

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**QUANTIFICAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO**

**SEMELHANTE A INSULINA I (IGF-I) EM PLASMA**

**BOVINO POR ELISA**

**Marcos Antonio Maioli**

Zootecnista

ARAÇATUBA - SP

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**QUANTIFICAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO  
SEMELHANTE A INSULINA I (IGF-I) EM PLASMA  
BOVINO POR ELISA**

**Marcos Antonio Maioli**

**Orientador: Prof. Adj. Guilherme de Paula Nogueira**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária - UNESP - Campus de Araçatuba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA - SP

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FMVA / UNESP

Maioli, Marcos Antonio

M285q      Quantificação do fator de crescimento semelhante a insulina  
I (IGF-I) em plasma bovino por ELISA / Marcos Antonio Maioli.  
74. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba

Orientador: Prof. Adjunto Guilherme de Paula Nogueira

1. Imunoensaio 2. Hormônio 3. Validação 4. Medidas, métodos e  
teorias I. T.

CDD 574.1925

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: *Quantidade de feto de vacas com semelhante a<sup>o</sup> insulina I (IGF-I) em plasma soro por Elisa*

AUTOR: MARCOS ANTONIO MAIOLI

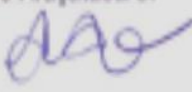
ORIENTADOR: GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA

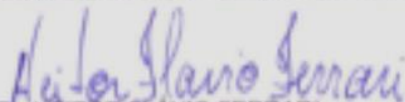
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA  
Departamento de Apoio Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP

  
Prof. Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES  
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP

  
Dr. DANIEL DE JESUS CARDOSO DE OLIVEIRA  
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - APTA / Secretaria da Agricultura, Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Araçatuba/SP

  
Profa. Dra. ANDRÉA FONTES GARCIA  
Centro Católico Auxilium - UNISALESIANO/Araçatuba

  
Prof. Dr. HEITOR FLÁVIO FERRARI  
Centro Católico Auxilium - UNISALESIANO/Araçatuba

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**MARCOS ANTONIO MAIOLI** – nascido no município de Piracaia (SP) no dia 7 de abril de 1986. Zootecnista formado pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Campus de Dracena (julho de 2010). Na graduação foi bolsista de Iniciação Científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, nº 2006/07097-6) durante 2 anos e bolsista PIBIC por 9 meses. Ingressou no curso de Mestrado em Ciência Animal pela UNESP, Campus de Araçatuba, em agosto de 2010 na área de Fisiopatologia Média e Cirúrgica desenvolvendo pesquisas nas áreas de bioquímica toxicológica e metabolismo, obtendo o título de mestre em junho de 2012 (bolsista FAPESP, processo nº. Na mesma instituição iniciou em julho de 2012 o Doutorado em Ciência Animal, porém na área de Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, sob orientação do Prof. Adj. Guilherme de Paula Nogueira. As nova área de atuação foi a validação de imunoensaios para quantificação hormonal em animais de produção. Durante os dois primeiros anos de doutorado (2012 a 2014) foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), posteriormente recebendo a bolsa FAPESP (nº 2014/09135-9). Entre os meses de junho a setembro de 2015 realizou estágio em pesquisa (processo FAPESP nº 2015/08021-2) na University of Missouri, Division of Animal Science, Columbia, Estados Unidos da América, sob supervisão do Dr. Duane H. Keisler.

**“A maioria de nós nasce gênio.  
Infelizmente a maioria morre na mediocridade”  
(Robin Sharma)**

**Dedico**

**À minha esposa, Camila Memari Trava Maioli por todo amor, carinho e compreensão  
ao longo desses anos além de ser uma de minhas maiores incentivadoras.**

**Aos meus pais, Sérgio Maioli e Maria Madalena da Silva Pinto Maioli por me guiarem  
pelos caminhos da vida e serem meus grandes exemplos.**

**Sem vocês nada seria possível.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelo caminho a mim traçado, pois ao longo de minha vida ocorreram alguns acontecimentos que não entendia o motivo, mas agora vejo que foram importantes para meu engrandecimento espiritual.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos nos dois primeiros anos de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo por me conceder a bolsa de estudos no país (2014/09135-9) e a de estágio em pesquisa no exterior (BEPE, 2015/08021-2).

Aos meus pais Sérgio Maioli e Maria Madalena da Silva Pinto Maioli pelo carinho e amor incondicionais e pela formação pessoal que me proporcionaram. Vocês significam o que há de mais importante na vida, que é uma base sólida, sobre a qual são construídos os princípios para se obter apenas realizações pessoais, mas também profissionais.

À minha esposa Camila Memari Trava Maioli, o grande amor da minha vida e um presente de Deus. Muito obrigado por me ajudar a superar momentos difíceis, e entender minha ausência durante alguns períodos (principalmente quando fui para os Estados Unidos). Além de ser minha incentivadora, é com certeza minha maior motivação. Obrigado por acreditar em mim.

Aos meus sogros, Ademir Trava e Sandra Memari Trava por serem essas pessoas maravilhosas, exemplos de dedicação, trabalho e honestidade. Muito obrigado por todo carinho, atenção e pelos conselhos extremamente valiosos.

Às minhas cunhadas Bruna e Georgia por serem tão atenciosas e carinhosas comigo. Vocês alegraram ainda mais a minha vida.

Ao meu orientador Prof. Adj. Guilherme de Paula Nogueira, um exemplo de comprometimento com o trabalho de pesquisa e docência. Muito obrigado por



ter aceito me orientar, sei que durante esse período muitos foram os desafios (3 diferentes projetos, falta de iodo até o recomeço de uma validação), porém juntos superamos. Obrigado também por ter me ajudado na viagem aos Estados Unidos, pois depois dela muita coisa mudou.

Ao Dr. Duane H. Keisler da Division of Animal Science, University of Missouri, por ter me recebido em seu laboratório. Exemplo de profissional, com uma carga gigantesca de conhecimento e paciência para entender o meu inglês. Obrigado pelos valiosos ensinamentos que foram de grande importância nessa fase final do trabalho.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) e ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

A equipe do Laboratório de Endocrinologia Animal da UNESP de Araçatuba: Devani Mariano Pinheiro, Marco Antonio Ruiz Lopes, Maria Carolina Villani Miguel, David Giraldo Arana, Juliana Stephani de Souza, Heni Falcão, Sarita Priscila Gobbo, Rafael Silva Cipriano e Danilo Gualberto. Esse trabalho só pôde ser realizado graças a ajuda de vocês, muito obrigado.

Aos membros da banca de qualificação Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive e Profa. Dra. Tereza Cristina Cardoso Silva por melhorarem esse trabalho com suas colocações.

Ao Prof. Adj. Marcelo Vasconcelos Meireles, Dr. Daniel de Jesus Cardoso de Oliveira, Prof. Dra. Andrea Fontes Garcia e Prof. Dr. Heitor Flávio Ferrari por aceitarem o convite para participação da banca avaliadora de defesa.

Aos meus amigos que sempre torceram e ainda torcem pelo meu sucesso. Não tenho irmãos de sangue, mas o destino se encarregou de conseguir alguns.

A vocês meu eterno agradecimento.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO .....	17
SUMMARY .....	19
1. INTRODUÇÃO .....	20
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	21
2.1. Puberdade e seu controle neuroendócrino .....	21
2.2. Fator de crescimento semelhante a insulina tipo I (IGF-I) e Participação nos processos reprodutivos .....	22
2.3. Imunoensaios .....	23
2.3.1. Breve histórico .....	23
2.3.2. Princípios básicos .....	25
2.3.3. Captação em fase sólida .....	26
2.3.4. Estreptavidina, biotina, interação e o uso na amplificação de sinal .....	27
3. HIPÓTESE .....	32
4. OBJETIVOS .....	32
4.1. Objetivo geral .....	32
4.2. Objetivo específico .....	32
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	33
5.1. Preparação do IGF-I conjugado com biotina .....	33
5.2. Extração para quantificação de IGF-I total .....	34
5.3. Preparo das placas (sensibilização e bloqueio) .....	35
5.4. Procedimentos adotados para estabelecimento do ensaio .....	35
5.4.1. Testes de ligação .....	35
5.4.2. Estabelecimento da curva padrão .....	37
5.4.3. Ensaio para quantificação de IGF-I .....	38
5.5. Procedimentos para quantificação de IGF-I total adotados na metodologia comercial .....	40
5.6. Procedimentos de validação do método in house .....	41
5.6.1. Exatidão e Precisão .....	41
5.6.2. Sensibilidade e limite de quantificação inferior .....	42

5.6.3. Avaliação da linearidade do método .....	42
5.6.4. Avaliação da aplicabilidade da metodologia em larga escala .....	43
5.7. Análise estatística .....	44
6. RESULTADOS.....	45
6.1. Testes de ligação.....	45
6.2. Curva padrão .....	47
6.3. Exatidão e Precisão .....	50
6.4. Sensibilidade e limite de quantificação inferior .....	55
6.6. Avaliação da aplicabilidade do método em larga escala .....	60
7. DISCUSSÃO .....	62
8.REFERÊNCIAS .....	68

## LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA 1- Estrutura tridimensional da estreptavidina. Cada um dos tetrâmeros está representado de uma cor e as estruturas em preto indicam os quatro pontos de interação com a biotina.....	28
FIGURA 2- Estrutura química da biotina.....	29
FIGURA 3- Estrutura química do derivado sintético da biotina o éster do ácido biotinamidohexanóico N-hidroxisuccinimídico (biotina-NHS-éster).....	30
FIGURA 4- Representação esquemática do princípio de amplificação de sinal utilizando a interação biotina-estreptavidina. A estrutura em amarelo representa uma proteína, as aminos primárias presentes nas lisinas foram ligadas a biotina, e essa por sua vez interage com a estreptavidina ligada a 3 ou mais moléculas de HRP, ampliando a capacidade de oxidação do substrato. ....	31
FIGURA 5- Fluxograma do processo de biotinação do IGF-I.....	34
FIGURA 6- Fluxograma dos testes de ligação. (A) Incubação 4 h a 4°C; (B) Incubação de 24 h a 4°C. ....	36
FIGURA 7- Fluxograma adotado para quantificação de IGF-I sem competição .....	39
FIGURA 8- Fluxograma adotado para quantificação de IGF-I com competição. ....	39
FIGURA 9- Testes de ligação realizados com incubação a 4°C por 4 horas (A) e por 24 horas (B). As setas indicam as diferentes concentrações de anti-IgG de coelho utilizadas para sensibilização dos poços e as linhas pontilhadas delimitam os intervalos das diluições do anticorpo anti-IGF-I. ....	46

FIGURA 10- Curvas padrão usadas como referência para quantificação de IGF-I. (A) Variação nos volumes dos pontos da curva padrão utilizando o protocolo sem competição. (B) Representação da curva padrão em porcentagem da ligação máxima- B/B<sub>0</sub>. (C) Curva padrão em ensaio sem competição utilizando 60 µL das soluções padrão. (D) Curva padrão em ensaio com competição. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados apresentados como média±D.P.....48

FIGURA 11- Comparativo das concentrações obtidas com o kit comercial e o ensaio in house com protocolo ou sem competição. (A) Sequência das amostras utilizadas para dosagem (aleatoriamente); (B) Amostras organizadas de forma decrescente em função da dose encontrada com o kit comercial; (C) Correlação entre as doses obtidas com o kit comercial e a ensaio in house sem competição. As dosagens com o kit foram realizadas em duplicata/amostra e as da metodologia *in house* após dois ensaios independentes realizados em duplicata/amostra e os resultados apresentados como média±EPM. ....51

FIGURA 12- Comparativo das concentrações obtidas com o kit comercial e o ensaio in house com competição com anticorpo anti-IGF-I na diluição 1:80.000. (A) Sequência aleatória das amostras utilizadas para dosagem; (B) Amostras organizadas de forma decrescente em função da dose encontrada com o kit comercial; (C) Correlação entre as doses obtidas com o kit e ensaio in house com competição. As dosagens com o kit foram realizadas em duplicata/amostra e as da metodologia *in house* após dois ensaios independentes realizados em duplicata/amostra e os resultados apresentados como média±EPM. ....52

- FIGURA 13- Comparativo das concentrações obtidas com a metodologia comercial e ensaio in house com competição com anticorpo anti-IGF-I na diluição 1:250.000. (A) Sequência das amostras utilizadas para dosagem; (B) Amostras organizadas de forma decrescente em função da dose encontrada com o kit comercial; (C) Correlação entre as doses obtidas com o kit e a metodologia com competição. As dosagens com o kit foram realizadas em duplicata/amostra e as da metodologia *in house* após dois ensaios independentes realizados em duplicata/amostra e os resultados apresentados como média±EPM. ....53
- FIGURA 14- Diferença percentual entre as doses obtidas com a metodologia comercial e utilizando o protocolo com competição com anticorpo anti-IGF-I na diluição 1:250.000. ....54
- FIGURA 15- Curvas padrão elaboradas utilizando o protocolo in house com competição, com anticorpo anti-IGF-I na diluição de 1:250.000. (A) Curva padrão sem transformação; (B) Regressão logística de 4 parâmetros; (C) Regressão linear após linearização dos dados. Os dados, expressos pela média±D.P, são representativos de quatro curvas padrão realizados em 3 dias diferentes e em duplicata. ....58
- FIGURA 16- Análise da distribuição dos resíduos das doses nominais e das doses calculadas pelas equações curva utilizando método linear (A) e o não linear (B). Os dados, expressos pela média±D.P, são representativos de quatro curvas padrão realizados em 3 dias diferentes e em duplicata. ....59
- FIGURA 17- Figura ilustrativa das oscilações das concentrações plasmáticas de IGF-I de quatro fêmeas da raça nelore a partir do segundo mês de vida. ....61

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1- Concentração real dos padrões utilizados na curva padrão e o correspondente em ng/mL considerando o mesmo fator de diluição das amostras .....	37
Tabela 2- Parâmetros avaliados das regressões entre o log da concentração e a variação da densidade óptica para escolha do volume mais indicado dos padrões para elaboração da curva padrão, utilizando o anticorpo anti-IGF-I na diluição de 1:80.000 e o método sem competição .....	49
Tabela 3- Parâmetros avaliados das regressões entre o log da concentração e a variação da densidade óptica para estimativa da diluição do anticorpo anti-IGF-I para realização dos testes, utilizando o método com competição.....	49
Tabela 4- Avaliação da sensibilidade analítica através da técnica de paralelismo .....	55
Tabela 5- Comparativo da sensibilidade do método in house em relação ao kit comercial .....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C= graus Celcius

µL= microlitro

DPRes= desvio padrão dos resíduos

EDTA= ácido etilamiamino tetra-acético

ELISA= ensaio imunoenzimático

IC50= Dose ou concentração capaz de provocar 50% da redução máxima observada

IGF-I= fator de crescimento semelhante a insulina tipo I

IGFBP = proteína transportadora do fator de crescimento semelhante a insulina

IgG= imunoglobulina

KDa= quilodalton

Ligação máxima=  $B_0$

M= molar

mU/mL= miliunidade por mililitro

ng/mL= nanograma por mililitro

nm= nanômetro

r= índice de correlação

$r^2$ = índice de confiabilidade da regressão

rpm= rotações por minuto

SQ= soma de quadrados

U/mL= unidade por mililitro

GnRH = hormônio liberador de gonadotrofinas



## QUANTIFICAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE A INSULINA I (IGF-I) EM PLASMA BOVINO POR ELISA

**RESUMO** - Esse estudo teve como objetivo a padronização de um ensaio imunoenzimático (ELISA) para a determinação das concentrações plasmáticas de IGF-I total, utilizando o sistema de amplificação biotina-estreptavidina peroxidase em um ensaio competitivo. O IGF-I foi extraído da IGFBP, utilizando o tampão glicina acidificado seguido de neutralização do pH com hidróxido de sódio. As microplacas foram sensibilizadas com anti IgG de coelho, e as dosagens realizadas utilizando duas abordagens, um método sem competição (incubação prévia das amostras com o anticorpo anti-h-IGF-I) e outro com competição (adição simultânea de IGF-I biotilado e amostra). Os melhores resultados foram obtidos utilizando o método competitivo, com a sensibilização da placa com 0,25 µg/poço de IgG anti-coelho, o anticorpo específico na diluição 1:250.000 e 0,06 ng/poço de IGF-I biotilado. O ensaio *in house* apresentou, um limite inferior de detecção de 50 ng/mL, uma correlação de 0.945 entre doses quando comparado à uma metodologia comercial. Além disso, após 33 ensaios (1114 amostras) a metodologia apresentou uma boa precisão, com coeficientes de variação inter-ensaio de 12,94% (345,8 ng/mL) para os controles alto e 20,71% (131,6 ng/mL) para o baixo. Dessa forma, conclui-se que a metodologia imunoenzimática para quantificação de IGF-I total utilizando o sistema de amplificação biotina-estreptavidina peroxidase em um ensaio competitivo está

estabelecida e apresenta-se como uma ferramenta útil para estudos que visem o monitoramento das concentrações de IGF-I.

**Palavras chave:** Método, Hormônio, Validação, Imunoensaio

## **MEASUREMENT OF INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR I (IGF-I) IN BOVINE PLASMA BY ELISA**

**SUMMARY** - This study aimed to standardize an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to determine plasma concentrations of total IGF-I using the amplification biotin-streptavidin peroxidase system in a competitive assay. The IGF-I was extracted from IGF-BPs using the acidified glycine buffer followed by the pH neutralization with sodium hydroxide. The microplates were coated with anti-rabbit IgG, thereafter the measurements were carried out using two approaches, one without competition (prior incubation of samples with the anti-h-IGF-I antibody) and another with competition (simultaneous addition of IGF-I and biotinylated sample). The best results were obtained using the competitive method, with the following combination of reagents: microplates were coated with 0.25 µg/well of anti-rabbit IgG, the specific antibody at a dilution of 1:250.000 and 0.06 ng/well of biotinylated IGF-I. The in house methodology showed sensitivity of detection limit of 50 ng/ml, a correlation between doses of 0.945 when compared to a commercial method. In addition, after 33 assays (quantification of 1114 samples) the proposed methodology presented a good precision, with inter-assay variation coefficients of 12.94% and 20.71% for the high and low controls, respectively. Finally, we concluded that ELISA method for the quantification of total IGF-I using the system biotin-streptavidin-peroxidase amplification in a competitive assay is established and is presented as a useful tool for studies aimed at monitoring the IGF-I concentrations.

**Keywords:** Methods , Hormone, Validation, Immunoassay

## 1 INTRODUÇÃO

O IGF-I, ou somatomedina C, é um peptídeo com peso molecular de aproximadamente 7,6 kDa composto por 70 aminoácidos pertencente a superfamília da insulina, devido a sua relação estrutural com a pró-insulina (ANDOH, 2005). É um potente mitógeno sintetizado, por diversos órgãos, principalmente pelo fígado em resposta ao GH produzido pela hipófise (YAKAR et al., 1999) e que atua como mediador metabólico relacionado com o início da puberdade em novilhas (RADCLIFF et al., 2004; BELTRAN, 2007).

A atividade estimulatória sobre os processos reprodutivos desempenhada pelo IGF-I ocorre de duas maneiras, uma por ação local nos ovários estimulando o crescimento folicular que deriva em maior produção de estradiol com consequente liberação de picos de LH (SIMPSON et al., 1991), e outra por ação direta no hipotálamo induzindo a liberação de kisspeptina que é um importante neurotransmissor estimulatório da secreção de GnRH (HINEY et al., 2010).

O peso e a condição corporal, durante o período pré-puberal, são fatores determinantes para a primeira ovulação (GARCIA et al., 2002) e apresentam correlação de 0,88 a 0,92 com as concentrações circulantes de IGF-I (LACAU-MENGIDO et al., 2000). Além da associação com os processos reprodutivos a concentração periférica de IGF-I pode também ser utilizada como um parâmetro indicador do status nutricional (KETELESLEGGERS et al., 1995).

Contudo, mesmo perante a reconhecida importância fisiológica desse hormônio sobre os aspectos produtivos e reprodutivos, as metodologias disponíveis no mercado em sua grande maioria não são desenvolvidas para a espécie bovina e apresentam um elevado custo, limitando assim o estudo desse hormônio em pesquisas desenvolvidas com elevado número de animais.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Puberdade e seu controle neuroendócrino

A puberdade em fêmeas, mais especificamente, é caracterizada pela primeira ovulação seguida da formação de um corpo lúteo capaz de se manter durante um ciclo estral completo (KINDER et al., 1987), além de manifestar todas as etapas envolvidas no comportamento sexual (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Segundo Moran et al. (1989), a primeira ovulação em média ocorre entre 6 e 24 meses de idade dependendo da genética e dos fatores ambientais em que se encontram os animais. Raças da espécie *Bos indicus*, como a Nelore, são mais tardias e em média iniciam a atividade reprodutiva aos 24 meses (ROBINSON, 1977).

Duas hipóteses são propostas para explicar os mecanismos neuroendócrinos envolvidos na maturação sexual, sendo estas denominadas gonadostática (HOHLWEG e DOHRN apud KNOBIL; NEILL, 1994) e central (DONAVAN; VAN DER WERFF, 1956). Em roedores, ovelhas e bovinos, dentre outras espécies, o controle da maturação sexual segue os preceitos estabelecidos pela hipótese gonadostática; já para equinos e primatas, por exemplo, o início da puberdade ocorre através da liberação de fatores de crescimento e neurotransmissores secretados pelos neurônios e células da glia.

A hipótese gonadostática consiste na redução da sensibilidade hipotalâmica aos esteroides gonadais, principalmente ao estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>), durante o período pré-púbere (HOHLWEG; DOHRN apud KNOBIL; NEILL, 1994) devido à diminuição do número de receptores de E<sub>2</sub> no hipotálamo (DAY et al., 1987).

Em trabalho realizado por Walker et al. (2013) que avaliou o perfil de expressão gênica no hipotálamo de ratos do nascimento até a maturação sexual, observou-se que a redução na expressão dos receptores de E<sub>2</sub> na região pré-óptica (PO) e o aumento na área medial basal do hipotálamo (MBH) coincidem com o início da atividade púbere dos animais. Os autores propõem que a queda da expressão na área PO é importante para cessar a retroalimentação negativa

do E<sub>2</sub> e a elevação na área MBH faz com que esse esteroide passe a exercer ação estimulatória no hipotálamo para a liberação dos picos pré-ovulatórios de LH.

No entanto, a ação dos estrógenos sobre os neurônios que secretam GnRH ainda permanece desconhecida (MAYER et al., 2010). Estudos utilizando imunohistoquímica, com dupla marcação, para neurônios secretores de GnRH e ER em hipotálamos de mamíferos de diversas espécies demonstraram a existência de um grande número de ER no hipotálamo, porém não foi evidenciada a presença nos neurônios secretores de GnRH. Em função disso, acredita-se que a influência dos estrógenos ocorre por vias aferentes sensíveis ao E<sub>2</sub> (GARCIA-SEGURA; MCCARTHY, 2004; SHIVERS et al., 1983), como por exemplo as vias de liberação de kisspeptina, neuroquinina B, glutamato e ácido gama-aminobutírico (GOODMAN et al., 2007; PETERSEN et al., 2003).

Além do controle exercido pelos estrógenos sobre o início da atividade puberal, existe também a importante participação de hormônios metabólicos no processo regulatório da secreção de GnRH, podendo-se citar entre eles o IGF-I (HINEY et al., 2010).

## **2.2 Fator de crescimento semelhante a insulina tipo I (IGF-I) e Participação nos processos reprodutivos**

O IGF-I é um peptídeo formado por 70 aminoácidos, com peso molecular de 7649 Da, apresenta homologia com a pró-insulina em virtude dessa semelhança recebeu o nome de fator de crescimento semelhante a insulina (RINDERKNECHT; HUMBEL, 1977).

Esse peptídeo é um potente mitógeno sintetizado e secretado no fígado em resposta ao GH produzido pelo hipotálamo (YAKAR et al., 1999), havendo evidências indicando-o como importante mediador metabólico envolvido no início da puberdade em novilhas.

Em pesquisa realizada por Beltran (2007), foram observadas maiores concentrações de IGF-I em animais que alcançaram a primeira prenhez antes dos 16 meses, comparado com novilhas não prenhes antes dos 16 meses, além

de ser encontrada uma correlação positiva entre a concentração plasmática de IGF-I e o peso corporal, sugerindo que esse hormônio é importante na determinação da precocidade sexual.

A atividade estimulatória sobre os processos reprodutivos desempenhada pelo IGF-I ocorre de duas maneiras, uma por ação local nos ovários e outra por ação direta sobre o sistema nervoso central.

Em experimento onde novilhas de corte pré-púberes foram imunizadas contra o fator de liberação do hormônio de crescimento, foi observada uma redução na concentração sérica de IGF-I e retardo da puberdade, provavelmente devido à redução do crescimento folicular, visto que uma redução da concentração de IGF-I sanguínea prejudica a habilidade dos ovários de produzir concentrações pré-ovulatórias de estradiol, o que conseqüentemente diminui o estímulo para liberação de LH (SIMPSON et al., 1991)

Além disso, segundo Hiney et al., (2010), o IGF-I atua como indutor da expressão do gene Kiss-1 no hipotálamo mais especificamente no núcleo anteroventral periventricular (AVPV) em ratas, sendo a kisspeptina um importante neurotransmissor estimulatório da secreção de GnRH.

## **2.3 Imunoensaios**

### **2.3.1 Breve histórico**

A maior evolução no campo da dosagem hormonal sem dúvidas foi o radioimunoensaio (RIA). Rosalyn Yalow, quando recebeu o prêmio Nobel em 1977, disse que a descoberta não foi resultado de uma pesquisa específica para esses fins, mas sim uma consequência de seus estudos realizados em parceria com Solomon Berson (YALOW, 1992).

No início da década de 1950, Yalow e Berson estavam testando a hipótese de que a diabetes poderia não ser apenas provocada pela deficiência da secreção de insulina, mas também por sua degradação anormal (BERSON; YALOW, 1956). O modelo de estudo adotado por eles incluía a administração intravenosa na insulina marcada com  $I^{131}$  em indivíduos não diabéticos e tratados

com insulina (diabéticos e pacientes esquizofrênicos tratados com insulina). Em trabalho publicado em 1956, Yalow and Berson observaram que a insulina radioativa era eliminada mais lentamente em indivíduos que haviam recebido injeções prévias de insulina comparado com os que nunca haviam recebido.

A partir disso, os pesquisadores formularam a hipótese de que o retardo na eliminação da insulina marcada com o isótopo nos indivíduos previamente tratados com insulina era consequência da ligação com anticorpos formados após a exposição anterior ao hormônio. Isso deu origem ao conceito base do RIA, pois uma das conclusões apresentadas pelos autores foi que a concentração de insulina- $I^{131}$  que permanecia ligada, considerando uma quantidade fixa de anticorpo, era uma função quantitativa da insulina presente no organismo.

Alguns anos após essa primeira hipótese, em 1959, foi publicado o primeiro trabalho apresentando uma metodologia para quantificação de insulina em humanos (YALOW; BERSON, 1959), moldando assim as práticas utilizadas na endocrinologia moderna (LEPAGE, et al, 2006).

A partir dessa descoberta, muitos laboratórios ao redor do mundo começaram a adotar essa metodologia de quantificação, no entanto ainda existia preocupação com a segurança dos pesquisadores devido a exposição à radiação, e o descarte do material radioativo, além dos custos da construção de estruturas seguras para o desenvolvimento desse tipo de ensaio.

As preocupações com a segurança eram decorrentes do uso do isótopo radioativo do iodo, o iodo 131 ( $I^{131}$ ) um emissor de radiação  $\beta$  e  $\gamma$ , o único disponível na época. Todavia, essas preocupações foram reduzidas quando fabricantes como a Amersham iniciaram a comercialização do isótopo do iodo 125 ( $I^{125}$ ), emissor apenas de radiação  $\gamma$  fraca, que apresentava alta especificidade e pureza quando comparada com ao  $I^{131}$  (LEQUIN, 2005), além de apresentar meia vida de 60 dias, 7,5 vezes maior que a do  $I^{131}$  (8 dias).

Até esse momento, a marcação com isótopos radioativos era considerada a única forma de marcação de antígenos e anticorpos conservando a sua integridade estrutural e função, devido inserção de uma pequena molécula a



estrutura proteica. Contudo, no início dos anos 1960, iniciaram-se os estudos para a conjugação de antígenos e anticorpos com enzimas, ainda visto com certo ceticismo pelos pesquisadores, pois era inconcebível a ideia da conjugação de grandes moléculas com antígenos e anticorpos e estes ainda manterem sua capacidade imunogênica (LEQUIN, 2005).

Entre os anos de 1966 e 1969, foram publicados os primeiros estudos com acoplamento entre antígenos ou anticorpos com enzimas, como a fosfatase alcalina, utilizando-se o método do glutaraldeído, com o propósito inicial de desenvolver de ferramentas para localização de compostos em estudos histopatológicos e histoquímicos.

Em 1971, essas metodologias foram modificadas e então surgiram os primeiros estudos visando mensuração quantitativa de compostos por técnicas imunoenzimáticas (ELISA), sendo estes desenvolvidos por Engvall e Perlmann (1971) para a quantificação de IgG em soro de coelhos utilizando a fosfatase alcalina e por van Weemen e Schuurs (1971) para a quantificação de gonadotrofina coriônica humana em urina utilizando a enzima extraída de raiz forte (“horseradish peroxidase”, HRP).

### **2.3.2 Princípios básicos**

Os imunoenaios são métodos bioanalíticos em que a quantificação do analito depende da reação entre um antígeno (analito) e um anticorpo e podem ser divididos em duas categorias principais, os ensaios com ou sem competição.

Os métodos competitivos são baseados em uma reação de competição pela ligação entre uma quantidade fixa do antígeno marcado (isótopo radioativo, sonda fluorescente, biotina ou enzima) e a quantidade variável do antígeno não marcado presente na amostra, por um limitado número de sítios de ligação com um anticorpo de alta afinidade contra o analito de interesse (VOLLER et al., 1978).

A interação entre o antígeno marcado/não marcado com o anticorpo dão origem a um imunocomplexo que posteriormente é separado da fração livre por técnicas físicas ou químicas. Os resultados obtidos após a mensuração do sinal

emitido (radioatividade, intensidade de fluorescência ou densidade óptica após conversão de um substrato cromógeno) são comparados aos obtidos com uma curva padrão, que pode ser utilizada para determinar a quantidade de analito na amostra (DARWISH, 2006).

A curva padrão, elaborada com diferentes concentrações conhecidas do antígeno não marcado, gera um sinal que possui relação com a concentração e após aplicação de métodos matemáticos é obtida uma função capaz de calcular a quantidade do analito presente nas amostras (HARVEY, 2000).

A quantificação de compostos de interesse por métodos não competitivos, como o ELISA tipo sanduiche, são baseados na utilização de dois anticorpos específicos contra o antígeno estudado, sendo um deles policlonal (geralmente utilizado como anticorpo de captura) e outro monoclonal (com elevada especificidade para um determinado epítipo do analito) conjugado a uma enzima, como por exemplo a HRP. Nesse sistema o antígeno presente na amostra se liga ao anticorpo adsorvido a microplaca e posteriormente é adicionado o anticorpo ligado a enzima (PORSTMANN; KIESSIG, 1992).

Assim como nos métodos com competição, a fração livre é descartada, um substrato específico para a enzima é adicionado e os resultados obtidos, após a mensuração da densidade óptica ou fluorescência resultante da conversão do substrato pela enzima, comparados a uma curva padrão.

### **2.3.3 Captação em fase sólida**

A separação da fração ligada da fração livre pode ser realizada pela adição de um anticorpo secundário em fase líquida ou sólida. Em fase líquida o anticorpo encontra-se em uma solução, esse por sua vez liga-se ao complexo antígeno-anticorpo que é separado por centrifugação (POWER et al., 1989; LAURENT; LINDBERG, 2002). Todavia, esse processo pode resultar em grande variação, principalmente quando os volumes utilizados são reduzidos, sendo um exemplo disso o uso de microplacas.

Nesse contexto, um dos grandes avanços nos imunoenaios foi o desenvolvimento de superfícies plásticas modificadas fisicamente, tornando-as

capazes de adsorver proteínas ou outras macromoléculas em sua superfície, eliminando a necessidade de centrifugações, e conseqüentemente aumento da estabilidade nos processos de lavagens, sendo esse sistema denominado captação em fase sólida (BUTLER, 2000).

Nesse sistema, uma superfície plástica como polietileno, poliestireno ou membranas sintéticas são modificadas fisicamente, criando assim sítios de ligação hidrofílicos e/ou hidrofóbicos adquirindo a capacidade de adsorver proteínas (antígenos ou anticorpos) ou outras macromoléculas imobilizando-as em sua superfície e causando apenas pequenas modificações em sua atividade imunogênica (CANTARERO et al., 1980).

Em ensaios imunoenzimáticos o uso de microplacas de poliestireno irradiado tornou-se a primeira opção, uma vez que esse polímero possui as características desejáveis para esse perfil de ensaio. Apresenta superfície mais plana quando observado em microscopia de força atômica, favorecendo a formação de camadas mais homogêneas de moléculas adsorvidas em sua superfície; é translúcido, permitindo assim passagem de luz para a mensuração da densidade óptica (D.O.) e, além disso, a irradiação induz a formação de sítios de ligações hidrofílicas e hidrofóbicas, o que permite a adsorção de uma amplitude maior de macromoléculas (BUTLER et al., 1997).

#### **2.3.4 Estreptavidina, biotina, interação e o uso na amplificação de sinal**

A estreptavidina, uma proteína tetramérica com aproximadamente 60 kDa, é secretada pela bactéria *Streptomyces avidinii* e foi descoberta no início dos anos 1960 quando filtrados derivados da fermentação do *Streptomyces* foram estudados para avaliação da atividade antibiótica. Os resultados desse estudo levaram a conclusão de que o mecanismo de ação da inibição do crescimento bacteriano estava associado a presença de uma proteína que se ligava fortemente a biotina, vitamina B8, impedindo sua participação como cofator em reações enzimáticas (CHAIET, 1963).

Os tetrâmeros componentes da estreptavidina possuem estrutura idêntica entre si, e cada um pode se ligar a uma molécula de biotina, fazendo com que essa proteína possa complexar-se com até 4 moléculas de biotina (Figura 1).



FIGURA 1- Estrutura tridimensional da estreptavidina. Cada um dos tetrâmeros está representado de uma cor e as estruturas em preto indicam os quatro pontos de interação com a biotina (FREITAG et al., 1997).

A estrutura da biotina, também conhecida como vitamina B7, B8 ou vitamina H teve sua estrutura apresentada pela primeira vez em 1942 e a primeira síntese química foi realizada em 1944. A estrutura química dessa vitamina consiste de dois anéis fundidos, uma cadeia lateral alifática do ácido valérico com um grupo carboxílico no final com peso molecular de 244 g/mol (Figura 2).

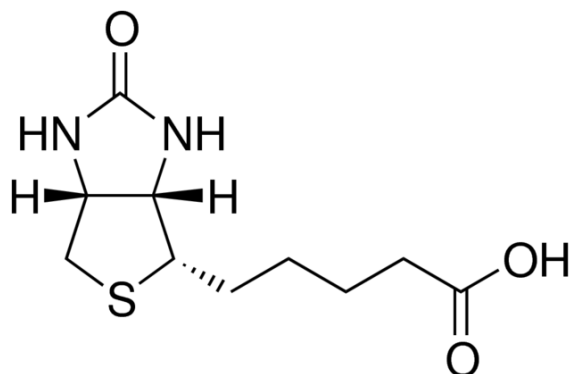


FIGURA 2- Estrutura química da biotina.

A interação entre essas moléculas é extremamente específica, e além disso consiste em uma das interações mais fortes descritas na natureza, com uma constante de afinidade de  $10^{15} \text{ M}^{-1}$  (GREEN, 1990; STAYTON et al., 1999). Em virtude dessa característica, a interação não covalente formada entre a avidina/estraptaavidina e a biotina apresentou-se como uma ferramenta útil para aplicação em diversas áreas, inclusive como um sistema de amplificação de sinal em imunoenaios (DIAMANDIS; CHRISTOPOULOS, 1991).

Baseando-se na premissa de que em sistemas de quantificação por imunoensaio, a determinação das concentrações do analito é dependente do monitoramento da radiação, cor, fluorescência ou luminescência emitidas (emissão de sinal), torna-se evidente que a intensidade do sinal está diretamente relacionada a qualidade e a sensibilidade do ensaio e dependendo das características do analito de interesse, esse fator pode tornar-se limitante para estabelecimento de um método analítico.

Em casos em que o antígeno de interesse esteja presente em baixas concentrações, faz-se necessário o uso de métodos de amplificação de sinal, dentre eles o uso de marcadores indiretos como o sistema biotina-estrepavidina/avidina (BATES, 1987).

A biotina, por ser uma molécula com baixo peso molecular, pode ser introduzida em macromoléculas biologicamente ativas sem causar prejuízo estrutural ou na atividade, sendo para isso utilizados análogos com modificações

na cadeia original dessa vitamina que favorecem a conjugação (biotinilação). Um dos análogos largamente utilizados é o éster derivado do ácido N-hidroxisuccinimídico, Figura 3 (BECKER et al., 1971; HEITZMANN; RICHARDS, 1974; BAYER; WILCHEK, 1990), sendo a principal vantagem no uso desse composto a reação espontânea com aminas primárias das lisinas, geralmente dando origem a proteínas poli-biotiniladas (HSU et al., 1981).

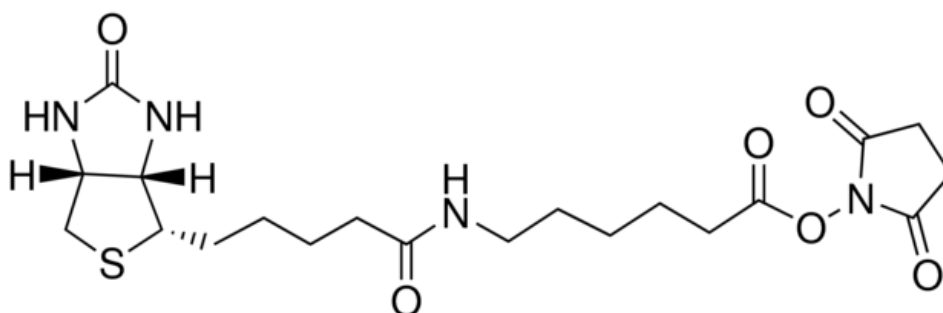


FIGURA 3- Estrutura química do derivado sintético da biotina o éster do ácido biotinamidohexanóico N-hidroxisuccinimídico (biotina-NHS-éster).

Em ensaios de competição, que visam quantificar analitos presentes em baixas concentrações, o antígeno poli-biotinilado consiste na chave para a amplificação do sinal emitido. Ao ligar-se ao anticorpo, o antígeno poli-biotinilado favorece a ligação de um igual número de moléculas de estreptavidina, geralmente conjugadas a 3-6 moléculas de enzima como por exemplo a HRP, ampliando o sinal em até 100 vezes (DIAMANDIS, et al., 1988; PAPANASTASIOU-DIAMANDI et al., 1989) quando comparado ao ELISA do tipo sanduiche (Figura 4).

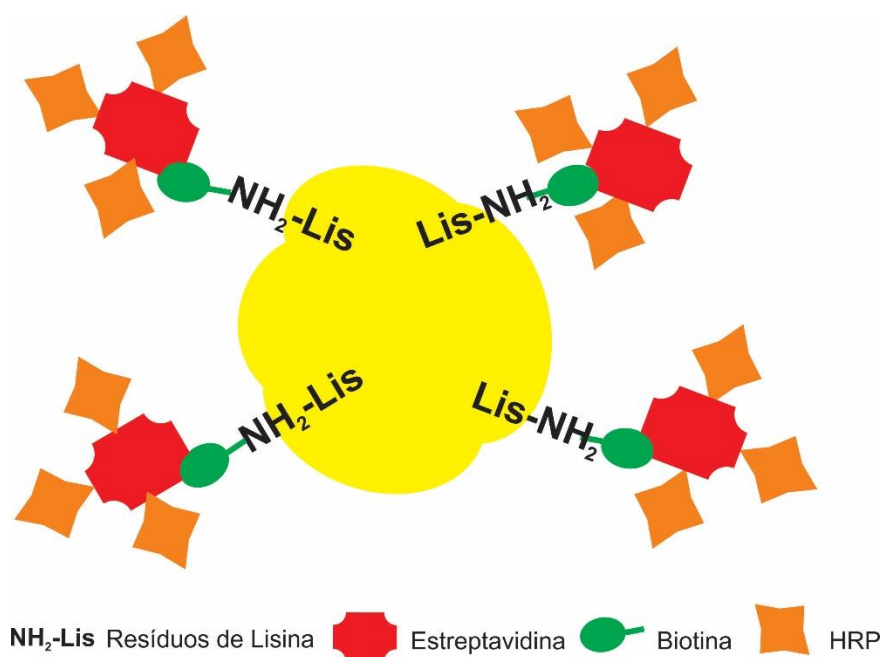


FIGURA 4- Representação esquemática do princípio de amplificação de sinal utilizando a interação biotina-estreptavidina. A estrutura em amarelo representa uma proteína, as aminas primárias presentes nas lisinas foram ligadas a biotina, e essa por sua vez interage com a estreptavidina ligada a 3 ou mais moléculas de HRP, ampliando a capacidade de oxidação do substrato.

Esse sistema de amplificação de sinal, além de apresentar-se como uma alternativa para aumentar a sensibilidade dos imunoenaios, pode ser uma forma de redução de custos, visto que em ensaios mais sensíveis é possível otimizar o uso dos anticorpos específicos, geralmente o item de custo mais elevado.

### **3 HIPÓTESE**

A quantificação de IGF-I total na espécie bovina pode ser realizada por meio de um ensaio de competição utilizando o sistema de amplificação de sinal biotina-estreptavidina peroxidase.

### **4 OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo geral**

Validar um ensaio imunoenzimático para a quantificação de IGF-I total em plasma de bovino.

#### **4.2 Objetivo específico**

Validação do ensaio imunoenzimático para quantificação de IGF-I total, utilizando o sistema de amplificação de sinal biotina-estreptavidina peroxidase em um ensaio competitivo, sendo para isso considerados os seguintes parâmetros:

1. Exatidão;
2. Precisão;
3. Sensibilidade e limite de quantificação inferior;
4. Linearidade;
5. Aplicação em grande escala.



## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Preparação do IGF-I conjugado com biotina

Para a conjugação, a biotina utilizada foi o éster do ácido biotinamidohexanóico N-hidroxisuccinimídico (Biotinamidohexanoic acid N-hydroxysuccinimide ester, Sigma-Aldrich – B2643) e o hormônio foi o h-IGF-I (Sigma-Aldrich- I3769). Inicialmente, foi preparada uma solução de biotina 1 mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO) e 25 µg de IGF-I foram solubilizados em 200 µL de PBS (50 mM NaPO<sub>4</sub> e NaCl 150 mM) pH= 7,4. Em seguida, em um frasco protegido da luz, 29,6 µL da solução de biotina foram misturados com 200 µL da solução contendo o hormônio, sendo respeitada a razão de 20 mol de biotina para cada mol de hormônio (20:1; mol/mol) e então foi realizada uma incubação por 3 horas a temperatura ambiente sob agitação constante.

Ao final da incubação, a conjugação foi interrompida com 20 µL de NH<sub>4</sub>Cl 1M por 30 min à temperatura ambiente, posteriormente, ao conjugado foram adicionados 2 mL de PBS acrescido de BSA 1%.

A biotina livre e o excesso de sais foram removidos por filtração, utilizando uma coluna de centrifugação (Vivaspin 2, GE Healthcare, cat 28-9322-40) com filtro de 3 kDa. Foram realizadas 3 centrifugações a 3000 x g por 50 minutos a 4°C (Eppendorf, modelo 5802R), e a cada centrifugação, o volume do filtrado no interior da coluna era repostado pela adição do mesmo volume de PBS (50 mM NaPO<sub>4</sub> e NaCl 150 mM) pH= 7,4. Por fim, ao hormônio biotinilado foi adicionado glicerol na proporção 1:1 (v/v), e este aliqotado e estocado a -20°C.

Para posterior utilização nos ensaios, o antígeno conjugado teve sua concentração estimada levando-se em consideração a massa de IGF-I utilizada (25 µg) e o volume final obtido (2,9 mL), sendo a concentração estimada de 8,62 µg/mL (Figura 5).

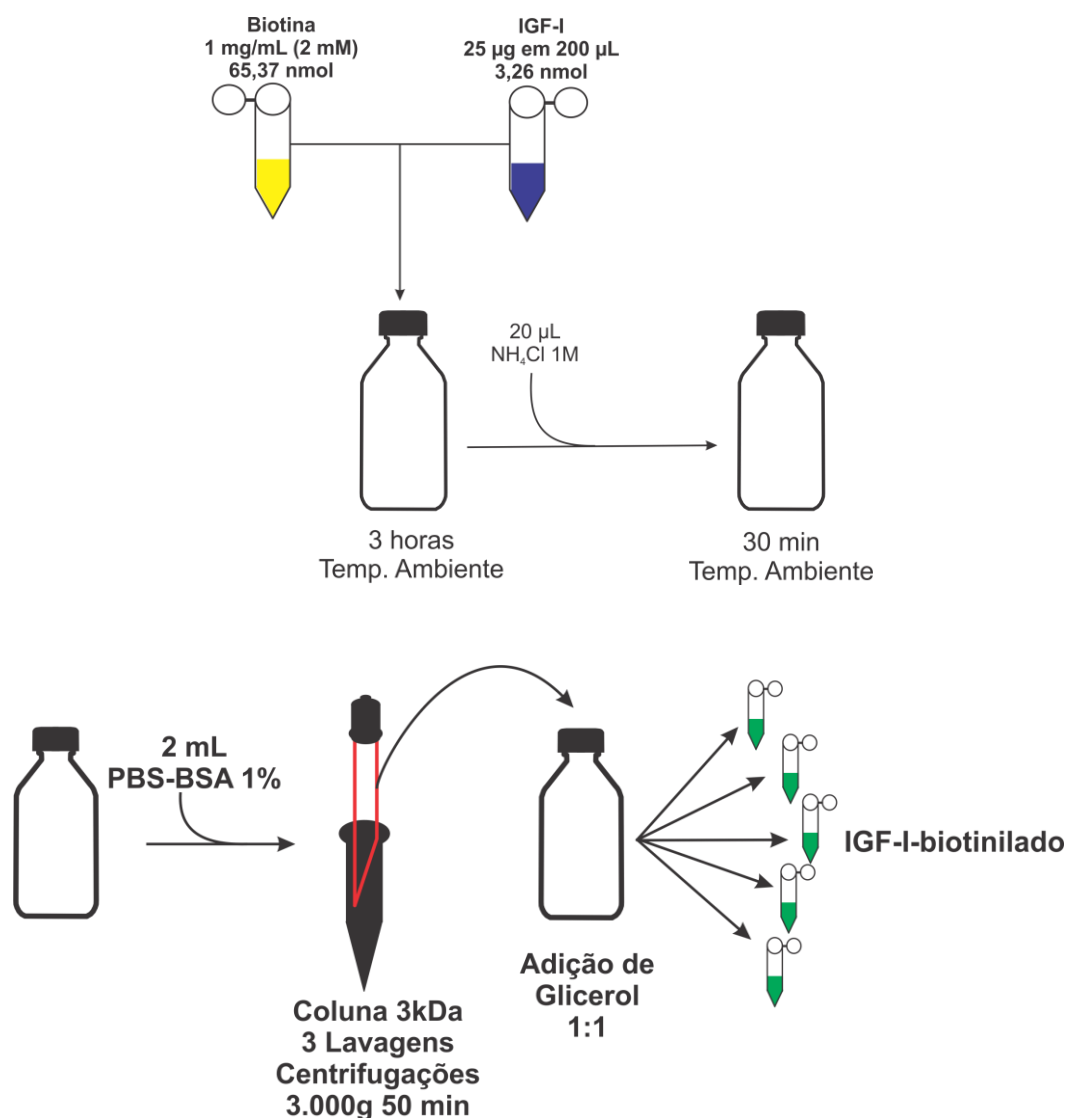


FIGURA 5- Fluxograma do processo de biotilação do IGF-I.

## 5.2 Extração para quantificação de IGF-I total

O método adotado para extração (desligamento do IGF-I da IGFBP) das amostras foi mesmo descrito por Lalman et al. (2000). Em tubos de polipropileno, 12x75 mm, foram adicionados 460 µL de tampão de ensaio, composto por 120 mM de NaCl, 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 10 mM de EDTA, 0,05% de Tween 20, 0,02% de sulfato de protamina e gelatina 1%, pH= 7,3, 10 µL de amostra e 400 µL de tampão glicina 1M pH=3,2. Os tubos foram tampados, o conteúdo

homogeneizado em vórtex multitubos (VWR, modelo VX-2500) e então incubados por 48 horas a 37°C. Após esse período de incubação em meio ácido, o pH foi neutralizado pela adição de 130 µL de NaOH 0,5N.

### **5.3 Preparo das placas (sensibilização e bloqueio)**

Para sensibilização das microplacas, com 96 poços (Nunc, Maxisorp, Thermo Scientific, cat. 80040LE0910), foi utilizada IgG de cabra contra IgG de coelho (Sigma-Aldrich- R2004). A cada poço foram adicionados 100 µL de tampão carbonato 0,0522 M, pH= 9,6 contendo anti-IgG de coelho (em diferentes concentrações). Após incubação “overnight” a 4°C, as placas foram lavadas com 300 µL/poço de solução de Tween 80 0,05% por 2 vezes, utilizando lavadora de microplacas Thermo Scientific (número de referência 5165000).

Posteriormente, foram realizados dois bloqueios dos sítios de ligação remanescentes nos poços, com a adição de 300 µL/poço de PBS-BSA 1%, pH=7,2. A cada bloqueio as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 50 min e submetidas a duas lavagens com solução de Tween 80 0,05%.

## **5.4 Procedimentos adotados para estabelecimento do ensaio**

### **5.4.1 Testes de ligação**

Previamente ao estabelecimento da curva padrão e quantificação de amostras, foram realizadas avaliações para encontrar a melhor combinação entre a concentração do anticorpo específico e o anticorpo de captura bem como a avaliação da funcionalidade do IGF-I após a biotinilação e estabelecer a melhor concentração para utilização nos ensaios.

Foram testados dois protocolos experimentais. **(i)** sensibilização das microplacas com diferentes concentrações de anti- IgG de coelho (0,25, 0,5, 0,75 e 1 µg IgG/poço), seguida da adição de diferentes diluições de anticorpo policlonal anti-h-IGF-I (Hormone & Pituitary Program, Harbor-UCLA Medical Centre, Carson, CA, USA, #AFP4892898) preparadas em tampão de ensaio, seguida pela adição de diferentes concentrações de IGF-I conjugado a biotina (0,06, 0,08, 0,16, 0,32 ng/100 µL/poço) diluído em tampão de ensaio, sendo

então realizada uma incubação a 4°C por 4 horas (Figura 6A); **(ii)** sensibilização das microplacas com diferentes concentrações de anti- IgG de coelho (0,25, 0,5, 0,75 e 1 µg IgG/poço), seguida pela adição simultânea de diferentes diluições de anticorpo anti-hIGF-I e de IGF-I conjugado a biotina (0,04, 0,06, 0,08, 0,16 ng/100 µL/poço) e uma incubação de 24 horas a 4°C (Figura 6B).

Após a incubação com o antígeno marcado, em ambos os sistemas citados, foram realizadas duas lavagens com Tween 80 0,05%, com posterior adição de 2.5 mU de peroxidase/100 µL/poço (Streptavidin-POD conjugate 500 U/mL, Roche). As microplacas foram então protegidas da luz e incubadas por 30 minutos à 4°C. Ao término da incubação as placas foram submetidas a 3 lavagens com Tween 80 0,05%, e então foram adicionados 100 µL/poço de substrato composto por 2 mM 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB), 100 mM de ácido cítrico, 10,63 mM de peróxido de ureia, 126,8 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 4% de DMSO.

As microplacas foram então incubadas a 37°C, protegidas da luz, por 40 minutos e a reação de oxidação do substrato pela enzima foi interrompida pela adição de 30 µL/poço de ácido sulfúrico 2M. A determinação da densidade óptica foi imediatamente realizada, em leitor de microplacas (Sunrise, Tecan, ref. 16039400), utilizando o comprimento de onda de 450 nm.

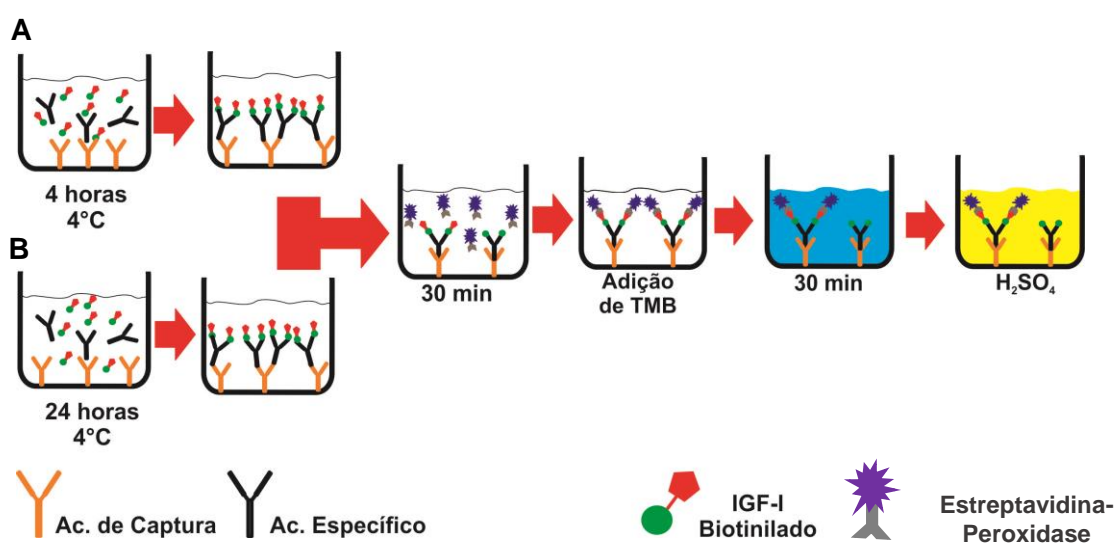


FIGURA 6- Fluxograma dos testes de ligação. (A) Incubação 4 h a 4°C; (B) Incubação de 24 h a 4°C.

#### 5.4.2 Estabelecimento da curva padrão

Após a estimativa das concentrações do anticorpo específico, do anticorpo de captura bem como do antígeno conjugado à biotina, iniciou-se o ajuste da curva padrão.

As concentrações iniciais tinham amplitude entre 2,34 ng/mL a 1000 ng/mL, faixa que de acordo com os resultados apresentados por Cooke et al., (2013) e Buratini et al. (2000) abrangem as variações fisiológicas da concentração de IGF-I no soro de bovinos. As soluções padrão possuíam concentrações equivalentes as citadas acima, porém para sua elaboração foi considerado o fator de diluição de 100 vezes (consequência da adição de reagentes no processo de extração das amostras). Com a inclusão desse fator foi eliminada a necessidade de correção posterior após a quantificação das amostras (Tabela 1).

Tabela 1- Concentração real dos padrões utilizados na curva padrão e o correspondente em ng/mL considerando o mesmo fator de diluição das amostras

<b>Concentração Real dos Padrões (ng/mL)</b>	<b>Concentração correspondente no plasma (ng/mL)</b>
0,0234	2,34
0,0468	4,68
0,0937	9,37
0,1875	18,75
0,375	37,5
0,75	75
1.5	150
3	300
6	600
10	1000

Foram realizados testes com diferentes volumes da curva padrão (20, 40, 60 e 80 µL/poço), com o intuito de identificar o mais adequado para o ensaio. Para isso, os dados foram plotados em gráficos, sendo que no eixo X foram inseridas as concentrações dos padrões convertidas em logaritmo de base 10 e

no eixo Y foram inseridos os valores das densidades ópticas e então foi aplicada a regressão logística de 4 parâmetros.

Os critérios adotados para escolha do volume foram: índice de correlação entre a densidade óptica obtida e as doses  $\geq 0,9$  assim como os valores de IC50 (concentração efetiva do antígeno que provoca a redução de 50% da variação total da densidade óptica).

#### **5.4.3 Ensaio para quantificação de IGF-I**

Foram testados dois protocolos experimentais, sendo a principal variação entre os dois a existência ou não de uma pré-incubação entre as amostras e o anticorpo anti-IGF-I para posterior adição do antígeno marcado.

O primeiro protocolo, com incubação prévia (sem competição), teve início com a sensibilização da microplaca com posterior bloqueio, já descrito. Após esse processo, foram adicionados os padrões, amostras (sendo que nos poços referentes a ligação não específica, ligação, máxima-  $B_0$ - e branco foi adicionado tampão de ensaio ao invés da amostra) e 100  $\mu\text{L}$ /poço do anticorpo anti-IGF-I seguida de incubação de 24 horas a 4°C.

Posteriormente, as placas foram lavadas por duas vezes com solução de Tween 80 0,05%, utilizando a lavadora de microplacas, e então adicionou-se 100  $\mu\text{L}$ /poço do IGF-I biotilado e uma nova incubação a 4°C por 4 horas foi realizada. Ao final desse período, foram realizadas duas lavagens com Tween 80 0,05% e os passos posteriores (adição da peroxidase, substrato e leitura) foram os mesmos adotados nos testes de ligação, previamente descritos (Figura 7).

No segundo protocolo, sem incubação prévia (com competição), após a sensibilização e bloqueio das placas, foram adicionados os padrões, amostras (nos poços referentes à ligação não específica, ligação, máxima ( $B_0$ ) e branco foi adicionado tampão de ensaio), 100  $\mu\text{L}$ /poço do anticorpo anti-IGF-I seguido pela adição de 100  $\mu\text{L}$ /poço do IGF-I biotilado. Após uma incubação de 24 horas a 4°C foram realizadas duas lavagens com Tween 80 0,05%, sendo que

os passos subsequentes (adição da peroxidase, substrato e leitura) foram os mesmos dos testes de ligação (Figura 8).

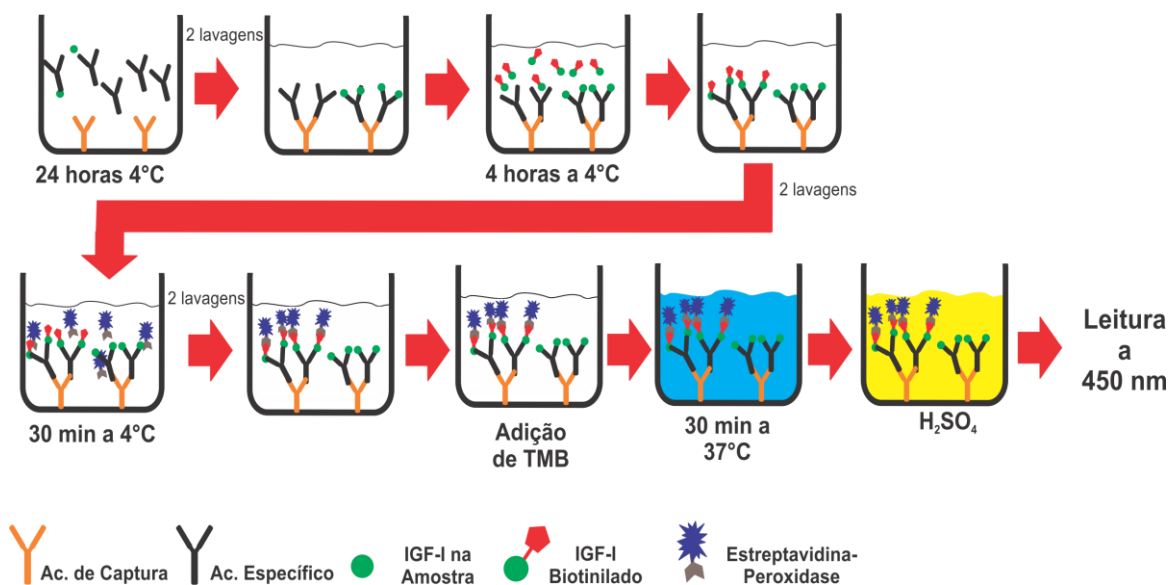


FIGURA 7- Fluxograma adotado para quantificação de IGF-I sem competição

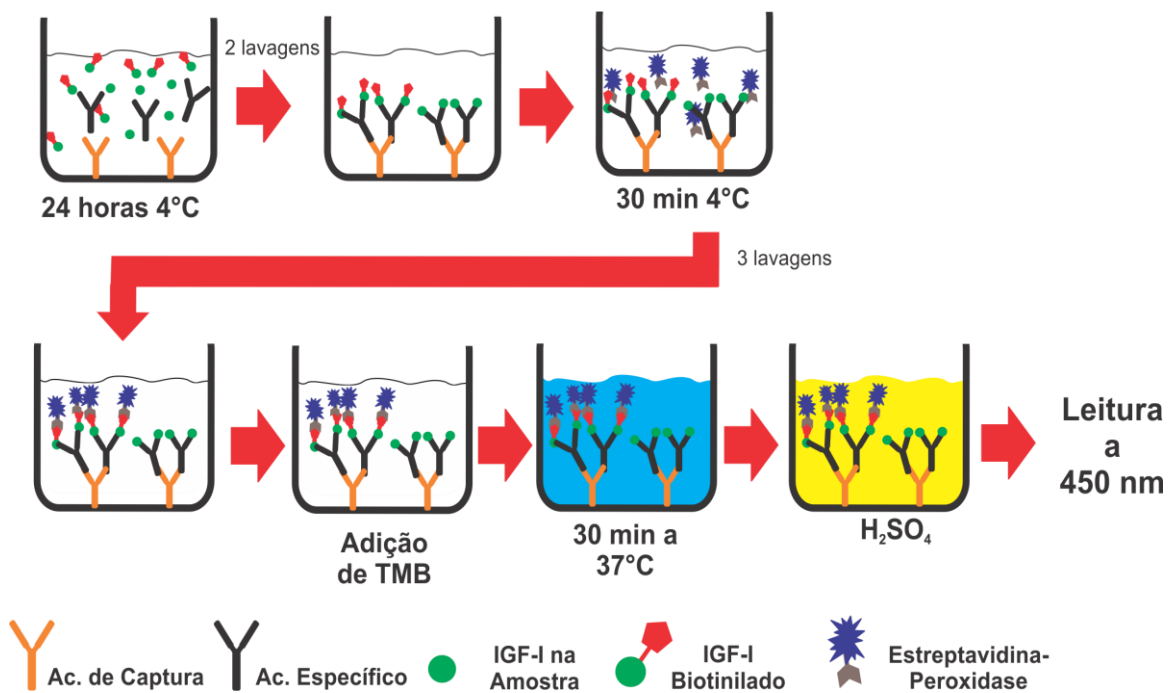


FIGURA 8- Fluxograma adotado para quantificação de IGF-I com competição.

### **5.5. Procedimentos para quantificação de IGF-I total adotados na metodologia comercial**

Dentre os kits de ELISA disponíveis no mercado para quantificação de IGF-I total e considerado como padrão para este estudo foi o fabricado pela empresa Anshlabs (cod. AL-121), que tem como princípio o ELISA do tipo sanduíche.

Previamente a quantificação de IGF-I total as amostras foram submetidas a extração do IGFBP, sendo para isso adicionados em tubos 12x75 mm 240  $\mu$ L do tampão de amostra I (pH= 2) seguido pela adição de 20  $\mu$ L de amostra e uma incubação de 30 min a temperatura ambiente sob agitação constante (300 rpm). Posteriormente foram adicionados 240  $\mu$ L do tampão de amostra II (pH= 11), para neutralização do pH, com nova incubação de 10 min a temperatura ambiente sob agitação constante (300 rpm). Esse procedimento resulta em um fator de diluição de 25 vezes que deve ser acrescentado após a determinação das doses com base na curva padrão.

Posteriormente, em uma placa sensibilizada com anticorpo anti-IGF-I, foram pipetados nos respectivos poços 50  $\mu$ L dos padrões (0; 0,44; 1,47; 4,78; 13,86 e 37,9 ng de IGF-I/mL), controles (alto e baixo) e amostras, seguido pela adição de 100  $\mu$ L de anticorpo anti-IGF-I conjugado com a enzima HRP, sendo realizada uma incubação de 60 min a temperatura ambiente sob agitação constante (600 rpm). Ao final da incubação, foram realizadas 5 lavagens em uma lavadora de microplacas com 350  $\mu$ L de tampão de lavagem fornecido pelo fabricante do kit.

Após as lavagens foi adicionada a solução cromógena contendo TMB, seguida por nova incubação de 9 min a temperatura ambiente, sob agitação constante (600 rpm) e protegida da luz. Ao término da incubação foram adicionados 100  $\mu$ L de solução ácida para interromper a reação e a determinação da densidade óptica foi imediatamente realizada, em leitor de microplacas utilizando o comprimento de onda de 450 nm.



Para o cálculo das concentrações de IGF-I, a D.O. e as concentrações dos calibradores foram convertidos em escala logarítmica e plotadas nos eixos y e x, respectivamente. Com base nessa distribuição foi elaborada uma regressão cúbica e os valores de D.O das amostras convertidos em ng IGF-I/mL, sendo aplicado ao final o fator de correção de 25 vezes. Os coeficientes de variação intra-ensaio foram para os controles alto 7,54% ( $9,25 \pm 0,69$  ng/mL) e para o baixo 11% ( $3,24 \pm 0,35$  ng/mL).

## **5.6 Procedimentos de validação do método in house**

A validação do método para quantificação de IGF-I será baseada sobre o que preconiza a ANVISA, na Resolução RE 899 publicada em 29 de maio de 2003, para testes quantitativos utilizados na determinação de princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias primas, que de acordo com a resolução acima citada enquadra-se na categoria I. Por esse motivo, serão realizados os seguintes parâmetros para a validação da técnica: linearidade, intervalo, precisão e repetibilidade e exatidão.

### **5.6.1 Exatidão e Precisão**

A exatidão foi avaliada através da comparação das concentrações obtidas pelos diferentes protocolos *in house* de ELISA apresentados nesse estudo (com e sem competição) e as obtidas, com as mesmas amostras, utilizando o kit comercial de ELISA adquirido da Anshlabs (cod. AL-121) para quantificação de IGF-I total, seguindo as instruções do fabricante.

Para isso, foram quantificadas 37 amostras de plasma provenientes de 3 novilhas da raça Nelore, coletadas durante os 7 primeiros meses de vida em experimento realizado entre os anos de 2011 e 2013. A quantificação das amostras utilizando o kit comercial foi realizada em duplicata, já as quantificações das amostras com o método *in house* foram realizadas em dois ensaios independentes e em duplicata. As doses obtidas ente as duas metodologias foram correlacionadas, e a diferença percentual calculada.

Além da exatidão foi realizada a avaliação da precisão do método *in house* (avaliado apenas no método com competição). Em uma amostra de plasma

coletada de uma vaca no quarto dia pós-parto (HALDAR et al., 2009) foram adicionados 350 e 100 ng/mL de IGF-I, sendo essas amostras submetidas ao processo de extração e quantificação, juntamente com as amostras dosadas para avaliação do método (item 5.6.3), e utilizadas como controles alto e baixo. A precisão dos ensaios *in house* foi avaliada através do cálculo dos coeficientes de variação das doses obtidas desses controles intra e inter-ensaio.

### **5.6.2 Sensibilidade e limite de quantificação inferior**

A avaliação desses parâmetros foi realizada utilizando o teste de paralelismo, sendo que para o correto estabelecimento desses parâmetros foi levada em consideração a necessidade do processo de extração, por esse motivo a diluição sequencial foi realizada na amostra previamente a extração.

Para isso uma amostra foi dosada utilizando o método *in house* sem ou com diluição sequencial, utilizando como diluente o tampão de ensaio (1:2, 1:4, 1:8; amostra/tampão). Essas amostras foram então extraídas em duplicata e quantificadas em triplicata em 2 ensaios independentes. Os resultados foram comparados com a dose obtida sem diluição e a dose estimada resultante das diluições subsequentes.

### **5.6.3 Avaliação da linearidade do método**

O estudo da linearidade do ELISA *in house* proposto, ou seja, a avaliação da linearidade da variação da densidade óptica em resposta à inclusão de níveis crescentes de IGF-I, foi feita nas 4 curvas padrão realizadas durante os ensaios de quantificação de IGF-I nos testes de aplicabilidade do método (item 5.6.4).

Os passos seguidos para esse estudo foram:

1. Conversão dos valores das concentrações dos padrões utilizados para elaboração da curva em log de base 10.
2. Plotagem dos valores da D.O (eixo y) e das concentrações dos padrões em escala logarítmica (eixo x).
3. Observação da distribuição dos dados e existência de linearidade de resposta.

Em função da ausência de resposta linear, os passos subsequentes adotados foram:

4. Conversão das densidades ópticas dos padrões da curva em porcentagem da ligação máxima (% de  $B/B_0$ ), com posterior transformação utilizando a função LOGIT:

$$Y = \ln\left(\frac{B/B_0(\%)}{100 - B/B_0(\%)}\right)$$

$\ln$ = logaritmo natural, que usa o número de Euler (2,718) como base;

5. Os valores foram novamente plotados em um gráfico, sendo os valores da porcentagem de ligação transformados pela função LOGIT distribuídos no eixo y, e das concentrações dos padrões, em escala logarítmica, no eixo x.
6. Cálculo da regressão linear utilizando o modelo:

$$Y = ax + b$$

$y$ = LOGIT  $B/B_0$  (%);

$a$ = inclinação;

$b$ = intercepto no eixo y quando x é igual a zero.

Os valores calculados pela equação resultante da conversão dos dados foram comparados com a concentração nominal dos padrões e os resíduos (diferença entre as doses nominais e as calculadas) plotados em gráfico para avaliação da dispersão.

Esses resultados foram comparados com os obtidos com a equação logística de 4 parâmetros (método não linear de cálculo das doses).

#### **5.6.4 Avaliação da aplicabilidade da metodologia em larga escala**

A avaliação da aplicabilidade do método *in house* para dosagem de IGF-I foi realizada através da quantificação de amostras de plasma colhidas, em experimento realizado pela equipe do laboratório de Endocrinologia Animal da UNESP de Araçatuba, entre junho de 2011 e maio de 2013. Foram selecionados

4 animais, sendo estas fêmeas, da raça Nelore com o início das coletas de sangue aos 30 dias de vida até o momento da identificação da puberdade ou até os 22 meses, somando assim um total de 1114 amostras.

Durante esse experimento as amostras de sangue venoso, utilizadas para quantificação hormonal, foram colhidas a cada quatro dias e/ou diariamente por 17 dias a cada 60 dias até o término do experimento, em tubos a vácuo com EDTA (Vacutainer®) e refrigerados a 4°C até a separação do plasma em centrífuga (Fanen Exelsa Baby I modelo 206) e as frações do plasma aliqüotadas em duplicata em tubos de 2 ml (Axigen Scientific MCT-200B) e armazenadas em freezer a -20°C até a realização dos ensaios de ELISA.

As quantificações de IGF-I dessas amostras foram realizadas em duplicata/amostra e os resultados apresentados em ng/mL.

### **5.7 Análise estatística**

O modelo estatístico utilizado para análise e elaboração da curva padrão foi a regressão logística de 4 parâmetros. Para avaliação da exatidão do método analítico, foi realizada a correlação de Pearson seguida pela regressão linear, nos testes de linearidade foram realizadas avaliações da distribuição de resíduos. O programa utilizado para os cálculos estatísticos foi o GraphPad Prism, versão 6.0 para Windows.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Testes de ligação

No teste de ligação com incubação de apenas 4 horas a combinação de diluições que resultou em uma densidade óptica próxima a 1.0 foi 0.25 µg de IgG anti-coelho/poço, 0.08 ng de IGF-I conj. biotina/poço e o anticorpo anti-IGF-I na diluição 1:80.000, figura 9 (A). Já no teste de ligação com incubação de 24 horas (Fig. 9 B), foram obtidas densidades ópticas mais elevadas, por esse motivo além das concentrações testadas anteriormente foram testadas diluições maiores do anticorpo (1:160.000, 1:200.000 e 1:250.000) e menores quantidades de IGF-I biotilado (0,04, 0,06, 0,08 e 0,16 ng/poço). Nesse caso, a combinação escolhida foi 0.25 µg de anti- IgG de coelho/poço, 0.06 ng de IGF-I biotilado/poço e o anticorpo anti-IGF-I nas diluições de 1:80.000 a 1:250.000 que resultaram em uma densidade óptica próxima a 2.

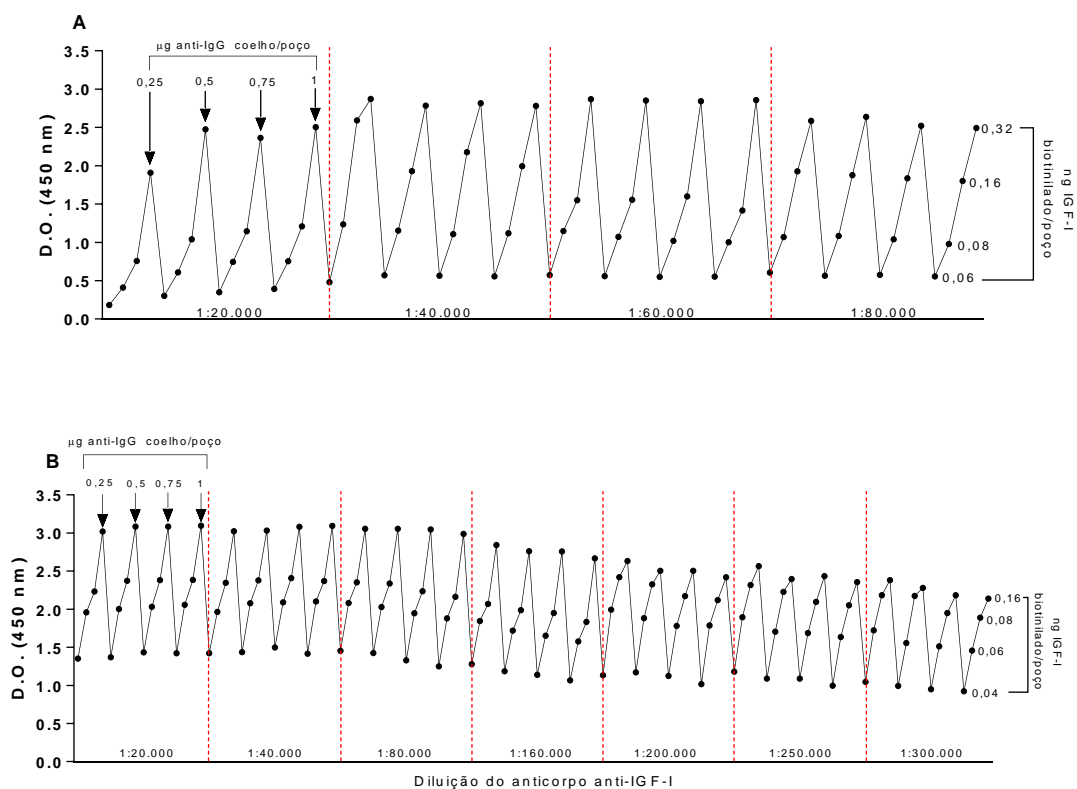


FIGURA 9- Testes de ligação realizados com incubação a 4°C por 4 horas (A) e por 24 horas (B). As setas indicam as diferentes concentrações de anti-IgG de coelho utilizadas para sensibilização dos poços e as linhas pontilhadas delimitam os intervalos das diluições do anticorpo anti-IGF-I.

## 6.2 Curva padrão

Inicialmente, foram elaboradas 11 soluções padrão de IGF-I com concentrações crescentes: 2,34, 4,68, 9,37, 18,75, 37,5, 75, 150, 300, 600, 750 e 1000 ng/mL.

Na figura 10A estão representados os resultados da variação do volume das soluções da curva padrão utilizando apenas o método sem competição. A utilização de 20 ou 40  $\mu\text{L}$  das soluções da curva padrão produziram diminuição na densidade óptica apenas a partir de 300 e a 75 ng/mL, respectivamente.

Os melhores resultados foram obtidos com 60 e 80  $\mu\text{L}$ , que promoveram redução na densidade óptica a partir de 18.75 ng/mL, com coeficientes de correlação e  $r^2$  (entre as doses e a D.O. superiores a 0.9) e variação absoluta na D.O. (D.O. máxima - D.O. mínima) de 0,9625 e 1,0495, respectivamente (Figura 10 A). Todavia ao compararmos os valores da soma de quadrados e o desvio padrão dos resíduos, o uso de 60  $\mu\text{L}$  das soluções padrão apresentou os menores valores para esses parâmetros. Outro aspecto avaliado foi a comparação do IC50, ou seja, a concentração que provoca a redução de 50% da variação total da densidade óptica obtida na curva padrão, e o uso de 60  $\mu\text{L}$  resultou em um IC50 superior ao obtido com 80  $\mu\text{L}$ , sendo assim foi escolhido como volume a ser utilizado para a realização dos ensaios (Tabela 2).

Além do estabelecimento do volume da curva padrão, as soluções com concentrações equivalentes a 2,34; 4,68; 9,37; 750 e 1000 ng/mL foram retirados da curva padrão em virtude da baixa variação na porcentagem de ligação ( $B/B_0$ ), inferior a 3% (Figura 10 B). Sendo assim, as concentrações dos pontos da curva padrão variaram entre 18,75 e 600 ng/mL.

A partir desse ponto, as avaliações começaram a ser realizadas também com o protocolo com competição, utilizando os mesmos parâmetros estabelecidos anteriormente (volume e concentração dos padrões), porém com diferentes diluições de anticorpo anti-IGF-I (1:80.000; 1:160.000; 1:200.000; 1:250.000 e 1:300.000).

Essa modificação resultou em redução na densidade óptica, sendo esta dependente do aumento da diluição do anticorpo anti-IGF-I, assim como na

amplitude de variação da DO (Figura 10 C e D). Os coeficientes de correlação e da regressão no método com competição apresentaram valores numericamente superiores ao método sem competição, além disso houve uma redução nos valores da soma de quadrados, bem como do desvio padrão dos resíduos, principalmente nas diluições de anticorpo 1:250.000 e 1:300.000, e o IC50 dessas curvas apresentou valor similar (Tabela 3).

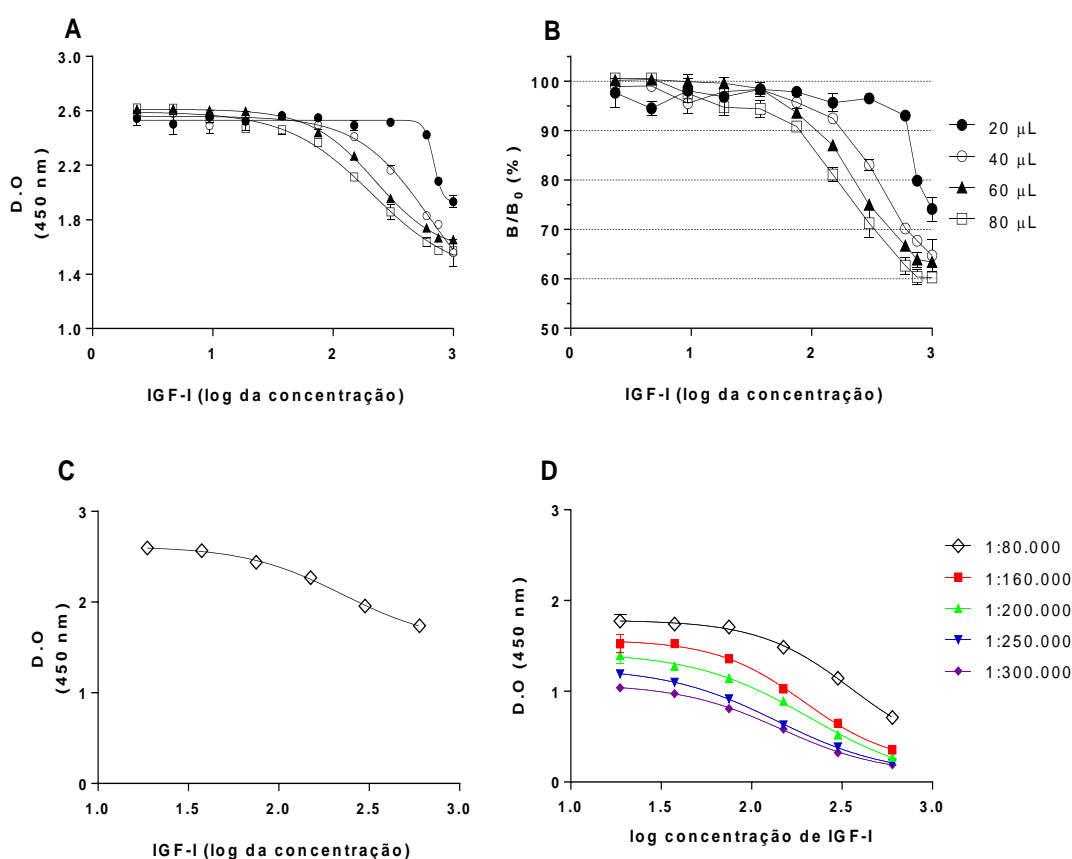


FIGURA 10- Curvas padrão usadas como referência para quantificação de IGF-I. (A) Variação nos volumes dos pontos da curva padrão utilizando o protocolo sem competição. (B) Representação da curva padrão em porcentagem da ligação máxima- B/B<sub>0</sub>. (C) Curva padrão em ensaio sem competição utilizando 60 µL das soluções padrão. (D) Curva padrão em ensaio com competição. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados apresentados como média±D.P.



Tabela 2- Parâmetros avaliados das regressões entre o log da concentração e a variação da densidade óptica para escolha do volume mais indicado dos padrões para elaboração da curva padrão, utilizando o anticorpo anti-IGF-I na diluição de 1:80.000 e o método sem competição

<b>Volume (µL)</b>	<b>Correlação</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>IC50 (ng/mL)</b>	<b>SQ</b>	<b>DP Res</b>
20	-0,6679	0,9483	685,2	0,0491	0,0524
40	-0,8625	0,9881	643,7	0,0347	0,0439
60	-0,9232	0,9978	224,7	0,0075	0,0205
80	-0,9528	0,9905	210,3	0,0354	0,0444

r<sup>2</sup>= coeficiente de regressão; IC50: concentração capaz de provocar 50% do efeito máximo; SQ= soma de quadrados (escala logarítmica); DP Res= desvio padrão dos resíduos (valores absolutos da D.O).

Tabela 3- Parâmetros avaliados das regressões entre o log da concentração e a variação da densidade óptica para estimativa da diluição do anticorpo anti-IGF-I para realização dos testes, utilizando o método com competição

<b>Diluição Anticorpo</b>	<b>Correlação</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>IC50 (ng/mL)</b>	<b>SQ</b>	<b>DP Res</b>
1:80.000	-0,9264	0,9902	240,2	0,1763	0,0469
1:160.000	-0,9661	0,9940	195,8	0,1433	0,0423
1:200.000	-0,9809	0,9933	209,9	0,1329	0,0407
1:250.000	-0,9910	0,9984	207,6	0,0025	0,0178
1:300.000	-0,9877	0,9974	145,4	0,0032	0,0199

r<sup>2</sup>= coeficiente de regressão; IC50: concentração capaz de provocar 50% do efeito máximo; SQ= soma de quadrados (escala logarítmica); DP Res= desvio padrão dos resíduos (valores absolutos da D.O).

### 6.3 Exatidão e Precisão

Com o intuito de avaliar a exatidão do ensaio 37 amostras, com concentrações altas, médias e baixas de IGF-I, foram quantificadas utilizando-se kit comercial e os resultados foram comparados com as concentrações obtidas nos métodos sem competição e com competição do ensaio *in house*.

O ensaio sem competição apresentou concentrações inferiores (entre 90 a 66%) às obtidas com o kit comercial (Figura 11 A e B), contudo o comportamento dos ensaios apresentou similaridade e uma correlação de 0,8065 entre os resultados (Figura 11 C). Já quando foi empregado o método com competição, com diluição do anticorpo específico 1:80.000, as concentrações encontradas foram mais próximas ao método comercial principalmente nas amostras com concentrações de IGF-I elevadas (Figura 12 A e B), e a correlação entre as doses foi de 0,7746 (Figura 12C).

Em função desses resultados, as amostras foram quantificadas novamente utilizando o protocolo com competição, porém utilizando uma diluição maior do anticorpo (1:250.000). Como pode ser observado na Figura 13 (A e B), o aumento na diluição aumentou a exatidão do método, sendo esta comprovada pela maior correlação ( $r=0.945$ ) e pela linha de tendência entre as doses que apresentou  $r^2$  de 0.893 (C).

Como consequência do aumento da exatidão, foi observada uma redução da diferença percentual, uma vez que 78% das amostras apresentaram diferença percentual inferior a 22% entre as doses obtidas com a metodologia *in house* em relação a comercial (Figura 14).

A metodologia com competição e diluição do anticorpo específico de 1:250.000 apresentou boa precisão, pois os coeficientes de variação intra-ensaio para o controle alto e baixo, calculados após 33 ensaios realizados em 4 dias com intervalos de 3 dias (5,8,10 e 10 ensaios), foram de  $9,05 \pm 4,06\%$  (345,8 ng/mL) e  $10,51 \pm 4,86\%$  (131,6 ng/mL), respectivamente. Já os coeficientes de variação inter-ensaio foram de 12,94% para o controle alto e 20,71% para o controle baixo.

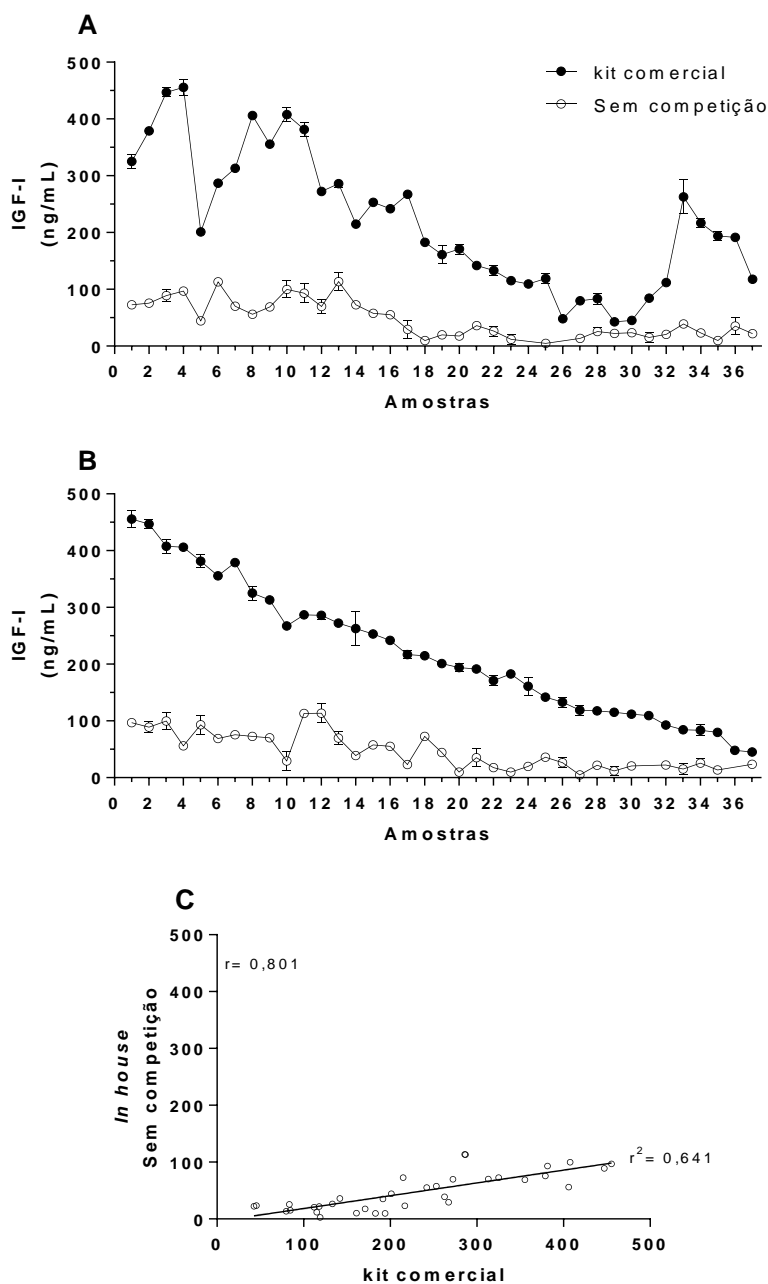


FIGURA 11- Comparativo das concentrações obtidas com o kit comercial e o ensaio *in house* com protocolo ou sem competição. (A) Sequência das amostras utilizadas para dosagem (aleatoriamente); (B) Amostras organizadas de forma decrescente em função da dose encontrada com o kit comercial; (C) Correlação entre as doses obtidas com o kit comercial e a ensaio *in house* sem competição. As dosagens com o kit foram realizadas em duplicata/amostra e as da metodologia *in house* após dois ensaios independentes realizados em duplicata/amostra e os resultados apresentados como média±EPM.

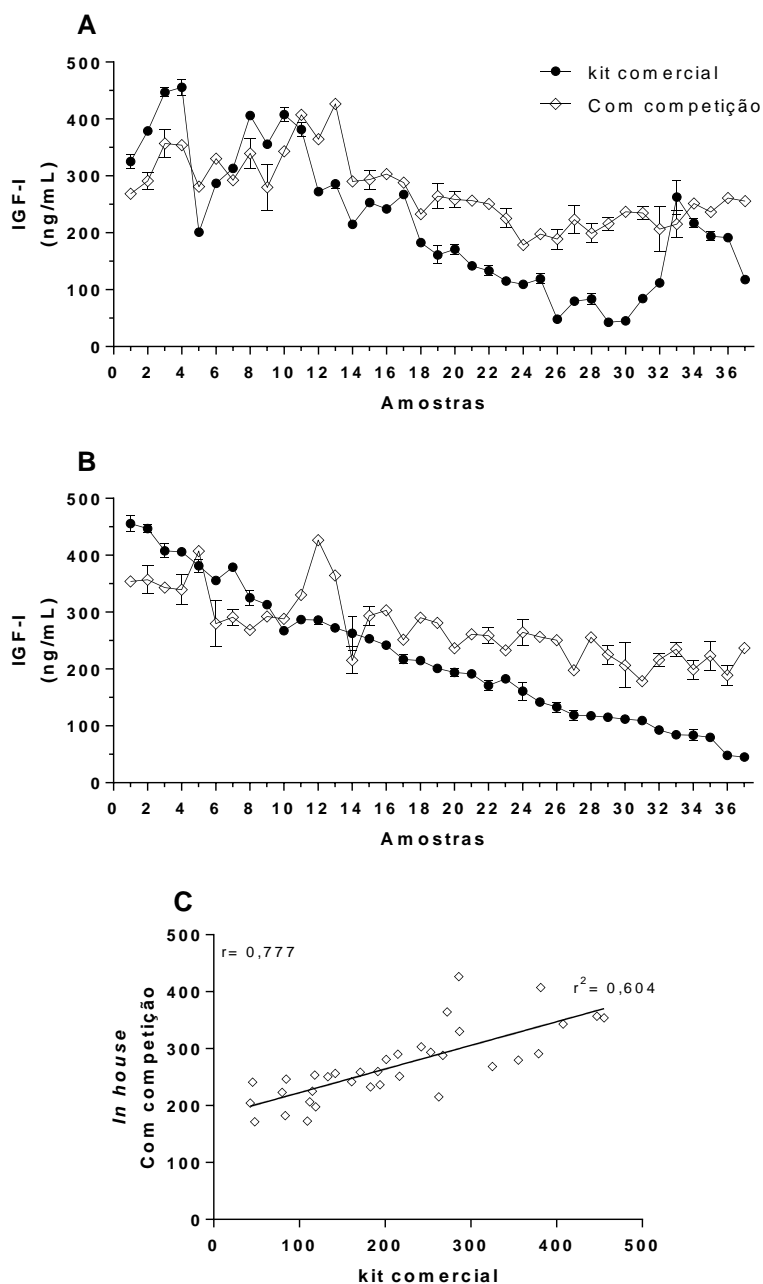


FIGURA 12- Comparativo das concentrações obtidas com o kit comercial e o ensaio *in house* com competição com anticorpo anti-IGF-I na diluição 1:80.000. (A) Sequência aleatória das amostras utilizadas para dosagem; (B) Amostras organizadas de forma decrescente em função da dose encontrada com o kit comercial; (C) Correlação entre as doses obtidas com o kit e ensaio *in house* com competição. As dosagens com o kit foram realizadas em duplicata/amostra e as da metodologia *in house* após dois ensaios independentes realizados em duplicata/amostra e os resultados apresentados como média±EPM.

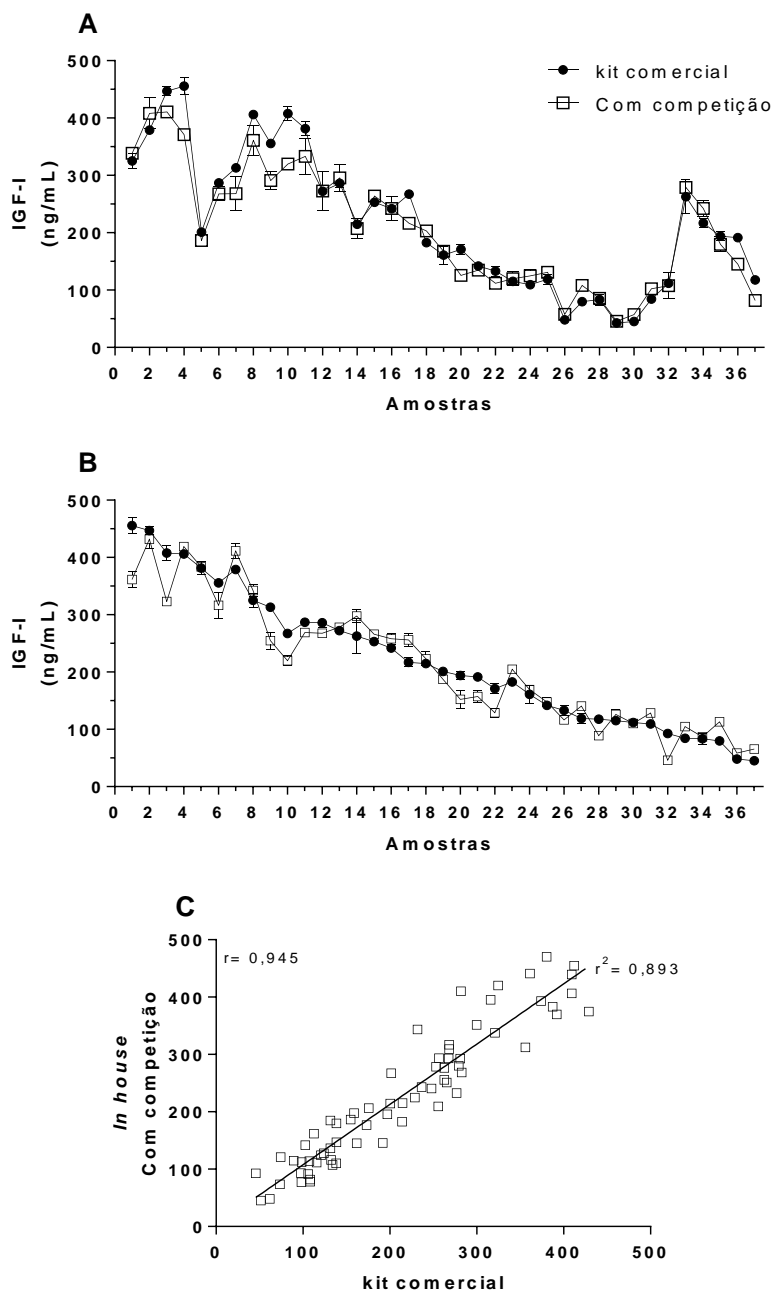


FIGURA 13- Comparativo das concentrações obtidas com a metodologia comercial e ensaio *in house* com competição com anticorpo anti-IGF-I na diluição 1:250.000. (A) Sequência das amostras utilizadas para dosagem; (B) Amostras organizadas de forma decrescente em função da dose encontrada com o kit comercial; (C) Correlação entre as doses obtidas com o kit e a metodologia com competição. As dosagens com o kit foram realizadas em duplicata/amostra e as da metodologia *in house* após dois ensaios independentes realizados em duplicata/amostra e os resultados apresentados como média $\pm$ EPM.

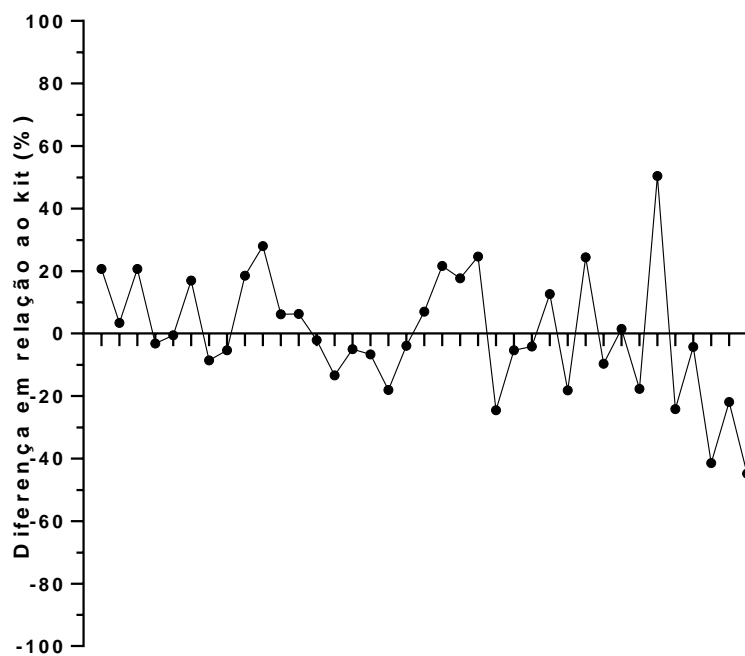


FIGURA 14- Diferença percentual entre as doses obtidas com a metodologia comercial e utilizando o protocolo com competição com anticorpo anti-IGF-I na diluição 1:250.000.

#### 6.4 Sensibilidade e limite de quantificação inferior

Na Tabela 4 estão representados os resultados da análise de paralelismo. As concentrações mensuradas pelo ensaio *in house* apresentaram redução proporcional em função do aumento da diluição da amostra até a razão de 1:8, ou seja, o equivalente a 12,5% do total de IGF-I presente na amostra ( $346,6 \pm 9,19$  ng/mL de IGF-I).

A partir dessa diluição (1:8) a metodologia analítica apresentou início de perda na sensibilidade, sendo por isso estabelecido o limite de detecção próximo a 50 ng/mL.

Tabela 4- Avaliação da sensibilidade através da técnica de paralelismo

Diluição	% da dose total	Valor esperado (ng/mL)	Valor obtido $\pm$ EPM (ng/mL)	% obtida
1	100	346,6	-	100
1:2	50	173,3	$146,6 \pm 4,86$	42,2
1:4	25	86,65	$69,4 \pm 2,68$	20
1:8	12,5	43,32	$46,8 \pm 3,49$	13,5

Os dados apresentados são representativos de 2 extrações com 2 quantificações independentes realizadas em quadruplicata.

Além disso, a sensibilidade entre os métodos analíticos *in house* e comercial também foi avaliada. Para isso foram levados em consideração, o volume, a concentração dos padrões utilizados na curva de calibração e o fator de diluição resultante da extração. Em linhas gerais, para detecção de IGF-I com o kit comercial é necessária uma quantidade aproximadamente 4 vezes maior de IGF-I/poço quando comparado ao ensaio *in house* (Tabela 5), comprovando assim a elevada sensibilidade do ELISA de competição proposto nesse trabalho.

Tabela 5- Comparativo da sensibilidade do método in house em relação ao kit comercial

<i>In house</i>				
<b>Curva padrão (eq. ng/mL)</b>	<b>Inclusão do fator de diluição da extração (100x)</b>	<b>ng de IGF- I/poço (60 µL)</b>	<b>pg de IGF- I/poço</b>	
18,75	0,1875	0,01125	11,25	
37,5	0,375	0,0225	22,5	
75	0,75	0,045	45	
150	1,5	0,09	90	
300	3	0,18	180	
600	6	0,36	360	
<b>Amostras (eq. ng/mL)</b>				
314,62	3,146	0,189	188,772	
360,425	3,604	0,216	216,255	
264,01	2,640	0,158	158,406	
242,275	2,423	0,145	145,365	
97,445	0,974	0,058	58,467	
81,73	0,817	0,049	49,038	
57,505	0,575	0,035	34,503	
57,25	0,573	0,034	34,350	
<b>Kit commercial</b>				
<b>Curva padrão (ng/mL)</b>	<b>Inclusão do fator de diluição da extração (25x)</b>	<b>ng de IGF- I/poço (50 µL)</b>	<b>pg de IGF- I/poço</b>	
0	0	0	0	
0,44	0,44	0,0264	26,4	
1,47	1,47	0,0882	88,2	
4,78	4,78	0,2868	286,8	
13,86	13,86	0,8316	831,6	
37,8	37,8	2,268	2268	
<b>Amostras (eq. ng/mL)</b>				
455,505	18,220	1,093	1093,212	
285,885	11,435	0,686	686,124	
253,33	10,133	0,608	607,992	
241,985	9,679	0,581	580,764	
193,96	7,758	0,466	465,504	
191,35	7,654	0,459	459,24	
48,044	1,922	0,115	115,3056	
45,28	1,811	0,109	108,672	



## 6.5 Linearidade

Como pode ser observado na Figura 15 A, o ensaio in house de quantificação de IGF-I apresentou a variação da D.O. da curva padrão com comportamento não linear, por esse motivo a regressão logística de 4 parâmetros foi aplicada (Figura 15 B). Após a transformação das concentrações dos padrões em log de base 10 e a conversão da D.O em % B/B<sub>0</sub> seguida pela aplicação da função *logit*, os dados passaram a apresentar característica linear (Figura 15C).

No entanto, ao aplicar-se a equação linear para o cálculo das concentrações dos padrões, houve uma maior dispersão dos resíduos em relação a concentração nominal de cada padrão quando comparada com os resultados obtidos com a regressão logística de 4 parâmetros (Figura 16 A e B, respectivamente).

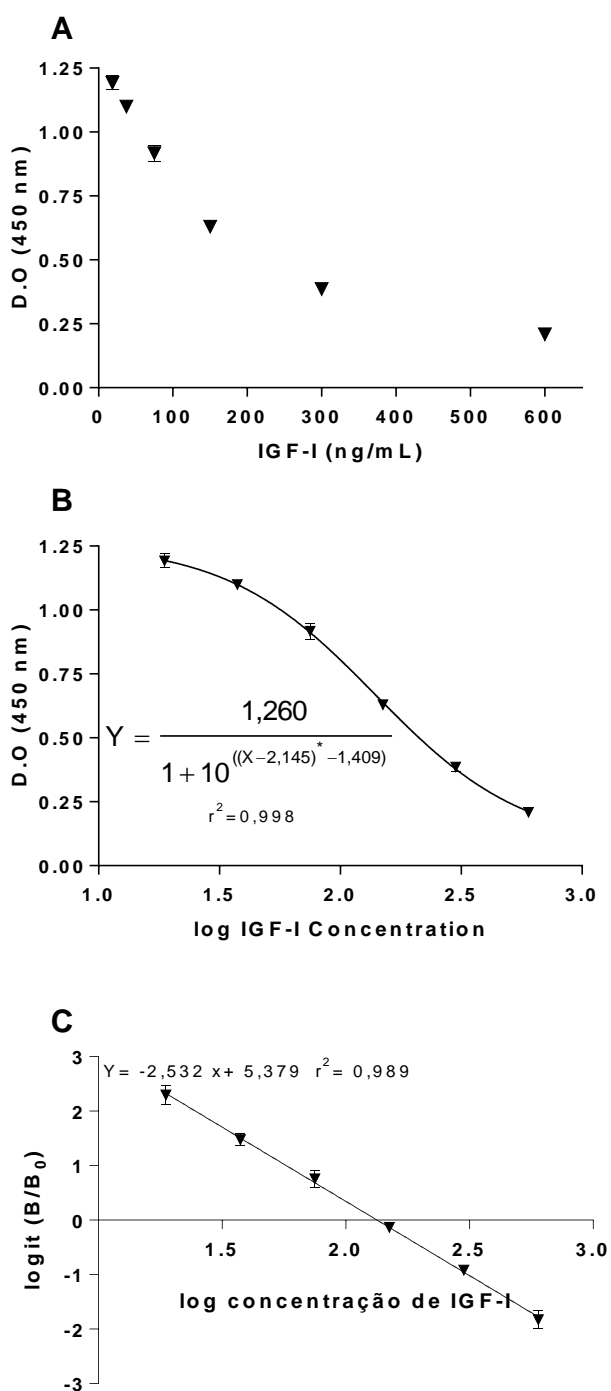


FIGURA 15- Curvas padrão elaboradas utilizando o protocolo *in house* com competição, com anticorpo anti-IGF-I na diluição de 1:250.000. (A) Curva padrão sem transformação; (B) Regressão logística de 4 parâmetros; (C) Regressão linear após linearização dos dados. Os dados, expressos pela média±D.P, são representativos de quatro curvas padrão realizados em 3 dias diferentes e em duplicata.

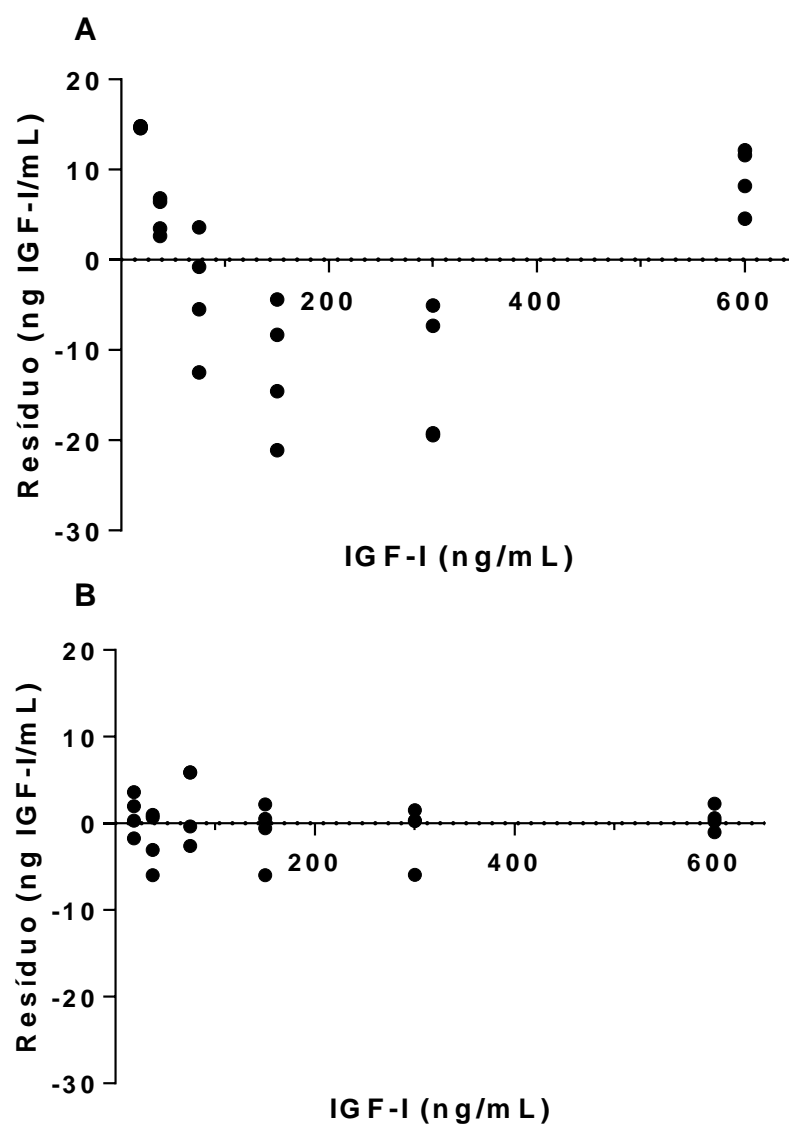


FIGURA 16- Análise da distribuição dos resíduos das doses nominais e das doses calculadas pelas equações da curva utilizando método linear (A) e o não linear (B). Os dados, expressos pela média±D.P, são representativos de quatro curvas padrão realizadas em 3 dias diferentes e em duplicata.

### **6.6 Avaliação da aplicabilidade do método em escala**

Com o intuito de avaliar a aplicabilidade do método, para um grande número de amostras, 1114 amostras foram submetidas a extração e quantificadas em duplicata, sendo estas distribuídas em 33 ensaios, com 36 amostras/ensaio, e 4 controles alto e 4 controles baixo (por ensaio).

O método apresentou capacidade de aplicação na quantificação de um grande número de amostras, sendo sensível o suficiente para o monitoramento das oscilações fisiológicas da concentração desse hormônio durante todo o período de vida dos animais em que foram coletadas as amostras (Figura 17 A, B, C e D). O intervalo estabelecido na curva padrão abrange as faixas normalmente encontradas fisiologicamente e, por fim, os coeficientes de variação entre as duplicatas das amostras apresentaram uma média de  $7,85 \pm 2,17\%$ .

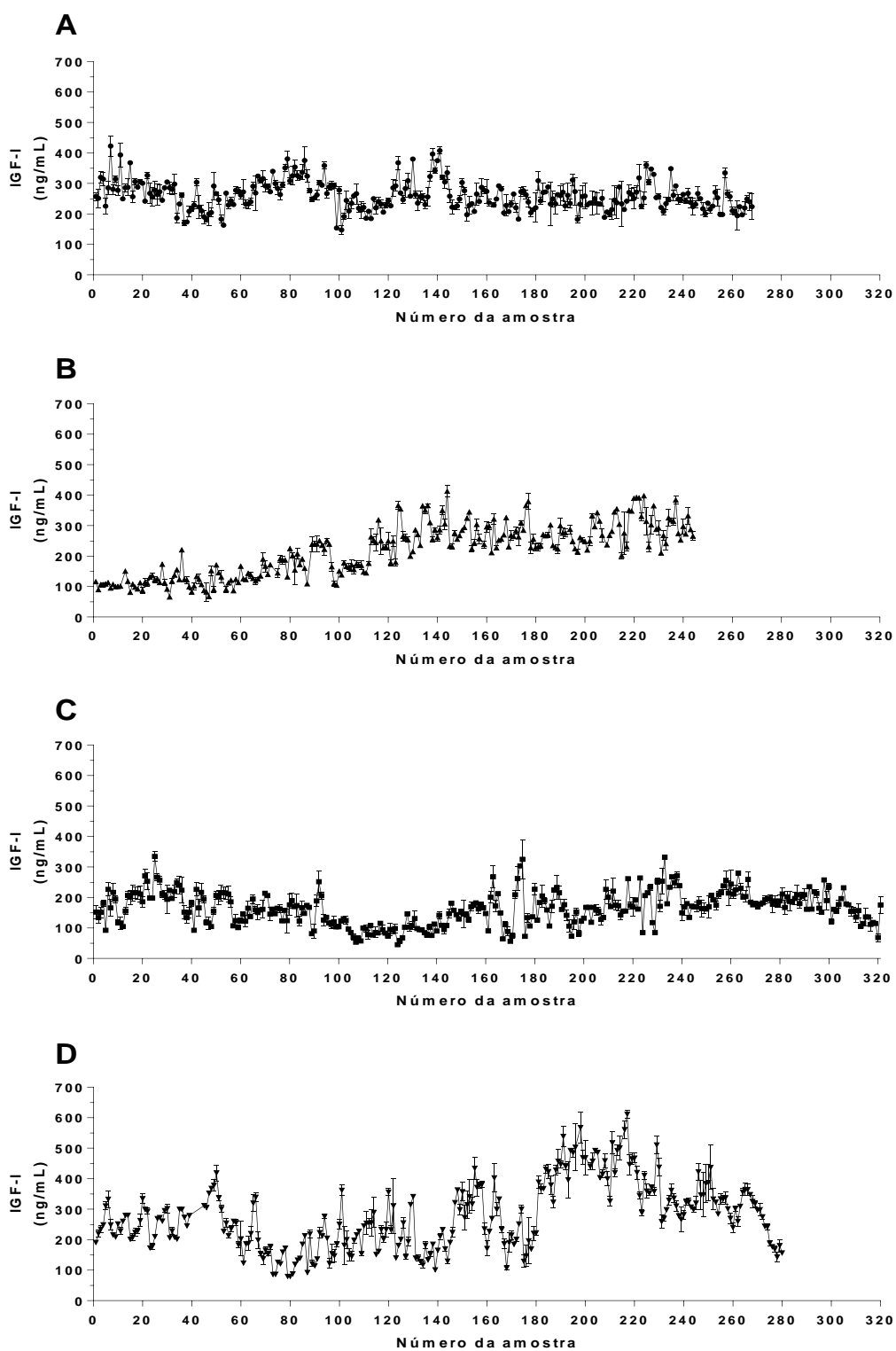


FIGURA 17- Figura ilustrativa das oscilações das concentrações plasmáticas de IGF-I de quatro fêmeas da raça nelore a partir do segundo mês de vida.

## 7 DISCUSSÃO

O método descrito nesse trabalho é pioneiro na quantificação de IGF-I plasmático total utilizando a técnica de duplo anticorpo com o sistema IGF-I-biotina-estreptavidina. Os métodos imunoenzimáticos (ELISA) atualmente disponíveis para quantificação desse hormônio são no sistema sanduíche, que utiliza um anticorpo específico para sensibilização da microplaca e o marcado (específico para outro epítipo do mesmo antígeno) ligado à peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP).

A utilização de um anticorpo de captura (IgG produzidas em cabra contra IgG de coelho) na sensibilização das placas apresenta-se como uma alternativa ao ELISA do tipo sanduíche, uma vez que reduz o coeficiente de variação intra-ensaio e diminui a quantidade de anticorpo específico (MEYER, 1986) utilizado no ensaio.

O primeiro passo para o estabelecimento do ELISA de captura, consistiu na elaboração de testes de ligação que avalia a integridade do antígeno após a biotilação e estima a melhor concentração do segundo anticorpo, do anticorpo específico e do IGF-I biotinilado.

O antígeno biotinilado nesse método apresentou boa capacidade de ligação, na maioria das combinações de diluição dos anticorpos testados e nos diferentes períodos de incubação, uma vez que as densidades ópticas ficaram acima de 1. Isso pode ser justificado pela possível conjugação de mais de uma molécula de biotina em cada molécula de IGF-I, visto que a fonte de biotina utilizada apresenta elevada afinidade com aminas primárias presentes na lisina, e de acordo com Rinderknecht e Humbel (1977) esse hormônio possui 3 lisinas em sua estrutura.

Ainda considerando os resultados dos testes de ligação, a redução das concentrações do anticorpo de captura não foi um dos fatores limitantes (interferiu na DO final), indicando que o sistema de captação do complexo antígeno-anticorpo não foi afetado.

O correto estabelecimento da quantidade de anticorpo anti IgG de coelho a ser utilizada para adsorção na microplaca é importante nesse ensaio de

captura em fase sólida, pois a inserção de grandes quantidades de anti-IgG pode induzir a formação de camadas sobrepostas com menor estabilidade em função das fracas interações das ligações existentes entre as proteínas dos anticorpos, o que compromete a reprodutibilidade do ensaio (BUTLER, 2000).

Ao avaliarmos a influência das diluições do anticorpo específico e do antígeno conjugado à biotina na densidade óptica, foi possível observar que o maior interferente foi a concentração do IGF-I biotilado, e com menor influência as diluições do anticorpo específico, utilizamos então 0,06 ng/mL de IGF-I biotilado e a diluição de diluição 1:80.000 do anticorpo específico.

Após o estabelecimento das proporções dos constituintes principais a serem utilizados nos ensaios, foram elaboradas curvas padrão com diferentes volumes de soluções. Para a escolha do melhor volume, os parâmetros considerados foram o índice de correlação entre a densidade óptica e o aumento das concentrações das soluções padrão ( $r$ ), a confiabilidade da regressão ( $r^2$ ), o valor do IC50, a soma dos resíduos e o desvio padrão dos resíduos.

De acordo com o preconizado pela resolução RE899 (ANVISA, 2003), em testes quantitativos para a determinação de princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias primas (categoria I), os valores de  $r$  e  $r^2$  devem ser iguais ou superiores a 0,9 para utilização da curva como padrão de cálculo das concentrações das amostras. Com a utilização de 60 e 80  $\mu$ L os valores desses coeficientes foram superiores a 0,98.

Os critérios finais para a escolha entre os dois volumes acima citados foram a soma de quadrados e o desvio padrão dos resíduos, pois estas medidas de dispersão indicam o quanto as D.Os. estão distantes da equação traçada (SOUZA, 1998). O uso de 60  $\mu$ L dos calibradores apresentou valores inferiores de SQ e DPRes, por esse motivo foi escolhido como volume a ser utilizado. Além disso, dos 11 padrões estabelecidos inicialmente, foram retiradas da curva as concentrações equivalentes a 2,34; 4,68; 9,37; 750 e 1000 ng/mL.

Com os parâmetros básicos do ensaio já determinados, foi realizada a quantificação do IGF-I de 37 amostras utilizando os métodos com e sem competição com anticorpo específico na diluição de 1:80.000.

O método com competição apresentou doses similares às do kit comercial quando comparado com o método sem competição, todavia em amostras com baixas concentrações de IGF-I houve maior diferença entre as doses detectadas pelo método *in house* na detecção. Com base nesses resultados, o método sem competição deixou de ser utilizado e as quantificações foram novamente realizadas, agora utilizando apenas o método sem prévia incubação e com o anticorpo anti-IGF-I diluído para 1:250.000.

O aumento da diluição do anticorpo específico além de tornar o ensaio com competição mais sensível à detecção de IGF-I, ampliou a exatidão do método sendo obtida uma correlação entre doses de 0,945 e uma diferença percentual menor entre as concentrações apresentadas pelo kit em relação ao método *in house*. Dessa forma, pode-se dizer que a melhora dos resultados foi consequência de uma associação entre a redução da quantidade de anticorpos específicos disponíveis aliada a competição pela ligação entre o antígeno marcado e o presente na amostra.

Contudo, o estabelecimento da competição logo no início do ensaio diverge dos princípios adotados para a quantificação do mesmo hormônio por radioimunoensaio, visto que nas metodologias descritas por Lacau-Mengido et al. (2000), Lalman et al. (2000) e Breier et al. (1991) é realizada uma pré-incubação das amostras com o anticorpo específico para posterior adição do IGF-I marcado com o radioisótopo.

Mesmo com o desenvolvimento de um teste com elevada exatidão, e com uma evidente melhora na sensibilidade, foram realizados testes de paralelismo para comprovação da sensibilidade do método e estabelecimento do limite de quantificação inferior, de acordo com as exigências da resolução publicada pela ANVISA em 2003.

Os testes demonstram que o método para quantificação de IGF-I produziu resultados bem próximos aos teóricos, calculados em função da diluição aplicada antes da extração. Com esse mesmo teste foi possível observar que com diluições superiores a 1:8 (12,5% de amostra e 87,5% de tampão) aplicadas a uma amostra com 346 ng de IGF-I/mL os resultados passaram a ser mais



distantes da dose calculada, sendo estabelecido 50 ng/mL como limite de quantificação inferior, que se encontra bem abaixo das concentrações relatadas na literatura para espécie bovina, que pode variar de 150 a 600 ng/mL (COOKE et al., 2013; BURATINI, 2000; BELTRAN, 2007).

Durante as análises de paralelismo também foram avaliados os possíveis erros provocados pela extração das amostras. Em linhas gerais, o IGF-I produzido pelo fígado antes de ser liberado na corrente sanguínea é ligado à proteína transportadora de fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFBPs) com o intuito de facilitar o transporte e aumentar a meia vida do hormônio (BALLARD et al., 1989; BLUM et al., 1989).

Nesse contexto métodos que objetivam a quantificação de IGF-I total, e não apenas da fração livre, exigem um processo prévio de desligamento do hormônio das IGFBPs. A extração consiste na indução do desligamento pela acidificação da amostra com posterior neutralização, sendo amplamente difundidos os métodos que utilizam etanol-ácido (BREIER et al., 1991) e o tampão glicina acidificado (LALMAN et al., 2000). No presente estudo, a extração foi realizada utilizando o tampão glicina 1M acidificado seguido da neutralização com NaOH. A principal razão da escolha desse método foi a ausência de etanol, uma vez que o uso de álcoois (principalmente com dois ou mais carbonos) pode alterar a conformação proteica dificultando a interação com o anticorpo nos sistemas imunoenzimáticos (Von MALTZAN; PRUET, 2011).

A extração com tampão glicina se apresentou como alternativa viável para quantificação de IGF-I por ELISA, pois não exerce nenhum efeito negativo sobre a interação do antígeno com o anticorpo além de induzir eficientemente o desligamento do hormônio de sua proteína transportadora.

Para fins de comparação, a sensibilidade da metodologia comercial foi comparada com a *in house*, e ficou claro que o uso do sistema de amplificação de sinal biotina-estreptavidina em ensaios de competição necessita de 4 vezes menos hormônio/poço para produzir os mesmos resultados do ELISA tipo sanduíche, já que a diluição do método de extração com glicina é de 100 vezes e o do kit comercial de apenas 25 vezes.

Dentre as inúmeras variações disponíveis em ensaios imunoenzimáticos, o ELISA do tipo sanduíche é reconhecido como o de maior especificidade, pois o uso de dois anticorpos específicos (um adsorvido a fase sólida e o outro ligado a HRP) amplia a especificidade na detecção do antígeno de interesse (GAN; PATEL, 2013). Comparando à especificidade do método *in house* de competição em relação ao kit, a proximidade encontrada entre as doses indica que não houve perda da especificidade mesmo utilizando apenas um anticorpo específico policlonal nos ensaios.

De acordo com a RE899 (ANVISA, 2003), outro parâmetro que deve ser considerado durante a validação de ensaios quantitativos é a linearidade, ou seja, a variação nas concentrações do analito devem produzir resposta linear e caso essa não exista deve se realizar transformação matemática para que essa seja atingida. Uma das características de ensaios imunológicos é a ausência de resposta linear e uma das transformações mais utilizadas para a linearização de dados é a *Log-Logit* (DESHPANDE, 1996).

Ao aplicar essa transformação nas DOs da curva, os dados passaram a apresentar linearidade, ainda assim, foi realizada uma análise da dispersão dos resíduos das doses calculadas pela equação linearizada e as concentrações nominais dos padrões utilizados na curva de calibração, e posteriormente o mesmo foi realizado utilizando um método não linear (regressão logística de 4 parâmetros).

A dispersão dos resíduos quando aplicada a linearização apresentou maior heterogeneidade de distribuição, principalmente nos extremos da curva padrão, sendo observado o oposto com a regressão logística. Essa heterogeneidade de distribuição indica que a equação não intercepta corretamente os pontos nos extremos da curva, provocando alteração na inclinação da equação e aumentando o nível de imprecisão.

Sendo assim, o modelo mais adequado para conversão da densidade óptica das amostras para doses foi o não linear, e mesmo apresentando característica não desejável pela resolução da ANVISA, a norma do INMETRO

DOQ-CGRE-008 (INMETRO, 2007) permite a utilização desse tipo de modelo para métodos analíticos que apresentam resposta não linear.

Ao aplicarmos a metodologia proposta em um grande número de amostras, essa apresentou-se como uma ferramenta viável, pois apresentou capacidade de detecção das alterações desse hormônio durante todas as fases de desenvolvimento dos animais (2 aos 20 meses) e os coeficientes de variação intra e inter-ensaio próximos aos exigidos pela ANVISA (2003) que estipula que os coeficientes de variação devem ser de até 20% para controle alto e de 15% para o controle baixo. Além disso, foi observado um coeficiente de variação entre as duplicatas de 7,86%, indicando uma boa repetibilidade entre as duplicatas.

Por fim, vale a pena ressaltar o custo benefício da aplicação da metodologia *in house* para a quantificação de IGF-I, pois geralmente os experimentos realizados na área de produção e reprodução animal são realizados com um número muito grande de repetições, muitas vezes inviabilizando a quantificação do hormônio.

Após uma busca em fabricantes de kits para quantificação de IGF-I, foi observada uma faixa de preço que varia de R\$ 1.934,00 (h-IGF-I, Sigma Aldrich) a R\$ 2.890,00 (bovine-IGF-I, MyBioSource), o que representa um custo por amostra de R\$ 48,35 e R\$ 72,45/amostra, respectivamente. O custo/amostra na metodologia *in house* é de R\$ 2,28, o que representa uma economia de no mínimo 95%.

Dessa forma, conclui-se que a metodologia imunoenzimática para quantificação de IGF-I total utilizando o sistema de amplificação biotina-estreptavidina peroxidase em um ensaio competitivo está estabelecida e apresenta-se como uma ferramenta útil para estudos que visem o monitoramento das concentrações de IGF-I.

## 8 REFERÊNCIAS

ANDOH, T. Development of non-radioisotopic immunoassay systems for measuring flounder IGF-I. **Zoological Science**, v.22, p. 1023-1030, 2005.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resoluções. Portaria nº 238. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1513>. Acesso em: 5 de fevereiro de 2015.

AVRAMEAS, S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. **Immunochemistry**, v. 6, p. 43-52, 1966.

BALLARD, J.; BAXTER, R.; BINOUX, M.; CLEMMONS, D.; DROP, S.; HALL, K.; HINTZ, R.; RECHLER, M. RUTANEN, E.; SCHWANDER, J. On the nomenclature of IGF-I binding proteins. **Acta Endocrinologica**, v. 121, p. 751-752, 1989.

BATES, D.L. Enzyme amplification in diagnostics. **Trends in Biotechnology**, v. 5, p. 204-209, 1987.

BAYER, E.A.; WILCHEK, M. Protein biotinylation. **Methods in Enzymology**, v. 184, p. 138-160, 1990.

BECKER, J.M.; WILCHEK, M.; KATCHALSKI, E. Irreversible inhibition of biotin transport in yeast by biotinyl-p-nitrophenyl ester. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 68, p. 2604-2607, 1971.

BELTRAN, M.P. **Possíveis efeitos da leptina e IGF-I plasmáticos sobre a puberdade e a precocidade sexual de novilhas Nelore (Bos taurus indicus)**. São Paulo, 2007. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2007.

BERSON, S.A.; YALOW, R.S., BAUMAN, A.; ROTHSCHILD, M.A., NEWERLY, K. Insulin I131. Metabolism in human subjects: demonstration of insulin binding

globulin in the circulation of insulin-treated subjects. **J. Clin. Invest**, v. 35, p. 170-190, 1956.

BLUM, W.F.; JENNE, E.W.; REPPIN, F.; KIETZMANN, K.; RANKE, M.B.; BIERICH, J.R. Insulin-like growth factor I (IGF-I)-binding protein complex is a better mitogen than free IGF-I. **Endocrinology**, v. 125, p. 766-772, 1989.

BREIER, B.H.; GALLAHER, B.W.; GLUCKMAN, P.D. Radioimmunoassay for insulin-growth factor-I: solutions to some potential problems and pitfalls. **Journal of Endocrinology**, v.128, p. 347-357, 1991.

BURATINI JUNIOR, J.; PRICE, C.A.; VISINTIN, J.A.; BÓ, G.A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**, v. 54, p. 21-431, 2000.

BUTLER, J.E. Solid supports in enzyme-linked Immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays. **Methods**, v. 22, p. 4-23, 2000.

BUTLER, J.E.; LÜ, E.P.; NAVARRO, P.; CHRISTIANSEN, B. Comparative studies on the interaction of proteins with a polydimethylsiloxane elastomer. I. Monolayer protein capture capacity (PCC) as a function of protein pI, buffer pH and buffer ionic strength. **Journal of Molecular Recognition**, v. 10, p. 36–51, 1997.

CANTARERO, L.A.; BUTLER, J.E.; OSBORNE, J.W. The adsorptive characteristics of proteins for polystyrene and their significance in solid-phase immunoassays, **Analytical Biochemistry**, v. 105, p. 375-382, 1980.

CHAIET, L.; MILLER, T.W.; TAUSIG, F.; WOLF, F.J. Antibiotic Msd-235. II. Separation and purification of synergistic components. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v. 161, p. 28-32, 1963.

COOKE, R.F; BOHNERT, D.W.; FRANCISCO, C.L.; MARQUES, R.S.; MUELLER, C.J.; KEISLER, D.H. Effects of bovine somatotropin administration on growth, physiological, and reproductive responses of replacement beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 2894-2901, 2013.

DARWISH, I.A. immunoassay methods and their applications in pharmaceutical analysis: basic methodology and recent advances. **International Journal of Biomedical Science**, v.2, p. 217-235, 2006.

DAY, M.L.; IMAKAWA, K.; WOLFE, P.L.; KITTOK, R.J.; KINDER, J.E. Endocrine mechanism of puberty in heifers. Role of hypothalamus-pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion. **Biology of Reproduction**, v. 37, p. 1054–1065, 1987.

DESHPANDE, S.S. **Enzyme immunoassays from concept to product development**. Nova Iorque: Chapman and Hall, 1996.

DIAMANDIS, E.P.; BHAYANA, V.; CONSWAY, K.; REICHSTEIN, E.; PAPANASTASIOU-DIAMANDI, A. Time-resolved fluoroimmunoassay of cortisol in serum with europium chelate as label. **Clinical Biochemistry**, v. 21, p. 291-296, 1988.

DIAMANDIS, E.P.; CHRISTOPOULOS, T.K. The Biotin-(Strept)Avidin System: Principles and Applications in Biotechnology, **Clinical Chemistry**, v. 37, p. 625-636, 1991.

DONAVAN, B. T.; VAN DER WERFF, J. J. B. Precocious puberty in rats with hypothalamic lesions. **Nature**, v.178, p. 745, 1956.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay for immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, p. 871-874, 1971.

FREITAG, S.; LE TRONG, I.; KLUMB, L., STRAYTON, P.S.; STENKAMP, R.E. Structural studies of the streptavidin binding loop. **Protein Science**, v.6, p.1157-1166, 1997.

GAN, S.D.; PATEL, D.R. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, p. 1-3, 2013.

GARCIA, M.R.; AMTALDEN, M.; WILLIAMS, S.W.; STANKO, R.L.; MORRISON, C.D.; KEISLER, D.H.; NIELSKI, S.E.; WILLIAMS, G.L. Serum leptin and its

adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 60, p.2158-2167, 2002.

GARCIA-SEGURA, L.M.; MCCARTHY, M.M. Minireview: role of glia in neuroendocrine function. **Endocrinology**, v. 145, p. 1082-1086, 2004.

GOODMAN, R.L.; LEHMAN, M.N.; SMITH, J.T.; COOLEN, L.M.; DE OLIVEIRA, C.V.; JAFARZADEHSHIRAZI, M.R.; PEREIRA, A.; IQBAL, J.; CARATY, A.; CIOFI, P.; CLARKE, I.J. Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. **Endocrinology**, v. 148, p. 5752–5760, 2007.

GREEN, N.M. Avidin and streptavidin. **Methods in Enzymology**, v. 184, p. 51-67, 1990.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. p. 513.

HALDAR, A.; PAUL, R.; PAN, S.; MITRA, A.; BISWAS, C.; MAJUMDAR, D.; GOSH, S.; SINGH, N.P.; NGACHAN, S.V.; BAJURBHORUEA, K.M.; PRAKASH, B.S. Validation of a simple, sensitive enzyme immunoassay (EIA) for the determination of caprine plasma LH. **Small Ruminant Research**, v. 84, p. 22-27, 2009.

HARVEY, D. **modern analytical chemistry**. 1. ed. Nova Iorque: McGraw-Hill Companies, Inc., 2000. Cap. 5, p. 105-134.

HEITZMANN, H.; RICHARDS, F.M. Use of the avidin-biotin complex for specific staining of biological membranes in electron microscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 71, p. 3537-3541, 1974.

HINEY, J.K.; SRIVASTAVA, V.K.; LES DEES, W. Insulin-like growth factor-1 stimulation of hypothalamic KiSS-1 gene expression is mediated by Akt: effect of alcohol. **Neuroscience**, v. 16, p. 625-632, 2010.

HOHLWEG, W.; DOHRN, M. Über die beziehungen zwischen hypophysenvorderlappen und keimdrusen. **Klin Wochenschr**, v. 11, p. 233-235, 1932. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Ed.) **The physiology of reproduction**. 2 ed. Nova Iorque: Raven Press, 1994. 1699-1737.

HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 29, p. 577-580, 1981.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/laboratórios/calibEnsaio.asp>. Acesso em: 20 de dezembro de 2015.

KETELSLEGERS, J.M.; MAITER, D.; MAES, M.; UNDERWOOD, L.E.; THISSEN, J.P. Nutritional regulation of insulin-like growth factor I. **Metabolism**, v. 44, p. 50-57, 1995.

KINDER, J.E.; DAY, M.L.; KITTOCK, R.J. Endocrine regulation of puberty in cows and ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 34, p. 167-186, 1987.

LACAU-MENGIDO, I.M.; MEJIA, M.E.; DÍAZ-TORGA, G.S.; GONZALEZ IGLESIAS, A.; FORMÍA, N.; LIBERTUN, C.; BECÚ-VILLALOBOS, C. Endocrine studies in ivermectin-treated heifers from birth to puberty. **Journal of Animal Science**, v.78, p. 817-824, 2000.

LALMAN, D.L.; WILLIAMS, J.E.; HESS, B.W.; THOMAS, M.G.; KEISLER, D.H. Effect of dietary energy on milk production and metabolic hormones in thin primiparous beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 530-538, 2000.

LAURENT, V.; LINDBERG, I. Mini-RIA: adaptation of conventional <sup>125</sup>I-labeled radioimmunoassay to a 96-tube format. **Analytical Biochemistry**, v. 309, p. 143-149, 2002.

LEPAGE, R.; ALBERT, C. Fifty years of development in the endocrinology laboratory. **Clinical Biochemistry**, v. 39, p. 542-557, 2006.



LEQUIN, R.M. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). **Clinical Chemistry**, v. 51, p. 2415-2418, 2005.

MAYER, C.; ACOSTA-MARTINEZ, M.; DUBOISB, S.L.; WOLFEC, A.; RADOVICKC, S.; BOEHMA, U.; LEVINE, J.E. Timing and completion of puberty in female mice depend on estrogen receptor  $\alpha$ -signaling in kisspeptin neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, p. 22693–22698, 2010.

MEYER, H.H.D. Possibilities to improve enzyme immunoassay (EIA) techniques and their application in animal production. In: **Proceedings of International Symposium on the Use of Nuclear Techniques in Studies of Animal Production and Health in Different Environments**. Vienna: International Atomic Energy Agency (IAEA), 1986. p. 255-262.

MORAN, C.; QUIRKE, J.F.; ROCHE, J.F. Puberty in heifers: a review. **Animal Reproduction Science**, v. 18, p. 167–182, 1989.

YALOW, R. Radioimmunoassay: a probe for fine structure of biological systems. In: LIDSTEN, J. (Ed.) **Nobel Lectures: Physiology or medicine 1971-1980**. Singapura: World Scientific Publishing Co., 1992. Disponível em: <[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1977/yalow-lecture.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1977/yalow-lecture.html)>. acesso em: 27 jan. 2015.

PAPANASTASIOU-DIAMADI, A.; CONWAY, K.; DIAMANDIS, E.P. Digoxin immunoassay with monoclonal and polyclonal antibodies using time-resolved fluorometry. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 78, p. 617-621, 1989.

PETERSEN, S.L.; OTTEM, E.N.; CARPENTER, C.D. Direct and Indirect Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons by Estradiol. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1771–1778, 2003.

PORSTMANN, T.; KIESSIG, S.T. Enzyme immunoassay techniques An overview. **Journal of Immunological Methods**, v. 150, p. 5-21, 1992.

POWER, M.J.; GOSLING, J.P.; FOTTRELL, P.F. Radioimmunoassay of osteocalcin with polyclonal and monoclonal antibodies. **Clinical Chemistry**, v. 35, p. 1408-1415, 1989.

RDCLIFF, R.P.; VANDEHAAR, M.J., KOBAYASHI, Y.; SHARMA, B.K.; TUCKER, H.A.; LUY, M.C. Effect of dietary energy and somatotropin on components of the somatotrophic axis in Holstein heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p.1229-1235, 2004.

RINDERKNECHT, E.; HUMBEL, R.E. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor i and its structural homology with proinsulin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 2769-2776, 1977.

ROBINSON, T.J. Reproduction in cattle. In: COLE, H.H.; CUPPS, P.T. **Reproduction of domestic animals**. 3 ed. Nova Iorque: Academic Press, 1977. p. 433-441.

SHIVERS, B.D.; HARLAN, R.E.; MORRELL, J.I.; PFAFF, D.W. Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurones. **Nature**, v. 304, p.345–347, 1983.

SIMPSON, R.B.; ARMSTRONG, J.D., HARVEY, R.W.; MILLER, D.C.; HEIMER, E.P.; CAMPBELL, R.M. Effect of active immunization against growth hormone-releasing factor on growth and onset of puberty in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 4914-4924, 1991.

SOUZA, G. **Introdução aos modelos de regressão linear e não-linear**. Brasília: Embrapa-SPI, 1998.

STAYTON, P.L.S.; NELSON, K.E.; McDEVITT, T.C.; BULMUS, V.; SHIMOBOJI, T.; DING, Z.; HOFFMAN, A.S. Smart and biofunctional streptavidin. **Biomolecular Engineering**, v. 16, p. 93-99, 1999.

VAN WEEMEN, B.K.; SCHUURS A.H.W.M. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 15, p. 232-236, 1971.

VOLLER, A.; BARTLETT, A.; BIDWELL, D.E. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. **Journal of Clinical Pathology**, v. 31, p. 507-520, 1978.

Von MALTZAN, K.; PRUETT, S.B. ELISA assays and alcohol: increasing carbon chain length can interfere with detection of cytokines. **Alcohol**, v. 45, p. 1-9, 2011.

WALKER, D.M.; KIRSON, D.; PEREZ, L.F.; GORE, A.C. Molecular profiling of postnatal development of the hypothalamus in female and male rats. **Biology of Reproduction**, v. 87, p. 1-12, 2012.

YAKAR, S.; LIU, J.L.; STANNARD, B.; BUTLER, A.; ACCILI, D.; SAUER, B.; LEROITH D. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 7324-7329, 1999.

YALOW, R.S.; BERSON, S.A. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. **Nature**, v. 184, p. 1648-1649, 1959.