1.975 mcg/ml por VILA & MIMICA⁽¹⁷⁾. Os valores encontrados em recém-nascidos foram de 1.118 mcg/ml por ETCHES et al.⁽⁶⁾; de 700-800 mcg/ml por BONAVIDA & SAPSE⁽⁴⁾ e de 930 mcg/ml nos recém-nascidos de termo deste trabalho. Estas dosagens foram realizadas sempre em lágrimas coletadas de olhos que não apresentavam infecção.

Não existe informação na literatura pesquisada correlacionando lisozima e fatores não-lisozimais em recém-nascidos com conjuntivites. Nossos resultados, concordantes com os de ETCHES et al.⁽⁶⁾, mostram redução do nível de lisozima nas lágrimas de recém-nascidos de termo com baixo peso e em prematuros. Isto poderia torná-los mais susceptíveis à infecção ocular. Este é um assunto que merecerá, sem dúvida, ser estudado futuramente. Contudo, parece provável que a lisozima representa somente uma fração de uma frente ampla de fatores antibacterianos sinérgicos⁽⁶⁾. De fato, considerando-se que imunoglobulinas específicas como IgA e IgG, imunoglobulinas não-específicas, lactoferrina, lisozima e ceruloplasmina formam uma linha de defesa contra infecção externa que parece ser mais efetiva que anticorpos produzidos sistemicamente^(1,7,10), isto ressalta que o papel individual de defesa da lisozima ainda não está adequadamente avaliado.

SUMMARY

The concentration of lysozyme in the lacrimal tear of newborn babies was measured by a modification of the lysoplate method. The 47 new-

born babies were classified in three groups; 22 normal terms, 11 small-for-dates and 14 preterms. The lysozyme concentration was greater in the normal term babies compared with the other two groups and increased with gestational age and weight of the newborns.

AGRADECIMENTO

Agradecemos ao Dr. Matheus Ajzenberg, Médico Pediatra, Chefe do Berçário da Associação Maternidade de São Paulo, pelo acesso e facilidades na realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARNOLD, R.R., COLE, M.G. and McGHEE, J.R. - A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science*, 197: 263-5, 1977.
2. AVISAR, R., MENACHÉ, R., SHAKED, P., RUBINSTEIN, J., MATCHEY, I, SAVIR, H. - Lysozyme content of tears in patients with Sjögren's Syndrome and rheumatoid arthritis. *Am. J. Ophthalmol.* 87: 148-51, 1979.
3. AVISAR, R., MENACHÉ, R., SHAKED, P., SAVIR, H. - Lysozyme content of tears in some external eye infections. *Am.J.Ophthalmol.* 92: 555-8, 1981.
4. BONAVIDA, B & SAPSE, A.T. - Human tear lysozyme. A quantitative determination with standard Schirmer strips. *Am.J.Ophthalmol.* 66: 70-6, 1968.
5. COPELAND, J.R., LAMBERTS, D.W. & HOLLY, F.J. - Investigation of the accuracy of tear lysozyme determination by the quantiplate method. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 22: 103-10, 1982.
6. ETCHES, P.C., LEAHY, F., HARRIS, D., BAUM, J.D. - Lysozyme in the tears of newborn babies. *Archives of Diseases of Childhood* 54: 218-21, 1979.
7. FRANKLIN, R.M., PRENDERGAST, R.A. & SILVERSTEIN, A.M. - Secretory immune system of rabbit ocular disease. *Invest. Ophthalmol. Visc. Sci.* 18: 1093, 1979.
8. HYPHER, T.J. - Fluid uptake in Schirmer papers and its relevance to their employment in tear collection for lysozyme tests. *Brit. J. Ophthalmol.* 64: 696-99, 1980.
9. JANSSEN, P.T. & VAN BIJSTERVELD, O.P. - Origin and biosynthesis of human tear fluid proteins. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 24:623-30, 1983.
10. KNOPF, H., BLAKLOW, N., GLASSMAN, M., CLINE, W., WONG, V. - Antibody in tears following intranasal vaccination with inactivated virus III. Role of tear and serum antibody in experimental vaccinia conjunctivitis. *Invest. Ophthalmol.* 10: 760-67, 1971.
11. MCGILL, J. - The tear film in health and disease. In: *External Eye Disease*; Easty & Smolin ed.; Butterworth & Co.; London; 1985. p. 106-12.
12. PENNA, E.P. - Dosagem da lisozima lacrimal em pacientes com Artrite Reumatóide de acordo com o tempo de evolução da doença. *Tese de Doutorado* apresentada ao Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia da F.M.U.F.M.G., Belo Horizonte, 1982.
13. SEAL, D.V., MACKIE, I.A., COAKES, R.L. & FAROOQI, B. - Quantitative tear lysozyme assay: a new technique for transporting specimens. *Brit. J. Ophthalmol.* 64: 700-4, 1980.
14. SEN, D.K. & SARIN, G.S. - Immunoassay of tear lysozyme in conjunctival diseases. *Brit. J. Ophthalmol.* 66:732-5, 1982.
15. STONE, W. & SERCARZ, E.E. - Proteins in human tears. Immunoelectrophoretic patterns. *Arch. Ophthalmol.* 81:815-9, 1969.
16. VIEIRA, S. - *Introdução à Bioestatística*. Campos ed.; 5ª ed.; Rio de Janeiro, 1988.
17. VILA, M.F. & MIMICA, I.M. - Dosagem da lisozima na lágrima humana. *Arq. Bras. Oftal.* 45: 129-30, 1982.