

Cálculo del tamaño muestral en procedimientos de experimentación con animales.

Valoración de las incidencias

Alejandro Rojo Amigo

Vall d'Hebron Institut de Recerca VHIR HUVH

Introducción

El cálculo del tamaño muestral en los diseños experimentales con seres vivos supone uno de los mayores retos y en algunos casos, hasta quebraderos de cabeza para muchos comités de ética en experimentación animal (CEEA) de los centros de investigación.

A pesar de que existen algunas fórmulas validadas en la literatura estadística especializada y de uso común - como por ejemplo la ecuación de recursos desarrollada por Mead en 1988 [1] o el trabajo de otros autores como Armitage y Berry en 1992 [2] o Doménech en 1982 [3] - cada procedimiento debe ser evaluado al detalle para escoger un método adecuado a las necesidades del mismo. Es decir, a priori no es lo mismo, por ejemplo, un proyecto de docencia de técnicas quirúrgicas con animales anestesiados de principio a fin y sin recuperación, que un proyecto en el que se ponen a prueba diferentes drogas a diferente concentración y los animales se mantienen durante tiempos prolongados. Podemos suponer que en su planteamiento inicial, el margen de error asumido por uno y otro es diferente siendo mayor el del caso de docencia. Pero si entramos al detalle de qué técnicas se emplearán, la experiencia de los alumnos, etc. puede resultar en un proyecto con un margen de error muy corto y que necesite un número de animales superior a lo previsto.

En el caso particular del CEEA del VHIR, en el que evaluamos procedimientos de 10 áreas de investigación diferentes y que comprenden 64 grupos de investigación, nos enfrentamos habitualmente a una variedad amplia de situaciones en este contexto. Por este motivo constituye un reto tanto la aplicación de un criterio unificado en la valoración del número de animales, como el correcto asesoramiento al investigador en lo que respecta a las incidencias que pueda presentar su proyecto.

Las incidencias constituyen probablemente el mayor problema al que se enfrenta un diseño experimental. Debemos tener en cuenta que en lo que respecta al número de animales

usados en investigación y la correcta aplicación de la "R" de reducción, es peor quedarse corto en un diseño que pasarse, ya que lo primero, aparte de invalidar los resultados obtenidos estadísticamente, conllevará seguramente la repetición de la totalidad del experimento y huelga decir, que eso aumenta el número de animales utilizados simplemente por un trabajo mal hecho en su diseño.

Fórmula para el cálculo de la muestra en base a incidencias seriadas en los procedimientos

$$X = N / ((A/100) \times (B/100) \times (C/100) \dots)$$

Donde:

X= Número final de animales necesarios o número de animales del cual debemos partir.

N= Número mínimo estadístico que permite concluir los objetivos propuestos en el proyecto.

A= 100 - % de incidencia 1.

B= 100 - % de incidencia 2.

C= 100 - % de incidencia 3, y así sucesivamente.

Esta fórmula surgió en el CEEA del VHIR tras una de nuestras largas discusiones en relación al cálculo de la N de un determinado proyecto, y no ha pasado por matemáticos o profesionales de la bioestadística, sino que es fruto de la aplicación del conocimiento y experiencia en diseños experimentales de los profesionales que componemos el comité. Básicamente, al no haber un consenso entre nosotros, algunos miembros decidimos recuperar las matemáticas elementales para llegar a una solución, pero poco a poco nos dimos cuenta de que podía ser aplicable a una gran variedad de procedimientos.

El proyecto en cuestión versaba sobre la implantación de células tumorales en flancos de ratones inmunodeficientes y en el que posteriormente, y tras valorar el crecimiento de las masas

hasta un determinado volumen, se establecerían grupos homogéneos en los que se iniciarían determinados tratamientos.

Este proyecto planteaba una incidencia de partida que significaba el descarte de animales en los que no se desarrollaría tumor (en inglés, *outliers*). La tasa de esta incidencia podía estimarse por el conocimiento previo de las células y del modelo animal. Seguidamente, se planteaba un nuevo descarte sobre la base de que no todos los tumores estarían en el volumen mínimo requerido para iniciar los tratamientos en un determinado momento.

Básicamente, teníamos delante una ecuación matemática con dos incógnitas en la que una dependía de la otra, y el conocimiento del modelo nos daba unas estimaciones del porcentaje de las incidencias probables y consecutivas (20 y 30% respectivamente), en base a la tasa de implantación y velocidad de crecimiento esperado. Aparte de esto, lo que posiblemente constituya la parte más esencial para nuestro método, teníamos la N mínima (20, en este caso) que permitía al investigador conseguir los objetivos propuestos con la suficiente potencia estadística:

$$20 = X - 20\%X - 30\%Y$$

Por lo tanto, al despejar las incógnitas vimos que podría simplificarse si aplicábamos a las matemáticas de la fórmula el porcentaje de éxito y no la incidencia, lo que derivó en la fórmula previamente descrita.

Ejemplo práctico

Sabemos que un investigador necesita 24 ratones en los que iniciar un tratamiento determinado cuando el volumen tumoral llegue a 200mm³. Necesitamos saber cuántos ratones se deben inyectar con células tumorales si sabemos que un 20% no desarrolla tumor y otro 20% será descartado por no alcanzar el volumen determinado a las 4 semanas de inyección.

Según:

$$X = N / ((A/100) \times (B/100) \times (C/100) \dots)$$

X= Número final de animales necesarios o número de animales del cual debemos partir.

$$N = 24$$

$$A = 100 - 20\% = 80\%$$

$$B = 100 - 20\% = 80\%$$

X = 24 / [(80/100) x (80/100)] = 37.5 Lo que equivale a 38 ratones que deben ser inyectados.

Para comprender que el objetivo del procedimiento puede variar la aplicación de las fórmulas empleadas, planteo la siguiente variación al mismo supuesto práctico. Consideremos ahora que el investigador quiere probar 2 tratamientos diferentes de la siguiente manera:

Grupo 1: Tratamiento 1

Grupo 2: Tratamiento 2

Grupo 3: Combinación de tratamientos 1 y 2

Grupo 4: Control. Vehículo empleado en los tratamientos anteriores como por ejemplo suero salino.

Además de esta información, nos referencia mediante publicaciones que necesita una N mínima estadística de 5 animales por grupo.

El planteamiento de este caso nos lleva a valorar la N mínima necesaria que debe tener cada grupo experimental por separado. Por lo tanto si aplicamos la fórmula:

$$X = N / ((A/100) \times (B/100) \times (C/100) \dots)$$

X= Número final de animales necesarios o número de animales del cual debemos partir.

$$N = 5$$

$$A = 100 - 20\% = 80\%$$

$$B = 100 - 20\% = 80\%$$

$$C = 100 - 10\% = 90\%$$

En este caso añadimos la incidencia C, que en ausencia de datos específicos, está calculada para prever las pérdidas de animales no atribuibles al procedimiento sino al propio modelo animal, que si recordamos es inmunodeficiente, y podemos valorarla en un 10%.

X = 5 / ((80/100) x (80/100) x (90/100)) = 8.68 Que equivale a 9 ratones por grupo experimental.

Si lo multiplicamos por el número de grupos obtendremos entonces la N total del procedimiento: **9 x 4 = 36 ratones que deben ser inyectados.**

Si por ejemplo nos fijamos en el planteamiento de Mead en su ecuación de recursos como alternativa al método propuesto, nos daremos cuenta de la complejidad que entraña aplicar las incidencias a este modelo. La fórmula desarrollada por Mead en 1988, en su libro "The Design of Experiments", describe que añadir una unidad experimental a un experimento pequeño con una población pequeña da buenos resultados pero que en el caso de

grandes poblaciones, el efecto es inapreciable. Mead establecía que la información total de un experimento compuesto por N unidades experimentales, puede ser representado por la variación total basada en N-1 grados de libertad, y dividía en 3 componentes fundamentales aparte de la N experimental:

$$E = N - B - T$$

Donde:

E= Es el error estimado para calcular la varianza (S^2) que debe estar entre 10 y 20.

N= El número total de animales del diseño.

B= El número de bloques del diseño experimental que Mead define como variación por causas ambientales.

T= El número de tratamientos que se realizan (o grupos).

Este método presenta además la complejidad en la estimación de errores y la problemática que el propio Mead exponía como "Blocking" en el Bloque B, ya que añadir este factor reduce grados de libertad.

Creemos que el método aquí propuesto es sencillo de aplicar y permite trabajar en un amplio rango de procedimientos, tanto para poblaciones grandes como pequeñas. A este respecto, un error típico en el cálculo de la N muestral en base a la valoración de incidencias de un procedimiento, es sumar este porcentaje de incidencias a la N mínima. Como se expone a continuación mediante ejemplos, es un error que se compensa solamente en el caso de un porcentaje bajo de incidencias:

Ejemplo 1

Incidencias bajas. Si la N mínima necesaria es 5 y el porcentaje de incidencias estimado es del 10%:

Suma del porcentaje de incidencias:

X= 5 \Rightarrow 10% de 5 es 0.5 que equivale a 1 animal con lo que la muestra debe ser de 6 animales.

Mediante la aplicación de la fórmula:

$$X = N / (A/100)$$

$$\text{Incidencia } A = 100 - 10\% = 90\%$$

$$X = 5 / (90/100) = 5.55 \Rightarrow \text{Lo que equivalen a 6 animales.}$$

Ejemplo 2

Incidencias elevadas. Si la N mínima necesaria es 5 y el porcentaje de incidencias estimado es del 20%:

Suma del porcentaje de incidencias:

X= 5 \Rightarrow 20% de 5 es 1 lo que equivale a 1 animal con lo que la muestra debe ser de 6 animales.

Mediante la aplicación de la fórmula:

$$X = N / (A/100)$$

$$\text{Incidencia } A = 100 - 20\% = 80\%$$

$$X = 5 / (80/100) = 6.25 \Rightarrow \text{Lo que equivalen a 7 animales.}$$

Puntos importantes a tener en cuenta para la aplicación del método propuesto:

1. El primer punto y más importante es que el investigador debe saber cuál es **la N mínima necesaria que le permite confirmar o refutar su hipótesis** con la suficiente potencia estadística. Para un grupo determinado o para el total de un experimento. Esta N puede provenir de referencias publicadas o de cálculos estadísticos.
2. Cuando aplicamos fórmulas matemáticas y a pesar de que son seres vivos, **debemos contar como un animal no sólo la unidad en números enteros, sino todos sus decimales, y debemos asimismo redondear al final de la aplicación de la fórmula.** Es decir, 0.3 es un ratón y 35.8 son 36 ratones, por ejemplo.
3. Podemos calcular de esta manera la N de un grupo o la N total de un experimento con N grupos. Simplemente debemos tener en cuenta que **si calculamos la N de un solo grupo, deberemos redondear antes de multiplicar por el número de grupos** propuestos.

Agradecimientos

A los miembros del CEEA del VHIR, cuya profesionalidad indiscutible y énfasis en la aplicación de las 3Rs en la experimentación con animales, ha motivado el desarrollo de este método: Carmen Espejo, PhD; Ibane Abasolo, PhD; Laura Soucek, PhD y Marta Rosal, DVM.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mead R. *The Design of Experiments: Statistical Principles for Practical Applications*. Cambridge University Press 1984.
2. Armitage P. y Berry G. *Estadística para la investigación biomédica*. Doyma, Barcelona 1992.
3. Domenech Massons J. M. *Bioestadística*. Ed. Herder, Barcelona 1982.