

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

Gabriela Specian Pinheiro (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Antônio Campanha Martinez (Co-orientador), Flavio Augusto Vicente Seixas (Orientador). E-mail: ra136162@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Umuarama, PR.

Área e subárea do conhecimento: Medicina veterinária, Saúde animal.

Palavras-chave: estresse; bioquímica; diagnóstico clínico.

RESUMO

O estresse em bovinos pode comprometer o desempenho produtivo e a saúde dos animais. A dosagem precisa do cortisol, principal hormônio do estresse, é fundamental para avaliar o bem-estar animal e identificar fatores de risco. Neste estudo, avaliamos a eficácia da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) para a dosagem de cortisol em soro bovino. Os resultados demonstraram a superioridade da LC-MS/MS em relação aos métodos tradicionais, proporcionando maior confiabilidade.

INTRODUÇÃO

O cortisol é um hormônio esteroide relacionado ao estresse produzido pelas glândulas adrenais e, em concentrações altas no sangue prejudica a absorção de nutrientes, diminui o número e capacidade de células do sistema imune, interfere no ciclo reprodutivo dentre outros (SANTANA et al., 2009). A dosagem do cortisol plasmático é feita pelos métodos de radioimunoensaio ou quimioluminescência, no entanto, estes métodos apresentam limitações em termos de precisão, custo e geração de resíduos, justificando a pesquisa por metodologias alternativas de dosagens como o LC-MS/MS.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de sangue de seis animais em tubos específicos, depois centrifugado à 1200 rpm por 8 minutos. O soro foi recolhido individualmente e uma amostra de referência com soro de todos os animais foi preparada num único “pool” de soro. Uma parte das amostras foi enviada para laboratório clínico para dosagem

por quimioluminescência. Na preparação das amostras para LCMS, foi diluído 100 μL de soro com 300 μL de água em um microtubo que foi agitado em vórtex. As amostras (400 μL) tiveram os esteroides separados pelo método sólido-líquido usando coluna isolute®-SPE. A eluição dos esteroides ocorreu com a adição de diclorometano (900 μL x 2) com fluxo por gravidade. Transferiu-se os eluatos para *vials* de vidro que foram submetidos a secagem em estufa à 40 °C por 8 horas. Após evaporação, o precipitado sólido foi redissolvido em 100 μL de fase móvel (Água 66% e Metanol 35% v/v). Os *vials* agitados em vórtex por 30 s, e o líquido transferido para um insert. Foi preparada uma curva de calibração de cortisol nas concentrações finais de 0.1, 20, 40, 60, 80 e 100 ng/mL, adicionando o hormônio ao *pool* de soro, extraídas conforme método descrito acima. Os parâmetros do LC-ES-MS/MS podem ser vistos na figura 1.

Item	Value	Setting	Units
Mode	Binary gradient	Binary gradient	
Total Flow	0.3000	0.3000	mL/min
B.Conc	35.0	35.0	%
Pump A Flow			mL/min
Pump B Flow			mL/min
Pump A Pressure	219		kgf/cm ²
Pump B Pressure	220		kgf/cm ²
Pump A Degassing Unit	-95		kPa
Pump B Degassing Unit	Not Connected		kPa
Oven Temperature	40.0	40	C
Temperature Limit(Maxi	90	90	C
Overlap Mode	Off	Off	
Vial No.(Autosampler)	1-2		
Injection Volume	10		μL
Nebulizing Gas Flow	3.0	3.0	L/min
Drying Gas Flow	7.0	7.0	L/min
Heating Gas Flow	13.0	13.0	L/min
Interface	ESI		
Interface Voltage		4.0	kV
Interface Current	6.7		μA
Interface Temperature	370	370	C
Desolvation Temperatur	631	631	C
DL Temperature	110	110	C
Heat Block Temperatur	450	450	C
Conversion Dynode Volt		10.0	kV
Detector Voltage		1.66	kV
IG Vacuum	2.6e-03		Pa
PG Vacuum	1.4e+02		Pa
CID Gas	270	270	kPa

Figura 1 – Parâmetros de ajuste do LC-MS/MS para detecção de cortisol nas amostras.

As amostras foram injetadas num LCMS-8050 (Shimadzu), volume de 10 μL , num fluxo de 0,3 mL/min, coluna Shimpack (75 mm L, 2 mm I.D., 3 μm), temperatura da coluna de 40 °C. Na fase móvel houve a mistura de: A) 5 mM formiato de amônio em água, B) 5 mM formiato de amônio em metanol. O gradiente foi feito por: 35%B (0-2,5 min), 35%B 45%B (2,5-4,0 min), 45%B 80%B (4,0-12,0 min), 95%B (12,01-15,0 min), 35%B (15,01-18,0 min). O íon principal de $m/z = +363,2$ e os íons produto $m/z = 121,1$; 105,3; e 327,2 foram monitorados nas transições MRM e os cromatogramas

TIC+ foram usados para calcular a área de cada pico no programa LabSolutions Insight®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cromatograma TIC+ do íon principal é mostrado na figura 2.

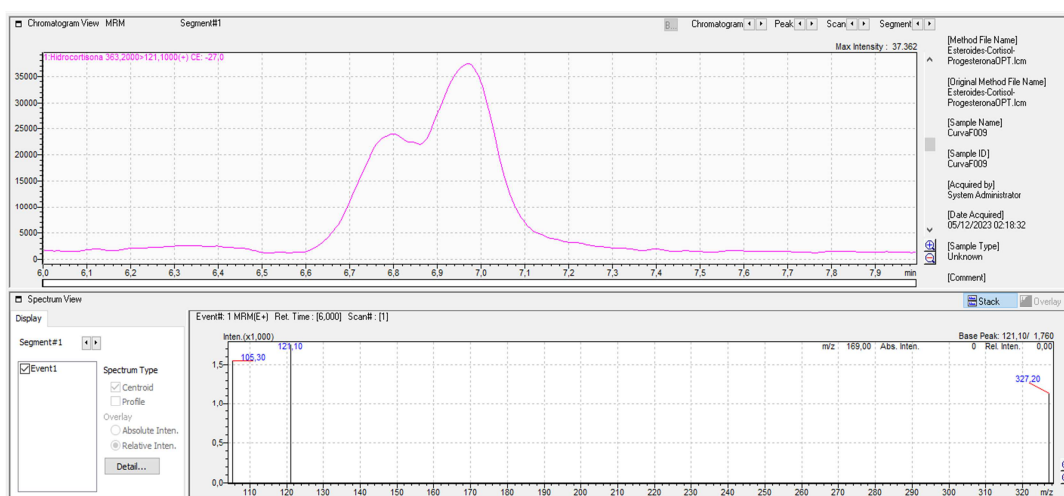


Figura 2 – Cromatograma TIC+ do cortisol extraído da amostra de soro, utilizado nas análises de quantificação.

A curva de calibração (Figura 3A), depois de corrigida com o cortisol endógeno (Figura 3B) apresentou coeficiente de variação de 0,60%, sendo aplicada nas análises.

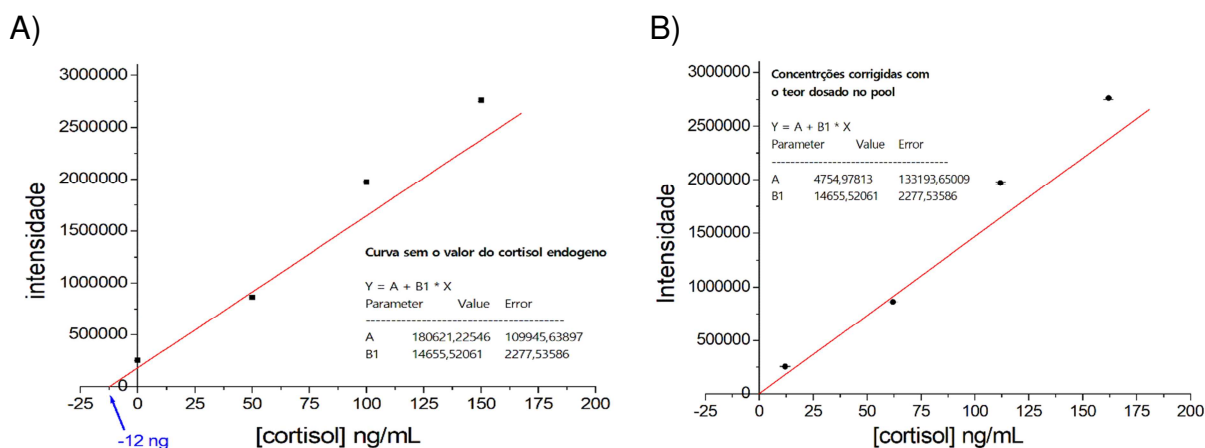


Figura 3 - Curvas de calibração para dosagem de cortisol nas amostras. **A)** Curva de calibração feita com alíquotas de cortisol adicionado na amostra de *pool* de soro. Esta curva não considerou o teor de cortisol endógeno. **B)** Curva de calibração com o teor total de cortisol corrigido com o teor de cortisol endógeno.

Devido ao alto custo da análise por quimioluminescência, foram dosados o teor de cortisol de apenas quatro amostras com valores evidenciados na tabela 1. Uma diferença nos resultados já era esperada, porém, observa-se que todas as amostras variaram na mesma ordem entre o mínimo e máximo.

A amostra 01 foi a de menor teor e a amostra 36 foi a de maior teor. O animal 36 era um boi castrado e espera-se que tenha um baixo teor de testosterona, o que poderia influenciar em seu comportamento agressivo. O nível elevado de cortisol para este animal é justificável, pois é produzido pelo córtex adrenal e não pelos testículos. No entanto, o valor medido por quimioluminescência está anormalmente alto

Tabela 1 – Resultados das dosagens do teor de cortisol comparando os métodos.

Identificação do animal	Valor dosado (ng/mL)		Diferença (ng/mL)
	LC-MS/MS	Quimioluminescência	
01	11	10	+1
<i>Pool de soro</i>	12	12	0
12	32	20	+12
36	35	44	-9

Estudos demonstram que o método de LCMS é mais preciso, porém, é menos usado devido ao alto custo (KARASHIMA & OSAKA, 2022).

CONCLUSÕES

A dosagem precisa pelo método de HPLC-ESI-MS/MS permitiu a identificação do cortisol em amostras de soro de bovinos, em concentrações compatíveis com o método tradicional de quimioluminescência, principalmente nas concentrações mais baixas, porém, está sujeito a erros aleatórios durante o preparo das amostras.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao programa PIBIC-CNPq/UEM, CAPES e Fundação Araucária.

REFERÊNCIAS

KARASHIMA, S.; OSAKA I. Rapidity and Precision of Steroid Hormone Measurement. **Journal of Clinical Medicine**, v.11, n.4, p. 956, 2022.



SANTANA, A. P. *et al.* Dosagem de cortisol sanguíneo em suínos submetidos ao manejo pré-abate e insensibilização elétrica. **Archivos de Zootecnia**, v. 58, n. 221, p. 149-152, 2009.