

CAPÍTULO 23

Diseño experimental

Alicia Graciela Antonini

En todo diseño experimental con el fin de llevar adelante un ensayo del que puedan obtenerse resultados que permitan aceptar o rechazar una hipótesis dada, se deben considerar una serie de factores referidos a las características del ensayo en sí mismo y a la metodología estadística a utilizar. Pero cuando se trabaja con animales, ya sea de laboratorio, destinados a la producción animal o de compañía, requiere de un cuidadoso diseño que sea capaz de suministrar información de calidad, a través de resultados confiables, que permitan comprender mejor un suceso biológico, evaluar diferentes respuestas a tratamientos, conocer características particulares de una especie, etc., utilizando el menor número de individuos posibles y teniendo en cuenta su bienestar.

Por esta razón un experimento siempre tendrá un marco teórico que sustente la planificación técnica, un protocolo de seguimiento, un análisis estadístico consecuente con el diseño y una interpretación acorde con la potencia de los resultados.

La realización de un ensayo biológico implica la presencia del error experimental, es decir no es posible controlar todos los factores que intervienen en un experimento de manera de eliminarlo completamente. Este error experimental tiene varios componentes algunos inherentes al operador y a los sistemas de medición, otros al método estadístico a aplicar y por último factores aleatorios que pudieran acontecer durante el desarrollo del experimento (Corva et al, 2009).

La toma de datos por más de un operador suele ser un factor importante en el aumento de la variabilidad observada, los instrumentos de medida, desde una balanza o cinta métrica hasta un espectrofotómetro, que tendrán su propio margen de error, pueden aumentar el error experimental y es particularmente importante considerar el caso de mediciones subjetivas, como pueden ser la condición corporal o el temperamento asignado a un animal donde se deberá tener en cuenta el uso de paneles de evaluadores.

Existen estrategias metodológicas para disminuir este error relacionadas con las técnicas a utilizar, la homogeneidad de las unidades experimentales, el uso de bloques, la inclusión de covariables, diseños multifactoriales, repeticiones, etc.

Hay dos tipos de errores presentes en todo ensayo que describiremos de manera sintética a través del siguiente cuadro y son el Error de tipo I o α y el Error de tipo II o β , sus probabilidades pueden considerarse como los riesgos de tomar decisiones incorrectas. Ambos errores se encuentran estrechamente relacionados y varían inversamente (Sokal et al, 2013; Spiegel, 1993; Steel et al, 1996a).

		Realidad	
		H_0 verdadero Falso	H_0 Falso H_1 verdadero
Decisión que toma el investigador	Acepto H_0	Acierto	Error β O De Tipo II
	Rechazo H_0	Error α O De Tipo I	Acierto (Potencia Θ)

Figura 1: Cuadro descriptivo de los errores posibles en una prueba estadística

Es importante considerar que en todo experimento habremos fijado un límite para el Error de Tipo I o α que puede ser del 0,10; 0,05; 0,01; 0,001, etc., que llamaremos nivel de significación. Si bien esta decisión es arbitraria, en general, de manera convencional, se acepta un error de 0,05 (Corva et al, 2009; Sokal et al, 2013; Y-Lun Chou, 1993). Esto significa que acepto que cada 100 veces que se repita el ensayo, en 5 oportunidades se estará rechazando una hipótesis nula cuando es verdadera. Siempre que se estén evaluando efectos tóxicos de una sustancia se recomienda la utilización de valores menores para el Error de Tipo I o α .

Población y muestra

Toda investigación se lleva adelante en un contexto poblacional, es decir hay una población (o universo) objeto de estudio (Steel et al, 1996b; Wayne, 2017)). Esta población puede ser infinita o finita, en el primer caso está claro que sería imposible estudiarla en su totalidad, pero también, en el segundo caso, existen razones prácticas, económicas, operativas, etc que hacen necesaria la toma de una muestra a partir de la cual se estimarán parámetros poblacionales (Ej. Evaluación de parámetros sanguíneos de un individuo a través de la extracción de una pequeña cantidad de sangre).

A partir de una muestra se podrán estimar medidas descriptivas (media, varianza, frecuencias, etc) y posteriormente inferir parámetros poblacionales (μ ,) comparar poblaciones, relacionar variables, etc. (Macchi, 2013).

Por esta razón la muestra deberá cumplir con dos condiciones: debe ser representativa y probabilística. Representativa porque todas las formas alternativas de la variable en estudio deberán estar representadas en una proporción similar a la que se encuentran en la población, y, probabilística, porque todos los individuos, células, establecimientos, etc de la población deberán tener las mismas probabilidades de ser elegidos para integrar la muestra.

POBLACION O UNIVERSO



Tamaño de la muestra

Debemos considerar que no se puede analizar a la población en estudio, sino que todo experimento se realiza a través de una muestra y que, a partir de ella se estimarán parámetros poblacionales y se tomarán decisiones. Por esta razón es muy importante determinar de manera correcta el tamaño de esa muestra.

No sólo hay argumentos estadísticos que consideraremos más adelante sino criterios éticos que nos obligan a ser lo más rigurosos posibles en este punto.

Los criterios éticos se fundan en el respeto por la vida en todas sus formas llevando a evitar sufrimiento y/o muertes evitables. Debemos tener en cuenta que un ensayo realizado con un número de animales menor al necesario para identificar diferencias significativas no permitirá

obtener resultados válidos y por lo tanto ese ensayo deberá repetirse y los animales utilizados habrán sido sacrificados inútilmente.

El tamaño de la muestra depende de varios factores que se deben conocer previamente relacionados por un lado con la población en estudio y por el otro con el tipo de variable que se pretende analizar y su distribución:

- a. Variabilidad de los registros en una determinada población
- b. Frecuencias de las variables
- c. Representatividad de los datos incluidos en la muestra
- d. Nivel de confianza
- e. Precisión
- f. Tipo de variable
 - a. Cuanto mayor es la variabilidad de los datos obtenidos en una determinada población, mayor deberá ser el tamaño muestral para evitar que por azar la muestra no incluya valores extremos lo que llevará a una descripción equívoca al inferir los valores poblacionales a partir de los muestrales. Ej.: El antiguo refrán “para muestra basta un botón” es válido dada la homogeneidad del “comportamiento” de la variable, es decir se espera que todos los botones sean iguales por lo que un único botón sería suficiente para representar al resto.
Diferente situación sería tener una caja de caramelos con 20 variedades distintas y pretender probar todas ellas tomando sólo 5 caramelos.
 - b. En los casos en que se estudien fenómenos que aparecen en frecuencias muy bajas, éstas determinarán un aumento significativo en el tamaño de muestra. Ej.: Si una determinada patología de origen genético se observa en 1 de cada 1.000 nacimientos, en una muestra de 100 individuos habría una alta probabilidad de no detectar ningún nacido con la mencionada patología. Una conclusión equivocada sería asumir que esa patología no existe en la población analizada.
 - c. Cuando la variable se comporte de manera diferente bajo ciertas condiciones, todas ellas deberán ser representadas de manera proporcional. Ej.: Si sabemos que el número de crías nacidas totales no es igual en hembras multíparas primíparas respecto de su segundo parto en adelante y se desea conocer el promedio de crías nacidas por hembra en un establecimiento, se deberá incluir de manera proporcional información proveniente de hembras de primer parto y de segundo parto en adelante. Utilizar información proveniente sólo de alguno de los dos grupos subestimaré o sobreestimaré la productividad total del establecimiento.
 - d. El nivel de confianza se establece habitualmente en el 95% a través del valor normalizado (z) que corresponde a 1,96.
 - e. La precisión es un valor arbitrario que define un intervalo aceptable para la media o frecuencia de la variable.
 - f. El tipo de variable definirá los parámetros a utilizar en la fórmula de cálculo

Cálculo del tamaño de la muestra para variables cualitativas y cuantitativas

Para variables cualitativas (Corva et al, 2009):

$$n = \left(\frac{z}{c} \right)^2 \times (p \times q)$$

n = Tamaño de muestra
z = Nivel de confianza
c = Certeza
p = probabilidad de ocurrencia
q = antiprobabilidad

Para variables cuantitativas (Corva et al, 2009):

$$n = \left(\frac{z \times S}{c} \right)^2$$

donde,

n = Tamaño de la muestra
z = Nivel de Confianza
c = Certeza
S = Desvío estándar

Prueba piloto

Cuando se describen las fórmulas de cálculo para el tamaño de la muestra y en ambos tipos de variables observamos que el nivel de confianza se fija generalmente en el 95% ($z=1,96$) y la certeza es arbitraria fijada por el investigador. Sin embargo, tanto los valores de probabilidades para las variables cualitativas cuanto el valor del desvío estándar para las variables cuantitativas se refiere a la población en estudio.

Cuando se conoce la incidencia de una determinada patología o la variabilidad de la población respecto a una característica dada esta información será trasladada a la fórmula de cálculo.

Sin embargo, si no existe información a priori, se deberá realizar una prueba piloto que permita conocer, al menos de una manera aproximada, estos estimadores.

Es interesante el origen etimológico de estas palabras ya que “prueba” viene del latín y significa bueno y “piloto” del griego y significa timón. De alguna manera los datos obtenidos a partir de esta prueba serán el timón que nos permitirá establecer la dirección que deberemos tomar en función del cálculo del tamaño muestral.

Se trata de un ensayo experimental o primera aproximación al conocimiento del comportamiento de una determinada variable en una población a partir de un número reducido de individuos.

Técnicas de muestreo

Como ya se mencionó la variable en estudio puede o no comportarse de manera diferencial bajo ciertas circunstancias, por esta razón existen diferentes técnicas de muestreo que permiten facilitar la representatividad de la muestra.

Existen dos tipos de muestreos, probabilísticos y no probabilísticos. Dentro del primer grupo se pueden mencionar los muestreos aleatorios simples, estratificados, por conglomerados y polietápicos. En el segundo grupo se encuentran los muestreos por conveniencia y dirigidos.

En los casos en que la variable se comporte de modo similar bajo diferentes condiciones el muestreo por aleatorización simple es práctico, sencillo y útil. Consiste en la toma de los datos al azar (sorteo directo, números aleatorios obtenidos computacionalmente, etc.) sin ningún tipo de consideración adicional.

Cuando de la observación de la variable surge un comportamiento diferencial bajo ciertas condiciones, se deberá tomar información proporcional para permitir que todas las condiciones estén representadas, a este tipo de muestreo se lo conoce como muestreo estratificado. Dentro de cada estrato se tomará información utilizando alguna técnica de aleatorización.

Otro tipo de muestreo es el muestreo por conglomerados donde se reconocen conjuntos similares y sólo se estudian algunos de ellos. La determinación de cuáles de ellos serán evaluados siempre deberá ser de manera aleatoria.

Por último, podemos mencionar aquellos muestreos polietápicos o por etapas que se realizan partiendo de algunos conglomerados tomados al azar, que se consideran las unidades muestrales primarias y a partir de ellas submuestras sucesivas de estratos con menor grado de complejidad

Existe como técnica de muestreo aquella denominada por conveniencia. A modo de ejemplo se puede considerar que se desea conocer el nivel de contaminación de los ríos de la provincia de Buenos Aires y se decide “por conveniencia” tomar muestras de agua de los arroyos que se encuentran a una distancia no mayor de 50 km del laboratorio donde serán procesadas. Esta técnica, si bien es válida, pocas veces es representativa de la población, y puede llevar a cometer errores de diagnóstico.

Algo similar puede suceder en el caso de los muestreos dirigidos donde el investigador decide qué individuos participan del experimento. Esta técnica se suele utilizar cuando se incluyen en el estudio animales enfermos que debido a la baja frecuencia de la patología sería poco

probable incluirlos por azar en una muestra reducida de individuos. Un ejemplo de muestreo dirigido es la elección de ciertos músculos para la determinación de presencia de *Trichinella spiralis* en cerdos a partir del conocimiento que se tiene sobre su ubicación más frecuente.

Diseño de experimentos

Todo experimento parte de una hipótesis que se desea probar o rechazar, es decir existe alguna evidencia empírica que lleva al investigador a plantearse teorías y preguntas que espera sean dilucidadas a través de los resultados obtenidos.

Si la planificación del experimento tiene errores metodológicos los resultados no darán respuestas satisfactorias o, peor aún, darán respuestas que se creerán ciertas cuando no lo son porque se originan en falsos supuestos.

Por esta razón, para diseñar un experimento debemos considerar al menos cuatro aspectos:

1. Definición de las unidades experimentales
 2. Tipo de variable a estudiar
 3. Tipo de distribución de la variable
 4. El tipo de análisis a realizar
 - a. Descripción de variables
 - b. Comparación entre grupos
 - c. Relación entre variables
1. En estos ensayos la unidad experimental es siempre el animal. Se debe tener especial atención en aquellos estudios celulares (ya sea de cultivos de tejidos provenientes de animales, células tumorales implantadas, etc) ya que, si bien el objeto de estudio es la célula y su condición, no podrán todas provenir del mismo individuo.
- Las unidades experimentales no podrán representar de manera aislada un determinado tratamiento o condición ya que quedarían confundidos estos tratamientos con el impacto idiosincrático del individuo.
2. Las variables a estudiar pueden clasificarse en dos grandes grupos, variables cualitativas y variables cuantitativas, éstas últimas pueden ser discretas o discontinuas o continuas. Definir correctamente el tipo de variable a estudiar determina a priori la metodología a utilizar.
- Las variables cualitativas (cuyas variantes tienen diferencia de calidad, por ejemplo: color de pelaje, preñada/vacía, aborto si/no, etc.) pueden ser descritas a través de sus frecuencias, mientras que el método de Ji-cuadrado compara grupos entre sí o relaciones entre variables.
- Las variables cuantitativas (cuyas variantes son de cantidad y tienen infinitos valores entre los extremos, por ejemplo: peso, altura, ganancia diaria, intervalo parto concepción, etc.). En este caso las descripciones podrán realizarse a partir de las medidas de tendencia central (media, mediana y moda) y de dispersión (varianza, desvío estándar, rango, error estándar). Para la comparación entre grupos podrá utilizarse la Prueba t de Student o el Aná-

lisis de Varianza y las relaciones entre variables podrán estimarse a través de una Prueba de Regresión.

3. Distribución de la variable

La distribución de las frecuencias de la variable puede ser Normal, Binomial o de Poisson (Spiegel, 1993; Sokal et al, 2013). Las variables cuantitativas con distribución normal permitirán la utilización de métodos paramétricos como los mencionados en el punto 2.

Cuando la distribución tenga un sesgo significativo se podrán considerar dos alternativas:

- Transformar la variable de modo que normalice su distribución
- Utilizar pruebas no paramétricas (Ji-cuadrado; Wilcoxon, Kruskal-Wallis, etc.)

4. El tipo de análisis a realizar determinará la prueba estadística a utilizar una vez considerados tanto el tipo como la distribución de la variable.

Toda prueba estadística tiene supuestos a considerar que de no cumplirse impedirán su uso, ya que los resultados son seriamente distorsionados y como consecuencia se llega a conclusiones erróneas.

Tomemos como ejemplo el Análisis de Varianza (Sokal et al, 2013; Steel et al 1996a) para el caso de un factor y efecto fijo (Modelo I) donde,

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_j + \epsilon_{ij}$$

Y_{ij} = registro del i-ésimo individuo que recibió el j-ésimo tratamiento

μ = media general

α_j = efecto del j-ésimo tratamiento

ϵ_{ij} = error del experimento

- a. Los datos deben distribuirse normalmente con $\mu=0$ y $\sigma^2=1$
 - b. Las observaciones deben ser independientes entre sí
 - c. Las varianzas deben ser homogéneas (homocedasticidad)
- a. Observar en una distribución valores de sesgo estandarizados mayores a 2 y menores a -2 que muestran el desplazamiento de la curva a derecha o izquierda de la media o valores de curtosis estandarizada mayores a 2 y menores a -2 que ponen en evidencia una gran dispersión de los datos alrededor de la media, serían indicadores claros de distribuciones no normales. Las pruebas de Kolmogorov-Smirnov o Shapiro-Wilks son las más utilizadas para verificar la normalidad de la distribución.
 - b. El caso más frecuente en el análisis de datos no independientes es cuando se obtiene información de individuos emparentados, registros del mismo individuo en distinto momento, etc. La distribución aleatoria de los residuos es un buen indicador de distribución independiente de los datos.
 - c. La prueba Levene que utiliza el estadístico de Fischer permite evaluar la homogeneidad de varianzas entre grupos.

Como ya se mencionó anteriormente, determinar que alguno de estos supuestos no se cumple llevará inevitablemente a replantear el tipo de prueba a utilizar. En el caso de distribuciones no normales se deberá transformar la variable o utilizar pruebas no paramétricas y en el caso de dependencia entre las observaciones se podrá hacer uso de diseños más complejos que permitan la identificación de estos efectos como en el caso de los análisis multivariados o a través del uso de covariables.

Referencias

- Corva, S.G., Silvestrini, M.P. Antonini, A.G. (2009) *Manual de Bioestadística Veterinaria*. La Plata. Ed. ProvetSur.
- Macchi, R.L. (2013). *Introducción a la estadística en Ciencias de la Salud*. Buenos Aires, Argentina. Ed. Panamericana
- Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. (2013) *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. New York, USA. New York University.
- Spiegel, M.R. (1993) *Estadística*. España. Ed. McGraw-Hill.
- Steel, R.G., y Torrie, J.H. (1996) *Bioestadística. Principios y Procedimientos*. México Ed. McGraw-Hill.
- Steel, R.G., Torrie, J.H. Dickey, D.A. (1996) *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach*. Ohio, USA. Ed. McGraw-Hill.
- Wayne, D. Bioestadística. (2017) *Base para el análisis de las ciencias de la salud*. USA. Ed. L. Wiley
- Ya-Lun Chou. (1993) *Análisis estadístico*. México. Ed. McGraw-Hill.