

Estudios sobre la valoración del principio ocitócico del lóbulo posterior de hipófisis

III. - ANALISIS MATEMATICO DE LOS RESULTADOS Y DETERMINACION DEL ERROR DEL METODO

Por ALBERTO TORINO, MANUEL LITTER y DORA K. de LITTER

En un trabajo anterior (TORINO, LITTER y LITTER, 1940 *b*), utilizando el líquido de VAN DYKE y HASTINGS (1927), a pH 7,4, para la valoración del principio ocitócico del lóbulo posterior de hipófisis según el método de DALE y LAIDLAW (1922), obtuvimos el 100 % de resultados satisfactorios en lo que se refiere a la respuesta cuantitativa del útero.

Este método, como todo método biológico tiene un porcentaje de error debido a la diferente sensibilidad de los úteros de animales distintos. La Farmacopea Británica (B. P. 1932) acepta como límite de error ± 20 %. BURN (1937), establece los mismos límites en general. La Farmacopea de los E. U. de N. América (U.S.P. XI, 1936), considera que la solución que se valora, debe tener una actividad, determinada con el útero de cobaya virgen, correspondiente a no menos de 80 % ni más de 120 % con respecto al preparado standard.

SAWASAKI (1925) en un estudio matemático de los resultados obtenidos con una sola preparación en 120 determinaciones, concluye que el error medio o sea la desviación standard, es de 13.83 %. Empleando otro cálculo, del que hablaremos más adelante, GADDUM (1938), llega a la conclusión de que el error standard de una determinación del principio ocitócico, es de 7,7 %.

Nos proponemos en el presente trabajo, efectuar un estudio de la exactitud del método basado en el análisis matemático de los resultados.

MÉTODOS

a) *Aparato*.—Es el utilizado en nuestros trabajos anteriores (TORINO, LITTER y LITTER, 1940 a y b), en donde se encuentra descrito en detalle.

b) *Líquido nutricio*.—El líquido del baño uterino, es el de VAN DYKE y HASTINGS (1927), ajustado a pH 7,4 mediante una corriente de CO₂ 10 % y O₂, 90 % (TORINO, LITTER y LITTER, 1940 b). Este líquido se preparaba en el momento de cada experiencia, ya que hemos observado que si se prepara una solución concentrada 20 veces (sin bicarbonato de sodio, cloruro de calcio ni cloruro de magnesio, que se agregan en el momento de su dilución), su estabilidad dura muy poco tiempo y después de dos a tres días, las curvas obtenidas no son cuantitativas y se producen contracciones espontáneas del útero.

c) *Elección del cobaya y preparación del útero*.—El cobaya que se va a utilizar y la preparación del útero han sido estudiados anteriormente (TORINO, LITTER y LITTER, 1940 a). El peso de los animales varió entre 215 y 345 g. En un caso en el que empleamos un cobaya de 205 g. no obtuvimos curvas satisfactorias.

d) *Extractos utilizados*.—La solución standard consistió en un extracto al 1/10.000 P/V del polvo tipo internacional facilitado por el National Institute for Medical Research de Hampstead, de acuerdo con la técnica expuesta en un trabajo anterior (TORINO, LITTER, LITTER, 1940 a). (1 cm³ = 0,2 U.I.).

El pH del extracto preparado con este método ha sido de 3,4 (Método colorimétrico corriente según CLARK (1928), utilizando como indicador el azul de bromofenol (pH 3,0—4,6).

Todas las experiencias se han hecho en el transcurso de 120 días y teniendo en cuenta los cálculos de GADDUM (1930), en este lapso, a dicho pH y a una temperatura de 4°C, (heladera eléctrica), la destrucción del principio oocitócico, debe estimarse en solo 1,5 %. Dicho extracto, algunas veces se diluyó al 1/10 en el momento de la experiencia.

Como soluciones que deben compararse, se utilizaron extractos líquidos del lóbulo posterior de hipófisis de distinta procedencia, y una vez un polvo de lóbulo posterior de hipófisis cuya extracción se efectuó con la misma técnica que la del polvo standard. En todos los casos, las soluciones se diluían hasta una concentración aproximadamente igual a la de la solución standard.

e) *Procedimiento*.—Una vez colocado el útero en condiciones para la experiencia, se esperaba su relajación (ayudándose con una pesa de 0,5 g.) que se obtenía generalmente entre 20 y 30 minutos, y haciendo girar el cilindro, se obtenía una línea que es la basal para todas las contracciones. Se comenzaba luego agregando al baño uterino (de 100 cm³) de 0,5 a 0,6 cm³ de la solución standard al 1/100,000. Si la contracción obtenida era satisfactoria, es decir de una altura mayor de 1,5 cm. y submáxima, se continuaba la experiencia; si la contracción era más pequeña, se utilizaba la solución al 1/10,000, empleando en este caso cantidades que dieran siempre contracciones submáximas. Se agregaba luego alternativamente dosis variables de la solución standard y de la solución desconocida, hasta obtener contracciones iguales con una y otra solución. Si esto no era posible, para valorar el resultado, se tomaba el promedio de dos valores muy cercanos, uno mayor y otro menor. Así por ejemplo, si el extracto desconocido tenía más de 8 unidades y menos de 10 unidades, se consideraba el valor de 9. En este último caso y siguiendo a GADDUM (1938), si la relación entre los límites de actividad eran de 1,5 o más, no se tomaba en cuenta la experiencia; si se obtenía que el extracto desconocido tenía menos de 15 unidades y más de 10, se rechazaba el ensayo, y se aceptaba si tenía más de 10 y menos de 14,5. Algunas veces se tomó el promedio de dos pares de contracciones iguales.

Para valorar la intensidad del efecto, hemos seguido los criterios sustentados en un trabajo anterior (TORINO, LITTER y LITTER, 1940 a), en lo que se refiere a la altura de la curva, la presencia de dentelladuras e inclinación de la misma.

Un ejemplo de experiencia se muestra en la fig. 1.

De la lectura de la curva, deducimos los valores de la Tabla I.

TABLA I

0.6 cm ³ St/100.000	4.9 cm.	0.5 cm ³ D/100.000	4.25 cm.
0.4 » St/100.000	4.35 »	0.7 » D/100.000	4.4 »
0.6 » St/100.000	4.9 »	0.9 » D/100.000	4.9 »

De estos valores se infiere lo siguiente:

$$0.9 \text{ cm}^3 \text{ D}/100.000 = 0.6 \text{ cm}^3 \text{ St}/100.000 (0.012 \text{ U. I.})$$

$$0.9 \text{ D}/100.000 : 0.012 \text{ U. I.} :: 100.000 : x$$

$$x = \frac{100.000 \times 0.012}{0.9} = 1333 \text{ U. I.}$$

Luego 1 g. del polvo desconocido contiene 1333 U.I.

La duración de una experiencia era aproximadamente de dos horas; hemos visto que después de este lapso, disminuía la sensibilidad y la discriminación del útero, y los resultados ya no eran cuantitativos.

RESULTADOS

Con el método descripto, se efectuaron dos series de experiencias; en una serie, se hicieron 14 ensayos en los que se comparó la actividad oitócica de un extracto de lóbulo posterior de hipófisis, preparado en la sección Organoterapia de este Instituto, con la de la solución standard; los valores hallados fueron sometidos al análisis matemático en la forma que veremos más adelante.

En un segundo grupo, se valoraron 6 extractos distintos; para cada uno se efectuaron dos o más experiencias; en esta serie y para efectuar el análisis matemático según GADDUM (1938), se incluyeron también los resultados de la primera serie, de manera que en total fueron 7 los extractos ensayados.

a) *Análisis matemático de las determinaciones efectuadas utilizando un solo extracto.* — Se estableció primero la desviación standard (σ) mediante la fórmula $\sigma = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n-1}}$, donde $\sum d^2$ es la suma

de los cuadrados de las desviaciones del promedio y n el número de ensayos.

En la Tabla II se consigna el desarrollo del cálculo.

TABLA II

Valores obtenidos U. I. por cm ³	Desviaciones del promedio (d)	d^2
16.60	+ 1.22	1.4884
15.00	— 0.38	0.1444
15.30	— 0.08	0.0064
15.40	+ 0.02	0.0004
16.00	+ 0.62	0.3844
16.00	+ 0.62	0.3844
17.50	+ 2.12	4.4944
17.50	+ 2.12	4.4944
14.50	— 0.88	0.7744
12.60	— 2.78	7.7284
16.80	+ 1.42	2.0164
12.00	— 3.38	11.4244
13.50	— 1.88	3.5344
16.60	+ 1.22	1.4884

Promedio 15.38

Desviación standard (σ) = ± 1.71 .

Hemos hallado luego el coeficiente de variación (C.V.), es decir la desviación standard, expresada como porcentaje del promedio; el resultado fué $\pm 11,12\%$. Multiplicado por 2,576 obtenemos los límites de error ($P = 0,99$) establecidos en el ADDENDUM (1936) de la Farmacopea Británica (1932). En nuestro caso el resultado ha sido $\pm 28,64\%$.

De manera que podemos concluir que si efectuamos una serie de determinaciones únicas del valor ocitócico de un extracto comparado con un standard, en 99 ensayos de 100 el resultado estará situado entre 128,64 y 71,36 % del verdadero valor.

A continuación hemos calculado la desviación standard del promedio hallado (15,38 unidades), denominado por BURN (1937) *error standard* (ϵ) con la siguiente fórmula:

$$\epsilon = \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n(n-1)}}$$

El resultado ha sido:

$$\epsilon = \pm 0.45$$

El coeficiente de variación (C, V,) de este resultado, es $\pm 2,80\%$, que multiplicado, por 2,576 da $\pm 7,21\%$.

Esto quiere decir que si efectuamos una serie de grupos de 14 determinaciones cada uno y obtenemos el promedio de los 14 valores en cada caso, 99 veces de 100, dicho promedio estará situado entre 107,21 % y 92,79 % del valor real. Al afirmar el valor de esta expresión, aceptamos el criterio sustentado por BURN (1937), en el sentido de que estas conclusiones obtenidas mediante las cifras de una serie de ensayos, pueden generalizarse para cualquier otra serie similar, ya que podemos aceptar como definitivamente establecido que la curva de distribución de los errores positivos y negativos, tiene la forma en campana correspondiente a una curva de distribución normal de frecuencia. (BURN, 1937).

En la Tabla III hemos calculado la desviación standard del promedio (error standard), el coeficiente de variación y los límites de error ($P = 0,99$) para 2,3, etc., determinaciones, hasta 10 e hipotéticamente los que se habrían obtenido en 100 y 1.000 ensayos. La fórmula utilizada para hallar el error standard, ha sido $\epsilon =$

$$\frac{\sigma}{\sqrt{n}}, \text{ donde } n \text{ igual a número de ensayos.}$$

TABLA III

Nº de determinaciones (<i>n</i>)	Desviación standard del promedio o error standard (ϵ)	Coefficiente de variación (C. V.)	Límites de error ($P = 0.9$) (C. V. \times 2.576)
2	± 1.21	$\pm 7.87 \%$	$\pm 20.27 \%$
3	± 0.99	$\pm 6.44 \%$	$\pm 16.59 \%$
4	± 0.85	$\pm 5.53 \%$	$\pm 14.21 \%$
5	± 0.77	$\pm 5.01 \%$	$\pm 13.81 \%$
6	± 0.70	$\pm 4.55 \%$	$\pm 11.72 \%$
7	± 0.65	$\pm 4.23 \%$	$\pm 10.90 \%$
8	± 0.61	$\pm 3.97 \%$	$\pm 10.22 \%$
9	± 0.57	$\pm 3.71 \%$	$\pm 9.56 \%$
10	± 0.51	$\pm 3.31 \%$	$\pm 8.53 \%$
100	± 0.17	$\pm 1.10 \%$	$\pm 2.83 \%$
1000	± 0.05	$\pm 0.32 \%$	$\pm 0.82 \%$

Entonces, si nos queremos colocar dentro de los límites de error aceptados por la Farmacopea Británica (B.P. 1932) y la Farmacopea de los Estados Unidos de N. América (U. S. P. XI, 1936), ($\pm 20 \%$) y que constituyen un margen adecuado para métodos biológicos, bastará efectuar dos determinaciones con el mismo extracto y tomar el resultado promedio; en este caso, el resultado obtenido podrá variar dentro del límite $\pm 20,27 \%$, 99 veces de 100 ($P. = 0,99$).

b) *Análisis matemático para las determinaciones efectuadas utilizando extractos distintos.*— En este caso, el cálculo se efectuó según lo establecido por GADDUM (1938), de la siguiente manera: se calculó el promedio de los resultados de cada extracto y las desviaciones de dicho promedio fueron elevadas al cuadrado y sumadas; cada resultado se dividió por el cuadrado del promedio correspondiente; de esta manera las desviaciones se calcularon como proporción (es decir, que multiplicadas por cien, darían porcentajes). La suma de los cuadrados de todas las desviaciones, así calculadas, se dividió por el número de los *grados de libertad* (esta cifra, se estableció por la siguiente fórmula: $\Sigma (n - 1)$, donde n es el número de experimentos efectuados con un solo extracto). Luego se extrajo la raíz cuadrada del resultado obteniéndose así la desviación standard, que multiplicada por cien, se expresa en porcentaje (coeficiente de variación [C.V.]).

La Tabla IV, demuestra el desarrollo de los cálculos en nuestro caso.

TABLA IV

Extracto	Valores U. I./cm ³	Promedios (M)	Desviaciones del promedio (d)	M ²
1	12.9 -11.1	12.00	+ 0.09 — — 0.09	144.0000
2	9.0 -10.0 *	9.50	— 0.50 — + 0.50	90.2500
3	20.0 -20.0	20.00	0.00 — 0.00	400.0000
4	3.75- 2.66	3.20	+ 0.55 — — 0.55	10.2400
5	4.0 - 4.0	4.00	0.00 — 0.00	16.0000
6	5.50- 6.00	6.18	— 0.68 — — 0.18	34.8100
	7.05		+ 0.87	
7	16.6 -15.0	15.38	+ 1.22 — — 0.38	236.5444
	15.3 -15.4		— 0.08 — + 0.02	
	16.0 -16.0		+ 0.62 — + 0.62	
	17.5 -17.5		+ 2.12 — + 2.12	
	17.5 -17.5		+ 2.12 — + 2.12	
	14.5 -12.6		— 0.88 — — 2.78	
	16.8 -12.0		+ 1.42 — — 3.38	
13.5 -16.6	— 1.88 — + 1.22			

Grados de libertad = $\Sigma (n - 1) = 20$

$\sigma = \sqrt{0.0129845866} = \pm 0.1139$; o sea $\pm 11.39 \%$

(*) En este caso se trataba de un polvo de lóbulo posterior de hipófisis y los valores están expresados en unidades internacionales por 10 mg. de polvo.

d^2	Σd^2	$\frac{\Sigma d^2}{M^2}$
0.0081-0.0081	0.0162	0.000112500
0.2500-0.2500	0.5000	0.005540165
0.0000-0.0000	0.0000	0.000000000
0.3025-0.3025	0.6050	0.059082031
0.0000-0.0000	0.0000	0.000000000
0.4624-0.0234	1.2517	0.032773536
0.7569		
1.4884-0.1444		
0.0064-0.0004		
0.3844-0.3844		
4.4944-4.4944	38.3636	0.162183500
4.4944-4.4944		
0.7744-7.7284		
2.0164-1.4244		
3.5344-1.4884		
		0.259681732

Multiplicando la desviación standard por 2,576, obtenemos los límites de error ($P = 0,99$) establecidos en el ADDENDUM, 1936, de la Farmacopea Británica, 1932. En nuestro caso, el resultado ha sido $\pm 29,34 \%$, es decir, si efectuamos una serie de determinaciones, 99 veces de 100 el resultado estará comprendido entre $129,34 \%$ y $70,66 \%$ del verdadero valor, datos estos que coinciden bastante bien con los obtenidos en el apartado anterior, correspondiente a una sola determinación.

DISCUSIÓN

La deducción más importante que debemos hacer de todos estos cálculos es que una única valoración del principio ocitócico del lóbulo posterior de hipófisis efectuada en un solo útero, tiene un error demasiado grande como para ser considerada útil. La Tabla III, nos indica que para obtener un límite de error ($P = 0,99$), de $\pm 20 \%$, debemos efectuar dos determinaciones y tomar el término medio. Si deseamos un límite de error ($P = 0,99$) de $\pm 10 \%$, hemos de efectuar 8 ó 9 determinaciones. Pero nosotros nos conformamos con los límites establecidos en la Farmacopea Británica (B.P., 1932) y en la Farmacopea de los Estados Unidos de N. América (U.S.P. XI, 1936), es decir $\pm 20 \%$.

Creemos haber sido los primeros en llegar a esta importante conclusión: que para efectuar una valoración del principio ocitócico del lóbulo posterior de la hipófisis, es necesario hacer por lo menos 2 determinaciones y si queremos mayor exactitud 8 ó 9.

GADDUM (1938), al efectuar el análisis matemático de sus resultados, establece como límites de error ($P = 0,99$) de una determinación $19,9 \%$, pero no debemos olvidar que este autor, para efectuar una valoración, emplea como aconseja BURN (1937) varios úteros, tratando de establecer desigualdades cada vez menores entre standard y desconocido, de manera que tiene que trabajar varios días para conseguirlo. En cambio, nosotros, por lo general, efectuamos una determinación diaria, de manera que en dos días tenemos completada una valoración; por lo tanto nuestro procedimiento no es más lento que el de BURN (1937) y dá un grado de exactitud satisfactorio.

Es conveniente recordar que BURN (1937), ha comprobado que un ensayo aislado efectuado con un solo útero, puede dar errores del 100% , cosa que nosotros jamás hemos obtenido, con el método indicado en la serie de nuestros trabajos (TORINO, LITTER y LITTER, 1940 *a* y *b*).

Antes de terminar queremos insistir en el hecho que, trabajando con un cobaya de 205 g. no obtuvimos curvas satisfactorias, de

manera que podemos establecer como límite inferior de peso 220 g. (aunque con 215 g. ya obtuvimos resultados cuantitativos pero no óptimos). De acuerdo con lo establecido en un trabajo anterior (TORINO, LITTER y LITTER, 1940 b), los límites de peso quedan comprendidos, pues, entre 220 g. y 350 g., con un peso óptimo entre 270 g. y 320 g.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1. — Se ha efectuado el análisis matemático de los resultados obtenidos en la valoración del principio ocitócico del lóbulo posterior de hipófisis, empleando un mismo extracto y extractos distintos.

2. — En el primer caso, los límites de error ($P = 0,99$) de un solo ensayo, han sido de $\pm 28,64\%$ y en el segundo caso, $\pm 29,34\%$.

3. — Para obtener límites de error ($P = 0,99$) de alrededor de $\pm 20\%$, son necesarias 2 determinaciones por lo menos y para $\pm 10\%$, 8 ó 9 ensayos.

4. — El peso de los cobayas, en esta clase de ensayos, debe estar comprendido entre 220 y 350 g. con un peso óptimo entre 270 y 320 g.

BIBLIOGRAFIA

1. *Addendum, 1936 to the British Pharmacopoeia, 1932, The General Medical Council.* London.
2. *British Pharmacopoeia, 1932. The General Medical Council.* London.
3. BURN, J. H., 1937. *Biological Standardization*, Oxford University Press. London.
4. CLARK, W. M., 1928. *The Determination of Hydrogen Ions*, 3th. Ed. Baillière, Tindall and Cox. London.
5. DALE, H. H. and LAIDLAW, P. P., 1912. *J. Pharmacol. and Exper. Therap.*, 4, 75.
6. GADDUM, J. H., 1930. *Biochem. J.*, 24, 939.
7. GADDUM, J. H., 1938. *Quart. J. of Pharm. and Pharmacol.*, 11, 697.
8. *Pharmacopoeia of the United States of America.* 11th. Decennial Revision, 1936.
9. SAWASAKI, H., 1925. *Arch. f. d. Ges. Physiol.*, 209, 137.
10. TORINO, A., LITTER, M. y LITTER, D. K. DE, 1940 a. *Semana Méd.*, 1, 475.
11. TORINO, A., LITTER, M. y LITTER, D. K. DE, 1940 b. *Ibid.* 2.
12. VAN DYKE, H. B. and HASTINGS, A. B., 1927. *Am. J. Physiol.*, 83, 563.