

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA LC-MS PARA DOSAGEM DO HORMÔNIO PROGESTERONA EM SORO DE MAMÍFEROS

Elena Macedo Gimenez (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Antônio Campanha Martinez, Gabriela Geraldo de Lima, Flavio Augusto Vicente Seixas (Orientador). E-mail: favseixas@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Engenharias e Tecnologia,
Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Agrárias /Medicina Veterinária.

Palavras-chave: *Bos taurus*; Esteroides; Reprodução animal;

RESUMO

Dosagens de concentrações hormonais podem indicar exatamente em qual período reprodutivo um animal se encontra, o que é de grande interesse em programas de inseminação artificial. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de dosagem de progesterona por Electrospray LCMS, já que esse hormônio desempenha importante papel em gestações. Foram avaliados dois métodos de determinação da concentração, um por curva de calibração e outro por utilização de padrão de referência. Para construção da curva, foram adicionadas concentrações de progesterona exógena entre 0 e 20 ng/mL em um *pool* de soro. Alternativamente, uma amostra de soro com concentração de progesterona dosada por radioimunoensaio (R.I.A.) e quimioluminescência foi utilizado como padrão de referência. Como forma de validação, o teor de progesterona de amostras de soro provenientes de duas vacas no cio, duas fora do cio e de um touro, foi determinado por LC-MS/MS após a extração sólido-líquido. As áreas dos cromatogramas MRM foram utilizadas para determinação dos teores e comparados com dosagens por quimioluminescência e R.I.A. Os resultados mostraram que a determinação da concentração por padrão de referência foi mais precisa que o método de curva de calibração, pois esta é afetada pela perda de sensibilidade do detector de massas com o tempo. As dosagens por LCMS usando padrão de referência apresentaram teores para cada amostra analisada intermediários entre os dosados pelos métodos tradicionais, indicando menor variação dos valores, com uma taxa de recuperação de 106%. O método desenvolvido se mostrou eficiente e pode ser aplicado em análises de rotinas laboratoriais.

INTRODUÇÃO

A ciclicidade reprodutiva dos mamíferos é complexa e determinada por fatores de crescimento e diversos hormônios, como a progesterona, que é um esteroide

diretamente relacionado à ovulação e à foliculogênese. Por ser o principal regulador das atividades do sistema reprodutor, seu índice de concentração no organismo pode ser utilizado como indicador do período do ciclo em que a fêmea se encontra (MENDONÇA, 2007). Além do mais, esse hormônio, proveniente do corpo lúteo, é indispensável para manter o desenvolvimento embrionário no período gestacional já que ele influencia o endométrio a estimular a diferenciação e crescimento do concepto (ARREDONDO; MARTÍNEZ, 1993). Sendo assim, a dosagem da progesterona é um indicativo para a administração da ciclagem reprodutiva em mamíferos domésticos, tanto para recria de animais de produção, quanto para animais de estimação. Atualmente os métodos mais utilizados para dosagem da progesterona são o radioimunoensaio (R.I.A.), que possui alta eficiência, entretanto tem por desvantagem o uso de materiais radioativos, e o teste de ensaios imunoenzimáticos ELISA, ambos não possuem muita viabilidade em larga escala e possuem alto custo. Há estudos recentes que também validaram a quimiluminescência como método de diagnóstico para a dosagem da progesterona, porém este ainda é pouco usado na medicina veterinária (CARDOSO, 2018). Assim, o desenvolvimento de metodologias rápidas, precisas e com menor custo para dosagem de hormônios é de grande interesse em clínica médico-veterinária.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para dosagem de progesterona, por tecnologia LC-MS/MS, para que possa ser utilizada na rotina de hospitais veterinários.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletados 10 mL de sangue de três vacas no cio e, em seguida, o soro foi extraído e misturado para obtenção de um *pool* de soro. Em seguida foi preparada uma solução estoque do padrão de progesterona, em metanol a 1 mg/mL, onde alíquotas foram adicionadas em *pool* de soro, na série de concentrações de 0.01, 1.00, 2.50, 5.00, 7.50, 10.00, 16,22 e 20,22 ng/mL, para construção de uma curva de calibração. Uma amostra de *pool* de plasma de duas vacas prenhas teve seu teor de progesterona dosado por R.I.A. e quimiluminescência em laboratório clínico, para ser utilizada como padrão de referência.

Como método de extração, as amostras de soro foram diluídas adicionando-se 100 µL de soro em 300 µL de água ultrapura. Depois, a amostra (400 µL) foi dispensada na coluna isolute® e, após 5 minutos foi adicionado 900 µL de diclorometano, por duas vezes para eluir as amostras. O eluído foi transferido para um *vial*, armazenado na estufa à 40 °C até secar. Depois de seco, foi redissolvido em 100 µL do solvente do HPLC cuja fase móvel continha: A 66% (5 mM Formiato de amônio + Água) e B 34% (5 mM Formiato de amônio + Metanol). As amostras para curva de calibração foram feitas em duplicatas. Injeções de 10 µL foram realizadas no equipamento LCMS-8050 (Shimadzu). O método espectrômetro foi operado do modo MRM com fonte de ionização electrospray com duas injeções de cada amostra. Amostras de soro de cinco animais foram utilizadas para validação da metodologia, onde as dosagens por R.I.A. e quimiluminescência, foram comparadas com os teores

dosados por LCMS por meio de curva de calibração e comparação com o padrão analítico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A curva de calibração foi considerada excelente pois o coeficiente de variação de cada ponto foi inferior a 20%. Quatro meses após a construção da curva de calibração, amostras de soro de duas vacas no cio, duas vacas fora do cio e de um touro foram coletadas e, em seguida tiveram o teor de progesterona dosado por três métodos: LC-MS/MS (este trabalho), por quimioluminescência e por R.I.A. Os resultados mostraram que os valores de progesterona dosados por LC-MS/MS utilizando os parâmetros da curva de calibração foram subestimados em relação as outras metodologias. A justificativa para esta discrepância é a perda gradual de sensibilidade do detector de massas com o passar do tempo. Assim, um padrão de referência com concentração conhecida deve ser utilizado a cada lote de dosagem (STANCZYK; CLARKE, 2010).

Quando os cromatogramas no modo de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) foram usados para quantificar a progesterona por comparação com o padrão de referência, os resultados foram mais precisos, conforme mostrado na tabela 01.

Tabela 1. Concentrações de progesterona dosadas pelos diferentes métodos em ng/mL. A dosagem por LC-MS/MS nesta tabela foi feita por comparação entre as áreas dos cromatogramas MRM das amostras, com a do padrão de referência.

ANIMAL	LC-MS/MS	Quimiolum.	R.I.A.
Vaca 729	14,56	15,51	n.d.
Vaca 01	5,47	9,72	11,70
Touro 01	0,48	0,20	1,16
Amostra 09	16,05	16,22	15,72
Amostra 10*	20,32	n.d.	24,45

* Amostra usada como recovery (Amostra 09 + 4 ng/dL). n.d. = não dosado.

A dosagem do teor de progesterona por comparação com um padrão analítico de concentração definida se mostrou mais preciso do que o feito por curva de calibração. Isso porque, o uso de padrão de referência não está sujeito a variações na sensibilidade do detector com o passar do tempo (STANCZYK; CLARKE, 2010). A sensibilidade do método LC-MS/MS foi aferida por estudo de recuperação (*recovery*), onde uma concentração conhecida de progesterona (4 ng/mL) foi adicionada a uma amostra de concentração também conhecida (16,05 ng/mL). Neste caso, a soma das duas concentrações (16,05 ng/mL + 4,00 ng/mL) deveria ser detectada pela metodologia LC-MS/MS no valor de 20,05 ng/mL. O resultado da

dosagem foi de 20,32 ng/mL, o que significa, um índice de recuperação de 106%. Índices de recuperação entre 90 e 110% são considerados excelentes, e índices entre 85 a 115% são considerados aceitáveis.

Os teores de progesterona dosados por LC-MS/MS apresentaram valores intermediários aos dosados R.I.A. e quimioluminescência, indicando menor variação. A vaca 01 não estava no cio, portanto, é esperado que seu teor de progesterona não ultrapasse 5 ng/mL, valor que só foi obtido pela metodologia LC-MS/MS.

CONCLUSÕES

A metodologia LC-MS/MS se mostrou eficiente para dosar o teor de progesterona em plasma de bovinos, desde que utilizado um padrão de referência com concentração conhecida de progesterona como controle.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação Araucária, CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

ARREDONDO, M.C.L.; MARTÍNEZ, J.T. Capacidad endócrina del blastocito de mamífero: II biosíntesis y metabolismo estrogénico. **Ginecol. Obstet. Méx.**, v.61, n. 4, p. 86-91, 1993. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-121150>. Acesso em: 29 ago. 2023

CARDOSO, C.A. **Utilização da quimioluminescência na determinação das concentrações séricas de progesterona, hormônios luteinizantes e folículo estimulante em novilhas holandesas**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2018. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/25750>. Acesso em: 29 ago. 2023.

MENDONÇA, F.D.; *et al.* Aspectos citopatológicos da mucosa vaginal de camundongas tratadas com progesterona. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 2, p. 313-318, 2007. Disponível em: [https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/ciencia-animal-brasileira/8-\(2007\)-2/aspectos-citopatologicos-da-mucosa-vaginal-de-camundongas-tratadas-com](https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/ciencia-animal-brasileira/8-(2007)-2/aspectos-citopatologicos-da-mucosa-vaginal-de-camundongas-tratadas-com). Acesso em: 29 ago. 2023.

STANCZYK F.Z.; CLARKE N.J. Advantages and challenges of mass spectrometry assays for steroid hormones. **Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v.121, p. 491-495, 2010.