

VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE ENZIMOIMUNOENSAIO (EIA) PARA DETERMINAÇÃO DE ESTRADIOL EM FEZES DE PEQUENOS FELÍDEOS

Nei Moreira¹, Wanderlei de Moraes², Astrid Bellem³, Janine Brown³, Emygdio A. Monteiro Filho⁴

1-Curso de Pós-Graduação em Zoologia, UFPR Palotina/PR, moreira@bio.ufpr.br; 2-Itaipu Binacional, PR.; 3-Conservation and Research Center, EUA; 4-Departamento de Zoologia, Curso de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR

Um procedimento altamente sensível de enzimoimunoensaio (EIA) para determinação de estradiol (E2) em fezes de pequenos felídeos em microplacas foi validado. Para a validação do método referido, as mesmas amostras fecais (n=156) foram processadas pelo método tradicionalmente empregado, o radioimunoensaio (RIA) e também através do EIA. As amostras fecais foram inicialmente analisadas para metabólitos de estradiol de acordo com o método de RIA descrito por Brown et al. (1994, Biol. Reprod. 51:776-786), exceto que as amostras não foram secas antes da análise. As amostras foram descongeladas e aproximadamente 0,5 g de fezes, previamente bem misturadas, foram fervidas em 5 ml de etanol aquoso (90%) durante 20 min. Após centrifugação em 500 X g durante 10 min, o sobrenadante foi recuperado e o pélete ressuspensionado em 5 ml de etanol 90%, turbilhonado ("vortex") por 1 min e recentrifugado. Os dois sobrenadantes de etanol foram combinados, evaporados completamente, redissolvidos em 1 ml de metanol e diluídos em solução salina-fosfato tamponada (0,01 M PO₄, 0,14 M NaCl, 0,5% BSA, 0,01% NaN₃) antes da análise. Os radioimunoensaios foram validados para cada espécie através da demonstração: 1) paralelismo entre as curvas de inibição de ligação das diluições de extrato fecal e o padrão de esteróide apropriado; e 2) recuperação significativa (> 90%) do esteróide exógeno adicionado aos extratos fecais. A eficiência da extração de esteróides fecais variou de 90 a 100% como determinado pela recuperação de ³H-estradiol adicionado antes da extração. Metabólitos de estradiol foram medidos como descrito por Brown et al. (1994). O ensaio de estradiol utilizou um anti-soro anti-estradiol-17β, um "rótulo" de ³H-estradiol-17β e padrões de estradiol. A dose mínima detectável baseada em 90% de ligação máxima foi 5 pg/tubo. Os coeficientes de variação intra- e interensaio para ambos os ensaios foram <10%. Todas as concentrações hormonais fecais foram expressas baseadas em grama de peso fecal úmido. O método de EIA foi validado através da demonstração do paralelismo dos resultados com o RIA. Em comparação com o RIA, o EIA foi mais sensível. Em conclusão, além de ser não radioativo e de baixo custo, o método oferece várias vantagens sobre o procedimento convencional de RIA para estradiol; essas são: (a) maior sensibilidade, (b) menos trabalho e economia de tempo, (c) uso mais econômico do anticorpo, (d) utilização de equipamento de menor custo, (e) não utilização de substâncias radioativas, evitando-se dessa forma riscos para quem processa as amostras, além da não produção de lixo radioativo.

Agradecimentos - à equipe do Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional por sua afeição e suporte. Roberto Rochadeli e James Joseph Roper. Suporte financeiro Itaipu Binacional, Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, Nuvital Nutrientes Ltda.