



X Congreso Latinoamericano de Buiatría
XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría

ESTUDO PRELIMINAR DA DOSAGEM SÉRICA DE LISOZIMA PARA AVALIAÇÃO
DA RESPOSTA IMUNE EM OVINOS

Maurício Garcia¹, Glaucie Jussilaine Alves²,
Roberta Carneira², Sabrina Caruso Chate², Yara
Ferreira Figueira², Ana Carolina Rusca Ponto².

¹ Professor-Titular, Curso de Medicina Veterinária da
Universidade Paulista (UNIP) - Endereço para
correspondência: Rua Enjolas Vampré, 146, São Paulo/
SP, CEP 04290-070. E-mail: mauricio@mgar.vet.br

² Estudante do Curso de Medicina Veterinária da
Universidade Paulista (UNIP) - São Paulo/SP.

RESUMO

A lisozima é uma enzima antimicrobiana presente nos tecidos e em todos os fluidos corpóreos. Apesar dessa propriedades, são raros os trabalhos que utilizem a dosagem de lisozima para a avaliação do sistema imune. Assim, o presente trabalho teve por objetivo fazer uma avaliação preliminar da eficiência da dosagem de lisozima como indicador de imunidade em ovinos. Foram utilizados seis carneiros adultos, dos quais foram colhidas amostras sanguíneas diariamente, durante um período de 8 dias, totalizando 48 amostras, sendo que nelas foi realizada a dosagem de gamaglobulinas por eletroforese, a dosagem de lisozima e a contagem de linfócitos. As contagens de linfócitos foram confrontadas com a dosagem de lisozima, apresentando uma correlação positiva de 11%. Esse valor, porém, não foi estatisticamente significativo. Já a dosagem de gamaglobulinas apresentou uma correlação positiva de 37%, valor estatisticamente significativo. As evidências deste experimento permitem supor que a dosagem de lisozima pode vir a ser uma alternativa simples e barata para a estimativa da concentração de gamaglobulinas séricas.

Palavras-chave: lisozima, imunidade, resposta imune

RESUMEN

Lisozima es una enzima antimicrobiana existente en todos los tejidos y líquidos corpóreos. A pesar de estas características, son muy raros los trabajos que emplean la dosificación del lisozima para la evaluación del sistema inmune. El actual trabajo tiene el objetivo de hacer una evaluación preliminar de la eficacia de la dosificación del lisozima como indicador de la inmunidad en ovinos. Seis ovinos adultos machos fueron utilizados, de los cuales muestras sanguíneas fueron colectadas diariamente, durante un periodo de 8 días, totalizando 48 muestras. En estas muestras fueron realizadas las dosificaciones de las gamaglobulinas por la electroforesis, la dosificación del lisozima y la cuenta de linfocitos. La cuenta de linfocitos fue confrontada con la dosificación del lisozima, presentando una correlación positiva de 3%. Este valor, sin embargo, no es estadísticamente significativo. La

dosificación de gamaglobulinas presentó una correlación positiva de 37%, valor significativo estadísticamente. Las evidencias de este experimento permiten asumir que la dosificación del lisozima puede venir a ser una alternativa simple y de bajo costo para la estimación de la concentración de las gamaglobulinas séricas.

Palabras índice: lisozima, inmunidad, respuesta imune

INTRODUÇÃO

Com a popularização da pecuária orgânica no mercado nacional e mundial, a atenção do consumidor está cada vez mais voltada para produtos com limitado uso de defensivos e isentos de resíduos químicos. Para conseguir isso, a melhor maneira é a prevenção e o estabelecimento de animais sadios, para que esses possam com suas próprias defesas se privar de moléstias comuns na criação. É por esse fato que o estudo do sistema imune dos ruminantes é de extrema valia, através de modelos experimentais, os quais, todavia, ainda não estão muito padronizados.

Existem várias formas de se avaliar a resposta imune, desde técnicas mais simples, como a contagem de linfócitos, até as sofisticadas estimulações mitogênicas com marcadores radioativos. Entretanto, no mundo há poucos estudos sobre uso destas técnicas em medicina veterinária, e praticamente inexitem no Brasil.

A dosagem de lisozima é uma técnica simples e barata porém muito pouco utilizada. Seu uso como indicador de imunidade inespecífica já foi descrito no rato, no suíno, no homem e no bovino (OSSERMAN e LAWLOR, 1966; BONIZZI et al., 1988; PONTI et al., 1989).

A lisozima é uma enzima antibacteriana presente nos tecidos e em todos os fluidos corpóreos, exceto no fluido cerebrospinal, suor e urina (BRIGHTAMAN et al., 1991). A lisozima divide os peptídeoglicanos que compõe a parede celular das bactérias gram-positivas. Ela também destrói algumas bactérias gram-negativas em conjunto com complemento.

A lisozima é encontrada em altas concentrações nos lisossomos dos neutrófilos e assim, se acumula nas áreas de inflamação aguda, incluindo os locais de invasão bacteriana. Ela também é sintetizada na mucosa gástrica e nos macrófagos dentro da mucosa intestinal. Como o resultado é encontrado em grandes quantidades no fluido intestinal. O pH ideal para atividade da lisozima, embora seja um pouco baixo (pH de 3 a 6) é facilmente obtido nos locais inflamatórios, bem como dentro dos fagossomos. A lisozima também é uma opsonina potente, facilitando a fagocitose na ausência de anticorpos específicos e sob condições nas quais a sua atividade enzimática possa ser ineficaz. A lisozima também é capaz de destruir vários vírus (TIZARD, 1998).



Apesar dessa propriedades, são muito raros os trabalhos internacionais que utilizem a dosagem de lisozima para a avaliação do sistema imune. BRIGHTMAN et al. (1991) estudaram a concentração de lisozima na lágrima de bezerros, cabras e ovelhas. Os autores detectaram que a lisozima só esta presente nas lágrimas de cabras e ovelhas, e não de bezerros. Já BERNERI et al. (1991) usaram a técnica para comparação da evolução de vacinas específicas de imunomoduladores no controle de doenças de bezerros de corte. RIEDEL e SCHMIDT (1991), estudando a influência de leucócitos no colostro no sistema imune de bezerros neonatos, utilizaram a técnica de dosagem de lisozima e provaram a presença da enzima no colostro. Outros estudos foram feitos para demonstrar a presença de lisozima no leite (PICCININI et al., 1999) e a eficácia da enzima na resistência a mastite (SEYFERT et al., 1996). BONIZZI et al. (1988), estudando a caracterização de alguns parâmetros de imunidade não específica em bezerros de leite, observaram haver um aumento da concentração de lisozima sanguínea na primavera.

Não foram encontrados trabalhos nacionais usando a lisozima como indicador de imunidade em animais. Assim, o presente trabalho tem por objetivo fazer uma avaliação preliminar da eficiência da dosagem de lisozima como indicador de imunidade em ovinos.

MATERAIS E MÉTODOS

Foram utilizados neste experimento seis carneiros adultos, castrados, mantidos em baias com cama de serragem e alimentados com feno de capim e ração comercial. Destes animais foram colhidas amostras sanguíneas diariamente, durante um período de 8 dias, totalizando 48 amostras.

As amostras de sangue foram colhidas em duas alíquotas, uma com anticoagulante e a outro sem. Das amostras sem anticoagulante foi obtido o soro sanguíneo o qual foi submetido a duas provas: dosagem de gamaglobulinas por eletroforese e dosagem de lisozima. As amostras com anticoagulantes foram submetidas à contagem leucocitária.

A porcentagem de gamaglobulinas foi determinada através da eletroforese de proteínas séricas em gel de agarose, segundo BARTA & POURCIAU (1984). Após a corrida eletroforética, o filme foi corado em lido em densitômetro (DS 50, Celm) a 520 nm. Esse valor percentual foi multiplicado pelo valor obtido na dosagem de proteínas totais, visando obter-se o valor absoluto de gamaglobulinas, expressos em g/dL. Para a determinação da quantidade total de proteína foi empregado o método do biureto, conforme descrito por WEICHSELBAUM (1946), utilizando-se um kit comercial para dosagem de proteínas (Labtest) e procedendo a leitura em analisador eletrônico (Quicklab).

A contagem global de leucócitos foi realizada através do método do hemocitômetro em câmeras hematimétricas de Neubauer, conforme descrito por

HEWITT (1984). A contagem diferencial foi feita através da extensão sanguínea corada pelo corante de Leishman e, após a obtenção da contagem relativa os números foram transformados em contagem absoluta de linfócitos, expressos em células por μL .

A dosagem de lisozima utilizou 20 mg de uma cepa liofilizada de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, cód. M3770) suspensa em 0,6 mL de solução fisiológica, conforme descrito por BONIZZI et al. (1988). Essa suspensão foi adicionada a 40 mL de agarose a 1% em tampão fosfato 1/15 M, pH 6,3. Após a solidificação do gel, serão feitos poços de 5 mm de diâmetro distantes de 3 cm um do outro. Os poços foram preenchidos com 0,05 mL do soro a ser testado. A leitura da placa foi feita após a incubação a 24°C por 18 horas através da medida do diâmetro do halo de lise bacteriana ao redor dos poços. O valor foi expresso em milímetros, representando a área de lise calculada a partir do diâmetro ($\pi \times D^2 / 4$), como sendo um valor indireto da quantidade de lisozima existente no soro de cada amostra.

Os dados foram analisados estatisticamente por estudos de correlação (ZAR, 1996), para um valor de $p=5\%$, empregando-se planilha eletrônica comercial (Excel 97, Microsoft) de acordo com as recomendações de DRETZKE & HEILMAN (1998).

RESULTADOS

Os resultados estão expressos nas tabelas 1 e 2 e mostram que a contagem de linfócitos, quando confrontada com a dosagem de lisozima, apresentou uma correlação positiva de 11% (Figura 1). Esse valor, porém, não foi estatisticamente significativo. Já a dosagem de gamaglobulinas apresentou uma correlação positiva de 37%, valor estatisticamente significativo (Figura 2).

DISCUSSÃO

A resposta imune tradicionalmente tem sido enfocada com base nas respostas linfocitárias, humoral e celular. Curiosamente, a atividade de células fagocitárias, especialmente macrófagos e neutrófilos, não são usualmente analisadas em trabalhos que procuram estudar a resposta imune. Todavia, é fundamental a participação de tais células nos mecanismos de defesa do organismo. Além disso, outra motivação do presente experimento foi a escassez de trabalhos que procuram descrever o uso de técnicas simples para a avaliação da resposta imunitária.

A dosagem de lisozima é conhecida desde a década de 60 (OSSERMAN e LAWLOR, 1966), mas há poucas publicações sobre seu uso no estudo da resposta imune em animais. A exceção de alguns trabalhos da Universidade de Milão (BONIZZI et al., 1988; PONTI et al., 1989), praticamente não existem publicações a respeito deste tema. Possivelmente, esse é o primeiro



X Congreso Latinoamericano de Buiatría XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría

artigo publicado na América Latina sobre o uso da dosagem de lisozima como parâmetro de imunidade em animais.

Os resultados deste trabalho indicam existir uma correlação entre os valores de lisozima e a concentração de gamaglobulinas no soro. É preciso, porém, que sejam conduzidos outros experimentos para que se confirme essa evidência aqui apresentada. Não foi encontrada na literatura, nacional ou internacional, nenhuma menção a este fenômeno. Se ele vier a ser comprovado, poderá ser criada uma alternativa para a estimativa de gamaglobulinas séricas. As técnicas existentes hoje

para dosagem de gamaglobulinas ou são caras, ou são trabalhosas, ou ambas. A eletroforese necessita de equipamentos como cubas e densitômetros. A imunodifusão radial necessita de anti-soros específicos ou kits importados, os quais são comercializados a preços muito altos. Mesmo a turbidometria com sulfato de zinco, que é uma técnica considerada como simples, necessita de um espectrofotômetro.

As conclusões devem ser tomadas com cautela, mas as evidências deste experimento permitem suspeitar que a dosagem de lisozima pode vir a ser uma alternativa simples e barata para a estimativa da concentração de gamaglobulinas séricas.

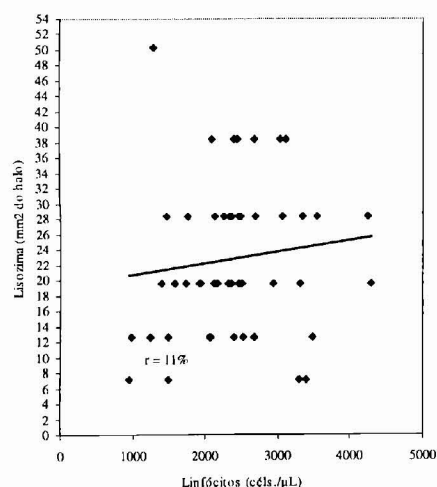


Figura 1 - Gráfico de dispersão dos valores da dosagem sérica de lisozima correlacionados com os valores da contagem sanguínea de linfócitos.

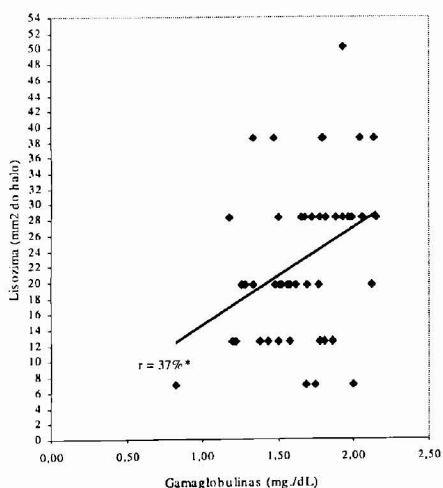


Figura 2 - Gráfico de dispersão dos valores da dosagem sérica de lisozima correlacionados com os valores de gamaglobulinas séricas.

SUMMARY

Lysozyme is an antimicrobial enzyme present in all tissues and corporeal fluids. Despite these properties, there are few papers about the use of lysozyme dosage for the evaluation of immune system. Thus, the purpose of the present work was to make a preliminary evaluation of the efficiency of lysozyme dosage as indicator of immunity in sheep. Six adult rams were used, of which blood samples were harvested daily, during 8 days, totaling 48 samples. In those samples, it was made the electrophoresis gammaglobulins dosage, the lysozyme dosage and the lymphocyte count. The lymphocyte count was collated with the lysozyme dosage, presenting a positive correlation of 11%. This value, however, was not statistically significant. In another hand, the dosage of gammaglobulins presented a positive correlation of 37%, statistically significant. The evidences of this experiment allow to assume that the dosage of lysozyme could be a simple and cheap alternative for the estimate of serum gammaglobulins concentration.

Keywords: lysozyme, immunity, immune response

BIBLIOGRÁFICA

1. BARTA, O. & POURCIAU, S.S. Electrophoresis. In: BARTA, O. Laboratory Techniques of Veterinary Clinical Immunology. Illinois: Charles C. Thomas, 1984. p.116-22.
2. BERNERI, C.; AMADORI, M.; CECCARELLI, A.; GUADAGNINI, P.F.; BOLZANI, E. Comparative evaluation of specific vaccines and immuno-modulators in disease control of beef cattle. Journal of Veterinary Medicine Series B. v.38, n.1, p.60-77, 1991.
3. BONIZZI, L.; AMADORI, M.; MELEGARI, M.; PONTI, W.; CECCARELLI, A.; BOLZANI, E. Characterization of some parameters of non-specific immunity in dairy cattle (I). Journal of Veterinary Medicine Series B. v.36, n.5, p.365-373, 1988.
4. BRIGHTMAN, A.H.; WACHSSTOCK, R.S.; ERSKINE,



- R. Lysozyme concentration in the tears of cattle, goats, and sheep. American Journal of Veterinary Research. v.52, n.1, p.9-11, 1991.
5. DRETZKE, B.J. & HEILMAN, K.A. Statistics with Microsoft® Excel. New Jersey: Practice Hall, 1998. 164p.
 6. HEWITT, S.G. Haematology. In: GRAY, D.E. Manual of Veterinary Investigation, Laboratory Techniques, 3. ed. London: Her Majesty's Stationery Office, 1984. v.2, p. 72-100.
 7. OSSERMAN, E.F. & LAWLOR, D.P. Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia. Journal of Experimental Medicine. v.124, p.921-952, 1966.
 8. PICCININI, R.; BRONZO, V.; MORONI, P.; LUZZAGO, C.; ZECCONI, A. Study on the relationship between milk immune factors and Staphylococcus aureus intramammary infections in dairy cows. Journal of Dairy Research. v.66, n.4, p.501-510, 1999.
 9. PONTI, W.; AMADORI, M.; AGNOLETTI, F.; BONIZZI, L.; PERI, E.; CALDORA, C. Characterization of some parameters of non-specific immunity in beef cattle (II). Journal of Veterinary Medicine, series B. v. 36, p. 402 – 408, 1989.
 10. RIEDEL, C.G. & SCHMIDT, F.W. The influence of colostral leukocytes on the immune system of the neonatal calf. III. Effects on phagocytosis. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift. v.98, n.9, p.330-334, 1991.
 11. SEYFERT, H.M.; HENKE, M.; INTERTHAL, H.; KLUSMANN, U.; KOCZAN, D.; NATOUR, S.; PUSCH, W.; SENFT, B.; STEINHOFF, U.M.; TUCKORICZ, A.; HOBOM, G. Defining candidate genes for mastitis resistance in cattle: The role of lactoferrin and lysozyme. Journal of Animal Breeding and Genetics. v.113, n.4-5, p.269-276, 1996.
 12. TIZARD, I.R. Imunologia Veterinaria. 5.ed. São Paulo: Roca, 1998. 545p. p.294-299.
 13. WEICHSELBAUM, C.T.E. An accurate and rapid method for determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. American Journal of Clinical Pathology. v.16, n.3, p.40-9, 1946.
 14. ZAR, J. H. Biostatistical Analysis. 3. ed. New Jersey: Practice Hall, 1996. 662p.

Tabela 1 - Valores (média ± desvio padrão) da dosagem sérica de lisozima, da dosagem sérica de gamaglobulinas e de linfócitos totais em ovinos (8 repetições por animal).

Animal	Lisozima (área em mm ²)	Gamaglobulina (mg/dL)	Linfócitos (cél./µL)
1	31,1±13,4 CV=43%	1,87±0,19 10%	2811±927 33%
2	20,6±9,5 CV=46%	1,50±0,14 9%	2411±577 24%
3	25,3±5,9 CV=24%	1,87±0,18 10%	2635±502 19%
4	16,5±6,6 CV=40%	1,22±0,18 15%	1818±531 29%
5	15,4±4,8 CV=31%	1,59±0,14 9%	1675±463 28%
6	27,8±8,7 CV=31%	1,89±0,17 9%	2964±660 22%
Total	22,8±10,0 44%	1,65±0,30 18%	2385±770 32%

Tabela 2 - Valores da correlação entre a dosagem sérica de lisozima e as dosagens de gamaglobulinas e de linfócitos.

Animal	Lisozima x Gamaglobulina	Lisozima x Linfócitos
1	-19%	-49%
2	-60%	-69%
3	+38%	-92%
4	+32%	+32%
5	-27%	+37%
6	0%	-21%
Total	+37%	+11%