

Bioensaio de hormônio de crescimento humano por incremento de peso de ratos hipofisectomizados: análise computadorizada de esquemas fatoriais 2x2

ESTHER PILTCHER HABER, SÉRGIO DALMORA, ELSIE NEIVA DOMINGUES DA SILVA, EMIKO MURAMOTO, PAULO BARTOLINI

INTRODUÇÃO

O bioensaio *in vivo* de incremento de peso corpóreo total em ratos hipofisectomizados tem sido descrito pelo WHO Expert Committee on Biological Standardization⁽¹⁾ como o teste provavelmente definitivo para determinação da potência do hormônio de crescimento humano (hGH) para uso clínico, sendo o único ensaio que reflete o crescimento corpóreo geral^(2, 7). O esquema convencional do ensaio fatorial 2x2 descrito por Wilhelmi⁽²⁾, quando realizado em 10 dias com 10 ratos por dose-grupo (20 e 100 μ g de padrão e desconhecido), totalizando quatro grupos de animais, requer pelo menos 11mg de cada preparação. Esta quantidade não é desprezível, particularmente para pequenos lotes de preparações, e pode tornar o ensaio inaplicável em certos tipos de pesquisa onde são disponíveis quantidades muito limitadas de material. Aproveitando-se da sensibilidade obtida nas nossas condições de ensaio⁽⁴⁾, procurou-se atingir, ao mesmo tempo, o máximo de economia com manutenção da precisão. Variou-se a dosagem e duração dos ensaios, controlando-se a qualidade dos parâmetros estatísticos obtidos em cada caso. Os cálculos para determinação de potência e análise estatística relativa a ensaios fatoriais 2x2 podem ser feitos manualmente, sendo, porém, relativamente complexos, e não existe na literatura a descrição de algum sistema de análise computadorizada relativo a este tipo de ensaio biológico. Portanto, um programa computacional, BASSY, em linguagem FORTRAN IV, foi implementado no sistema IBM 4341 do Ipen-CNEN/SP e aplicado na análise do esquema fatorial 2x2 para determinação repetitiva da atividade biológica do padrão secundário de hGH-Ipen contra o Padrão Internacional de Hormônio de Crescimento Bovino (bGH) para Bioensaio, 55/1

(WHO). Três ensaios convencionais, realizados usando-se 20 e 100 μ g das duas preparações, serviram de base para a comparação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparações do hormônio de crescimento

O primeiro Padrão Internacional de Hormônio de Crescimento Bovino (bGH) para Bioensaio, 55/1 (WHO), foi gentilmente fornecido pelo National Institute of Biological Standards and Control (NIBSC, Inglaterra). O Padrão Secundário Ipen de hGH, para bioensaio, imunoensaio, ensaio por receptores e marcação, foi preparado neste laboratório como previamente descrito⁽³⁾, liofilizado em glicina 0.5M e tampão fosfato 0.005M, pH 7.2, em ampolas seladas sob vácuo. Seu perfil eletroforético (Fig. 1), em gel de poliacrilamida (PAGE) a 7%, comparado ao do hGH-I-1 altamente purificado (AFP-4793B) para iodação, gentilmente cedido pelo National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases (NIAMD, Baltimore, EUA), foi obtido em um densitômetro Joyce Loebel Scan 400, por leitura em luz ultravioleta⁽⁶⁾.

Ratos hipofisectomizados

Fêmeas Wistar foram hipofisectomizadas neste laboratório por via parafaríngea aos 45-60 dias de idade. Imediatamente após a cirurgia, injetou-se por via intraperitoneal solução de penicilina ou equivalente, na dose de 30.000UI por animal. Ao atingirem peso constante (variação menor que 3% em 10 dias), geralmente na faixa de 130-150g, iniciou-se a administração de

hormônio de crescimento. Durante a fase preparativa e dos ensaios, os animais foram mantidos em ambiente de luminosidade natural, com temperatura mais possivelmente em torno de 24°C. Foi fornecida ração comum para ratos *ad libitum*.

Bioensaio

O ensaio de incremento de peso corpóreo foi realizado segundo o método de Wilhelmi⁽²⁾. O GH bovino foi dissolvido em NaOH 0.01M e diluído com solução salina. O GH humano foi dissolvido em água destilada com glicina e fosfato já presentes no pó liofilizado. Foram preparadas soluções frescas diariamente. Dez ratos por grupo de dose foram usados em todos os ensaios apresentados. Dosagem e duração dos ensaios foram variadas, como descrito nos resultados. Seguiu-se a convenção de Wilhelmi⁽²⁾, segundo a qual um ensaio de 10 dias se refere a nove dias consecutivos de injeções subcutâneas (sem interrupção no fim de semana), registrando-se o peso no 10º dia. Foi determinado o incremento de peso corpóreo com relação ao primeiro dia de injeção de GH, ou melhor, foi calculada a inclinação da curva de crescimento obtida pela pesagem diária de cada rato. A sensibilidade do ensaio, determinada na Fig. 2, foi calculada segundo a definição de Rodbard⁽¹⁰⁾. A estatística usada foi a descrita por Bliss para ensaios fatoriais 2x2⁽⁵⁾. A aplicação do programa BASSY (Fig. 3) possibilitou o cálculo dos seguintes parâmetros estatísticos, úteis para o controle de qualidade do ensaio: 1. potência da preparação relativa à preparação padrão; 2. inclinação combinada das curvas dose-resposta; 3. desvio padrão relativo à curva do-

Pedidos de separata: Paulo Bartolini — Divisão de Radiobiologia, Ipen-CNEN. Caixa Postal 11.049 — 05508 — São Paulo-SP.

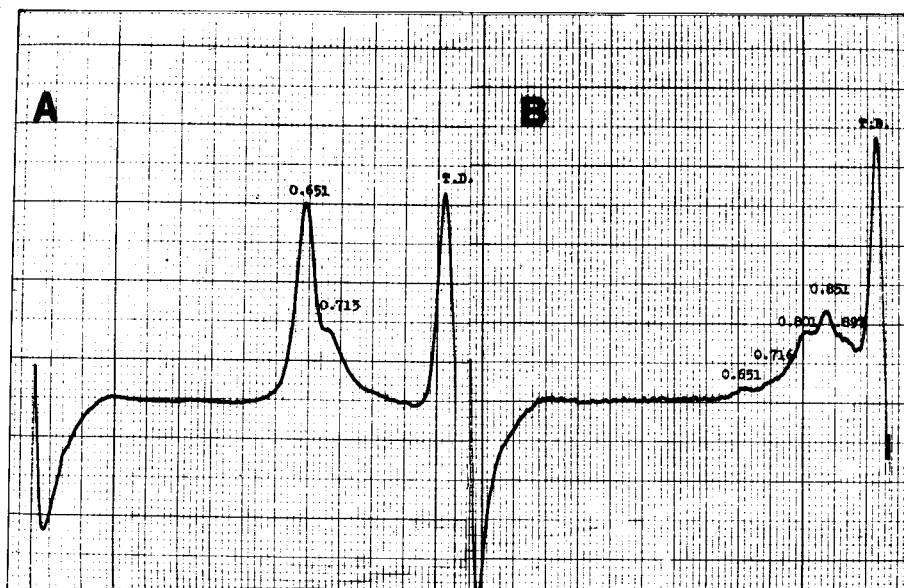


Fig. 1 — Leitura direta, em luz UV, dos densitogramas em PAGE 7% obtidos para o hGH-I-1 dos NIAMDD (A) e Padrão Secundário Ipen de hGH (B). Foram aplicados aproximadamente 150 µg/gel. Distribuição qualitativa dos Ihs, identificados pelos valores da distância de migração relativa (Rm). TD = corante traçador (azul de bromefenol).

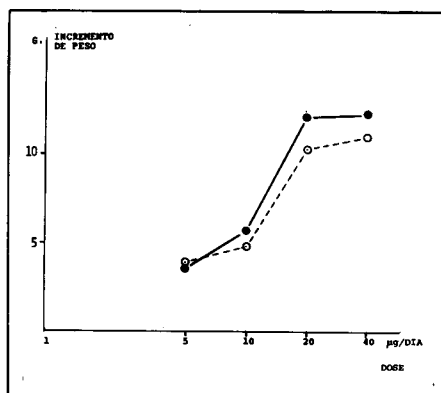


Fig. 2 — Curva dose-resposta obtida com injeção de quantidades mínimas de hGH-Ipen em ratos hipofisectomizados (n = 6, por grupo). — ● — Ensaio de 10 dias. — ○ — Ensaio de seis dias.

se-resposta; 4. índice de precisão (λ); 5. erro padrão do ensaio; 6. limites de confiança; 7. testes de significância para diferença: entre as preparações, entre as doses, entre as inclinações das curvas (desvio do paralelismo) e entre os blocos (gaiolas). A formulação básica do programa é a análise por grupos de animais, nos quais é injetada uma dose de cada preparação sem levar em consideração a divisão por blocos. O usuário poderá, entretanto, optar pela análise que considera também a divisão dos animais por blocos, nos quais um representante de cada dose e de cada preparação está incluído em cada gaiola, que contém quatro ratos de característica uniforme. Isto possibilita segregar fontes de variação devidas a diferentes ninhadas, gaiolas etc. O programa não fixa o número de animais que deverá ser usado no ensaio, permitindo, desta forma, a escolha que melhor se adapte a cada pesquisa (total máximo de 80 ratos). Os valores de t e F deverão ser fornecidos pelo usuário, de acordo com o número de ratos usados e com o fato de se usar ou não a divisão em blocos, permitindo

TABELA 1
Exemplo de saída do programa BASSY para bioensaios fatoriais 2x2

µg/Day		TD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
10	U1	9.0	1.0	1.0	0.7	0.8	0.8	1.2	0.6	1.0	1.0	0.9	
10	S1	10.5	1.2	1.2	1.1	0.8	0.9	1.2	1.2	1.1	0.8	1.0	
20	U2	13.0	1.2	1.2	1.5	1.4	1.4	1.1	1.3	1.5	1.1	1.3	
20	S2	13.8	1.4	1.2	1.1	1.4	1.3	1.8	1.8	1.2	1.2	1.4	
SY		46.3	TG	4.8	4.6	4.4	4.4	4.4	5.3	4.9	4.8	4.1	4.6

Biological assay (BASSY)
2x2 factorial assay design
Run on 20/02/86
U = hGH unknown
S = hGH standard

Potency = 0.804
Combined slope = 1.213
Standard deviation = 0.193
Index of precision = 0.159
Standard error upper = 0.908 lower = 0.711
Fiducial limits upper = 1.020 lower = 0.598
Difference between preparations is not significant (P = 0.05 F = 3.55)
Difference between doses is significant (P = 0.05 F = 35.77)
Difference between groups is not significant (P = 0.05 F = 0.76)
Slope divergence is not significant (P = 0.05 F = 0.33)
P = 0.05
F₉₅(1,27) (Difference between preparations; doses and slope divergence) = 4.21
F₉₅(9,27) (Difference between groups) = 2.25
T = 2.052

do o cálculo do intervalo de confiança e da variância. A Tabela 1 mostra um exemplo de saída do programa BASSY, onde são apresentados os resultados, os parâmetros estatísticos desejados e os 40 dados experimentais introduzidos: inclinações das curvas de crescimento de cada rato (g/rato/dia). Neste quadro as linhas representam os grupos de dose, enquanto as colunas os blocos das gaiolas. A coluna TD expõe o somatório de ganho de peso dos animais para cada dose empregada. A linha TG indica o somatório do ganho de peso por cada gaiola.

RESULTADOS

A Tabela 2 apresenta potência, desvio

padrão, inclinação combinada, índices de precisão e paralelismo e limites de confiança dos três ensaios de 10 dias realizados usando-se uma dose diária de 20 e 100µg/rato de padrão e desconhecido (esquema convencional). No primeiro ensaio, a potência e os parâmetros estatísticos foram também calculados no sexto e 15º dias. A potência média para este esquema de ensaio foi de $3,36 \pm 0,29$ UI/mg, com um CV interensaio de 8,7%.

A curva dose-resposta (Fig. 2), obtida com grupos de seis ratos, com quatro dosagens diferentes, em ensaios de seis e 10 dias, mostra que a melhor faixa de determinação está entre 10 e 20µg/rato/dia. O cálculo de sensibilidade baseado nas respostas e desvios padrão correspondentes à dose zero e à dose mínima administrada (5µg) forneceu valores de dose mínima detectável (DMD) de 4,85 e 1,99µg/rato/dia respectivamente nos ensaios de seis e 10 dias (p = 0,05).

Com base nestes resultados, o hGH-Ipen foi testado em dois tipos de esquema: a. 10 e 20µg do desconhecido e 20 e 40µg do padrão para seis e 10 dias; b. 5 e 10µg do desconhecido e 10 e 20µg do padrão, divididos

em duas injeções diárias, para cinco, seis e 10 dias. Potências e parâmetros estatísticos relativos a estes ensaios são apresentados na Tabela 3. Para efeito de comparação, os valores relativos ao ensaio convencional de 10 dias com 20 e 100µg de padrão e desconhecido e os miligramas de hGH necessários em cada esquema são também registrados (última coluna da tabela).

Considerando-se todos os ensaios (n = 6) nos diferentes esquemas descritos nas Tabelas 2 e 3, a potência média do hGH-Ipen foi de $3,59 \pm 0,68$ UI/mg, com um CV interensaio = 18,9%.

DISCUSSÃO

As melhores condições de ensaio, com

TABELA 2
Ensaio fatorial 2x2 clássico com doses de 20 e 100µg de padrão (bGH-WHO) e desconhecido (hGH-Ipen)

Ensaio (n°)	Duração (dias)	Potência (UI/mg)	Desvio padrão da curva dose-resposta	Inclinação combinada	Índice de precisão	Limites de confiança (%)	Desvio do ** paralelismo
1	6	3,38	2,70	5,01	0,539	43,9-497,0	0,01
	*10	3,63	2,80	8,59	0,326	58,7-220,4	0,43
	15	2,84	3,95	12,90	0,306	62,3-194,4	0,51
2	*10	3,39	4,79	10,72	0,447	49,6-327,4	0,34
	*10	3,05	3,24	9,45	0,339	58,8-216,7	0,36

*Interensaio (n = 3) X = 3,36 ± 0,29 (CV = 8,7%).

**Teste F: o desvio não é significativo (p > 0,05) quando F < 4,11.

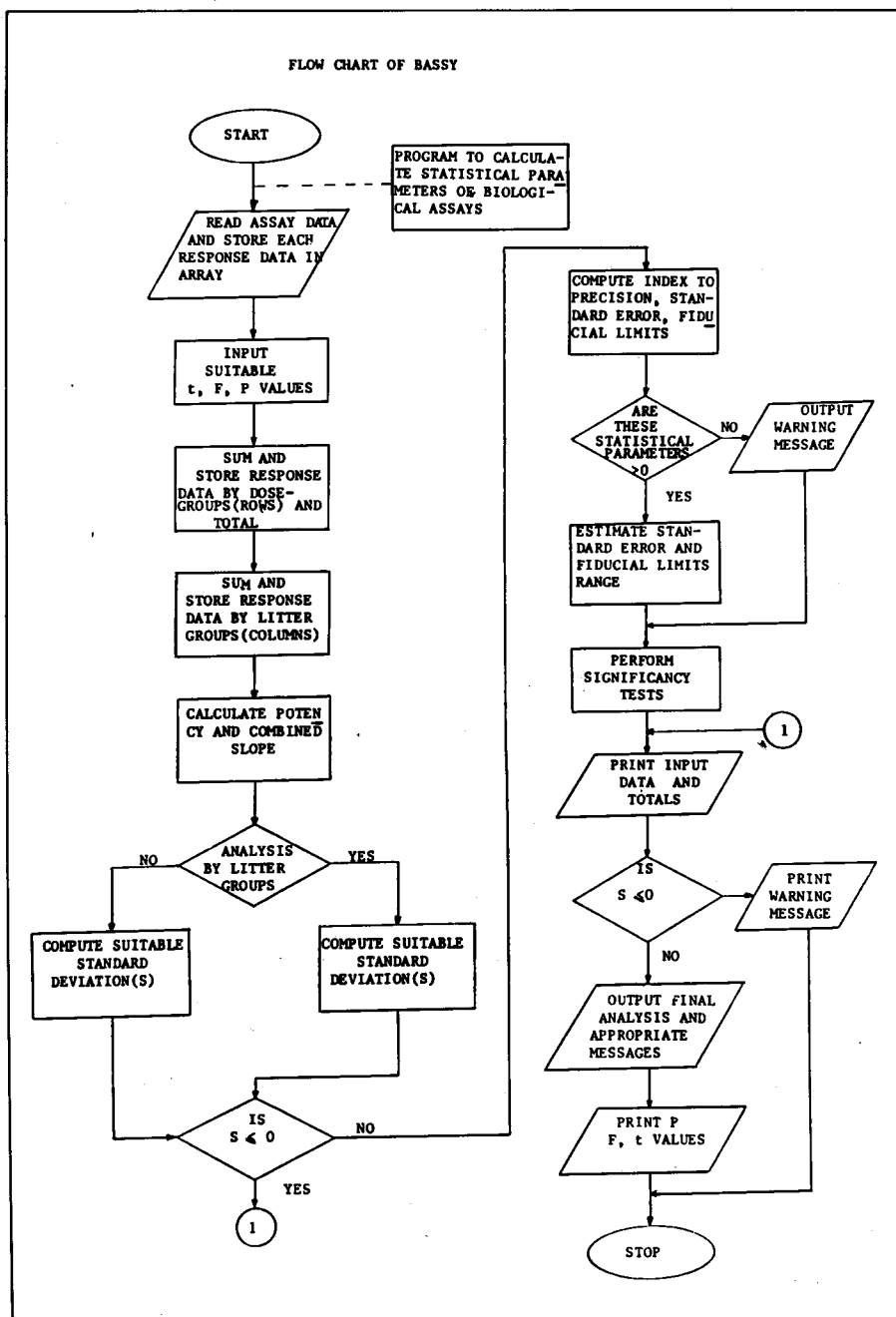


Fig. 3 — Diagrama de bloco do programa de computação BASSY.

melhoria na precisão e paralelismo altamente significativo, junto com grande economia em GH, são obtidas com o esquema A no ensaio de 10 dias. No esquema B, ensaios de cinco e seis dias, os parâmetros estatísticos são ainda aceitáveis e a economia

de aproximadamente 20 vezes no desconhecido pode tornar este ensaio bastante útil para fins de pesquisa, especialmente quando são disponíveis quantidades muito limitadas de material. Em adição, a duração do ensaio também é extremamente importan-

te na economia de produção ou em certos tipos de pesquisa; assim, um ensaio de cinco dias pode ser realizado durante uma semana de trabalho regular com apenas 0,6mg de material, mantendo ainda uma precisão aceitável. Isto é bastante relevante no que tange ao uso econômico do novo Padrão Internacional de hGH-WHO (80/505), permitindo a execução de um ensaio completo de 10 dias com apenas uma ampola de material (1,7mg).

A sensibilidade desta técnica, calculada mediante o ensaio apresentado na Fig. 2, cujo objetivo principal foi definir a melhor zona de linearidade, é maior do que a encontrada na literatura para este tipo de bioensaio^(9, 11). Obviamente, mais ensaios para cada esquema seriam necessários com o intuito de se obter maior confiabilidade na reprodutibilidade dos parâmetros estatísticos apresentados. Este trabalho tomou como base a indicação de que a reprodutibilidade interensaio apresentada na Tabela 2 é bastante satisfatória. Um estudo de maior extensão nesta direção não foi ainda realizado devido aos altos custos representados em termos de preparações padrão, animais, tempo e trabalho especializado.

Deve-se ressaltar, também, a importância do perfil densitométrico em PAGE (Fig. 1) obtido por técnica não destrutiva e leitura direta, em UV, que, ao nosso ver, deveria ser sempre incluída em quaisquer dados de potência de extratos de hGH, mostrando sua distribuição iso-hormonal. No caso da preparação em estudo, o perfil densitométrico obtido indica que a atividade biológica relativamente alta pode ser devida ao fato de se tratar de uma preparação rica em formas eletronegativas, notoriamente mais ativas, onde o isômero fundamental está presente apenas em quantidades mínimas⁽⁸⁾.

A aplicação da análise computadorizada pode facilitar enormemente a rápida comparação entre ensaios e esquemas diferentes. Este programa serviu também de apoio na formulação da monografia sobre hGH e sua determinação de potência, que deverá constar na quarta edição da *Farmacopéia brasileira*, podendo obviamente ser aplicado também a outras determinações fatoriais 2x2.

Finalmente este estudo propiciou a oportunidade de controlar a estabilidade de preparações ampolizadas antigas (o Padrão Internacional de bGH foi estabelecido em 1955!) e a precisão interensaio desta técnica *in vivo*. Mesmo quando a mesma ampola aberta foi ocasionalmente usada por alguns meses, não foi observada uma correlação significativamente negativa com o incremento do peso do rato (dados não apresentados) durante o período de quatro

TABELA 3
Intercomparação entre hGH-Ipen e bGH-WHO por bioensaio fatorial 2x2 com variação das doses e da duração

Ensaio (n.º)	Doses (µg) desconh./padrão	Duração (dias)	Potência (UI/mg)	Desvio padrão	Inclinação combinada	Índice de precisão	Limites de confiança (%)	** Desvio do paralelismo	hGH (mg) necessário
0	20/100	10	3,63	2,80	8,59	0,326	58,7-220,4	0,43	10,8
1	10-20/20-40	6	5,42	2,11	8,05	0,262	60,1-511,1	0,01	1,5
		10	4,76	2,10	11,32	0,186	80,1-219,4	0,02	2,7
2*	5-10/10-20	5	2,86	1,84	7,31	0,252	90,8-253,1	1,54	0,6
		6	3,83	1,82	8,87	0,205	84,7-224,5	1,43	0,8
		10	2,35	2,78	10,30	0,270	91,5-252,3	0,71	1,4
3*	5-10/10-20	6	2,86	2,17	8,14	0,267	94,4-291,6	0,57	0,8

* Nestes ensaios as doses diárias foram administradas divididas em duas injeções.

** Teste F: o desvio não é significativo ($p > 0,05$) quando $F < 4,11$.

anos em que este padrão foi usado. O coeficiente de variação interensaio, de 8,7% quando o mesmo esquema de ensaio foi aplicado, foi ainda menor que 20% quando diferentes esquemas foram usados por um ano.

DISPONIBILIDADE DO PROGRAMA

O programa e sua documentação estão disponíveis mediante solicitação na Divisão de Radiobiologia do Ipen-CNEN/São Paulo, não sendo necessários, para seu uso, conhecimentos específicos na área de Informática.

RESUMO

O bioensaio de hormônio de crescimento humano por incremento de peso corpóreo de ratos hipofisectomizados tem sido estudado com enfoque especial na economia de tempo e material, além de melhorar ou ao menos manter a qualidade dos pa-

râmetros estatísticos do ensaio fatorial 2x2 clássico, que usa doses de 20 e 100µg/rato/dia. A determinação da atividade biológica e dos parâmetros estatísticos relativos foi obtida através de um programa de computação BASSY, em linguagem FORTRAN IV, descrito para a análise de ensaio fatorial 2x2. Com uma sensibilidade calculada da ordem de 2µg/rato/dia, o ensaio pode ainda ser realizado em condições de maior economia usando-se apenas um total de 0,6mg de hGH, com um índice de precisão (λ) inferior a 0,3. O presente estudo também mostra a excelente estabilidade das preparações padrão (WHO) e Ipen ampolizadas e a precisão interensaio relativamente alta deste bioensaio *in vivo*: CV = 8,7 e 18,9% respectivamente, usando-se o mesmo ($n = 3$) e diferentes ($n = 6$) esquemas de ensaio em um período superior a um ano.

SUMMARY

The bioassay of human growth hormo-

*ne (hGH) by the body weight gain of hypophysectomized rats has been studied with special focus on the economy of time and material, while improving or at least maintaining the quality of the statistical parameters of the classical 2x2 factorial assay. With a sensitivity reaching a maximum of about 2µg/rat/day, the assay could still be performed in conditions of maximal economy using only 0.6mg of hGH, with an index of precision inferior to 0.3. The data of these bioassay designs were processed through a computer program (BASSY) set up at the Ipen-CNEN/São Paulo in an IBM 4341 System. Informations regarding the software and retrieval system are also provided. The present study also shows the excellent stability of ampouled standard preparations and the relatively high inter-assay precision of this *in vivo* bioassay: CV = 8.7 and 18.9% respectively using the same ($n = 3$) and different ($n = 6$) assay designs over more than a one year period.*

REFERÊNCIAS

- BANGHAM, D.R. — Standards for growth hormone (personal communication), 1984.
- BANGHAM, D.R.; GAINES DAS, R.E. & SCHULTSTER, D. — The international standards for human growth hormone for bioassay: calibrations and characterization by international collaborative study. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 42: 269-282, 1985.
- BARTOLINI, P.; CAMILLO, M.A.P. *et al.* — Quality control in the potency determination of hGH extracts: radioimmunoassay and radioreceptorassay with standardized labelling and assay conditions. *Radioimmunoassay and related procedures in Medicine*. Vienna, IAEA Editora, 1982. pp. 540-543.
- BARTOLINI, P. — Efeitos da radioiodação sobre as atividades biológica, imunológica, de ligação a receptores e propriedades físico-químicas do hormônio de crescimento humano. Tese de doutoramento apresentada à Escola Paulista de Medicina, 1984. pp. 41-48.
- BLISS, C.I. — *The statistics of bioassay*. New York, Academic Press, 1952.
- SANTOS, A.J.G. — Preparação de um extrato homogêneo de hormônio de crescimento humano, iso-hormônio B, e sua marcação com ¹²⁵I para utilização em radioensaios. Dissertação de mestrado apresentada no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 1985. pp. 68-80.
- HINTZ, R.L.; BANGHAM, D.R. *et al.* — Report of the consensus-forming session on somatotropins: proposed analytical and bioassay methods for identification and assay of GH preparation for human use. In: Chiu, Y.H. & Gueriguian, J.D. (eds.) — *Hormone drugs*. Rockville, MD, United States Pharmacopeial Convention MC, 1982. pp. 382-403.
- LEWIS, U.J.; PENCE, S.J. *et al.* — Enhancement of the growth promoting activity of human growth hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 67: 617-624, 1975.
- PAPKOFF, H. & LI, C.H. — *Hypophyseal growth hormone. Methods in hormone research, bioassay*. New York, Academic Press, 1962. pp. 671-704.
- RODBARD, D. — Statistical estimation of the minimal detectable concentration (sensitivity) for radioligand assays. *Anal Biochem.*, 90: 1-12, 1978.
- THORNGREEN, K.G. & HANSSON, L.I. — Bioassay of growth hormone. *Acta Endocrinol.*, 75: 669-682, 1974.
- WILHELMI, A.E. — Growth hormone bioassay. In: Berson, S.A. & Yallow, R.S. (eds.) — *Methods in investigative and diagnostic endocrinology*. Amsterdam, North Holland Publishing Co., 1973. pp. 296-302.