EDUARDO TSUYOSHI YAMAGUCHI

**Dosagens sanguíneas de ocitocina por enzimoimunoensaio após
diferentes regimes de infusão de ocitocina em gestantes submetidas à
cesariana eletiva com raquianestesia**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de: Anestesiologia
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Luis Abramides Torres

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Yamaguchi, Eduardo Tsuyoshi

Dosagens sanguíneas de ocitocina por enzimoimunoensaio após diferentes regimes de infusão de ocitocina em gestantes submetidas à cesariana eletiva com raquianestesia / Eduardo Tsuyoshi Yamaguchi. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Anestesiologia.

Orientador: Marcelo Luis Abramides Torres.

Descritores: 1. Ocitocina 2.Cesárea 3.Elisa 4.Raquianestesia

USP/FM/DBD-097/11

Dedico esta tese:

À minha mãe, Nitie, por nunca ter medido esforços para poder me oferecer educação e conhecimento. Hoje sou capaz de valorizar toda a sua dedicação à família e aos filhos e, com orgulho, escrever que ela é um exemplo de vida.

A Marcel, por ter estado ao meu lado mesmo nos momentos difíceis do desenvolvimento desta tese.

Os meus mais sinceros agradecimentos:

Ao Professor Doutor Marcelo Luis Abramides Torres, pela orientação prestada a esta tese.

À Doutora Mônica Maria Siaulys, por ter despertado em mim o gosto pela anestesiologia obstétrica e pela pesquisa científica.

Ao Doutor André Beer Junior, por um dia ter acreditado em minha capacidade e ter me possibilitado prosseguir na anestesiologia.

Ao Professor Didier Payen, chefe do Serviço de Anestesiologia do Hospital Lariboisière de Paris (França), por ter me recebido em seu Serviço e possibilitado o desenvolvimento de parte da discussão desta tese.

Ao Professor Sandro Rogério de Almeida, por ter cedido espaço em seu laboratório para o condicionamento e, também, para as dosagens das amostras das pacientes desta tese, que foram realizadas no Laboratório de Micologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Ao amigo Cláudio Mocelin, pelo auxílio na revisão da língua inglesa.

À Maura Gonzaga Lapa, pela revisão da parte estatística.

Aos amigos e colegas anesthesiologists do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo.

Aos obstetras do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo.

À FAPESP, pela concessão de auxílio financeiro para compra dos kits de purificação e de ELISA, necessários para realização deste trabalho (Processo nº 0750100-1, 2007).

À CAPES, pela concessão de bolsa do Programa de Doutorado com Estágio no Exterior (PDDE) realizado no Hospital Lariboisière de Paris (França) no período de novembro de 2008 a maio de 2009 (BEX 3281-08-6).

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2^a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de tabelas

Lista de gráfico

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivo.....	6
2 MÉTODOS.....	7
2.1 Purificação das amostras.....	11
2.2 Dosagem da ocitocina.....	14
3 RESULTADOS.....	19
4 DISCUSSÃO.....	26
5 CONCLUSÕES.....	33
6 ANEXOS.....	34
7 REFERÊNCIAS.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	análise de variância
DC	débito cardíaco
ELISA	enzimoimunoensaio
FC	frequência cardíaca
G1	grupo 1
G2	grupo 2
G3	grupo 3
Ht	hematócrito
L3-L4	vértebra lombar 3 e 4
p	probabilidade
PAS	pressão arterial sistólica
RIA	radioimunoensaio
RL	solução de Ringer com lactato
SF	solução fisiológica a 0,9%
T4	quarta vértebra torácica

LISTA DE SÍMBOLOS

bpm	batimento por minuto
C	Celsius
C-18	carbono 18
COX	ciclo-oxigenase
HCl	ácido clorídrico
L	litro
μg	micrograma
μL	microlitro
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mL/Kg	mililitro por quilograma de peso
mmHg	milímetro de mercúrio
N	normal
nm	nanômetro
ng/mL	nanograma por mililitro
rpm	rotação por minuto
UI	unidade internacional
UI/min	unidade internacional por minuto

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados demográficos, número de cirurgias uterinas prévias e parâmetros hemodinâmicos controles.....	21
Tabela 2 - PAS, FC, consumo de metaraminol e Ht antes e depois da infusão da ocitocina.....	22
Tabela 3 - Concentração sérica de ocitocina (ng/mL).....	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Criotubos contendo 1,5 mL do soro de uma paciente.....	11
Figura 2 - Soluções tampão: A (lavagem) e B (eluição) do kit de purificação.....	12
Figura 3 – Gotejamento do soro purificado em tubo de polipropileno.....	13
Figura 4 – Kit de ELISA para dosagem da ocitocina.....	14
Figura 5 – Microplaca do kit de ELISA.....	15
Figura 6 - Leitor da microplaca de ELISA.....	16
Figura 7 - Concentração sérica de ocitocina por ELISA.....	25

RESUMO

Yamaguchi ET. *Dosagens sanguíneas de ocitocina por enzimoimunoensaio após diferentes regimes de infusão de ocitocina em gestantes submetidas à cesariana eletiva com raquianestesia* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

INTRODUÇÃO: Apesar de ser a droga de primeira escolha na prevenção da hemorragia pós-parto, o uso da ocitocina em cesarianas permanece empírico. O objetivo deste estudo foi dosar a ocitocina sérica após a administração profilática de diferentes regimes de ocitocina em pacientes submetidas à cesariana eletiva. MÉTODOS: 30 pacientes que se apresentaram para cesariana eletiva foram randomizadas para receber ocitocina intravenosa, após o clampeamento do cordão umbilical, nos seguintes grupos: G1 (n=9): 10 UI de ocitocina infundidas em 30 minutos (0,33 UI/min), G2 (n=11): 10 UI de ocitocina infundidas em 3 minutos e 45 segundos (2,67 UI/min) e G3 (n=10): 80 UI de ocitocina infundidas em 30 minutos (2,67 UI/min). Este estudo foi encoberto para as pacientes e para os cirurgiões. A avaliação do tono uterino foi realizada pela equipe cirúrgica e a dosagem da concentração sérica de ocitocina foi feita pela técnica de enzimoimunoensaio (ELISA), antes da anestesia (T0) e nos tempos 5 (T5), 30 (T30) e 60 (T60) minutos após o início da infusão da ocitocina. RESULTADOS: Os níveis de ocitocina sérica (média $\pm$ erro padrão, ng/mL) foram semelhantes entre os grupos em T0 (0,062 $\pm$ 0,021; 0,039 $\pm$ 0,019 e 0,067 $\pm$ 0,041; respectivamente, p = 0,76) e em T60 (0,648 $\pm$ 0,257; 0,356 $\pm$ 0,257 e 0,683 $\pm$ 0,257; respectivamente, p =

0,58). G3 apresentou níveis maiores de ocitocina que G1 em T5 ($3,651 \pm 0,741$ versus $0,709 \pm 0,268$; $p = 0,01$). Em T30, G3 apresentou níveis de ocitocina sérica maiores que G1 ($6,190 \pm 1,195$ versus $1,174 \pm 0,375$; $p < 0,01$) e, também, que G2 ($6,190 \pm 1,195$ versus $0,411 \pm 0,206$; $p < 0,01$). Os parâmetros hemodinâmicos foram semelhantes entre os grupos. O tono uterino foi considerado satisfatório em todos os intervalos estudados e não houve a necessidade de utilização de uterotônico complementar. CONCLUSÃO: Foram demonstradas dosagens séricas de ocitocina por ELISA em gestantes submetidas à cesariana eletiva. A administração de 80 UI de ocitocina em 30 minutos resulta em níveis séricos de ocitocina maiores que os outros dois métodos de administração aos 5 e 30 minutos, porém, estas concentrações não diferem aos 60 minutos.

Descritores: 1. Ocitocina 2. Cesárea 3. ELISA 4. Raquianestesia

SUMMARY

Yamaguchi ET. Oxytocin blood levels following different regimens of oxytocin administration in elective cesarean delivery [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2011.

BACKGROUND: The use of oxytocin to prevent postpartum hemorrhage after elective cesarean delivery still remains empirical. The purpose of this study was to determine oxytocin serum levels following different regimens of prophylactic oxytocin administration in pregnant women undergoing elective cesarean delivery. **METHODS:** 30 healthy pregnant patients were randomized to receive intravenous oxytocin, after clamping of the umbilical cord, into the following groups: G1 (n=9), 10 IU of oxytocin infused over 30 minutes (0.33 IU/min); G2 (n=11), 10 IU of oxytocin infused over 3 minutes and 45 seconds (2.67 IU/min) and G3 (n=10), 80 IU of oxytocin infused over 30 minutes (2.67 IU/min). Both patient and surgeon were blinded to the study group allocation. Uterine tone was assessed by palpation by the surgeon. Serum oxytocin concentration was determined by enzyme immunoassay (EIA) before anesthesia (T0) and at 5 (T5), 30 (T30) and 60 (T60) minutes following the start of oxytocin infusion. **RESULTS:** Serum oxytocin levels (mean $\pm$ standard error, ng/mL) were similar in the groups at T0 (0.062 ± 0.021 , 0.039 ± 0.019 and 0.067 ± 0.041 , respectively, $P = 0.76$), and T60 (0.648 ± 0.257 , 0.356 ± 0.257 and 0.683 ± 0.257 , respectively, $P = 0.58$). G3 presented higher serum oxytocin than G1 at T5 (3.651 ± 0.741 versus 0.709 ± 0.268 , $P = 0.01$). At T30, serum oxytocin levels of G3 were higher than G1 (6.190 ± 1.195 versus 1.174

± 0.375 , $P < 0.01$) and also than G2 (6.190 ± 1.195 versus 0.411 ± 0.206 , $P < 0.01$). Hemodynamic data were similar in all groups. Uterine tone was considered satisfactory in all intervals studied and no additional uterotonic agent was needed. CONCLUSION: We demonstrate serum oxytocin determinations by EIA in healthy pregnant women presented for elective cesarean delivery. Administering 80 IU in 30 min results in higher serum oxytocin levels at 5 and 30 min than the other two methods of oxytocin administration, but the concentrations did not differ at 60 min.

Descriptors: 1. Oxytocin 2. Cesarean Section 3. Enzyme-linked Immunosorbent Assay 4. Spinal Anesthesia

INTRODUÇÃO

A ocitocina é um polipeptídeo com uma configuração em anel, produzido pelo hipotálamo e armazenado na neuro-hipófise. Foi o primeiro hormônio polipeptídeo a ser sintetizado, em 1953, por Du Vigneaud. Ao se ligar em seu receptor na superfície do miométrio, a ocitocina promove o aumento da frequência e da intensidade das contrações uterinas. Por meio da fosfolipase C, leva à formação de diacilglicerol e de inositol-trifosfato; o diacilglicerol estimula a síntese de prostaglandinas, enquanto que o inositol-trifosfato promove a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático¹. Além disso, a ocitocina ativa a COX-2 pela interação com a proteína G, estimulando, novamente, a síntese de prostaglandinas².

É utilizada na prática clínica para induzir ou acelerar a progressão do trabalho de parto. Além disso, é a droga de primeira escolha na prevenção e tratamento da atonia uterina após o nascimento do bebê, minimizando a ocorrência de hemorragia no puerpério. O uso profilático da ocitocina é justificado por diminuir em até 40% a incidência de hemorragia pós-parto, quando comparado ao placebo ou a infusão não profilática³⁻⁵, além de diminuir a necessidade de utilização de outros agentes uterotônicos⁶.

Entretanto, é surpreendente que, apesar da utilização rotineira em pacientes obstétricas, a ocitocina ainda é administrada de maneira empírica em cesarianas eletivas. Cada instituição médica, e mesmo cada médico, executa seu próprio regime de infusão, como já foi demonstrado por Wedisinghe et al.⁷,

que relataram a existência de pelo menos 38 regimes diferentes de infusão de ocitocina no Reino Unido, refletindo a necessidade de protocolos mais consistentes e de mais estudos sobre o tema.

Alguns estudos tentaram correlacionar diferentes doses de ocitocina com eficácia clínica, no entanto, não existe até o momento, consenso sobre quais seriam a dose e a velocidade ideais de sua infusão em cesarianas eletivas. Sarna et al.⁸ compararam diferentes doses de ocitocina (5, 10, 15 e 20 UI) administradas por via venosa, mas com a mesma velocidade de infusão (1 UI/min), sugerindo ser desnecessário a utilização de doses superiores à 5 UI de ocitocina, já que todas as doses promoveram contração uterina satisfatória. No entanto, para alguns autores, doses maiores seriam necessárias para prevenir a ocorrência de atonia uterina em cesarianas. Munn et al.⁶, comparando diferentes doses de ocitocina administradas por via venosa com diferentes velocidades de infusão (10 UI em 30 minutos, ou seja, 0,33 UI/min e 80 UI em 30 minutos, ou seja, 2,67 UI/min), demonstraram haver maior necessidade de utilização de outros uterotônicos no grupo em que se utilizou a dose mais baixa (39% e 19%, respectivamente). Deve ser ressaltado que, neste estudo, a cesariana foi indicada para a maioria das pacientes devido à falha na progressão do trabalho de parto, ou seja, não se tratavam de cesarianas eletivas.

Alterações hemodinâmicas, como hipotensão e taquicardia, podem ocorrer principalmente quando a ocitocina é administrada em bolus por via venosa (por exemplo, 5 UI ou 10 UI). Pinder et al.⁹ demonstraram que a administração de 10 UI de ocitocina em bolus provocava diminuição da pressão

arterial média não invasiva após 30 segundos de sua injeção, além de aumento da FC e do DC após 1 minuto com a injeção de 5 UI de ocitocina e, após 2 minutos com a injeção de 10 UI de ocitocina. Estes autores não realizaram expansão volêmica prévia e trataram a hipotensão arterial materna com 30 mg de efedrina diluídas em 1000 mL de solução fisiológica, não mencionando os valores em que as pacientes foram consideradas normo ou hipotensas. Thomas et al.¹⁰ demonstraram que após 35 segundos da injeção de 5 UI de ocitocina em bolus, ocorria diminuição em até 27 mmHg da pressão arterial média invasiva e aumento em até 17 bpm da FC materna em gestantes submetidas à cesariana eletiva. Estes autores realizaram expansão volêmica com 500 mL de solução de Hartmann e trataram a hipotensão com 3 mg de efedrina quando a pressão arterial média diminuía 20% em relação ao valor pré-operatório.

Thomas e Cooper¹¹, em revisão de casos de óbitos maternos relacionados à anestesia, relataram um caso de morte materna após a administração de 10 UI de ocitocina em bolus, solicitada pelo obstetra, em paciente apresentando hipotonia uterina, associada à instabilidade hemodinâmica secundária à hipovolemia e ao bloqueio alto do sistema nervoso autônomo simpático pós-raquianestesia para cesariana. Diante destas evidências, para a segurança da paciente, a ocitocina deve ser administrada como infusão, evitando-se a utilização de bolus.

Os receptores miométriais aumentam de intensidade com o avanço da gestação¹², e a interação da ocitocina com o seu receptor tem grande importância na determinação de sua ação terapêutica. O aumento da dose de

ocitocina para acelerar a progressão do trabalho de parto nem sempre está relacionado com menor perda sanguínea após o parto, provavelmente, por um mecanismo de dessensitização, que é concentração dependente, dos receptores de ocitocina presentes no miométrio¹³⁻¹⁶. De maneira semelhante, a exposição de altas doses de ocitocina após o parto em modelos experimentais, também, poderia levar a esta dessensitização, tornando o miométrio menos responsivo a doses adicionais de ocitocina¹⁶.

Existem poucos trabalhos com dosagens sanguíneas de ocitocina. Estes trabalhos envolvem dosagens sanguíneas de ocitocina em trabalho de parto¹⁷⁻²⁰ utilizando-se a técnica de RIA, ou estudos experimentais para validação da técnica de ELISA para a dosagem de ocitocina em animais^{21,22}.

Ainda mais raros, são os trabalhos envolvendo a farmacocinética da ocitocina. Thornton et al.¹⁸, estudando 10 gestantes durante o trabalho de parto e após 8 a 10 semanas do parto, demonstraram haver aumento do clearance da ocitocina durante a gestação, quando comparado ao período pós-parto. Tal fato ocorreria, provavelmente, pelo aumento da atividade da ocitocinase produzida pela placenta ou, então, por alguma alteração metabólica associada à gravidez. Além disso, o clearance da ocitocina, aparentemente, é independente de sua concentração plasmática, tanto durante a gestação, quanto no pós-parto, o que também foi observado por Perry et al.¹⁷, estudando gestantes em trabalho de parto. Neste estudo, o aumento do ritmo de infusão da ocitocina determinou níveis plasmáticos periféricos de ocitocina maiores, porém, isto não se correlacionou com o grau de contratilidade uterina.

Apesar de não existirem relatos publicados, a dosagem sanguínea de ocitocina em cesarianas eletivas poderia contribuir para guiar sua melhor utilização na prática clínica, já que se trata de uma medicação de uso rotineiro e empírico em pacientes obstétricas e não está desprovida de efeitos colaterais.

OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi dosar a concentração de ocitocina sérica, utilizando-se a técnica de ELISA, após a administração profilática de diferentes regimes de infusão de ocitocina em gestantes submetidas à cesariana eletiva.

MÉTODOS

Após aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo de pesquisa nº 626/04) e do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (CEP-HU/USP, registro: 576/05), foi realizado estudo prospectivo aleatório, envolvendo gestantes saudáveis que se apresentaram para cesariana eletiva, no Centro Obstétrico do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo.

Não foram incluídas as pacientes com antecedentes mórbidos (hipertensão arterial, cardiopatias, asma brônquica, etc), gestação prematura (idade gestacional < 37 semanas), corioamnionite, pacientes em trabalho de parto e as que apresentassem outros fatores de risco para o desenvolvimento de atonia uterina no período pós-parto (por exemplo: hiperdistensão do útero, polidrâmnio, gemelaridade, cinco ou mais cirurgias uterinas prévias e anomalias fetais).

Após a obtenção do termo de consentimento das pacientes, elas foram alocadas em uma lista, utilizando-se um programa de computador (randomization.com) e o estudo foi encoberto para as pacientes e equipe cirúrgica. Imediatamente após o clampeamento do cordão umbilical, foi administrada ocitocina através de bomba de infusão por via intravenosa em seringa contendo volume total de 20 mL de solução que poderia ser:

- G1: 10 UI de ocitocina diluídas em 18 mL de SF e infundidas em 30 minutos (0,33 UI/min);
- G2: 10 UI de ocitocina diluídas em 18 mL SF e infundidas em 3 minutos e 45 segundos (2,67 UI/min);
- G3: 80 UI de ocitocina diluídas em 4 mL de SF e infundidas em 30 minutos (2,67 UI/min).

Todas as seringas foram preparadas pelo mesmo investigador, respeitando-se a sequência da lista previamente criada, e apresentavam a mesma aparência e volume final de solução (20 mL). Como em G2 a infusão da solução se encerrava em aproximadamente 5 minutos, e em G1 e G3 a infusão se encerrava em 30 minutos, a bomba de infusão foi coberta com um pano opaco.

As pacientes foram monitoradas com eletrocardioscópio, aparelho de pressão não invasiva e oximetria de pulso. Foi realizada expansão volêmica com 10 mL/Kg de RL concomitantemente à raquianestesia, que foi executada entre os espaços de L3-L4, utilizando-se 15 mg de bupivacaína hiperbárica a 0,5% e 40 µg de morfina a 0,02%, injetados em aproximadamente 60 segundos com a paciente na posição sentada. Em seguida, as pacientes permaneceram em decúbito dorsal horizontal com deslocamento uterino para a esquerda, através de coxim colocado sob o glúteo direito e com cateter nasal com 1 L/min de oxigênio até o nascimento do bebê. O bloqueio sensitivo foi testado através

da percepção térmica com soro gelado até se atingir o dermatomo de T4, sendo, então, autorizado o início do procedimento cirúrgico.

A monitorização hemodinâmica foi realizada de minuto a minuto, sendo que a pressão arterial controle foi determinada em cada paciente pela média de três medidas da PAS realizadas imediatamente antes da raquianestesia e com a paciente em decúbito lateral esquerdo. Hipotensão materna foi definida como qualquer diminuição da PAS controle, sendo administrados, neste caso, bolus de 0,2 mg de metaraminol a 0,02%; para diminuições superiores a 20% da PAS controle foram feitos bolus de 0,4 mg de metaraminol. No caso de FC menor que 50 bpm, o metaraminol seria substituído pela efedrina (bolus de 5 mg). A avaliação hemodinâmica foi realizada pela comparação da PAS, FC e do consumo de metaraminol, antes e depois do início da infusão da ocitocina

A contratilidade uterina foi avaliada pelo cirurgião assistente através de palpação manual nos tempos 5, 30 e 60 minutos após o início da infusão da ocitocina, e classificada como satisfatória ou não, sendo que neste último caso, seria administrado 0,2 mg de metilergonovina intramuscular. Foi colhido hematócrito da paciente antes da realização da anestesia e 60 minutos após a retirada da placenta. Episódios de náusea ou vômito durante a cesariana foram também registrados.

Seriam excluídas do estudo, as pacientes que apresentassem instabilidade hemodinâmica antes ou após a infusão da ocitocina: 3 episódios seguidos de hipotensão arterial não responsiva ao vasopressor, 3 episódios

seguidos de bradicardia (FC menor 50 bpm) após a administração do metaraminol e que não se corrigisse pela substituição do metaraminol pela efedrina, ou, ainda, 3 episódios seguidos de taquicardia (FC maior que 120 bpm). Seriam também excluídas, as pacientes que apresentassem contratilidade uterina não satisfatória, mesmo após a administração da metilergonovina.

Para as dosagens séricas da ocitocina foram coletadas amostras sanguíneas das pacientes antes da anestesia (tempo 0 – T0) e nos tempos 5 (T5), 30 (T30) e 60 minutos (T60) após o clampeamento do cordão umbilical.

Através de cateter posicionado em veia de antebraço contralateral ao acesso venoso em que a paciente recebia a infusão de ocitocina, foram coletados, em tubo seco, 8 mL de sangue da paciente e acrescentada aprotinina (500 KUI/mL de sangue) como inibidor de protease. Os tubos com as amostras sanguíneas foram mantidos em geladeira (temperatura de 4° C) até a obtenção das 4 amostras (tempo 0, 5, 30 e 60 minutos) de cada paciente, por um período não superior a 2 horas e, em seguida, encaminhados dentro de um frasco de isopor ao laboratório, onde foram centrifugados com 2500 rpm a 4° C por 30 minutos, sendo coletados 1,5 mL do soro através de pipeta calibrada e armazenados em 2 criotubos (cada amostra em duplicata) que foram mantidos em freezer a -70° C.

Figura 1. Criotubos contendo 1,5 mL do soro de uma paciente

Purificação das amostras

Os criotubos contendo as amostras do soro das pacientes foram incubados em ar ambiente (temperatura de 22° C) e submetidos à purificação por cromatografia de afinidade, usando coluna contendo C-18 com o kit de purificação da Península Laboratories LLC – Bachem Group® (San Carlos, Califórnia, Estados Unidos), que já possuía as soluções tampões prontas (A, tampão de lavagem e B, tampão eluente). O processo de purificação das amostras foi feito rigorosamente, conforme protocolo sugerido pelo fabricante do kit e será resumidamente descrito a seguir:

Figura 2. Soluções tampão: A (lavagem) e B (eluição) do kit de purificação

- A coluna de purificação, contendo 200 mg de C-18, foi equilibrada com 1 mL do tampão B (cada 200 mL da solução possuía 60% de acetonitrila e 1% ácido trifluoroacético) e, em seguida, lavada 3 vezes (3 mL cada vez) com o tampão A (cada 500 mL da solução possuía 1% ácido trifluoroacético).
- Adicionou-se 1,4 mL do tampão A ao mesmo volume de soro da amostra da paciente em outro tubo que foi centrifugado com 8500 rpm a 4° C por 20 minutos, e passou-se a solução pela coluna de C-18 previamente tratada.

- Foram feitas novas lavagens da coluna com 3 mL do tampão A por 2 vezes, descartando-se o lavado. O peptídeo na coluna foi lentamente eluído com 3 mL do tampão B, uma única vez, e o eluente foi coletado em um tubo de polipropileno.

Figura 3. Gotejamento do soro purificado em tubo de polipropileno

Finalizada a purificação, a amostra foi submetida à concentração num concentrador a vapor para um volume final de 100 μ L. Essa amostra foi, então, diluída em solução tampão do kit de ELISA para um volume final de 700

μL e centrifugada com 10000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante recolhido e estocado a -70°C até a sua utilização.

Dosagem da ocitocina

A dosagem da ocitocina foi realizada por ELISA utilizando-se o kit da Peninsula Laboratories, LLC – Bachem Group® (San Carlos, California) com placa de 96 poços já sensibilizada, contendo antissoro imobilizado, também, seguindo-se rigorosamente o protocolo (Protocolo IV – vide anexo página 47) fornecido pelo fabricante do kit e que será descrito a seguir:

Figura 4. Kit de ELISA para dosagem da ocitocina

- Em cada poço, foram adicionados 50 μ L da amostra purificada da paciente e 25 μ L do antissoro do kit. A placa foi incubada por uma noite a 4° C.

Figura 5. Microplaca do kit de ELISA

- No dia seguinte, a placa foi incubada por mais uma hora em temperatura ambiente (22° C) e, após isso, adicionadas 25 μ L de ocitocina biotinilada em cada poço da placa, seguindo-se nova incubação por 2 horas em temperatura ambiente.

- Foi realizada lavagem da microplaca com tampão de lavagem do kit por cinco vezes (300 μ L por poço).
- Adicionou-se em cada poço 100 μ L de estreptoavidina conjugada à peroxidase, e a placa foi incubada por uma hora à temperatura ambiente.
- Foi realizada nova lavagem da microplaca e, em seguida, foram adicionadas 100 μ L por poço da solução substrato (TMB). A placa foi incubada por 30 minutos e, em seguida, foi adicionada 100 μ L da solução de parada (2 N HCl). A densidade óptica foi determinada em leitora de ELISA para microplacas, utilizando filtro de 450 nm.

Figura 6. Leitor da microplaca de ELISA

O protocolo do kit de ELISA sugeria 6 ou 10 pontos para a obtenção da curva padrão que é necessária para a obtenção das dosagens. Os padrões e as amostras eram em duplicata e dois poços brancos (sem amostra) foram incluídos para determinações de resgate. Desta forma, cada placa acomodaria 37 ou 41 amostras em duplicata, respectivamente. Como em cada tempo estudado (0, 5, 30 e 60 minutos) foi colhido uma amostra sanguínea em duplicata (total de 8 amostras), cada kit possibilitaria o estudo de até 5 pacientes.

A concentração sérica de ocitocina foi considerada como sendo o desfecho primário. Uma amostragem de 27 pacientes (9 por grupo) foi estimada para detectar uma diferença de 5 ng/mL nos níveis séricos de ocitocina aos 30 minutos entre a hipótese nula (média = 6 ng/mL) e a hipótese alternativa (média = 1 ng/mL) com um desvio padrão estimado de 3,5 ng/mL (α bicaudal = 0,05 e poder = 80%) usando teste t de Student para duas amostras independentes. A PAS e o consumo de metaraminol (ambos, antes e depois da infusão de ocitocina) foram considerados como sendo os desfechos secundários.

Os dados obtidos foram analisados usando o programa estatístico SPSS (Statistical Package for Social Sciences Inc., Chicago, IL, USA) versão 15,0 com ANOVA (dados demográficos, PAS, FC, número de cirurgias prévias, Ht e consumo de metaraminol) ou teste do Qui-quadrado (náusea). Um valor de probabilidade (p) menor que 0,05 foi considerado como significativo. As dosagens de ocitocina foram, também, analisadas com ANOVA com correção de

Brown-Forsythe, comparando os grupos 2 a 2 no caso de $p < 0,05$ com correção de Games-Howell.

RESULTADOS

Trinta gestantes foram consideradas elegíveis para participar do estudo, e após obtenção do termo de consentimento, elas foram incluídas no estudo, seguindo-se a sequência da lista de randomização que foi previamente criada. Todas as pacientes concluíram o estudo, não havendo violação do protocolo.

Os três grupos foram semelhantes em relação às variáveis demográficas, no número de cirurgias uterinas prévias e nos valores hemodinâmicos controles (PAS e FC) (Tabela 1). Os grupos também foram semelhantes em relação à PAS, FC e consumo de metaraminol antes e após 5 e 10 minutos do início da infusão da ocitocina (Tabela 2). Em 2 pacientes (uma de G2 e outra de G3), houve a necessidade de substituir o metaraminol pela efedrina devido à $FC < 50$ bpm, que ocorreu, em ambos os casos, antes do início da infusão da ocitocina. Não houve diferença entre os valores do hematócrito coletado antes da anestesia e após 60 minutos da extração placentária (Tabela 2).

Após a infusão de ocitocina, houve uma paciente em cada grupo (11%, 9%, 10% respectivamente, $p = 0,99$) que referiu náusea e não houve episódios de vômitos em nenhum dos grupos estudados. A contratilidade uterina foi considerada satisfatória pelo cirurgião em todos os casos, não havendo necessidade de utilização de uterotônico complementar.

A média das duplicatas da ocitocina sérica foram semelhantes em T0 ($p = 0,76$) e em T60 ($p = 0,58$), porém diferentes em T5 ($p = 0,01$) e em T30 ($p < 0,01$). Fazendo-se a correção de Brown-Forsythe e Games-Howel (comparando-se 2 a 2) nestes tempos, observou-se que em T5, as concentrações de ocitocina sérica de G3 foram maiores que G1 ($p < 0,01$). Em T30, as concentrações de ocitocina sérica de G3 foram maiores que G1 ($p < 0,01$) e, também, que G2 ($p < 0,01$) (Tabela 3). A representação gráfica dos valores da ocitocina durante os momentos estudados está ilustrada na Figura 1.

Tabela 1 – Dados demográficos, número de cirurgias uterinas prévias e parâmetros hemodinâmicos controles

	G1	G2	G3	p
	(n = 9)	(n = 11)	(n = 10)	
Idade (anos)	27 ± 5,1	30 ± 5,8	27 ± 4,2	0,37
Peso (Kg)	73 ± 13	79 ± 19	72 ± 10	0,49
Altura (m)	1,60 ± 0,07	1,59 ± 0,08	1,57 ± 0,05	0,53
Cirurgias uterinas prévias	2 (0 – 3)	1 (0 – 3)	1,5 (0 – 4)	0,41
PAS (mmHg)	123 ± 8	117 ± 11	121 ± 16	0,54
FC (bpm)	89 ± 13	83 ± 13	83 ± 13	0,48

Valores expressos em média ± desvio padrão

Os dados de cirurgias uterinas prévias estão expressos em mediana com a variação entre parênteses

Tabela 2 – PAS, FC, consumo de metaraminol e Ht antes e depois da infusão da ocitocina

	G1	G2	G3	p
	(n = 9)	(n = 11)	(n = 10)	
<i>Antes da ocitocina</i>				
PAS (mmHg)	117 ± 18	117 ± 10	112 ± 19	0,79
FC (bpm)	88 ± 16	90 ± 28	90 ± 26	0,96
Metaraminol (mg)	1,93 ± 0,67	1,60 ± 0,87	1,96 ± 0,99	0,79
<i>Depois da ocitocina</i>				
PAS 5' (mmHg)	115 ± 6	114 ± 12	108 ± 11	0,28
FC 5' (bpm)	80 ± 7	80 ± 17	77 ± 13	0,86
Metaraminol 5' (mg)	0,71 ± 0,23	0,62 ± 0,36	0,73 ± 0,30	0,28
PAS 10' (mmHg)	116 ± 7	115 ± 8	113 ± 15	0,80
FC 10' (bpm)	70 ± 6	73 ± 13	73 ± 8	0,74
Metaraminol 10' (mg)	0,73 ± 0,40	0,44 ± 0,26	0,67 ± 0,39	0,80
Ht 0' (%)	38,4 ± 4,3	37,1 ± 2,3	36,8 ± 3,2	0,54
Ht 60' (%)	36,4 ± 4,7	35,5 ± 2,9	35,9 ± 2,7	0,86

Valores expressos em média ± desvio padrão

PAS 5' e FC 5': média dos valores de pressão arterial sistólica e frequência cardíaca, respectivamente, nos primeiros 5 minutos do início da infusão da ocitocina

PAS 10' e FC 10': média dos valores de pressão arterial sistólica e frequência cardíaca, respectivamente, do sexto ao décimo minuto após o início da infusão da ocitocina

Metaraminol 5': média do consumo de metaraminol nos primeiros 5 minutos do início da infusão da ocitocina

Metaraminol 10': média do consumo de metaraminol do sexto ao décimo minuto após o início da infusão da ocitocina

Ht 0': média dos valores do hematócrito coletado antes do início da cirurgia

Ht 60': média dos valores do hematócrito coletado após 60 minutos da extração placentária

Tabela 3 - Concentração sérica de ocitocina (ng/mL)

Momento	G1 (n = 9)	G2 (n = 11)	G3 (n = 10)	p
T0	0,062 ± 0,021	0,039 ± 0,019	0,067 ± 0,041	0,76
T5	0,709 ± 0,268	1,975 ± 0,652	3,651 ± 0,741	0,01*
T30	1,174 ± 0,375	0,411 ± 0,206	6,190 ± 1,195	< 0,01**
T60	0,648 ± 0,257	0,356 ± 0,257	0,683 ± 0,257	0,58

Valores expressos em média ± erro padrão

T0: antes da administração da ocitocina

T5, T30 e T60: 5, 30 e 60 minutos após o início da administração da ocitocina

* e ** p < 0,05, fazendo-se a correção de Brown-Forsythe e Games-Howell:

*G1 e G3 (p < 0,01), G1 e G2 (p = 0,47), G2 e G3 (p = 0,17)

**G1 e G3 (p < 0,01), G2 e G3 (p < 0,01), G1 e G2 (p = 1)

Figura 7. Concentração sérica de ocitocina por ELISA

Valores expressos em média $\pm$ erro padrão

T0: antes da administração da ocitocina

T5, T30 e T60: 5, 30 e 60 minutos após o início da administração da ocitocina

DISCUSSÃO

Neste estudo, foram realizadas dosagens séricas de ocitocina por ELISA em gestantes submetidas à cesariana eletiva com diferentes regimes de infusão de ocitocina exógena, administrada após o clampeamento do cordão umbilical. Até o presente momento, não existia relato na literatura sobre este tipo de dosagem, havendo apenas dosagem de ocitocina por RIA em gestantes em trabalho de parto¹⁷⁻²⁰ ou dosagem de ocitocina por ELISA em animais^{21,22}. A técnica de ELISA apresenta boa correlação com as técnicas de RIA publicadas, validando a metodologia utilizada neste estudo, além de apresentar a vantagem de se manipular material não-radiativo²².

Optamos por estudar gestantes que não estavam em trabalho de parto e que não receberam ocitocina antes do pinçamento do cordão umbilical, pois, desta maneira, todas as pacientes apresentariam concentrações semelhantes de ocitocina ao início do estudo, o que foi confirmado com as concentrações de ocitocina observadas e que só puderam ser obtidas devido à alta sensibilidade do método de ELISA utilizado, que era capaz de detectar concentrações de ocitocina de 0 a 500 ng/mL.

O manuseio de peptídeos, como a ocitocina, requer cuidados especiais, principalmente, porque eles devem ser armazenados sob refrigeração (- 70° C) para evitar sua degradação pelas aminopeptidases e pela sua baixa estabilidade molecular em ar ambiente. Neste estudo, para a obtenção de

dosagens de ocitocina mais precisas, foi realizada purificação prévia das amostras, eliminando, assim, substâncias potencialmente interferentes, como a albumina, por exemplo. Durante toda esta etapa de purificação das amostras, procuramos seguir rigorosamente as orientações fornecidas pelo fabricante do kit utilizado, pois como em toda técnica de purificação, a recuperação da substância desejada (ocitocina) pode ser incompleta, por isso, a otimização deste procedimento deve ser mandatória.

Observamos que após 5 minutos do início da infusão da ocitocina exógena, G1 apresentou concentrações séricas de ocitocina menores que G3, pois, tanto a dose quanto a velocidade de infusão administradas em G1 foram menores que G3. Interessante notar que, neste instante, G1 apresentou concentrações de ocitocina semelhantes a G2, mesmo com velocidades de infusão diferentes (8 vezes maior em G2), que pode ter ocorrido pela ação das aminopeptidases maternas. Após 30 minutos, as concentrações de ocitocina de G3 foram maiores que G1 e G2, mas, deve ser lembrado que a infusão de ocitocina foi completada após aproximadamente 5 minutos do início de sua administração em G2. Então, G2 apresentou concentrações de ocitocina menores que G3, mesmo utilizando-se a mesma velocidade de infusão que G3, provavelmente por ação das aminopeptidases maternas, já que a meia-vida da ocitocina é de aproximadamente 15 minutos²³. O mesmo pode ser dito, após 60 minutos do início da infusão da ocitocina, quando os 3 grupos apresentaram concentrações de ocitocina semelhantes, pois, neste momento, a infusão da

ocitocina já havia se completado há pelo menos 30 minutos em todas as pacientes estudadas.

Em G1 e G2, optamos por utilizar a dose de 10 UI de ocitocina, pois é a dose administrada em nosso serviço e, também, por ser a dose habitual na maioria dos trabalhos recentemente publicados^{6,8,9,24}. No outro extremo, optamos por trabalhar com uma dose de ocitocina (80 UI) considerada alta, mas segura para as pacientes, conforme demonstrado por Munn et al.⁶ Em um estudo randomizado e duplamente encoberto, eles observaram redução da necessidade de utilização de agentes uterotônicos adicionais à ocitocina, utilizando-se 80 UI de ocitocina administradas numa velocidade de 2,67 UI/min, quando comparado à dose 10 UI infundidas em 0,33 UI/min, em pacientes que evoluíram para cesariana após distócia em trabalho de parto. Embora, este estudo não tenha poder para estabelecer este tipo de associação, não foi observada a necessidade de outro agente uterotônico no grupo em que foi utilizado 10 UI de ocitocina a 0,33 UI/min.

Em modelos experimentais, a utilização de altas doses de ocitocina no período pós-parto poderia levar a um mecanismo agudo de dessensitização dos seus receptores, tornando o miométrio menos responsivo a doses suplementares de ocitocina¹⁶. Em situações nas quais a ocitocina não está sendo clinicamente satisfatória, a utilização de outros agentes uterotônicos, como a metilergonovina e as prostaglandinas, deve ser considerada, evitando-se o risco do desenvolvimento de efeitos colaterais maternos, decorrentes do uso de altas doses de ocitocina²⁵.

A grande limitação deste estudo é o fato dele não ter poder para correlacionar níveis séricos de ocitocina com eficácia clínica. Dentro deste contexto, seria aparentemente desnecessária a utilização de dose ou velocidade de infusão de ocitocina que fossem superiores às do grupo 1 (10 UI infundidas em 30 minutos, ou seja, 0,33 UI/min), em que todas as pacientes apresentaram contratilidade uterina satisfatória, sem efeitos colaterais significativos, além de concentrações séricas de ocitocina mais lineares por um período mais longo. Existe uma carência na literatura médica deste tipo de correlação, além de não haver trabalhos envolvendo dosagem de ocitocina em cesarianas eletivas. Aparentemente, os níveis plasmáticos periféricos de ocitocina não refletem o grau de contratilidade uterina, já que Perry et al.¹⁷ não observaram correlação entre os níveis de ocitocina dosados por RIA e a sua depuração em gestantes em trabalho de parto.

Outra limitação, é que foram incluídas, neste trabalho, somente pacientes que se apresentaram para cesariana eletiva e que, em teoria, não apresentariam fatores de risco para o desenvolvimento de atonia uterina após o parto. Em recente estudo, King et al.²⁶, demonstraram que a utilização de 5 UI de ocitocina em bolus, administrada previamente à infusão de ocitocina (40 UI diluídas em 500 mL de SF por 30 minutos e, em seguida, 20 UI diluídas em 1 L de SF por 8 horas) não alteraria a necessidade de administração de outro agente uterotônico, nas primeiras 24 horas após o parto em gestantes submetidas à cesariana eletiva e que apresentassem, pelo menos, um fator de risco para o desenvolvimento de atonia uterina.

Na prática clínica, observa-se que, em muitas vezes, a ocitocina é administrada baseada na experiência individual o que pode resultar, a princípio, em doses desnecessariamente altas de ocitocina. Em recente editorial, Tsen e Balki²⁷, discutiram a necessidade de mais estudos sobre o tema e do desenvolvimento de protocolos mais consistentes para a utilização da ocitocina, já que o método de sua utilização pode levar a efeitos colaterais maternos, principalmente cardiovasculares, significativos.

Métodos invasivos para a monitorização hemodinâmica têm sido aplicados em alguns estudos na tentativa da melhor compreensão da dinâmica materna durante a cesariana. Auler Jr et al.²⁸, utilizando um analisador contínuo da onda de pulso arterial (FloTrac/VigileoTM), demonstraram haver um aumento significativo da FC e diminuição do VS após raquianestesia em cesarianas. Estes autores não observaram alterações no DC após a administração de ocitocina (2 UI diluídas em 10 mL de solução fisiológica e infundidas em 60 segundos). Por outro, Dyer et al.²⁹, observaram aumento do DC após a administração de ocitocina (2,5 UI diluídas em 10 mL de água infundidas em 30 segundos), utilizando dois tipos independentes de monitorização: bioimpedância transtorácica (BioZ) e analisador da onda de pulso radial (LiDCOplus). Estes autores, também demonstraram que a coadministração de ocitocina com um vasopressor pode atenuar os efeitos cardiovasculares secundários à infusão de ocitocina. Desta forma, a utilização de 80 µg de fenilefrina atenuaria a

diminuição da resistência vascular sistêmica induzida pela ocitocina, bem como, o aumento da FC e do DC.

A PAS, FC e o consumo de metaraminol foram semelhantes entre os grupos neste estudo. Após o início da infusão da ocitocina, optamos por agrupar estes parâmetros hemodinâmicos nos primeiros 10 minutos (dividindo a cada 5 minutos) por serem os momentos mais críticos para a ocorrência de possíveis alterações hemodinâmicas, como foi demonstrado por alguns autores nos estudos mais recentes envolvendo o uso da ocitocina, em que o foco principal foi a repercussão hemodinâmica de sua administração^{9,10}. Utilizando-se a monitorização habitual para cesarianas eletivas, nossa opção foi pelo tratamento preventivo da hipotensão arterial materna e, para isso, a principal intervenção foi a utilização de bolus de 0,2 mg de metaraminol para o tratamento de qualquer diminuição da PAS de cada paciente.

Após aproximadamente 60 anos de sua síntese, o uso da ocitocina representa um grande avanço da medicina em pacientes obstétricas. Apesar de ser a droga de primeira escolha na prevenção e tratamento da atonia uterina em cesarianas eletivas, não existe consenso, até o momento, sobre a dose e a velocidade ideais de sua utilização, resultando numa grande variabilidade de infusões, baseadas, principalmente, na experiência prática de cada profissional. A administração de altas doses em bolus deve ser desencorajada, especialmente pelos seus efeitos no sistema cardiovascular. Outros estudos correlacionando doses e velocidades de infusão com dosagens sanguíneas de ocitocina, bem como, sua relação com seu receptor no miométrio devem ser

desenvolvidos para sua melhor utilização na prática clínica, aumentando-se a eficácia terapêutica e a segurança para a paciente.

CONCLUSÕES

Neste estudo, foram realizadas dosagens séricas de ocitocina por ELISA em gestantes saudáveis submetidas à cesariana eletiva após diferentes doses e velocidades de infusão de ocitocina profilática realizadas na prática clínica.

A administração de 80 UI de ocitocina em 30 minutos (2,67 UI/min) resulta em níveis séricos de ocitocina maiores que os outros dois métodos de administração aos 5 e 30 minutos, porém, as concentrações de ocitocina entre os grupos não diferem aos 60 minutos.

ANEXOS

Anexo 1. Planilha com as dosagens de ocitocina (ng/mL)

Paciente	Grupo	Ocitocina 0	Ocitocina 0'	Ocitocina 5	Ocitocina 5'	Ocitocina 30	Ocitocina 30'	Ocitocina 60	Ocitocina 60'
1	1	1,29E-01	1,46E-01	1,01E+00	1,07E+00	7,55E-01	6,90E-01	1,19E+00	1,66E+00
2	1	3,50E-01	0,00E+00	2,81E+00	2,24E+00	2,14E+00	2,27E+00	3,83E-01	3,83E-01
3	1	4,57E-02	8,06E-03	3,30E-01	2,83E-01	2,14E+00	2,45E+00	1,71E+00	1,07E+00
4	1	9,57E-02	1,13E-01	1,15E+00	1,08E+00	2,94E+00	3,21E+00	2,60E+00	1,53E+00
5	1	6,12E-02	5,34E-02	5,54E-01	6,74E-01	6,16E-01	5,97E-01	1,97E-01	2,16E-01
6	1	2,97E-05	1,42E-06	3,17E-02	7,69E-02	1,17E-05	2,67E-06	6,76E-06	2,40E-05
7	1	7,13E-02	5,76E-02	9,14E-01	5,45E-01	1,46E+00	1,40E+00	3,79E-01	3,56E-01
8	1	1,37E-05	1,02E-05	8,27E-04	5,21E-03	1,31E-01	2,35E-01	1,62E-05	1,31E-05
9	1	1,21E-06	1,84E-06	4,60E-03	3,16E-03	8,60E-02	2,45E-02	3,59E-05	2,68E-05
10	2	5,90E-02	4,64E-02	4,76E+00	6,24E+00	1,65E-01	2,71E-01	1,39E-01	1,86E-01
11	2	9,90E-06	3,67E-05	1,13E-01	3,24E-01	5,72E-04	5,26E-04	7,21E-05	6,09E-05
12	2	9,01E-02	2,10E-01	2,76E+00	2,89E+00	3,55E-01	4,13E-01	7,33E-01	5,42E-01
13	2	1,61E-06	2,91E-06	2,73E-01	9,50E-02	1,51E-03	1,58E-03	1,25E-04	4,62E-06
14	2	1,61E-06	2,91E-06	2,73E-01	9,50E-02	1,51E-03	1,58E-03	1,25E-04	4,63E-06
15	2	1,16E-01	1,86E-01	5,48E+00	4,57E+00	1,36E+00	9,56E-01	2,17E+00	3,27E+00
16	2	2,97E-05	1,42E-06	3,17E-02	7,69E-02	1,17E-05	2,67E-06	6,77E-06	2,40E-05
17	2	7,85E-05	2,07E-04	1,54E+00	2,91E+00	1,83E+00	2,46E+00	3,30E-04	4,35E-03
18	2	6,74E-07	7,03E-07	2,66E-01	7,90E-01	2,46E-05	1,49E-04	1,36E-01	3,72E-01
19	2	3,91E-06	9,80E-06	4,99E-01	3,72E-01	2,26E-04	1,55E-04	4,06E-04	1,62E-03
20	2	1,03E-01	6,92E-02	4,93E+00	4,17E+00	2,75E-01	9,56E-01	1,43E-01	1,43E-01
21	3	5,90E-02	1,16E-01	3,52E+00	4,15E+00	4,15E+00	4,09E+00	9,47E-01	1,36E+00
22	3	2,16E-06	8,90E-07	3,31E+00	3,45E+00	9,92E+00	1,45E+01	9,91E-02	1,99E-02
23	3	2,16E-06	8,91E-07	3,31E+00	3,45E+00	9,92E+00	1,45E+01	9,91E-02	1,99E-02
24	3	2,67E-01	1,85E-02	6,15E+00	6,63E+00	8,83E+00	7,59E+00	1,10E-01	3,31E+00
25	3	5,45E-01	2,75E-01	8,51E+00	8,51E+00	2,68E+00	1,10E+01	1,63E+00	1,24E+00
26	3	3,55E-02	3,19E-02	5,32E+00	3,22E+00	5,65E+00	5,24E+00	2,17E+00	1,40E+00
27	3	7,85E-05	2,07E-04	1,54E+00	2,91E+00	1,83E+00	2,46E+00	3,30E-04	4,35E-03
28	3	3,60E-07	1,62E-05	8,24E-01	2,07E-01	3,28E+00	1,31E+00	7,60E-03	1,62E-03
29	3	9,02E-06	4,81E-06	1,90E+00	1,20E+00	3,14E+00	1,48E+00	8,26E-03	2,78E-02
30	3	4,43E-06	5,48E-09	3,01E+00	1,90E+00	2,89E+00	9,33E+00	2,89E-01	9,34E-01

Valores em duplicata expressos em exponencial

Anexo 2. Protocolo do kit de dosagem da ocitocina por ELISA

**PENINSULA LABORATORIES, LLC
A MEMBER OF THE BACHEM GROUP**

**GENERAL PROTOCOL
FOR
Peptide Enzyme Immunoassay (EIA)**

CAUTION: INVESTIGATIONAL DEVICE
LIMITED BY FEDERAL LAW TO INVESTIGATIONAL USE

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES

305 OLD COUNTY RD. SAN CARLOS, CA 94070
TEL: (650) 592-5392 (800) 922-1516 FAX: (650) 595-4071

EIA KITS - BASIC NOTIONS AND FACTS

Our **EIA** kits are competitive immunoassays whose working principle can be diagrammed as follows:

The **antiserum** is immobilized on a 96-well plate. A constant concentration of **Bt-tracer** (biotinylated tracer) and varying concentrations of unlabeled standard or sample peptide compete for binding specifically to the antiserum. Captured Bt-tracer is subsequently bound by **SA-HRP** (streptavidin-conjugated horseradish peroxidase), which produces a soluble colored product after **TMB** (3,3',5,5'-tetramethyl benzidine dihydrochloride) is added.

The **sequence of the standard** peptide is shown on the datasheet. It is also in our catalog and on our web site (www.BACHEM.com) as the "**antigen sequence**" (note that large protein sequences are usually not shown).

The standard is used to make a **standard curve** in the **range** specified in the kit's **datasheet**. Standard curves are **S-shaped** (on a **semi-log plot**) but for a few kits they appear to be almost linear over the kit's range. The **measuring range** is the range of standard concentrations near the middle or near the **IC₅₀** of the standard curve. Typical standard curves for most kits are printed in our catalog but can also be obtained via e-mail (immunology@usbachem.com). Unknown sample concentrations are measured by comparing their absorbance with the standard curve.

We include sufficient reagents for **96 determinations**, enabling the generation of **duplicate six- or ten-point standard curves** and the analysis of up to **41 samples in duplicate**.

VARIATION • ACCURACY • EXTRACTION • CROSSREACTIVITY

The kit's IC_{50} , or the shape of the standard curve, may show some variation but this will not affect the kit's accuracy in the measuring range. The kit accurately measures sample peptides if the following conditions are met.

A) The kit's antiserum must not cross-react appreciably with other factors present in the sample. Cross-reactivity tables are included with each kit. The user may wish to test the cross-reactivity with other peptides, some of which may be available from our catalog.

B) The sample peptides must be identical to the kit's standard. Ideally the kit's synthetic standard mimics the natural peptide perfectly. Sometimes, however, natural peptides exist as families of species related by a common or similar sequence. In addition, natural peptides may be enzymatically or spontaneously modified, may exist in complexes, and may assume alternative structural forms. In these cases the kit might not measure the exact concentration of a particular natural peptide species, but, it may still be used for relative average measurements.

C) Serum samples must be extracted. Factors present in serum can bind to kit components and affect the measurements. Thus, it is advisable to extract peptides from serum before measuring them. Extraction may not be as important if the sample is diluted before measuring or if it is in tissue culture medium, but, in general, one may expect low sensitivity or high background problems if extraction is not used. Some antigens can be measured directly in un-extracted serum. If so, a specially formulated **extraction-free** kit may be available in our catalog or as a custom product, which can be used without extraction for human or rat serum.

D) Both samples and standards must be measured under the same conditions.

TECHNICAL HELP and ORDERING INFORMATION

Please e-mail **technical questions** to immunology@usbachem.com

For additional kits or listings of our most current catalog products, please visit our web site at www.bachem.com or call us at:

Tel: (800) 922-1516 (for U.S. and Canada)

(650) 592-5392 (for International)

Fax: (650) 595-4071

SAFETY PRECAUTIONS

The physical and chemical properties of the reagents contained in this kit have been tested individually. Reagents do not contain ingredients which have been determined to be health hazards and which comprise greater than 1% of the mixture or which could be released from the mixture in concentrations that would exceed OSHA permissible exposure limits.

Hazardous Ingredients

The standard is supplied in lyophilized form. The lyophilized antiserum contains Tween-20 and thimerosal. The EIA buffer concentrate contains Tris and thimerosal. The buffer is in liquid form. The SA-HRP contains 0.01% methylisothiazolone, 0.01% bromonitrodioxane, and 10 ppm Proclin 300 as a preservative.

Physical and Chemical Data

Components are stable in closed containers under normal temperatures and pressures. No hazardous polymerization is known.

Fire and Explosion Data

Components are non-combustible with negligible fire hazard when exposed to heat or flame. Fire fighting media should be appropriate to burning material.

Health Hazards

Components may be harmful by inhalation, ingestion, or skin absorption and may cause skin irritation or eye irritation. In case of eye contact, flush eye with water and contact a physician. In case of skin contact, wash skin with soap and water.

Reactivity Data

Components are stable in closed containers under normal temperatures and pressures.

Spill and Disposal Procedures

For spills, ventilate area and wash spill site. For disposal, please dispose in accordance with local regulations.

Handling and Storage Information

Safety glasses, gloves, and a full-length lab coat should be worn to prevent unnecessary contact.

The above information is believed to be correct but does not purport to be all-inclusive and shall be used only as a guide. It is the user's responsibility to determine the suitability of this information for the adoption of safety precautions as may be necessary. Peninsula Laboratories, LLC shall not be held liable for any damage resulting from the handling or use of the above product.

GUARANTEE AND LIMITATION OF REMEDY

PENINSULA LABORATORIES, LLC makes no guarantee of any kind, expressed or implied, which extends beyond the description of the material in this kit, except that these materials and this kit will meet our specifications at the time of delivery. The customer's remedy and PENINSULA LABORATORIES, LLC's sole liability hereunder are limited at PENINSULA LABORATORIES, LLC's option to refund the purchase price or the replacement of material that does not meet our specifications. By the acceptance of our products, the customer indemnifies and holds PENINSULA LABORATORIES, LLC harmless against, and assumes all liability for the consequences of its use or misuse by the customer, its employees or others.

STORAGE

When you receive the kit, store the lyophilized components at a constant -20 °C for up to one year from the kit's assembly date. The remaining components should be stored in the refrigerator (2-4 °C) also up to 1 year. Long term storage, improper storage conditions and large temperature fluctuation cycles may result in the accumulation of precipitates in the TMB solution and in the EIA buffer concentrate. These precipitates should not affect the assay noticeably. Nevertheless, if you observe such precipitates, we recommend that you avoid them by allowing them to sink to the bottom.

MATERIALS PROVIDED

- EIA buffer concentrate (50 ml 20 X concentrate).
- One 96-well immunoplate with acetate plate sealer.
- One vial of peptide antibody (lyophilized powder).
- One vial of peptide standard (1 µg lyophilized powder).
- One vial of biotinylated peptide (lyophilized powder).
- Streptavidin-HRP concentrate (100 µl 200 X concentrate).
- Substrate solution (11 ml of TMB and H₂O₂).
- 2 N HCl (15 ml)
- **One vial standard diluent (peptide-free rat or human serum) for extraction-free kits only (8 ml)**

MATERIALS NOT PROVIDED

- SEP-COLUMN containing 200 mg of C18 Cat No. Y-1000
- Extraction kit Cat No S-5000 for 50 samples with buffers
- 96-well microtiter plate reader set up to measure 450 nm.
- 96-well plate washer and shaker (**optional**)
- Sterile deionized or USP water
- Curve fitting software (**optional**)
- Test tubes, pipettes and various other standard laboratory items

ASSAY PROTOCOL

Reagents, samples, and the plate should be brought to room temperature before use. Shakers (optional) may help lower the experimental variation of duplicates (recommended at 60 rpm).

I - LAYOUT

Design the plate layout. *The following layouts are suggested for either 6-point or 10-point standard curves. The standards and the samples are duplicated, and two blank wells are included for background determinations. These layouts accommodate 37 and 41 duplicate samples, respectively.*

Six-Point Standard Curve Layout

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk	Blk	U2	U2	U10	U10	U18	U18	U26	U26	U34	U34
B	S1	S1	U3	U3	U11	U11	U19	U19	U27	U27	U35	U35
C	S2	S2	U4	U4	U12	U12	U20	U20	U28	U28	U36	U36
D	S3	S3	U5	U5	U13	U13	U21	U21	U29	U29	U37	U37
E	S4	S4	U6	U6	U14	U14	U22	U22	U30	U30	U38	U38
F	S5	S5	U7	U7	U15	U15	U23	U23	U31	U31	U39	U39
G	S0	S0	U8	U8	U16	U16	U24	U24	U32	U32	U40	U40
H	U1	U1	U9	U9	U17	U17	U25	U25	U33	U33	U41	U41

Ten-Point Standard Curve Layout

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk	Blk	S8	S8	U6	U6	U14	U14	U22	U22	U30	U30
B	S1	S1	S9	S9	U7	U7	U15	U15	U23	U23	U31	U31
C	S2	S2	S0	S0	U8	U8	U16	U16	U24	U24	U32	U32
D	S3	S3	U1	U1	U9	U9	U17	U17	U25	U25	U33	U33
E	S4	S4	U2	U2	U10	U10	U18	U18	U26	U26	U34	U34
F	S5	S5	U3	U3	U11	U11	U19	U19	U27	U27	U35	U35
G	S6	S6	U4	U4	U12	U12	U20	U20	U28	U28	U36	U36
H	S7	S7	U5	U5	U13	U13	U21	U21	U29	U29	U37	U37

Blk = blank S = standards U = unknown samples

II - PREPARE SAMPLES

1- Sample extraction. *Sample extraction is recommended especially for serum samples. It may not be as important for some tissue culture samples. See "Suggested Protocol for Sample Extraction" below for details. The kit may still be used without extraction but this may cause unexpected results due to the possible binding between serum proteins and kit components.*

If you purchased an Extraction-Free Kit you may use it for the measurement of human or rat serum or plasma (according to its designation) without performing an extraction.

2 - Sample concentration. *The concentration of the target molecule must be within the measuring range of the kit (in a region around the IC_{50}). If you cannot estimate the concentration range of your sample*

you can prepare it at different concentrations such that one of the samples may be within the measuring range.

III - PREPARE KIT COMPONENTS

Lyophilized kit components should not be re-hydrated until they are needed. In particular, the standard and the tracer may not be needed until after an incubation step. Please check the appropriate protocol.

1 - Equilibrate unopened kit components to room temperature. *Do not open reagents and immunoplate while they are cold. Equilibrate at room temperature before opening to avoid accumulation of moisture.*

2 - Prepare the EIA buffer. *Dilute the EIA buffer concentrate to 1,000 ml with sterile deionized or USP pure water (18 MOhm) and mix well.*

3 - Reconstitute the standard. ***In protocol V the standard is used after an 1-hour incubation with antiserum .*** *Add 1 ml of standard diluent buffer to the vial of lyophilized standard peptide (1 µg) and vortex. If samples are to be extracted and re-suspended in EIA buffer as described below, use EIA buffer as a diluent. Otherwise, we encourage customers to use their own diluent such that standards and samples will be treated equally. For extraction-free kits we provide peptide-free rat or human serum as a diluent, but again, customers should use their own sample diluent provided it does not bind appreciably to the antiserum.*

4 - Reconstitute the antiserum. *Add 5 ml of EIA buffer and vortex.*

5 - Reconstitute the Bt-tracer. ***Please check the appropriate protocol and reconstitute just before it is needed.*** *Add 5 ml of EIA buffer to the vial of lyophilized biotinylated peptide and vortex.*

6 - Prepare the standards. *Make serial dilutions of the standard to cover the range of this kit. The following tables may be useful to help you prepare either a 6-point or a 10-point standard curve (more precision).*

	0 - 5 ng/ml			0 - 10 ng/ml			0 - 25 ng/ml			0 - 100 ng/ml			0 - 500 ng/ml		
	μl	of	μl/dil	μl	of	μl/dil	μl	of	μl/dil	μl	of	μl/dil	μl	of	μl/dil
stock	-----	-----	1000	-----	-----	1000	-----	-----	1000	-----	-----	1000	-----	-----	1000
S1	5	stock	995	5	10	stock	990	10	25	stock	975	25	50	stock	450
S2	500	S1	500	2.5	500	S1	500	5	500	S1	500	12.5	200	S1	200
S3	500	S2	500	1.25	500	S2	500	2.5	500	S2	500	6.25	200	S2	200
S4	500	S3	500	0.625	500	S3	500	1.25	500	S3	500	3.13	200	S3	200
S5	500	S4	500	0.313	500	S4	500	0.625	500	S4	500	1.563	200	S4	200
S6	500	S5	500	0.156	500	S5	500	0.313	500	S5	500	0.781	200	S5	200
S7	500	S6	500	0.078	500	S6	500	0.156	500	S6	500	0.391	200	S6	200
S8	500	S7	500	0.039	500	S7	500	0.078	500	S7	500	0.195	200	S7	200
S9	500	S8	500	0.02	500	S8	500	0.039	500	S8	500	0.098	200	S8	200
S0	-----	-----	500	0	-----	500	0	-----	500	0	-----	500	-----	-----	0

	0 - 5 ng/ml			0 - 10 ng/ml			0 - 25 ng/ml			0 - 100 ng/ml			0 - 500 ng/ml		
	μl	of	μl/dil	μl	of	μl/dil	μl	of	μl/dil	μl	of	μl/dil	μl	of	μl/dil
stock	-----	-----	1000	-----	-----	1000	-----	-----	1000	-----	-----	1000	-----	-----	1000
S1	5	stock	995	5	10	stock	990	10	25	stock	975	25	50	stock	450
S2	200	S1	800	1	200	S1	800	2	200	S1	800	5	100	S1	400
S3	200	S2	800	0.2	200	S2	800	0.4	200	S2	800	1	100	S2	400
S4	200	S3	800	0.04	200	S3	800	0.08	200	S3	800	0.2	100	S3	400
S5	200	S4	800	0.008	200	S4	800	0.016	200	S4	800	0.04	100	S4	400
S0	-----	-----	800	0	-----	800	0	-----	800	0	-----	800	-----	-----	0

IV - ASSAY

There are six different protocols: I, II, III, IV, V, and VI.
Please check the datasheet enclosed with the kit and choose the appropriate protocol.

PROTOCOL I (Std.Ab.Bt)

1 - Into each well of the immunoplate add

50 μ l standard or sample

25 μ l antiserum

25 μ l Bt-tracer

Add only buffer to the blank wells (these will give you the background to be subtracted from all readings). These should not be confused with the "SO Standards" which contain no standard peptide and which will yield the highest OD readings.

2 - Incubate at room temperature for 2 hours.

3 - Wash immunoplate 5 times with 300 μ l/well of EIA buffer.

Be very careful not to cross-contaminate between wells in the first wash/dispensing cycle. In each wash cycle empty plate contents with a rapid flicking motion of the wrist, then gently blot dry the top of plate on paper towels. Dispense 300 μ l of EIA buffer into each well and gently shake for at least a few seconds. Thorough washing is essential.

4 - Add 100 μ l /well of streptavidin-HRP. *Tap or centrifuge the SA-HRP vial to collect all liquid contents on the bottom of the vial.*

Dilute 1/200 in EIA buffer (60 μ l / 12 ml) and vortex. Add 100 μ l to all wells, including the blanks.

5 - Incubate at room temperature for 1 hour.

6 - Wash immunoplate 5 times (see step 3).

7 - Add 100 μ l/well of TMB solution. *Add to all wells, including the blanks.*

8 - Incubate at room temperature (usually 30 - 60 minutes).

You may read the developing blue color at 650 nm and use the data for your calculations.

9 - Terminate reactions by adding 100 μ l 2 N HCl per well.

10 - Read absorbance at 450 nm within ten minutes.

PROTOCOL II (Std.Ab1hr.BtON)

- 1 - Into each well of the immunoplate add**
50 μ l standard or sample
25 μ l antiserum

Add only buffer to the blank wells (these will give you the background to be subtracted from all readings). These should not be confused with the "SO Standards" which contain no standard peptide and which will yield the highest OD readings.

- 2 - Incubate at room temperature for 1 hour.**

- 3 - Rehydrate the Bt-tracer (see III-5) and add 25 μ l / well.**

Add Bt-tracer to all wells except the blank wells.

- 4 - Incubate at 4°C overnight.** *Shorter incubation times may result in low signal.*

- 5 - Wash immunoplate 5 times with 300 μ l/well of EIA buffer.**

Be very careful not to cross-contaminate between wells in the first wash/dispensing cycle. In each wash cycle empty plate contents with a rapid flicking motion of the wrist, then gently blot dry the top of plate on paper towels. Dispense 300 μ l of EIA buffer into each well and gently shake for at least a few seconds. Thorough washing is essential.

- 6 - Add 100 μ l /well of streptavidin-HRP.** *Tap or centrifuge the SA-HRP vial to collect all liquid contents on the bottom of the vial.*

Dilute 1/200 in EIA buffer (60 μ l / 12 ml) and vortex. Add 100 μ l to all wells, including the blanks.

- 7 - Incubate at room temperature for 1 hour.**

- 8 - Wash immunoplate 5 times (see step 5).**

- 9 - Add 100 μ l/well of TMB solution.** *Add to all wells, including the blanks.*

- 10 - Incubate at room temperature (usually 30 - 60 minutes).**

You may read the developing blue color at 650 nm and use the data for your calculations.

- 11 - Terminate reactions by adding 100 μ l 2 N HCl per well.**

- 12 - Read absorbance at 450 nm within ten minutes.**

PROTOCOL III (Std.Ab1hr.Bt)

- 1 - Into each well of the immunoplate add**
50 μ l standard or sample
25 μ l antiserum

Add only buffer to the blank wells (these will give you the background to be subtracted from all readings). These should not be confused with the "SO Standards" which contain no standard peptide and which will yield the highest OD readings.

- 2 - Incubate at room temperature for 1 hour.** *Shorter pre-incubations may result in lower sensitivity.*

- 3 - Rehydrate the Bt-tracer (see III-5) and add 25 μ l / well.**
Add Bt-tracer to all wells except the blank wells.

- 4 - Incubate at room temperature for 2 hours.**

- 5 - Wash immunoplate 5 times with 300 μ l/well of EIA buffer.**
Be very careful not to cross-contaminate between wells in the first wash/dispensing cycle. In each wash cycle empty plate contents with a rapid flicking motion of the wrist, then gently blot dry the top of plate on paper towels. Dispense 300 μ l of EIA buffer into each well and gently shake for at least a few seconds. Thorough washing is essential.

- 6 - Add 100 μ l /well of streptavidin-HRP.** *Tap or centrifuge the SA-HRP vial to collect all liquid contents on the bottom of the vial. Dilute 1/200 in EIA buffer (60 μ l / 12 ml) and vortex. Add 100 μ l to all wells, including the blanks.*

- 7 - Incubate at room temperature for 1 hour.**

- 8 - Wash immunoplate 5 times (see step 5).**

- 9 - Add 100 μ l/well of TMB solution.** *Add to all wells, including the blanks.*

- 10 - Incubate at room temperature (usually 30 - 60 minutes).**
You may read the developing blue color at 650 nm and use the data for your calculations.

- 11 - Terminate reactions by adding 100 μ l 2 N HCl per well.**

- 12 - Read absorbance at 450 nm within ten minutes.**

PROTOCOL IV (Std.AbON.Bt)

- 1 - Into each well of the immunoplate add**
50 μ l standard or sample
25 μ l antiserum

Add only buffer to the blank wells (these will give you the background to be subtracted from all readings). These should not be confused with the "SO Standards" which contain no standard peptide and which will yield the highest OD readings.

2 - Incubate at 4°C overnight. *Shorter pre-incubations may result in lower sensitivity.*

3 - Incubate at RT for 1 hour. *This is to allow the plate to reach room temperature.*

3 - Rehydrate the Bt-tracer (see III-5) and add 25 μ l / well.
Add Bt-tracer to all wells except the blank wells.

4 - Incubate at room temperature for 2 hours.

5 - Wash immunoplate 5 times with 300 μ l/well of EIA buffer.
 Be very careful not to cross-contaminate between wells in the first wash/dispensing cycle. In each wash cycle empty plate contents with a rapid flicking motion of the wrist, then gently blot dry the top of plate on paper towels. Dispense 300 μ l of EIA buffer into each well and gently shake for at least a few seconds. Thorough washing is essential.

6 - Add 100 μ l /well of streptavidin-HRP. *Tap or centrifuge the SA-HRP vial to collect all liquid contents on the bottom of the vial. Dilute 1/200 in EIA buffer (60 μ l / 12 ml) and vortex. Add 100 μ l to all wells, including the blanks.*

7 - Incubate at room temperature for 1 hour.

8 - Wash immunoplate 5 times (see step 5).

9 - Add 100 μ l/well of TMB solution. *Add to all wells, including the blanks.*

10 - Incubate at room temperature (usually 30 - 60 minutes).
You may read the developing blue color at 650 nm and use the data for your calculations.

11 - Terminate reactions by adding 100 μ l 2 N HCl per well.

12 - Read absorbance at 450 nm within ten minutes.

PROTOCOL V (Ab1hr.Std2hr.BtON)

1 - Into each well of the immunoplate add 25 μ l antiserum.

Add only buffer to the blank wells (these will give you the background to be subtracted from all readings). These should not be confused with the "SO Standards" which contain no standard peptide and which will yield the highest OD readings.

2 - Incubate at room temperature for 1 hour.

3 - Add 50 μ l standard or sample. *Do not wash plate before adding. Do not add to blank wells.*

4 - Incubate at room temperature for 2 hours. *Shorter pre-incubations may result in lower sensitivity.*

5 - Rehydrate the Bt-tracer (see III-5) and add 25 μ l / well.

Add Bt-tracer to all wells except the blank wells. Agitate gently.

6 - Incubate at 4°C overnight.

7 - Wash immunoplate 5 times with 300 μ l/well of EIA buffer.

Be very careful not to cross-contaminate between wells in the first wash/dispensing cycle. In each wash cycle empty plate contents with a rapid flicking motion of the wrist, then gently blot dry the top of plate on paper towels. Dispense 300 μ l of EIA buffer into each well and gently shake for at least a few seconds. Thorough washing is essential.

8 - Add 100 μ l /well of streptavidin-HRP. *Tap or centrifuge the SA-HRP vial to collect all liquid contents on the bottom of the vial.*

Dilute 1/200 in EIA buffer (60 μ l / 12 ml) and vortex. Add 100 μ l to all wells, including the blanks.

9 - Incubate at room temperature for 1 hour.

10 - Wash immunoplate 5 times (see step 7).

11 - Add 100 μ l/well of TMB solution. *Add to all wells, including the blanks.*

12 - Incubate at room temperature (usually 30 - 60 minutes).

You may read the developing blue color at 650 nm and use the data for your calculations.

13 - Terminate reactions by adding 100 μ l 2 N HCl per well.

14 - Read absorbance at 450 nm within ten minutes.

PROTOCOL VI (Std.Ab.BtON)

1 - Into each well of the immunoplate add

50 μ l standard or sample

25 μ l antiserum

25 μ l Bt-tracer

Add only buffer to the blank wells (these will give you the background to be subtracted from all readings). These should not be confused with the "SO Standards" which contain no standard peptide and which will yield the highest OD readings.

2 - Incubate at 4°C overnight.

3 - Wash immunoplate 5 times with 300 μ l/well of EIA buffer.

Be very careful not to cross-contaminate between wells in the first wash/dispensing cycle. In each wash cycle empty plate contents with a rapid flicking motion of the wrist, then gently blot dry the top of plate on paper towels. Dispense 300 μ l of EIA buffer into each well and gently shake for at least a few seconds. Thorough washing is essential.

4 - Add 100 μ l /well of streptavidin-HRP. *Tap or centrifuge the SA-HRP vial to collect all liquid contents on the bottom of the vial.*

Dilute 1/200 in EIA buffer (60 μ l / 12 ml) and vortex. Add 100 μ l to all wells, including the blanks.

5 - Incubate at room temperature for 1 hour.

6 - Wash immunoplate 5 times (see step 3).

7 - Add 100 μ l/well of TMB solution. *Add to all wells, including the blanks.*

8 - Incubate at room temperature (usually 30 - 60 minutes).

You may read the developing blue color at 650 nm and use the data for your calculations.

9 - Terminate reactions by adding 100 μ l 2 N HCl per well.

10 - Read absorbance at 450 nm within ten minutes.

V - ANALYSIS

Plot data and calculate results. We recommend that you use curve fitting software for your data analysis. Plate readers often include such software packages. This is, however, not essential and you may opt to plot manually on semi-log paper. You can also use a spreadsheet program. Should you need help with the latter method we recommend the following procedure.

Set up a spreadsheet as shown below (note that the values on the spreadsheet are merely illustrative and are not necessarily typical for this particular kit). If you e-mail us at immunology@usbachem.com we will be happy to send you the actual working Excel spreadsheet shown below.

Set up an 8 X 12 area to match the layout of the plate (in this case it is the six-point layout) and dump the plate reader data in it.

Calculate the average of the blanks on another cell as indicated by the arrows starting from cells A1 and A2.

Enter the concentration of the standards (see under ng/ml in figure).

Calculate the average of the ODs of the standards and subtract the background (blank) as indicated by the arrows for the last standard (cells G1 and G2).

Plot a standard curve points on a semi-log scale. Use the y axis for the average of the OD readings (minus the blank average) and the x axis for the standard concentrations in ng/ml.

Use the equation shown below to calculate the values on the "FIT" column and plot a smooth line of FIT values versus standard concentrations. Then change the parameters a (max), b (slope), c (IC_{50}), and d (min), until you are satisfied that fit is good.

$$y = \frac{a - d}{1 + (x/c)^b} + d$$

Next calculate the average of your sample readings and subtract the blank average (see arrows starting from A3 and A4, and the arrows leading to "Average").

Finally, you may use the "reverse" of the equation above to calculate the concentrations in ng/ml for all your samples.

$$x = c \frac{y - a}{(d - y)^{1/b}}$$

Caution: In the example above we set the S0 ng/ml value at 0.001 so that the value could be plotted on a semi-log scale, but value is actually **ZERO**. Furthermore, when you calculate sample concentrations using the "reverse" equation if $y = d$ or $y > a$ or $y < d$, the reading is out of range and the calculation will yield an error or a meaningless negative concentration.

SUGGESTED PROTOCOL FOR SAMPLE EXTRACTION

We have provided an excess amount of standard that you may use to determine if extraction is required. For example, if you are working with serum, you may spike it with known amounts of standard and check if they are accurately determined by the assay with and without extraction. Extraction eliminates potentially interfering substances, such as albumin. Extraction may also be necessary to concentrate the sample to within the measuring range. As with any purification technique, recovery of the desired substance is likely to be incomplete.

Therefore, both optimization and quantification of the extraction procedure are recommended for more accurate determinations. While we cannot provide you with extraction optimization and quantification protocols, we have included enough standard in the kit should you wish to use it for this purpose.

C18 Sep-Column Extraction Method

The following generic protocol is meant to help users with little experience in extracting their samples. It should be applicable to different biological fluids but should not be thought of as an optimized protocol for any particular antigen.

Required Materials

- SEP-COLUMN containing 200 mg of C18 Cat No. Y-1000
- Buffer A (BUFF-A): 1% trifluoroacetic acid (TFA, HPLC Grade). (Acidifies plasma sample to remove interfering proteins such as albumin)
- Buffer B (BUFF-B): 60% acetonitrile (HPLC Grade), 1% TFA, and 39% distilled water. (Elutes peptide from C18 column)
- You may also consider purchasing Extraction kits (Cat No. S-5000), which include SEP-columns and buffers

Withdrawal and Preparation of Plasma

- Collect blood samples (2 - 6 ml) into a chilled syringe and transfer into a polypropylene tube containing EDTA (1 mg/ml of blood) as an anticoagulant and Apronitin (500 KIU/ml of blood) as a protease inhibitor at 4°C. Do not use heparinized tubes as they may interfere with the assay. Vacutainers with EDTA are acceptable.
- Centrifuge blood at 1,600xg for 15 minutes at 4°C.
- Collect the top (plasma) layer.
- Proceed to extraction immediately or freeze at -70°C for later use.

Extraction Procedure

- Add an equal amount of Buffer A to the plasma.
- Centrifuge at 6,000xg to 17,000xg for 20 minutes at 4°C.

- Transfer supernatant to a new tube discarding any pellet that may be present.
- Equilibrate a SEP-COLUMN by washing with 1 ml Buffer B followed by 3 X 3 ml Buffer A.
- Load the plasma solution onto the equilibrated SEP-Column.
- Slowly wash the column with Buffer A (3 ml, twice) and discard the wash. A light vacuum (10 sec/drop) may be applied to the column.
- Elute the peptide slowly with Buffer B (3 ml, once) and collect eluant in a polypropylene tube. A light vacuum may be applied as in previous step.
- Freeze-dry eluant to dryness using a dry ice/methanol bath to freeze the sample and a centrifugal concentrator to evaporate it
- Dissolve the residue in a suitable volume of EIA buffer such that the concentration of the substance of interest will fall close to the IC_{50} (within the measuring range).

TROUBLESHOOTING

Most problems are caused by poor technique or by alterations of the protocol. Also, please check that the kit's expiration date has not passed and that the kit has been stored properly. Please read the storage section on page 5.

- Can the kit be used more than once?
 - Although we do not guarantee the performance of our kits on a second or subsequent use, the end user should be able to use the kit multiple times if the reconstituted specific anti-serum, standard and Bt-tracer are stored at or below a constant -20 °C and the rest of the components are kept dry and refrigerated (2-4 °C). Freezing aliquots of the reconstituted components may further extend multiple use lifetime.
- What are some sources of inaccurate readings?
 - exceeding the OD range of plate reader
 - dirt or grease on the bottom of the plate - Wipe with 70% ethanol

- air bubbles or foaming in wells.
- The standard curve does not look right.
 - If you wait too long to read, the curve will be flattened at the top. If you are not familiar with the kit we recommend you read the plate several times while the blue color is still developing (at 650 nm). The blue color will be less intense compared to that of the terminated reactions (Yellow 450 nm) but the data are still good and this way you won't risk losing the lower end of the range.
 - Some curves are almost linear, check our catalog for a typical plot of the product you are using - it may be normal for that particular product.
- The IC_{50} is not as expected
 - Note that the IC_{50} reported with each of our products is based on the concentration of the prepared standards before they are added to the assay solution.
 - A difference by a factor of two or three may be normal for some kits and may be caused by the time it takes to equilibrate the binding of the tracer and the standard. This will be especially true for pre-incubation protocols. If possible you should always include your own reliable standard at a concentration close to the expected IC_{50} to check the accuracy of the kit.
 - In cases where the standard curves are almost rectilinear, accurate IC_{50} values cannot be calculated.
 - Using excessive amounts of antiserum or tracer, or using a degraded standard may all raise the IC_{50} .
- There is too much variation in duplicated readings.
 - There are only trivial explanations for this such as: (a) poor mixing, (b) poor pipetting technique or faulty pipettes, (c) kit reagents not allowed to equilibrate to room temperature before use, (d) cross-contamination of samples, e.g. droplets or spray from one well to the next, (e) bubbles or foaming in the wells, or finger prints or dirt on the bottom of the plate, etc.

- The ODs are lower than expected.
 - The color intensity has little to do with the accuracy of the kit, as long as the slope in the measuring range is normal, but, if the intensity is extremely low, and assuming that you have waited long enough, this may mean that one of the components (antiserum, Bt-tracer, SA-HRP, or TMB) was added in low amounts or was degraded due to incorrect storage or excessive freeze-thawing.
- The curve looks OK but the results seem implausible.
 - Possibly you used different solvents or conditions for standards and samples.
 - The antiserum may bind to another antigenically similar peptide
 - Antigen was lost during extraction or extraction did not eliminate interfering factors
 - Make sure that the kit's antigen is the same as the target that you are trying to measure. Sometimes the kit's antigen is a peptide that is part of but not the complete natural protein. If so the kit can still be used for determining relative concentrations but not necessarily for determining the absolute concentration of the complete protein antigen.

REFERENCES

T. Porstmann and S.T. Kiessig *Enzyme immunoassay techniques. An Overview.* J. Immunol. Methods **150**, 5-21 (1992)

S. Avrameas *Amplification systems in immunoenzymatic techniques.* J. Immunol. Methods **150**, 23-32 (1992)

E. Bucht et al. *A rapid extraction method for serum calcitonin.* Clin. Chim. Acta, **195**, 115-124 (1991)

REFERÊNCIAS

1. Dyer RA, Van Dyk D, Dresner A. The use of uterotonic drugs during caesarean section. *Int J Obstet Anesth*. 2010;19:313-9.
2. Arias F. Pharmacology of oxytocin and prostaglandins. *Clin Obstet Gynecol*. 2000;43:455-68.
3. Prendiville W, Elbourne D, Chalmers I. The effects of routine oxytocin administration in the management of the third stage of labour: An overview of the evidence from controlled trials. *Br J Obstet Gynaecol*. 1988;95:3-16.
4. Nordstrom L, Fogelstam K, Gridman G, Larsson A, Rydhstroem H. Routine oxytocin in the third stage of labour. A placebo controlled randomized trial. *Br J Obstet Gynecol*. 1997;104:781-6.
5. Rogers J, Wood J, McCandish R, Ayers S, Truesdale A, Elbourne D. Active versus expectant management of third stage labour. The Hinchingsbrooke randomized controlled trial. *Lancet*. 1998;351:693-9.

6. Munn MB, Owen J, Vincent R, Wakefield M, Chestnut DH, Hauth JC. Comparison of two oxytocin regimens to prevent uterine atony at cesarean delivery: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol*. 2001;98:386-90.

7. Wedisinghe L, Macleod M, Murphy DJ. Use of oxytocin to prevent haemorrhage at caesarean section – a survey of practice in the United Kingdom. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008;137:27-30.

8. Sarna MC, Soni AK, Gomez M, Oriol NE. Intravenous oxytocin in patients undergoing elective cesarean section. *Anesth Analg*. 1997;84:753-6.

9. Pinder AJ, Dresner M, CAlow C, O’Riordan J, Johnson R. Haemodynamic changes caused by oxytocin during caesarean section under spinal anaesthesia. *Int J Obstet Anesth*. 2002;11:156-9.

10. Thomas JS, Koh SH, Cooper GM. Haemodynamic effects of oxytocin given as i.v. bolus or infusion on women undergoing caesarean section. *Br J Anaesth*. 2007;98:116-9.

11. Thomas TA & Cooper GM. Maternal deaths from anaesthesia. An extract from Why Mothers Die 1997-1999, the Confidential Enquires into Maternal Deaths in the United Kingdom. *Br J Anaesth*. 2002;89:499-508.

12. Garfield RE, Kannan MS, Daniel EE. Gap junction formation in myometrium: control by estrogens, progesterone and prostaglandins. *Am J Physiol.* 1980;238:C81-9.
13. Robinson C, Schumann R, Zhang P, Young RC. Oxytocin-induced desensitization of the oxytocin receptor. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188:497-502.
14. Phaneuf S, Asboth G, Carrasco MP, Linares BR, Kimura T, Harris A, Bernal AL. Desensitization of oxytocin receptors in human myometrium. *Hum Reprod Update.* 1998;4:625-33.
15. Magalhaes JK, Carvalho JC, Parkes RK, Kingdom J, Li Y, Balki M. Oxytocin pretreatment decreases oxytocin-induced myometrial contractions in pregnant rats in a concentration-dependent but not time-dependent manner. *Reprod Sci.* 2009;16:501-8.
16. Balki M, Cristian AL, Kingdom J, Carvalho JC. Oxytocin pretreatment of pregnant rat myometrium reduces the efficacy of oxytocin but not of ergonovine maleate or prostaglandin F2alpha. *Reprod Sci.* 2010;17:269-77.

17. Perry RL, Satin AJ, Barth WH, Valtier S, Cody JT, Hankins GDV. The pharmacokinetics of oxytocin as they apply to labor induction. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;174:1590-3.
18. Thornton S, Davison JM, Baylis PH. Effect of human pregnancy on metabolic clearance rate of oxytocin. *Am J Physiol.* 1990;259:R21-4.
19. Stocche RM, Garcia LV, Klamt JG. Effects of analgesic intrathecal sufentanil and 0.25% epidural bupivacaine on oxytocin and cortisol plasma concentration in labor patients. *Rev Bras Anesthesiol.* 2001;51:285-97.
20. Kumaresan P, Anandarangam PB, Dianzon W, Vasicka A. Plasma oxytocin levels during human pregnancy and labor as determined by radioimmunoassay. *Am J Obstet Gynecol.* 1974;119:215-23.
21. Kawasaki K, Mitsui Y, Ono T, Ogawa H, Takano I, Sankai T, Terao K. Simple method for assaying serum oxytocin and changes of serum oxytocin level during parturition in cynomolgus monkeys. *Exp Anim.* 2002;51:181-5.
22. Prakash BS, Metten M, Schams D, Wuttke W. Development of a sensitive enzyme immunoassay for oxytocin determination in bovine plasma. *Anim Reprod Sci.* 1998;51:185-94.

23. Gonser M. Labor induction and augmentation with oxytocin: pharmacokinetic considerations. *Arch Gynecol Obstet*. 1995;256:63-6.

24. Bolton TJ, Randall K, Yentis SM. Effect of the confidential enquires into maternal deaths on the use of syntocinon® at caesarean section in the UK. *Anaesthesia*. 2003;58:277-9.

25. Yamaguchi ET, Cardoso MM, Torres MLA. Oxytocin in cesarean sections. What's the best way to use it? *Rev Bras Anesthesiol*. 2007;57:324-30.

26. King KJ, Douglas MJ, Unger W, Wong A, King RAR. Five unit bolus oxytocin at cesarean delivery in women at risk of atony: a randomized, double-blind, controlled trial. *Anesth Analg*. 2010;111:1460-6.

27. Tsen LC & Balki M. Oxytocin protocols during cesarean delivery: time to acknowledge the risk/benefit ratio? *Int J Obstet Anesth*. 2010;19:243-5.

28. Auler Jr JOC, Torres MLA, Cardoso MM, Tebaldi TC, Schmidt AP, Kondo MM, Zugaib M. Clinical evaluation of the flotrac/vigileo™ system for

continuous cardiac output monitoring in patients undergoing regional anesthesia for elective cesarean section: a pilot study. *Clinics*. 2010;65:793-8.

29. Dyer RA, Reed AR, Van Dyk D, Arcache MJ, Hodges O, Lombard CJ, Greenwood J, James MF. Hemodynamic effects of ephedrine, phenylephrine and the coadministration of phenylephrine with oxytocin during spinal anesthesia for elective cesarean delivery. *Anesthesiology*. 2009;111:753-65.