

Avaliação da fidedignidade dos ensaios de esteróides fecais realizados no Laboratório de Medidas Hormonais do Departamento de Fisiologia da UFRN

Heveline Gomes do Nascimento¹, Luiz Carlos Fernandes² e Maria Bernardete Cordeiro de Sousa³

¹Aluna bolsista CNPq/ PIBIC, ²Técnico do Laboratório de Medidas Hormonais, ³Professora Orientadora do Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Resumo

Neste estudo foi avaliada a confiabilidade das técnicas de extração fecal e dosagem do cortisol, progesterona e andrógenos de *Callithrix jacchus* cujas concentrações são mensuradas por ensaio imunoenzimático (ELISA). A amostra foi composta por 10 ensaios aleatoriamente selecionados por ano, dentro do período de 1998 a 2006, para o cortisol e a progesterona, e de 1999 a 2006, para os andrógenos, totalizando 260 ensaios. Os valores médios anuais obtidos para os coeficientes de variação inter e intra-ensaios dos controles de baixa e alta concentração encontraram-se dentro do esperado pelos modelos estatísticos (máximo de 45% de variação). Observou-se que ao longo dos anos os ensaios mostraram menor desvio padrão nos valores obtidos para as amostras controle (pools), indicando que tanto o processo de extração como de dosagem pelo ELISA foram sendo aperfeiçoados.

Palavras chave: *Callithrix jacchus*, extração e dosagem de esteróides fecais, validação técnica

Abstract

In this study we analysed the accuracy of the fecal extraction and dosage techniques for cortisol, progesterone and androgens of common marmosets (*Callithrix jacchus*) using enzyme immunoassays (ELISA). The sample included 10 assays randomly selected per year from 1998 to 2006, for cortisol and progesterone, and from 1999 to 2006 for androgens, totalising 260 assays. The maximum and minimum annual values obtained for inter- and intra-assays coefficients of variation were within the statistical models (until 45%). It was observed that, throughout the years, the standard deviations decreased and, consequently, that both processes, extraction and ELISA technique, were improved through the period time.

Keywords: *Callithrix jacchus*, fecal steroids extraction, technical validation

Introdução

As alterações hormonais relacionadas à reprodução de *Callithrix jacchus* têm despertado o interesse de muitos pesquisadores. São comuns nesta área, estudos sobre as alterações hormonais que ocorrem nas diferentes fases do ciclo reprodutivo desta espécie, bem como em contextos de disputa entre fêmeas e entre machos, relacionados aos mecanismos de hierarquia de dominância (ABBOTT, 1987, 1988; ALENCAR *et al.*, 2006).

Grande parte dos estudos sobre a endocrinologia de machos e fêmeas de *Callithrix jacchus* se baseia nas determinações de níveis hormonais no sangue que envolve a captura e a contenção do animal. Esta manipulação é invasiva e pode provocar alterações na resposta do animal principalmente nos níveis de cortisol que podem ser influenciados pelo nível de estresse do procedimento.

A determinação da concentração de esteróides e seus metabólitos nas fezes, com o objetivo de medir a função gonadal e adrenal de primatas, tem sido utilizada como uma metodologia alternativa por muitos pesquisadores (WASSER, 1996; JURKE *et al.*, 1997; STRIER *et al.*, 1999; ALBUQUERQUE *et al.*, 2001). Esta técnica oferece um grande potencial para ampliação dos conhecimentos da função endócrina, por permitir um monitoramento não invasivo, portanto sem causar distúrbios sociais e comportamentais nos animais analisados. Além disso, esta técnica pode ser aplicada em estudos de campo, possibilitando a ampliação dos conhecimentos sobre a socioendocrinologia desta espécie a partir do cruzamento das informações obtidas de animais no seu ambiente natural e os estudos realizados em cativeiro (SOUSA e ZIEGLER, 1998).

No Laboratório de Medidas Hormonais do Departamento de Fisiologia são realizadas medidas de esteróides fecais e plasmáticos da espécie *Callithrix jacchus*, pelo método imunoenzimático (ELISA). As amostras de fezes coletadas devem ser submetidas previamente a um processo de extração constituído de duas etapas: hidrólise e solvólise. A execução de procedimentos de dosagem hormonal requer o estabelecimento de rotinas e padronização de procedimentos que tendem a ser aperfeiçoados ao longo do tempo. Neste contexto, espera-se que os coeficientes de variação dos ensaios apresentem um decréscimo, aumentando sua fidedignidade e confiabilidade.

Este trabalho analisa os procedimentos realizados no Laboratório de Medidas Hormonais do Departamento de Fisiologia da UFRN e tem como objetivo avaliar a fidedignidade da técnica de extração e dosagem realizada pelo método imunoenzimático no citado laboratório, determinando também os parâmetros de sensibilidade da concentração de

hormônios quantificados no material fecal, de modo a avaliar como evoluíram os referidos procedimentos, desde a sua implantação há nove anos até a data atual.

Materiais e Métodos

Os procedimentos de dosagem hormonal em fezes requerem a separação dos hormônios do material biológico. Assim sendo, durante o estudo foi realizado o processo de extração. Foram realizados dois processos seqüenciais para separação dos hormônios unidos por meio de ligações simples, duplas e triplas para posterior quantificação. As amostras de fezes foram coletadas nos ambiente de cativeiro e de campo e armazenadas em freezer.

Determinação dos esteróides nas fezes:

Após serem retiradas do freezer as amostras foram colocadas à temperatura ambiente por um período de aproximadamente 10 minutos para descongelamento. Em seguida, com o auxílio de uma espátula, cada amostra fecal foi homogeneizada e utilizando-se uma balança de precisão foi pesada uma alíquota de 0,1g de fezes que é transferida para um tubo plástico de 15mL, devidamente identificado. Depois da pesagem as amostras foram submetidas ao processo de hidrólise para separação dos esteróides existentes nas fezes. Nesta fase da extração são separados os esteóides livres e os encontrados na forma de conjugação simples com o ácido glicurônico e sulfatos. Os esteróides excretados nas fezes na forma de glicuronídeos e sulfatos de dupla conjugação somente são extraídos pela solvólise ácida como descrito por ZIEGLER *et al.*, (1997).

Posteriormente à extração dos esteróides fecais foi utilizada a técnica imunoenzimática (ELISA) para determinação da concentração dos hormônios. A metodologia empregada seguiu o protocolo experimental desenvolvido por MUNRO e STABENFELDT (1984) para dosagens de esteróides no sangue e que foi adaptada por ZIEGLER *et al.* (1996) para determinações de esteróides nas fezes. Os dados da padronização analítica demonstram a existência de paralelismo entre os valores obtidos no sangue e nas fezes ($p \leq 0,05$) para todos os hormônios dosados (progesterona, andrógenos e cortisol). Os controles (*pools*) utilizados nos testes de validação foram obtidos a partir de amostras de fezes de fêmeas ou de machos em diferentes condições reprodutivas. As curvas padrão dos diferentes hormônios analisados foram preparadas a partir de cristais de hormônios obtidos da Sigma Chemical Co., EUA. Para a

preparação das curvas padrão foram utilizadas diferentes concentrações dos padrões, que incluíram aquelas provavelmente existentes nas amostras.

As determinações dos hormônios (progesterona, andrógenos e cortisol) pelo ELISA apresentaram variações metodológicas que incluíram os diferentes anticorpos e a concentração da enzima (HRP), mas apresentaram um padrão geral igual, de modo que foi descrito o procedimento técnico comum para os três hormônios, destacando-se as diferenças para cada um deles. As placas para microtitulação de fundo plano (Nunc) para realização do ELISA foram previamente sensibilizadas com o anticorpo específico de cada hormônio, segundo a metodologia descrita por MUNRO e STABENFELDT (1991). Após a retirada das amostras do refrigerador e agitação no vórtex por 10 segundos, transferiu-se 50 µL (ensaios da progesterona e dos andrógenos) e 100 µL (ensaio do cortisol) deste material para tubos de ensaio e procedeu-se as análises, de acordo com o trabalho de Sousa e Ziegler (1998), para cortisol e progesterona e Castro e Sousa (2005), para os andrógenos.

Validação dos Ensaios

A execução de procedimentos de dosagem de hormônios requer uma série de parâmetros para validar ensaios. A validação dos ensaios é realizada através de três conjuntos de amostras fecais de fêmeas e de machos denominadas de controles ou *pools*, que passam pelo mesmo processo de extração como as demais amostras fecais. Assim, se obtém o controle de machos, o controle de fêmeas e o terceiro controle de macho/fêmea. Essas amostras são utilizadas como amostras-controle nos ensaios, sendo dosados em todos os ensaios o controle de baixa e o controle de alta (de 4 a 5 vezes o volume do controle de baixa usado) e os resultados obtidos são analisados por meio do coeficiente de variação (CV) que verifica a variabilidade dos valores médios encontrados em função do desvio padrão em torno da média da amostra.

A precisão e a confiabilidade dos ensaios são asseguradas pela determinação do CV inter-ensaio – que corresponde a variação nos valores obtidos na dosagem do controle em placas diferentes para o mesmo hormônio – e do CV intra-ensaio – variação nos valores obtidos na dosagem dos controles (*pools*) na mesma placa, já que as amostras e os controles são pipetados em duplicata, em cada placa – estimados pelo método de Rodbard (LEITE, 2002).

$$CV = \frac{s \cdot 100\%}{\bar{x}}, \text{ onde } s \text{ é a estimativa do desvio padrão, e } \bar{x} \text{ é a média aritmética do}$$

valor do pool obtido.

O limite de variação dos coeficientes de variação nos ensaios para que os mesmos sejam considerados válidos varia entre a metade e dois terços da variação no controle inter-ensaio. Como a concentração dos hormônios esteróides na amostra é da ordem de uma parte por bilhão (1 ppb; ng do constituinte/ g da amostra de fezes) o CV aceitável é no máximo 45%, assim a tolerância é de 22,5 a 30%. Assim sendo, os resultados das amostras podem ser expressos da seguinte forma:

$$\text{Resultado} = \text{valor obtido} + \text{CV\%}$$

Procedimento

Para este trabalho foram considerados os valores médios de 10 ensaios dos esteróides cortisol e progesterona obtidos no período de 1998 a 2006 e, para os andrógenos, do período de 1999 a 2006. Foram analisados os valores médios e o desvio padrão dos coeficientes de variação inter e intra-ensaio dos controles de baixa e alta concentração, para cada ano e para o período como um todo. Foram também analisados os limites de detecção dos ensaios nos referidos períodos considerando os mesmos ensaios.

Resultados

Os valores médios das concentrações hormonais obtidas para os controles (*pools*), altos e baixos, inter e intra-ensaios, no período de 1998 a 2006 variam respectivamente de um máximo de 32,8 % (2003) e 11,7% (2000) e 10,2% (2000) 2,3% (2004) para o cortisol; 46,6% (2003) e 10,4% (2005) e 26,4% (2001) e 2,6% (1998) para progesterona; e 30,4% (1999) e 5,7% (2006) e 14,1% (1999) 1,0% (2006) para os andrógenos.

Na Tabela 1 são ilustrados os resultados para os controles inter- e intra-ensaios para os três hormônios estudados para cada ano analisado. Em relação a todos eles, pode ser observado que todos os valores médios anuais estão dentro dos limites recomendados e observa-se uma diminuição nos valores dos CV, particularmente no CV inter-ensaio, a partir de 2000. Em 2004 é registrada outra diminuição que se prolonga até o ano de 2006, final da presente análise.

O limite de detecção dos ensaios para os três hormônios foi analisado para o mesmo conjunto de amostras. Conforme mostrado na Figura 1, os valores variaram de 1,14 a 10,20 ng de hormônio/g de fezes, sendo em média de 4,84 ng hormônio/g de fezes para o cortisol (Figura 1A), de 0,20 a 5,22 ng de hormônio/g de fezes para progesterona (Figura 1B), e 0,89 a 6,92 ng de hormônio/g de fezes para os andrógenos (Figura 1C). De um modo geral, pode ser

visualizado um padrão semelhante de variação para todos os hormônios, com diminuição nos valores de detecção nos anos mais recentes.

Tabela 1 – Concentrações médias observadas para os coeficientes de variação inter- e intra-ensaio (ng hormônio/g do analito) para os hormônios cortisol, progesterona e andrógenos, com os respectivos desvios padrões (%) no período de 1998 a 2006.

Analito	Ensaio	Período (Ano)								
		1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Cortisol	Inter	28,66	39,95	27,73	27,19	16,19	32,85	16,01	18,16	11,70
	desvio	3,66	17,78	9,49	3,65	0,13	5,09	5,29	0,24	3,51
	intra	3,43	6,51	10,17	3,29	3,17	7,46	2,34	4,30	3,22
	desvio	0,07	0,13	4,91	1,28	1,89	2,29	1,78	0,10	0,22
Progesterona	inter	40,32	24,27	12,20	44,32	14,58	46,56	39,36	10,44	14,49
	desvio	3,24	11,24	9,98	4,73	2,67	13,69	4,32	3,47	1,34
	intra	2,64	11,47	15,29	26,43	12,95	22,21	4,90	2,85	3,59
	desvio	1,50	5,83	7,67	0,88	1,06	3,81	1,70	0,19	1,39
Andrógenos	inter	-	30,24	26,76	12,63	21,20	25,41	13,62	15,89	5,66
	desvio	-	2,34	3,53	0,24	2,11	8,29	2,38	5,01	0,08
	intra	-	14,09	10,63	6,76	6,84	6,18	1,90	2,31	1,02
	desvio	-	2,62	2,04	0,51	2,42	6,17	0,48	0,62	0,09

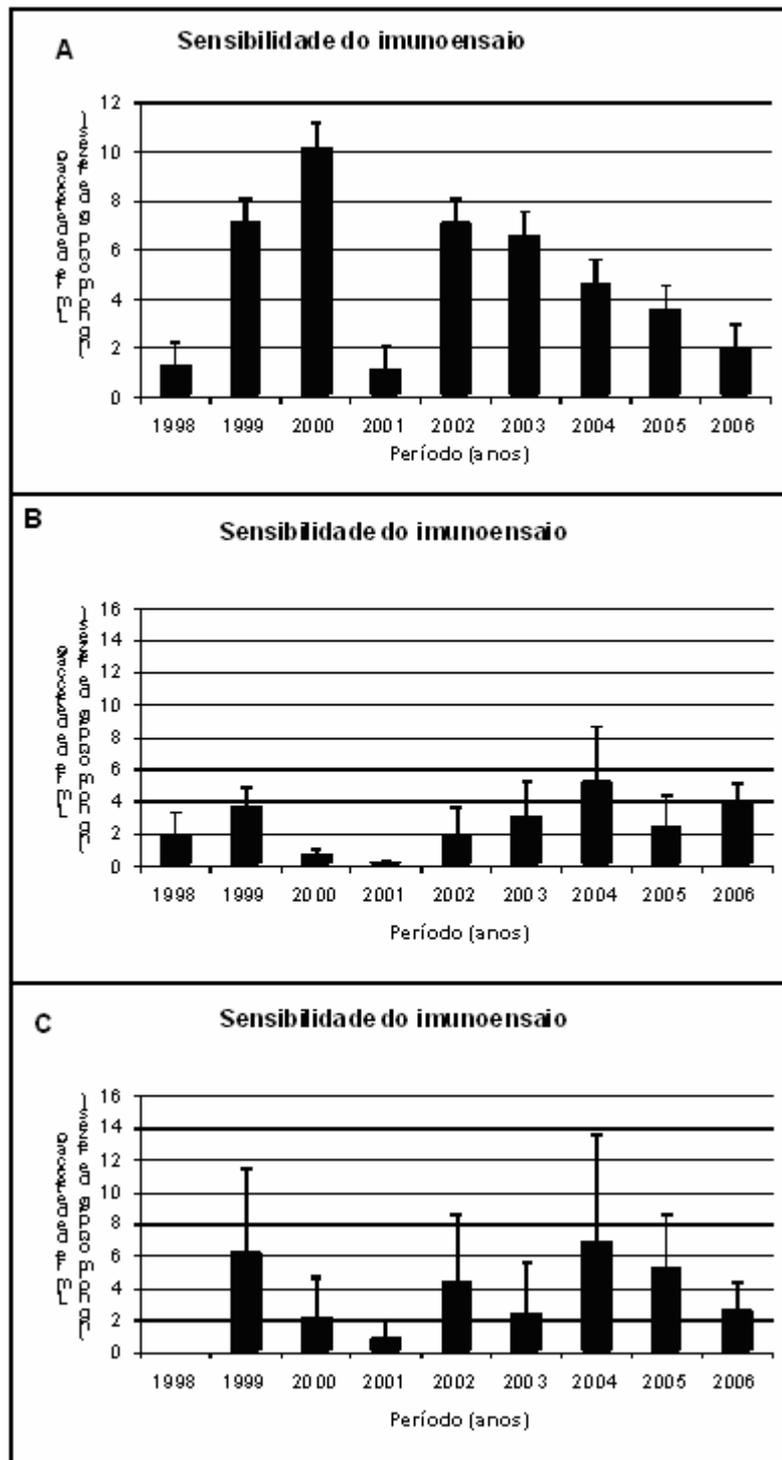


Figura 1 – Concentrações médias (+ DP) do limite de detecção do cortisol (A), progesterona (B) e andrógenos (C) em amostras fecais de *C. jacchus*, realizados no Laboratório de Medidas Hormonais da UFRN, no período de 1998 a 2006, para cortisol e progesterona e 1999 a 2006 para os andrógenos.

Discussão

Muitos métodos estão disponíveis para quantificação de hormônios em diferentes tipos de materiais. O material mais freqüentemente investigado desde os primeiros ensaios hormonais sempre foi o sangue, uma vez que se obtêm neste tipo de medida os valores hormonais mais próximos do que está realmente circulando nos órgãos e tecidos dos organismos estudados. Este método é considerado direto e fornece medidas com pouca variação entre ensaios (LOVALLO e THOMAS, 2002). Por outro lado, com a necessidade de se dosar hormônios em animais em vida livre, outras técnicas foram desenvolvidas e hoje estão disponíveis para diferentes primatas do Velho Mundo e do Novo Mundo (ZIEGLER e WITTWER, 2005). O Laboratório de Medidas Hormonais do Departamento de Fisiologia da UFRN passou a desenvolver dosagens no plasma de *Callithrix jacchus* em 1995 e, em 1997, passou a executar técnicas usando o material fecal de animais experimentais e controles vivendo na situação de cativeiro e campo. Nesta perspectiva, a identificação da variabilidade e reprodutibilidade da técnica deve ser acompanhada, de modo a garantir a qualidade das análises realizadas. Estas validações incluem a análise, segundo parâmetros estatísticos, dos coeficientes de variação dos ensaios. No presente estudo verificou-se que as adaptações realizadas na técnica de extração na qual o volume do extrato foi reduzido 8 para 5 mL, com supressão de um dos passos do ensaio de extração (CUNHA *et al.*, 1998) e utilização de reagentes de boa qualidade e manutenção dos equipamentos dentro do controle de qualidade, diminuíram os níveis de variação inter- e intra-ensaio bem como o limite mínimo de detecção hormonal. Estes dados no conjunto apontam para a importância de se controlar a qualidade dos ensaios, os quais devem também ser avaliados e comparados com os resultados obtidos em outros laboratórios (FEARS *et al.*, 2002; GAIL *et al.*, 1996), o que se pretende fazer em futuro próximo. É importante salientar que nos últimos dois anos os ensaios passaram a ser desenvolvidos por um único técnico, o que pode também ter contribuído para diminuição dos indicadores avaliados.

Referências

- ABBOTT, D. H. Behaviourally mediated suppression of reproduction in female primates. **Journal Zoology of London**, v. 231, p. 455-470, 1987.
- ABBOTT, D. H. Natural suppression of fertility. In: *Reproduction and Disease in Captive And Wild Animals* (J. P. Hearn and G. R. Smith, eds.). **Symposia of the Zoological Society of London**, v. 60, p. 7-28, 1988.

ALBUQUERQUE, A.C.S.R.; SOUSA, M.B.C.S., SANTOS, H.M. e ZIEGLER, T.E., 2001. Behavioral and hormonal analysis of social relationships between oldest females in a wild monogamous group of common marmosets (*Callithrix jacchus*). **International Journal of Primatology**, v. 22, p.632-645, 2001.

ALENCAR, A.I., SOUSA, M.B.C., ABBOTT, D.H. e YAMAMOTO, M.E. Contested dominance modifies the anovulatory consequences of social subordination in female marmosets. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 39, p. 647658. 2006.

CUNHA, M.S., FREIRE, M.V. e SOUSA, M.B.C. Validação da técnica de extração de esteróides fecais após diminuição do volume do solvente orgânico utilizado durante a solvólise. **Anais do 9º. Congresso de Iniciação Científica da UFRN**, p. 93, 1998.

FEARS, T.R., ZIEGLER, R.G., DONALDSON, J.L. FALK, RT, HOOVER.N. STANCZYK, F.Z., VAUGHT, J.B e GAIL, M.H. Reproducibility studies and interlaboratory concordance of serum hormone levels: estrone, estradiol, estrone sulphate, and progesterone. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 5, p. 835-844, 1996.

GAIL, M.H., FEARS, T.R., HOOVER, R.N., CHANDLER, D.W., DONALDSON, J.L., HYER, M.B., PEE, D., RICKER, W.V, SIITERI, P.K., STANCZYK, F.Z., VAUGHT, J.B e ZIEGLER, R.G. Reproducibility studies and interlaboratory concordance for androgens assays of male plasma hormone levels. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 11, p. 785-789, 2002.

JURKE, M. H., CZEKALA, N. M. e FITCH-SNYDER, H. Non-invasive detection and monitoring of estrus, pregnancy and the postpartum period in pygmy loris (*Nycticebus pygmaeus*) using fecal estrogen metabolites. **American Journal of Primatology**, v. 41, p. 103-115, 1997.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 4.ed. São Paulo: Átomo, 2002.

LOVALLO, W.R. e THOMAS, T.L. Stress hormones in psychophysiological research: Emotional, behavioral, and cognitive implications. In: Cacioppo JT, Tassinary LG, Berntson GG, editors. *Handbook of psychophysiology* (2nd ed). Cambridge, England: Cambridge University Press, 2000; 342–367.

MUNRO, C. e STABENFELDT, G. Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. **Journal of Endocrinology**, v. 101, p. 41-49, 1984.

MUNRO, C. J., STABENFELDT, G. H., CRAGUN, J. R., et. al. Relationship of serum estradiol and progesterone concentrations to the excretion profiles of their major urinary metabolites as measured by enzyme immunoassay and radioimmunoassay. **Clinical Chemistry**, v. 37, p. 838-844, 1991.

SOUSA, M. B. C. e ZIEGLER, T. E. Diurnal Variation on the excretion patterns of fecal steroids in common marmoset (*Callithrix jacchus*) females. **American Journal of Primatology**, v. 46, p. 105-117, 1998.

STRIER, K. B., ZIEGLER, T. E. e WITWERT, D. J. Seasonal and social correlates of fecal testosterone and cortisol levels in wild male muriquis (*Brachyteles arachnoides*). **Hormones and Behavior**, v. 35, p. 125-134, 1999.

WASSER, S. K. Reproductive control in wild baboons measured by fecal steroids. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 393-399, 1996.

ZIEGLER, T. E., SHEFFLER, G., WITWERT, D. J., SCHULTZ-DARKEN, N.N., SNOWDON, C. T. e ABBOTT, D. H. Metabolism of reproductive steroids during the ovarian cycle in two species of Callithrichids, *Saguinus oedipus* and *Callithrix jacchus*, and estimation of the ovulatory period from fecal steroids. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 91-99, 1996.

ZIEGLER, T.E., SCHEFFLER, G. e CARLSON, A.A. Methods and use of fecal steroid analyses for monitoring reproductive functioning in marmosets and tamarins Em: Sousa, M.B.C. & Menezes, A.A.L. (Eds), **A Primatologia no Brasil** vol.6, pp.249-258, 1997.

ZIEGLER, T. E. e WITWERT, D. J. Fecal steroid research in the field and in the laboratory: Improved methods for storage, transporting, processing and analysis. **American Journal of Primatology**, v. 67, p. 159-174, 2005.

Heveline Gomes do Nascimento

Endereço eletrônico: hevegomes@yahoo.com.br

Base de pesquisa: Laboratório de Endocrinologia Comportamental

Endereço postal: Departamento de Fisiologia, Centro de Biociências, 59078-970, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Campus Universitário, Natal/RN – Brasil.