

REVISTA DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA PARA LAS CIENCIAS DEL ANIMAL DE LABORATORIO

ANIMALES DE LABORATORIO

Verano 2014 . Número 62

EL TAMAÑO DE LA MUESTRA

Diseño experimental y consideraciones
sobre el tamaño de muestra.

La replicación justificada de procedimientos:
Una oportunidad de mejora.

Cálculo del tamaño muestral
en procedimientos de experimentación
con animales. Valoración de las incidencias.

Entrevista: Alberto Pastor Campos
Secretario del Órgano Evaluador de
Proyectos en la Universidad
Miguel Hernández de Elche
Veterinario especialista en salud
y bienestar animal.



sociedad española
para las ciencias
del animal de laboratorio





Centrados en su investigación.

Como proveedor global de modelos de alta calidad de investigación, dietas y servicios de asistencia, Harlan Laboratories ha demostrado su rendimiento con equipos de investigación en todo el mundo. Nuestra misión es la de ayudarle a mejorar sus investigaciones.

Para más información, visite nuestra Web www.harlan.com o contacte con nosotros en rms.es@harlan.com

Modelos

Dietas

Servicios



©2010 Harlan Laboratories, Inc.
Harlan, Harlan Laboratories, Helping you do research better, and the Harlan logo are trademarks of Harlan Laboratories, Inc. www.harlan.com

GRUPO EDITOR

Grupo Editor



REVISTA DE LA SOCIEDAD

ESPAÑOLA PARA LAS
CIENCIAS DEL ANIMAL
DE LABORATORIO

www.secal.es

DIRECTORA

Teresa Rodrigo Calduch
direccion.revista@secal.es

SUBDIRECTOR

Hernán Serna Duque
direccion.revista@secal.es

EDITORES DE ESTILO E IMAGEN

Olga Fernández Rodríguez
Juan de Dios Hourcade Bueno
Lara Sedó Cabezón

PUBLICIDAD

Amaia Enbeita
publicidad.revista@secal.es

FOTOGRAFÍA DE PORTADA

Shutterstock

DISEÑO Y MAQUETACIÓN

CONEXION E.P.
clientes@agenciaconexion.com.co

IMPRIME

LCS REPROGRAF

DEPÓSITO LEGAL

M-1362-1999

Responsables Secciones



**NOTICIAS SECAL
ACTUALIDAD**
Cristina Gerbolés Freixas
kgerboles@gmail.com



TÉCNICAS
María Granada Picazo
mgpicazo@sescam.jccm.es



**ÉTICA Y LEGISLACIÓN
SEGURIDAD EN 5 MINUTOS**
Jesús Martínez Palacio
jesus.martinez@ciemat.es



¿Y TÚ QUÉ OPINAS?
José Luis Martín Barrasa
jlmbarrasa@gmail.com



LIBROS Y PÁGINAS WEB
Daniel Baizán Vicent
baizan@vivotecnia-ms.com



FACTOR HUMANO
Javier Fidalgo Fernández
fidalgo@ocelata.com

Junta de Gobierno

PRESIDENCIA

Javier Guillén Izco (2011-2015)

VICEPRESIDENCIA

Antonio Martínez Escandell (2013-2017)

SECRETARÍA

Elena Ciordia Balduz (2011-2015)

VICESECRETARÍA

Angel Naranjo Pino (2013-2017)

TESORERÍA

Isabel Blanco Gutiérrez (2011-2015)

VICETESORERÍA

Carlota Largo Aramburu (2013-2017)

VOCALÍAS

Rosa Bonavía Abril (2011-2015)
Juan de Dios Hourcade Bueno (2013-2017)
Leticia Martínez Caro (2011-2015)
NorayBio (2013-2017)
Luis Parra García (2011-2015)
Anna Puyol ALTarriba (2011-2015)
María Reyes Panadero (2013-2017)
Juan Rodríguez Cuesta (2013-2017)

SOCIOS BENEFACTORES:

ANADE
ANIMALARIA
ANTONIO MATACHANA S.A.
BIOESCAPE GmbH
BIOSIS S.L.
CENTRE D'ELEVAGE JANVIER
CHARLES RIVER LABORATORIES
DINOX S.L.
DYNAMIMED
ETYCA S.L.
GLAXO SMITHKLINE
GRANJA S. BERNARDO
HARLAN LABORATORIES MODELS
MEVION TECHNOLOGY S.L.
IZASA S.A.
NIRCO S.L.
NORAY BIOINFORMATICS S.L.U.
PANLAB S.L.U.
RETTENMAIER IBERICA S.L.
SODISPAN RESEARCH SL
SOURALIT
SDS DIETEX FRANCE
STERILTECH S.L.
STERIS
VESTILAB S.A.
VIVOTECNIA

Tan cerca
como ellos,
del personal
del animalario.



Anúnciese en ANIMALES DE LABORATORIO,
la revista en habla hispana más importante del sector
y posicione sus productos directamente
en manos de los animalarios.

► Foto Shutterstock



sociedad española
para las ciencias
del animal de laboratorio

www.secal.es

INDICE

EDITORIAL

7 NOTICIAS

- Actividades de la SECAL.

11 ACTUALIDAD

- Avance científico para modular la sensibilidad al dolor.
- La inhibición de una familia de proteínas ayuda a combatir la leucemia mieloide crónica.
- Nueva diana terapéutica contra el cáncer de mama.
- La dieta mediterránea baja la presión arterial.

16 ARTÍCULOS

- Diseño experimental y consideraciones sobre el tamaño de muestra.
- La replicación justificada de procedimientos: Una oportunidad de mejora.
- Formación como herramienta de mejora de la reproducibilidad de los artículos.

31 TÉCNICAS

- Cálculo del tamaño muestral en procedimientos de experimentación con animales. Valoración de las incidencias.

35 ÉTICA Y LEGISLACIÓN

- El des-engaño de las células STAP.

39 FACTOR HUMANO

- Ciento Cincuenta.

41 LIBROS Y PÁGINAS WEB

- La comprensión de la muestra.

44 ¿YTÚ QUÉ OPINAS?

- Conejos... ¿bloqueados?

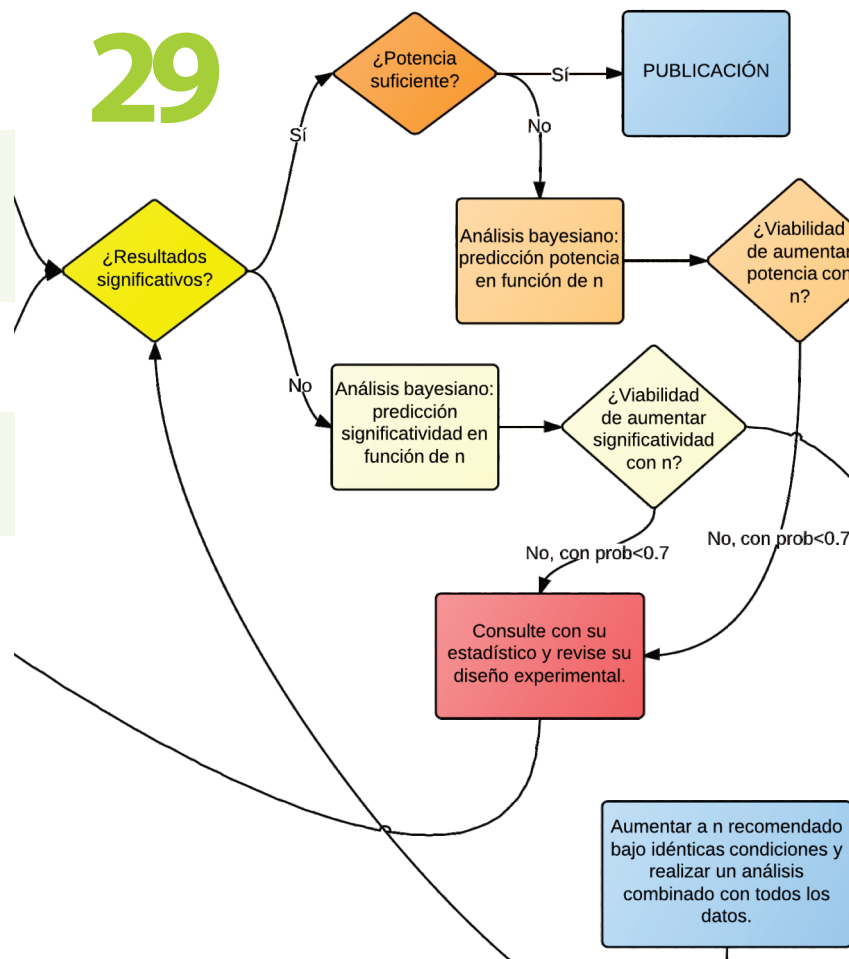
46 SEGURIDAD EN 5 MINUTOS

- Como nos ayudan las nuevas tecnologías. De la seguridad e higiene en el trabajo al bienestar animal. Medida de iluminación y ruido en nuestras instalaciones con App's para teléfono móvil.

51 ENTREVISTA

- Alberto Pastor Campos.

54 CRUSECAL



EDITORIAL

Más que una cifra

En la mayoría de las ocasiones en las que se desarrolla una hipótesis en la que los animales adquieren un valor importante como fuente de conclusiones, el investigador trabaja inicialmente sobre un marco de criterios y procedimientos dentro del método científico con objeto de preparar una batería experimental, que le permita obtener datos válidos y reproducibles.

En este número pretendemos llevar al lector, por medio de una serie de artículos, a la reflexión y la práctica dentro del diseño estadístico, con el objetivo final de proporcionar herramientas que hagan que mejore, si cabe, el diseño, el análisis y la interpretación de resultados en sus estudios experimentales. Llevaremos el cálculo del tamaño de la muestra por un río de información rico en detalles, que al final nos dejará en un puerto lleno de probabilidades, en el cual descubriremos que el trabajo realmente no está en la determinación de la N, si no en la puesta a punto de fórmulas prácticas, y conciencias claras y decididas a reflexionar y formarse en relación al número de animales que se usan dentro del ámbito científico.

Consideramos que este número servirá para actualizar a los investigadores y a los miembros de Órganos Evaluadores de Proyectos, sobre los aspectos básicos a considerar en el diseño de los experimentos. Lo que sin duda, se verá reflejado en una disminución o aumento en el número de animales utilizados, pero sobre todo en la calidad de los resultados y la reproducibilidad de los estudios.

Dirección Revista SECAL



Actividades de la SECAL

El 24 de junio de 2014 se celebró una Reunión Ordinaria de la Junta de Gobierno de la SECAL, en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. A continuación se presenta un resumen de los principales temas tratados.

Relaciones internacionales

Federation of Laboratory Animal Science Associations (FELASA)

FELASA pide que se compartan las estadísticas de los usos de animales para poder comprobar si se produce un incremento irreal del número de usos con las nuevas tablas que se deben utilizar a partir del 2014.

La iniciativa europea en contra de la Directiva ha recogido más de un millón de firmas lo que obliga a hacer una audición pública en el Parlamento. FELASA no puede tomar ninguna acción directa por lo que se pide a las asociaciones que contacten con los nuevos parlamentarios elegidos en sus países y les den información al respecto. Desde SECAL se preparará un pequeño escrito para enviar a todos los grupos políticos españoles que tienen representantes en el parlamento europeo, en el que se expondrán las razones por las que esta iniciativa antiviviseccionista no debería seguir adelante y por qué la experimentación con animales es necesaria y no debería ser considerada vivisección.

El representante suizo ha propuesto crear una red de *Animal Welfare Officers* a nivel europeo para armonizar criterios, al estilo de la que está establecida en Suiza.

International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS)

El comité europeo ha otorgado 7 becas a investigadores del este de Europa para tener estancias formativas en centros de Europa occidental.

Laboratory Animals Ltd. (LAL)

La sociedad francesa no ha aceptado la última propuesta en la que se establecía el 50% como mínimo de los miembros de cada sociedad suscritos a la revista. Esta sociedad tiene un elevado número de miembros y ha presentado una nueva propuesta estableciendo diferentes precios de la revista en función del porcentaje de miembros suscritos. Esta propuesta se remitirá de nuevo a las sociedades y la SECAL tendrá que decidir.

Para seguir optando al descuento actual el porcentaje de socios suscritos deberá ser del 81%, si es menos el precio final se incrementará respecto al actual. Esto afectará a la idea de tener dos cuotas distintas de socio de la SECAL, con o sin revista ya que el precio de la revista variará en función del número de socios interesados en recibirla.

Temas Nacionales. Legislación

Relaciones con los Ministerios

La SECAL ha celebrado un seminario informativo sobre la cumplimentación de los cuadros estadísticos del uso de animales en experimentación y otros fines científicos según la Directiva Europea 63/2010.

El seminario ha sido impartido por Dña Pilar León Arnáiz, del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Los documentos y vídeos de esta sesión serán colgados en la web.

Están funcionando ya algunos Grupos de trabajo de implementación de la directiva sobre *Animal Welfare Bodies*. La intención es homogeneizar las funciones de estos órganos, los mínimos de composición, expertos, etc. De este grupo saldrá un documento de recomendaciones que se colgará en la web de la Comisión previsiblemente en agosto/septiembre.

Otras actividades

Congreso Cáceres 2015

En el congreso, además de las comunicaciones orales habrá diez sesiones científicas. Se han decidido cuatro temas para los Workshops además de los directores y coordinadores de los mismos.

Ya se ha realizado el dossier para los exhibidores y el plano para la distribución de los stands.

Noticias

Convenios formalizados.

Ya está finalizada la tramitación del convenio con AEBios y SEGIB. También están en trámite los dos últimos convenios aprobados, el solicitado para la realización del Congreso de Ciencias Fisiológicas de Granada y el convenio para realizar la Jornada de Bienestar animal solicitado por el Hospital Clínico Veterinario de la Complutense.

AALAS-GPAC: e-learning library.

El grupo de cincuenta y un miembros está funcionando, cuarenta y cinco de ellos ya están realizando cursos, todavía quedan dos plazas sin cubrir.

**TÚ TAMBIÉN
PUEDES SER
PARTE DE
LA SECAL**
¡HAZTE SOCIO!

www.secal.es



CRC Vestilab®
Clean Room Control

**Control Total en Animalarios,
Centros I+D, Salas Estériles / Blancas**



www.vestilab.com

a member of the
ALSiCO
group

VI JORNADA CIENTÍFICA SECAL BARCELONA

JUEVES 20
NOVIEMBRE
2014

Sala Llimona Hotel Catalonia Barcelona Plaza
Plaza España 6-8
08014 Barcelona

APRENDER ES ADAPTARSE: FORMACIÓN PARA EL CAMBIO

PROGRAMA

- 10:30-11:00 **Recepción participantes**
- 11:00-11-15 **Inauguración de la jornada**
Javier Guillen (Presidente SECAL)
- 11:10-12:35 **Requisitos de capacitación en el manejo de animales de experimentación. Nueva regulación.**
Salvador Fortes (Mineco)
- 12:45-13:30 **Signos clínicos: técnicos en acción**
Angel Naranjo Pino (CNB-CSIC Madrid)
- 13:30-14:30 **Pausa comida**
- 14:30-15:00 **Modelos de biobanco de tejidos obtenidos de animales de experimentación con fines de investigación biomédica**
María Antonia Fortuño (CIMA, Universidad de Navarra)
- 15:00-15:30 **Controles Microbiológicos Ambientales y de Agua en un Animalario**
Cesar Eguiluz Fernandez (CNM, Madrid)
- 15:30-18:00 **Asamblea General de Socios de la SECAL**

Más información en www.secal.es



INSTRUMENTACIÓN E INSTALACIONES CIENTÍFICAS

C/. Laguna del Marquesado 14, Nave 1
28021 MADRID
Teléfono: 91 710 95 47
Fax: 91 796 65 52
E-mail: steriltech@steriltech.net
www.steriltech.net

Proteja su Investigación de la Contaminación con la Tecnología Clarus™ Peróxido de Hidrógeno Vaporizado



- Totalmente escalable
- Libre de residuos
- Baja Temperatura
- Excelente compatibilidad de materiales



CLARUS™ Z
Especialmente diseñado para salas
▪ Salas hasta 500 m³



CLARUS™ C

- SAS Biológicos
- Salas hasta 350 m³
- Racks Ventilados
- Aisladores
- Lava-racks



CLARUS™ L

- Racks Ventilados
- Aisladores
- Incubadores de CO₂
- Lava-racks



BMT Iberia, s.l.
C/. Laguna del Marquesado 14, Nave 1
28021 MADRID
Teléfono: 91 7230347
Fax: 91 5054494
E-mail: bmtiberia@steriltech.net
www.bmtiberia.es

Esterilizadores a Vapor STERIVAP HP IL, VAKULAB, UNISTERI



Avance científico para modular la sensibilidad al dolor

Científicos del Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCYL) han dado un paso importante para tratar de modular el dolor.

« Un trabajo con ratones modificados genéticamente publicado en la revista científica *Journal of Neuroscience* confirma la implicación de ciertas proteínas en la sensibilidad al dolor y abre la puerta a posibles tratamientos frente al dolor crónico. »

El equipo de Juan Carlos Arévalo trabaja desde hace años con las neurotrofinas, una familia de proteínas que son factores de crecimiento y desempeñan un papel muy importante en el sistema nervioso, ya que favorecen la supervivencia de las neuronas, su crecimiento, diferenciación y la interacción entre ellas y en la sensibilidad al dolor.

En este trabajo se han centrado especialmente en una de estas neurotrofinas, denominada NGF (del inglés *nerve growth factor*), y en su receptor, TrkA, al que se une para cumplir sus funciones.

El NGF es una proteína importante por sus efectos sobre la supervivencia neuronal y el crecimiento; es un mediador del dolor periférico y en adultos modula la respuesta al dolor. La importancia de NGF se ha destacado por observaciones recientes de que casi todos los casos de insensibilidad congénita al dolor son causados por mutaciones en el receptor de NGF. Se han relacionado mutaciones en el gen *TrkA* con una neuropatía sensorial

por la que algunos individuos son incapaces de sentir dolor. Estas personas tienen mutaciones que convierten a este receptor en inactivo y el resultado es que no responden ante estímulos dolorosos.

Investigadores del INCYL han generado un receptor más activo para comprobar el papel de NGF y TrkA en la modulación del dolor. Los ratones modificados con este propósito han mostrado un incremento en la sensibilidad al dolor por calor, frío o inflamación. Además, estos animales tienen una mayor inervación de la piel, con lo que recogen más los estímulos dolorosos.

Para conseguir este efecto en los ratones, los científicos han modificado la ubiquitinación del receptor, proceso mediante el que una proteína llamada ubiquitina se une a los receptores TrkA, lo que hace que se degraden. Al impedir la ubiquitinación, el receptor no se degrada, está activo durante más tiempo y por eso los ratones muestran más sensibilidad al dolor.

El resultado es importante porque *“si somos capaces de modular esta modificación del receptor, es decir, la ubiquitinación, seríamos capaces también de modular la sensibilidad al dolor”*, destaca Juan Carlos Arévalo.

Los investigadores comenzaron a trabajar con cultivos de células y experimentos *in vitro* y gracias al conocimiento que adquirieron han podido diseñar los ratones modificados genéticamente con los que han trabajado en los últimos años. El siguiente paso sería diseñar moléculas que, en efecto, permitan modular el dolor.



Foto: shutterstock

<http://www.dicyt.com/noticias/avance-cientifico-para-modular-la-sensibilidad-al-dolor>

<http://www.agenciasinc.es/Noticias/Ratones-hipersensibles-ayudaran-a-modular-el-dolor-cronico>

T. Yu, L. Calvo, B. Anta, S. López-Benito, R. López-Bellido, *et al.* **In Vivo Regulation of NGF-Mediated Functions by Nedd4-2 Ubiquitination of TrkA.** *Journal of Neuroscience* 2014, 34(17): 6098-106. DOI:10.1523/JNEUROSCI.4271-13.2014.

La inhibición de una familia de proteínas ayuda a combatir la leucemia mieloide crónica

Un equipo de investigación del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL) ha identificado una familia de proteínas denominadas NADPH oxidasas que podría ser una buena diana terapéutica para luchar contra la leucemia mieloide crónica. Los científicos piensan que la combinación de la terapia existente con inhibidores de esta familia de proteínas, podría dar muy buenos resultados, tal y como ya han comprobado en cultivos celulares y modelos animales.

Los resultados de este trabajo publicados en la revista científica *Clinical Cancer Research* confirman que las NADPH oxidasas tienen un papel importante en el cáncer, ya que al mismo tiempo que este equipo realizaba esta investigación en leucemia, otros grupos han ido publicando resultados similares en tumores sólidos.

Los científicos consideran que el dato más importante del estudio es que cuando se combina la terapia actual con la inhibición de esta familia de proteínas, los efectos son mucho más fuertes. Además, las células normales no se verían demasiado afectadas por esa acción combinada, ya que no expresan la oncoproteína que origina la enfermedad. Es decir, que el resultado de esta combinación de fármacos sería un tratamiento muy específico contra las células tumorales.

Esta familia de proteínas tiene una función fisiológica en las células normales, están especializadas en la producción de radicales libres del oxígeno, pero su actividad se ve incrementada en las células del cáncer.

La leucemia mieloide crónica es el paradigma de las enfermedades que se han empezado a tratar con una diana molecular definida, tiene una proteína oncogénica a la que se dirigen los inhibidores de la tirosina quinasa, que son muy eficaces en controlar la enfermedad. Sin embargo, estos inhibidores no acaban de curar la enfermedad, sino que queda latente y en el momento en el que se retiran los inhibidores vuelve a aparecer.

Todavía queda mucho camino, porque a pesar de los buenos resultados en cultivos de células y en animales, se tienen que desarrollar inhibidores específicos de estas enzimas que puedan utilizarse en humanos.

« En la actualidad los investigadores buscan tratamientos complementarios que puedan actuar de una forma sinérgica con los inhibidores de la tirosina quinasa. Este avance es un paso importante para conseguirlo y alcanzar el gran objetivo: curar la enfermedad y retirar el tratamiento. »

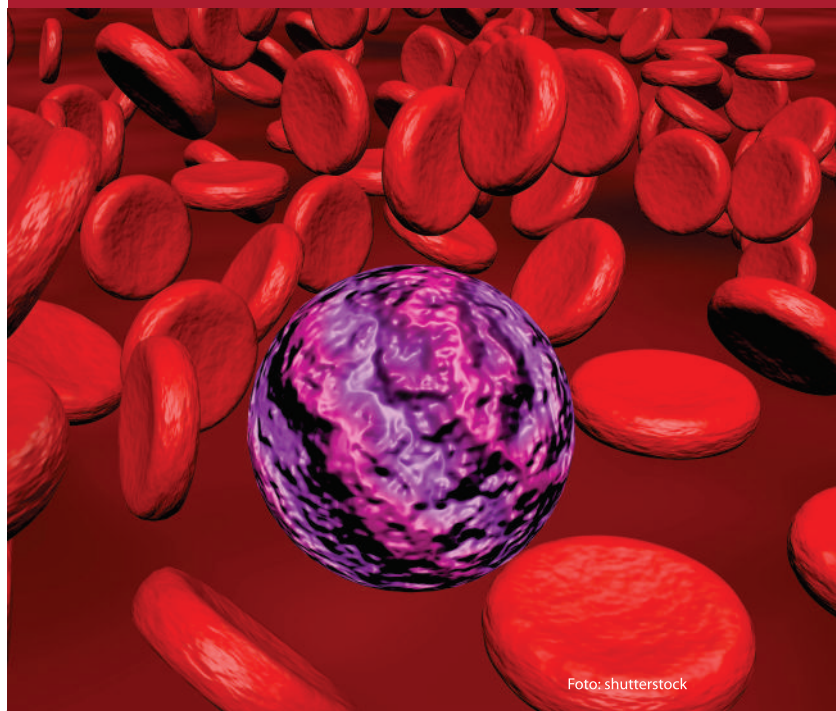


Foto: shutterstock

<http://www.dicyt.com/noticias/la-inhibicion-de-una-familia-de-proteinas-ayuda-a-combatir-la-leucemia-mieloide-cronica>

B. Sánchez-Sánchez, S. Gutiérrez-Herrero, G. López-Ruano, R. Prieto-Bermejo, M. Romo-González, et al. **NADPH oxidases as therapeutic targets in chronic myeloid leukemia**. *Clinical Cancer Research* 2014, May 15. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3044

Nueva diana terapéutica contra el cáncer de mama

Científicos del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca identifican una proteína clave en el desarrollo de los subtipos de cáncer de mama más frecuentes; han identificado a la proteína R-Ras2, también denominada TC21, como diana terapéutica contra el cáncer de mama.

Los investigadores de este centro mixto del CSIC y la Universidad de Salamanca han comprobado que al eliminar esta proteína en ratones se frena el crecimiento de los tumores primarios y se evita la metástasis en los pulmones.

El estudio tenía el doble objetivo de estudiar el papel de esta proteína a nivel fisiológico y su potencial como diana terapéutica; saber si la inhibición de esta proteína ejercía algún efecto sobre el crecimiento tumoral y las metástasis, y además, comprobar si la inhibición de TC21 tenía algún efecto colateral negativo que pudiera descartar tratamientos que atacaran esta molécula.

Las respuestas a las dos cuestiones suponen un potencial avance contra el cáncer de mama. Por una parte, *“si eliminamos la proteína, los animales sanos, no sufren alteraciones graves que nos hagan descartar terapias”*, comenta el científico Xosé Bustelo. Por otra, el papel de TC21 es muy relevante para el desarrollo de la enfermedad. Suprimir esta molécula evita el crecimiento de los dos subtipos de cáncer de mama más frecuentes, los denominados Her2 positivos (porque tienen una alta expresión del biomarcador Her2) y los triple negativos (que no expresan ni Her2 ni los receptores para estrógenos y progesterona).

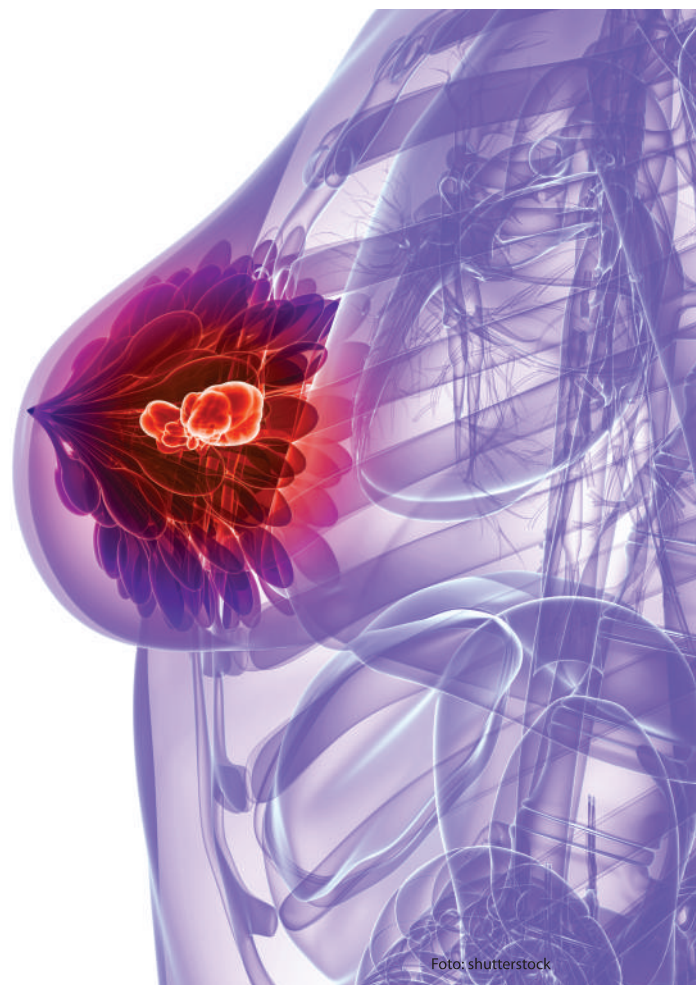


Foto: shutterstock

« La eliminación de esta proteína no impide que las células salgan del tumor y vayan a los tejidos periféricos, pero una vez que llegan a ellos no pueden sobrevivir, lo que explica que no se registren metástasis en el pulmón. »

El artículo que aparece en *Nature Communications* se centra en el cáncer de mama aunque los científicos también tienen datos positivos en tumores linfoides y hematopoyéticos que aún no han sido publicados.

<http://www.dicyt.com/noticias/nueva-diana-terapeutica-contra-el-cancer-de-mama>

R.M. Larive, G. Moriggi, M. Menacho-Márquez, M. Cañamero, E. de Álava, et al. **Contribution of the R-Ras2 GTP-binding protein to primary breast tumorigenesis and late-stage metastatic disease.** *Nature Communications* 5, Article number: 3881. DOI:10.1038/ncomms4881

La dieta mediterránea baja la presión arterial

Comer grasas no saturadas como las que contiene el aceite de oliva, junto con vegetales de hoja verde, entre otros, genera un tipo de ácido graso que disminuye la presión arterial.

El estudio, publicado en *Proceedings of the National Academy of Sciences*, fue llevado a cabo en ratones y ayuda a entender trabajos anteriores en los que se concluye que la dieta mediterránea combate la hipertensión.

« La investigación muestra que una dieta que combina grasas no saturadas con vegetales ricos en nitritos, como el aceite de oliva y la lechuga, puede proteger de la hipertensión arterial. »

La dieta mediterránea incluye grasas insaturadas que se encuentran en el aceite de oliva, las nueces y los aguacates, junto con verduras como la espinaca, el apio y las zanahorias que son ricos en nitritos y nitratos. Cuando se combinan estos dos grupos de alimentos, la reacción de los ácidos grasos insaturados con compuestos de nitrógeno en las verduras provoca la formación de ácidos grasos nitro.

En el estudio con ratones se investigó el proceso por el que estos ácidos grasos nitro reducen la presión arterial, analizando la inhibición de una enzima conocida como epóxido hidrolasa soluble que regula la presión arterial. Los investigadores detectaron que ratones modificados genéticamente para ser resistentes a este proceso inhibitorio, mantuvieron su presión arterial alta a pesar de ser alimentados con ácidos grasos nitro, mientras que los ratones control bajaron la presión sanguínea con la misma dieta.

Los resultados de este estudio ayudan a explicar por qué la investigación anterior ha demostrado que una dieta mediterránea suplementada con aceite de oliva extra virgen o frutos secos puede reducir la incidencia de problemas cardiovasculares.



Foto: shutterstock



Foto: shutterstock

<http://www.20minutos.es/noticia/2144769/0/dieta-mediterranea/acidosis-nitro/hipertension/#xtor=AD-15&xts=467263>

R. L. Charles, O. Rudyk, O. Prysyzhna, A. Kamynina, J. Yang, *et al.*
Protection from hypertension in mice by the Mediterranean diet is mediated by nitro fatty acid inhibition of soluble epoxide hydrolase.
PNAS 2014, 111(22):8167-72.

Estás a un clic 

de navegar en nuestro sitio web,
donde encontrarás información de
las ciencias del animal de laboratorio
www.secal.es



sociedad española
para las ciencias
del animal de laboratorio

Diseño experimental y consideraciones sobre el tamaño de muestra

A. Pastor, A.M. Mayoral y J. Morales

Universidad Miguel Hernández de Elche

Introducción

El diseño de un experimento es el conjunto de todos aquellos pasos previos que deben realizarse para asegurar que los datos que se obtengan finalmente, permitan realizar un análisis objetivo y obtener generalizaciones válidas sobre el problema planteado. Antes de comenzar el experimento se debe especificar claramente el problema, los objetivos y las preguntas que la investigación debe contestar, es decir lo que se denomina en Estadística “contrastes de interés”. Mead (1988) considera que el diseño experimental es un trabajo conjunto entre investigador y estadístico y debe desembocar en:

- i) Definir claramente los objetivos inherentes al problema experimental que se desea analizar, estableciendo la estructura de tratamientos a realizar para proporcionar respuestas al problema planteado (lo que se denomina fase de concepción);
- ii) Determinar los recursos experimentales disponibles (lo que se denomina fase de recursos);
- iii) Hacer compatibles ambas acciones, reconociendo y teniendo en cuenta las restricciones prácticas.

Sin embargo, durante la fase de recursos el investigador siempre se plantea las siguientes preguntas: ¿cuántos sujetos son necesarios para poder establecer conclusiones estadísticas de forma concluyente? y ¿qué ocurre si no se puede alcanzar el tamaño necesario?

La respuesta a la primera pregunta son otras muchas preguntas como por ejemplo: ¿se ha realizado una experiencia similar anteriormente?, ¿cuál es el objetivo que se persigue alcanzar?, ¿con que significación estadística se desea concluir?, ¿cuál es el efecto que se espera obtener?. Todas ellas aportan información relevante para tratar de determinar el tamaño de muestra más adecuado para el experimento planteado. Sin embargo, si una vez fijado en función de los criterios establecidos

por el investigador, dicho tamaño no se puede alcanzar por falta de recursos o tiempo, no se debe desechar el experimento. En este caso se deberá establecer claramente el tipo de conclusiones a las que se podrá llegar dado el tamaño de muestra que se ha podido alcanzar.

El objetivo de este artículo es presentar de forma lo más práctica posible el problema de la determinación del tamaño de muestra en diferentes situaciones que son habituales dentro del diseño de experimentos. La formulación genérica que vamos a considerar viene dada por una variable o característica Y , denominada variable respuesta o de interés, que se encuentra clasificada según una variable o característica T , denominada variable predictora, clasificadora o explicativa, y que representa los diferentes tratamientos o situaciones que se piensa pueden afectar al comportamiento de la respuesta. Más concretamente, nos centraremos en estudiar los problemas asociados con el cálculo del tamaño de la muestra para la comparación de diferentes datos: dos proporciones, dos medias independientes, dos medias emparejadas y varias (k) medias independientes.

Para obtener el tamaño de muestra adecuado en cualquier experimento hay que establecer: el objetivo u objetivos del estudio; el diseño del experimento a realizar; la hipótesis de trabajo, y la determinación de la diferencia de los datos que se considerará significativa en el experimento planteado. A continuación detallamos cada uno de estos aspectos.

Objetivos del estudio

El establecimiento de los objetivos del estudio corresponde al investigador y tienen que ser planteados desde el inicio del experimento. Para ello es necesario hacer una reflexión concienzuda basada en una serie de preguntas cuyas respuestas deben ayudar a diseñar correctamente el experimento. Estas deben ser: ¿qué variable(s) identifica(n) el problema?, ¿cómo ha(n) de cuantificarse la(s) variable(s)?, ¿qué factores influyen sobre la(s) variables(s)?, ¿cuáles de ellos son interesantes para la investigación?, ¿cuáles son importantes pero no interesan y

cuáles no son importantes?, ¿sobre qué población se generalizarán los resultados obtenidos?, ¿cuántas veces y de qué forma se repetirá el experimento?.

La respuesta a todas estas cuestiones permite determinar el problema estadístico al que nos enfrentamos y por lo tanto, plantear el procedimiento de cálculo de tamaño de muestra adecuado para cada situación.

Diseño del experimento

Hay que especificar cómo se va a llevar a cabo el experimento. Eso significa por ejemplo, que si estamos interesados en comparar dos tratamientos deberemos especificar si los tratamientos se van a aplicar a grupos de sujetos diferentes o si se aplicaran secuencialmente sobre la misma población. Una vez se ha especificado el experimento que se desea llevar a cabo, comienza la tarea de la recogida de datos. Aunque esto suele parecer una tarea rutinaria, no es así. Debe tenerse en cuenta que los análisis y las conclusiones se basan en los datos recogidos y por tanto, un proceso de adquisición erróneo puede invalidar el experimento. En este proceso de adquisición de datos hay que considerar fundamentalmente:

- **Calidad de los datos**, que afecta a las conclusiones finales del estudio. Debe quedar muy claro, antes de comenzar el experimento, cuál es el proceso de toma y almacenamiento de datos, para evitar errores durante el proceso experimental. Un aspecto muy importante a tener en cuenta es el error cometido en las mediciones experimentales. La aparición de datos anómalos (*outliers*) debe tratarse como un problema importante y el investigador debe preguntarse: ¿estos datos pueden ser posibles o se deben a una mala recogida de la información, transcripción o a un error experimental de medición?, ¿puede ocurrir que se haya diseñado de forma incorrecta el experimento para que aparezcan estos datos?
- **Estructura de los datos**, que identifica las unidades experimentales, los grupos o bloques de tratamiento. Una documentación exhaustiva del método experimental se considera crucial para el análisis de los datos. La dependencia o independencia de los datos recogidos resulta fundamental, ya que determina de forma unívoca el tipo de análisis estadístico que puede utilizarse.
- **Mecanización de los datos**, que reduce la manipulación de los mismos en el proceso de recogida de información. Este

proceso debe ser lo más sencillo posible para evitar el trasiego de documentación y ficheros que puede generar grandes pérdidas de datos y, en consecuencia, deficiencias severas en las conclusiones del estudio.

- **Análisis de datos**, que viene marcado por los objetivos, los tipos de datos, y la recogida de información realizada en el proceso experimental.

Hipótesis de trabajo y procedimiento para el cálculo de tamaño de muestra

Asociado con el objetivo y el diseño experimental establecido se encuentra la hipótesis de partida y la determinación del tamaño de la muestra. En la práctica, el tamaño de la muestra puede obtenerse a través de un análisis de precisión o análisis de potencia. Para realizar cualquiera de los dos es necesario controlar los denominados errores de tipo I y tipo II que vienen implícitos en cualquier análisis estadístico interesado en el estudio de la efectividad de un tratamiento o en la comparación de la efectividad de dos o más tratamientos. Como ejemplo supongamos que tenemos dos grupos de individuos y que a uno de ellos le suministramos un nuevo tratamiento y al otro le damos un placebo. Si no poseemos ningún tipo de información sobre el nuevo tratamiento, el contraste de interés en esta situación vendría dado por:

$$\left. \begin{array}{l} H_0 : \text{El tratamiento no es efectivo} \\ H_A : \text{El tratamiento es efectivo} \end{array} \right\} , (6)$$

donde en la hipótesis nula (H_0) concluimos que la efectividad del nuevo tratamiento es igual al efecto producido por el placebo, mientras que en la hipótesis alternativa (H_A) concluimos que el tratamiento tiene una efectividad distinta a la producida por el placebo.

Para resolver de forma correcta cualquier contraste estadístico se deben tener en cuenta lo que se conoce como errores de tipo I y tipo II, cuyas probabilidades viene dadas por:

$$\begin{aligned} \alpha &= P(\text{error tipo I}) = P(\text{rechazar } H_0 \text{ cuando es cierta}) \quad (7) \\ \beta &= P(\text{error tipo II}) = P(\text{no rechazar } H_0 \text{ cuando es falsa}) \quad (8) \end{aligned}$$

La probabilidad de error de tipo I (también conocido como error tipo α o falso positivo) es el que utilizan normalmente los investigadores para resolver cualquier tipo de contraste. Cuando el valor p del contraste planteado para los datos experimentales

es inferior a dicha significación se concluye que se puede rechazar la hipótesis nula, y por tanto, podemos concluir que el tratamiento tiene una efectividad distinta a la que proporciona el placebo. Por el contrario, si el valor p es superior a la significación, se concluye que la efectividad del tratamiento es similar a la que produce el placebo, ya que no es posible rechazar la hipótesis nula planteada.

Sin embargo, a la hora de establecer esta conclusión muchos investigadores se olvidan de la probabilidad de error de tipo II (también conocido como error tipo β o falso negativo), que es tan o más importante que la de tipo I. Con el error de tipo I rechazaríamos la hipótesis de que el tratamiento no es efectivo cuando realmente no lo es, mientras que con el error de tipo II, no rechazaríamos la hipótesis de que el tratamiento no es efectivo cuando realmente sí lo es. Para controlar este error se define la potencia del contraste como:

$$\text{Potencia} = 1 - \beta = P(\text{rechazar } H_0 \text{ cuando es falsa}) \quad (9)$$

Por tanto, cuando estamos resolviendo cualquier contraste no podemos fijarnos únicamente en el valor p obtenido, ya que es necesario además reportar la potencia del contraste realizado. Potencias muy pequeñas con valores p significativos indican que a pesar de concluir que podemos rechazar la hipótesis nula tendríamos una probabilidad muy baja de rechazar dicha hipótesis cuando en realidad es falsa, con lo que quedarían invalidadas nuestras conclusiones experimentales. A la hora de establecer el tamaño de muestra se suele llegar a un compromiso entre ambos errores, ya que no se puede reducir uno sin alterar el otro. De forma habitual se suelen tomar:

$$\alpha=0.05, \quad \beta=0.2, \quad 1-\beta=0.8 \quad (10)$$

que establece que la probabilidad de rechazar H_0 cuando es cierta es del 5%, mientras que rechazarla cuando es falsa se sitúa en el 80%. Valores más exigentes provocarán tamaños de muestra más exigentes, y por tanto, se debe proceder con cuidado a la hora de cambiarlos. Además, estos valores deben fijarse antes de comenzar el experimento y no pueden ser alterados a lo largo del mismo para conseguir resultados significativos. El efecto directo de introducir dichos cambios es que el tamaño muestral elegido al comienzo del experimento deja de tener sentido y quedarían invalidados todos los resultados experimentales obtenidos.

El siguiente paso es determinar la prueba de contraste a utilizar para las hipótesis de partida planteadas. Por ejemplo, en el caso de la comparación de dos tratamientos (T1 y T2) en el que se

desea comparar la efectividad media de cada uno de ellos, las hipótesis de partida podrían ser:

- **Prueba de igualdad:** Este es la prueba habitual de comparación de dos medias que realizan la mayoría de paquetes estadísticos. El objetivo en este caso es saber si podemos considerar que la efectividad media de ambos tratamientos puede considerarse distinta.

$$\left. \begin{array}{l} H_0 : \mu_{T1} = \mu_{T2} \\ H_A : \mu_{T1} \neq \mu_{T2} \end{array} \right\} (1)$$

- **Prueba de no inferioridad:** Esta prueba debe utilizarse cuando se quiere concluir que los dos tratamientos tienen el mismo efecto cuando la diferencia de medias entre ellos es inferior a δ , que se conoce con el nombre de diferencia clínica relevante. Se debe utilizar cuando se sospecha que un tratamiento mejorará el comportamiento medio respecto del otro tratamiento en una cantidad δ . La dificultad para el investigador estriba en fijar dicho valor.

$$\left. \begin{array}{l} H_0 : \mu_{T1} - \mu_{T2} \geq \delta \\ H_A : \mu_{T1} - \mu_{T2} < \delta \end{array} \right\} (2)$$

- **Prueba de superioridad:** Funciona de forma similar a la prueba anterior pero en este caso se quiere concluir que los dos tratamientos tienen el mismo efecto cuando la diferencia de medias entre ellos es superior a δ .

$$\left. \begin{array}{l} H_0 : \mu_{T1} - \mu_{T2} \leq \delta \\ H_A : \mu_{T1} - \mu_{T2} > \delta \end{array} \right\} (3)$$

- **Prueba de equivalencia:** Esta prueba debe utilizarse cuando se quiere concluir que los dos tratamientos tienen el mismo efecto cuando la diferencia de medias entre ellos es en valor absoluto inferior a δ . Lo que se evalúa en realidad es si los tratamientos pueden considerarse equivalentes, es decir, que tienen un efecto similar.

$$\left. \begin{array}{l} H_0 : |\mu_{T1} - \mu_{T2}| \geq \delta \\ H_A : |\mu_{T1} - \mu_{T2}| < \delta \end{array} \right\} (4)$$

Diferencia Clínica significativa

La determinación de la diferencia clínica significativa para las pruebas de no inferioridad, superioridad o equivalencia resulta un aspecto crucial para el establecimiento del tamaño de la muestra. Si se dispone de información previa sobre otra experiencia o tratamientos similares puede establecerse a partir de dicha información. Si no es así, deberá ser el investigador el que establezca el valor o valores que considere adecuados para el experimento a realizar. Hay que tener en cuenta que este valor condicionará de forma notable el cálculo del tamaño de la muestra final.

Para simplificar los cálculos del tamaño de la muestra se suele sustituir la diferencia clínica significativa por el tamaño del efecto o "effect size" (Cohen, 1988) que tiene en cuenta a la vez tanto la diferencia clínica significativa como la variabilidad asociada con dicha diferencia. En el caso de la comparación de dos medias el tamaño del efecto viene dado por:

$$\delta = \frac{\mu_{T1} - \mu_{T2}}{\sigma}, \quad (5)$$

siendo σ la varianza común para ambas poblaciones, cuya formulación depende de si asumimos que ambas poblaciones tienen varianzas iguales o distintas. Cohen (1998) sugiere valores que representan tamaños de efecto pequeños, medios y grandes. Un tamaño de efecto pequeño representa que las medias de ambas poblaciones son similares pero distintas, es decir, se espera que un tratamiento mejore el efecto del otro pero de forma muy reducida. Un tamaño de efecto grande representa que las medias de ambas poblaciones son muy diferentes, lo que implica que un tratamiento mejora de forma extensible respecto del otro tratamiento. En la sección de ejemplos mostraremos el comportamiento del tamaño del efecto en el cálculo del tamaño de muestra.

En la sección siguiente se presentan las situaciones prácticas más habituales y se muestra cómo proceder en cada una de ellas para el cálculo del tamaño de la muestra. Para ejemplificar los resultados se utiliza una aplicación creada a tal efecto mediante el programa R (R Core Team, 2014) y sus librerías shiny (RStudio and Inc., 2014) y pwr (Stephane Champely, 2012). Dicha aplicación estará disponible en la web del Órgano Evaluador de Proyectos de la Universidad Miguel Hernández (<http://oep.umh.es>) en un futuro próximo.

Para un desarrollo más completo del cálculo del tamaño de la muestra en ensayos clínicos se puede consultar Chow, Shao, y Wang (2003).

Casos Prácticos

En este apartado se presentan diferentes experimentos en los que se muestra el cálculo del tamaño de la muestra asociado. Más concretamente, trataremos las situaciones en las que interesa comparar dos medias, dos proporciones, o k medias poblaciones (prueba ANOVA). Para cada experimento plantearemos el objetivo, la hipótesis de trabajo, la formulación del tamaño del efecto específico para esa situación, y los diferentes valores considerados de tamaño de efecto, significación y potencia necesarios para el cálculo del tamaño de la muestra.

Tamaño de muestra para la comparación de dos medias

El problema de comparación de dos medias se plantea cuando el objetivo que se persigue es el estudio de una variable de tipo continuo (respuesta) frente a una variable de tipo categórico que identifica dos tipos de tratamientos (predictora). Más concretamente, lo que se pretende investigar es el comportamiento de la media de la variable respuesta para ambos tratamientos. Los contrastes de interés que se pueden plantear son los presentados en la sección "Hipótesis de trabajo". En este caso consideramos la prueba de igualdad dada en (1) y el tamaño de efecto dado en (5). En la Figura 1 se representa el cálculo del tamaño de la muestra para la prueba de igualdad de medias en diferentes situaciones en función del tamaño del efecto considerado. Consideramos valores de potencia igual a 0.7, 0.8, y 0.9, y valores del nivel de significación iguales a 0.01, 0.05, y 0.1. En línea discontinua naranja se presentan los resultados para tamaños de efecto pequeño (0.2), mediano (0.5) y grande (0.8) dados por Cohen (1988). Hay que destacar que los valores de tamaño de la muestra más pequeños resultan de las combinaciones menos exigentes, es decir, con valores de significación más grandes y potencias más pequeñas. Este comportamiento es natural debido a que estamos siendo menos exigentes con las probabilidades de error de tipo I y II. Por el contrario, los valores de tamaño de muestra más grandes se obtienen para la potencia más alta y significación más pequeña, es decir, cuando queremos que dichas probabilidades de error sean lo más pequeñas posible. Para valores estándar de potencia (0.8) y nivel de significación (0.05), el tamaño de la muestra para un tamaño de efecto grande es de 26 sujetos. Habitualmente, en los ensayos clínicos se suele considerar un porcentaje de descarte que permite tener sujetos de reserva en caso de que alguno de los seleccionados para la muestra desaparezca del estudio. Considerando un porcentaje de descarte del 10%, el tamaño de muestra para cada grupo bajo estudio sería de 29 sujetos.

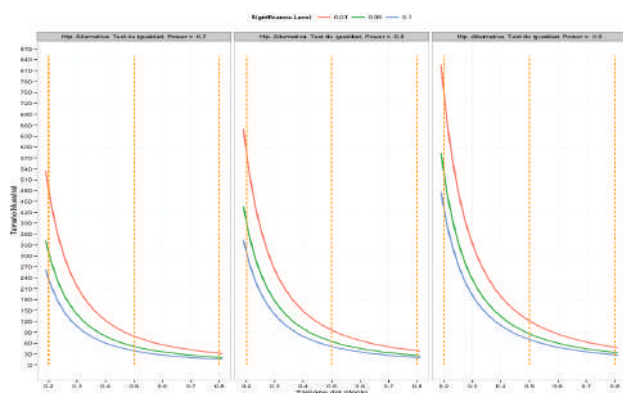


Figura 1.- Tamaño de la muestra para diferentes significaciones, potencias y tamaño de efecto en la comparación de dos medias mediante la prueba de igualdad.

Tamaño de muestra para la comparación de dos proporciones

Imaginemos un experimento en el que nos interesa registrar el porcentaje de sujetos que evolucionan de forma positiva frente a la aplicación de un tratamiento. Si en lugar de considerar un único grupo, tomamos dos grupos de sujetos de forma que en cada grupo aplicamos un tratamiento distinto, nos encontramos ante el problema de comparación de proporciones en dos poblaciones independientes. En este caso consideramos la prueba de igualdad

$$\left. \begin{aligned} H_0 : \theta_{T1} &= \theta_{T2} \\ H_A : \theta_{T1} &\neq \theta_{T2} \end{aligned} \right\} (11)$$

siendo θ_{T1} y θ_{T2} la proporción de sujetos que evolucionan de forma positiva en cada población respectivamente. En este caso el tamaño de efecto viene dado por la expresión

$$h = 2\arcsin(\theta_{T1}) - 2\arcsin(\theta_{T2}). (12)$$

En la Figura 2 se representa el cálculo del tamaño de muestra para la prueba de igualdad de proporciones en diferentes situaciones en función del tamaño del efecto considerado. Consideramos valores de potencia igual a 0.7, 0.8, y 0.9, y valores del nivel de significación iguales a 0.01, 0.05, y 0.1. En línea discontinua naranja se presentan los resultados para tamaños de efecto pequeño (0.2), mediano (0.5) y grande (0.8) dados por Cohen (1988). Se puede observar que el comportamiento del tamaño de muestra es muy similar al observado para la prueba de dos medias. Para valores estándar de potencia (0.8) y nivel de significación (0.05), el tamaño de muestra para un tamaño de

efecto grande es de 25 sujetos. Con un porcentaje de descarte del 10%, el tamaño muestral final para cada grupo sería de 28 sujetos.

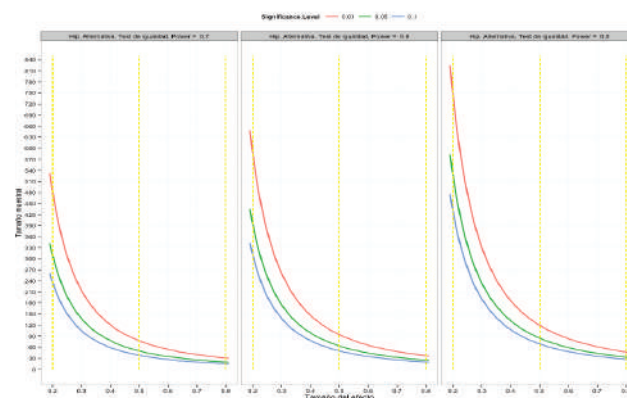


Figura 2.- Tamaño de muestra para diferentes significaciones, potencias y tamaño de efecto en la comparación de dos proporciones mediante la prueba de igualdad.

Tamaño de muestra para la comparación de k medias (ANOVA)

El problema de comparación de medias de más de dos grupos, o comúnmente llamada prueba ANOVA, es una generalización del problema de comparación de dos medias. En este caso el experimento considera más de dos grupos, y estamos interesados en comparar las medias de la variable de interés para diferentes grupos. El contraste de interés específica que la hipótesis nula y la de igualdad de todas las medias, mientras que la hipótesis alternativa establece que hay al menos dos grupos cuyas medias pueden considerarse distintas. La expresión del tamaño del efecto es mucho más compleja y viene dada en Cohen (1988). En la Figura 3 se representa el cálculo del tamaño de muestra para la prueba ANOVA en diferentes situaciones en función del tamaño del efecto considerado. Consideramos únicamente el tamaño de potencia 0.8, valores del nivel de significación iguales a 0.01, 0.05, y 0.1, y número de grupos igual a 3, 4, 5 y 6. En línea discontinua naranja se presentan los resultados para tamaños de efecto pequeño (0.1), mediano (0.25) y grande (0.4) dados por Cohen (1988). El comportamiento del nivel de significación es similar a los anteriores casos estudiados, mientras que se puede ver que conforme se aumenta el número de grupos, el tamaño de muestra requerida es inferior. Para valores estándar de potencia (0.8), nivel de significación (0.05) y 5 grupos, el tamaño de la muestra para un tamaño de efecto grande es de 19 sujetos por grupo. Con un porcentaje de descarte del 10% el tamaño muestral final para cada grupo sería de 21 sujetos.

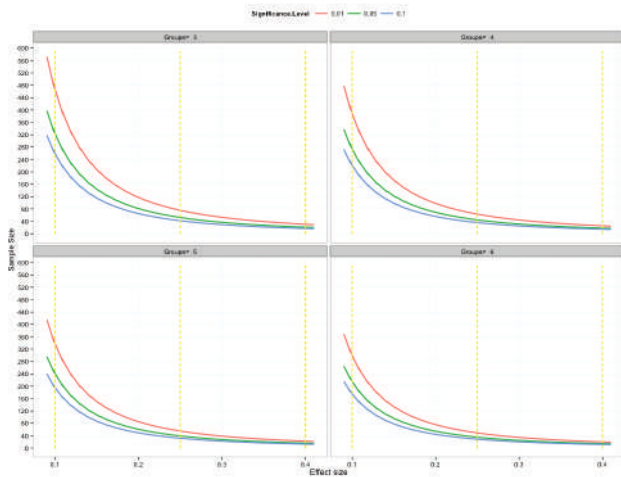


Figura 3.- Tamaño de muestra para diferentes significaciones, potencias y tamaño de efecto para la comparación de k medias (k=3, 4, 5 y 6) con potencia igual a 0.8.

Conclusiones

En este artículo se han pretendido mostrar las ideas principales involucradas en el cálculo del tamaño de la muestra en el diseño de experimentos. Se han presentado tres ejemplos típicos experimentales pero se recomienda la lectura de Cohen (1988) y Chow, Shao, y Wang (2003) para un estudio mucho más detallado del cálculo del tamaño de la muestra en muchas otras situaciones experimentales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chow S-C., Shao J., and Wang H. *Sample size calculations in clinical research*. CRC Press 2003.
2. Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioral Sciences* 2nd ed. Lawrence Erlbaum Associates 1988.
3. Mead R. *The design of experiments*. Cambridge, New York: Cambridge University Press 1988.
4. R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014. URL <http://www.R-project.org/>.
5. Rstudio and Inc. *Shiny: Web Application Framework*. 2014, <http://www.rstudio.com/shiny/>.
6. Stephane Champely. *pwr: Basic functions for power analysis*. 2012, <http://CRAN.R-project.org/package=pwr>.

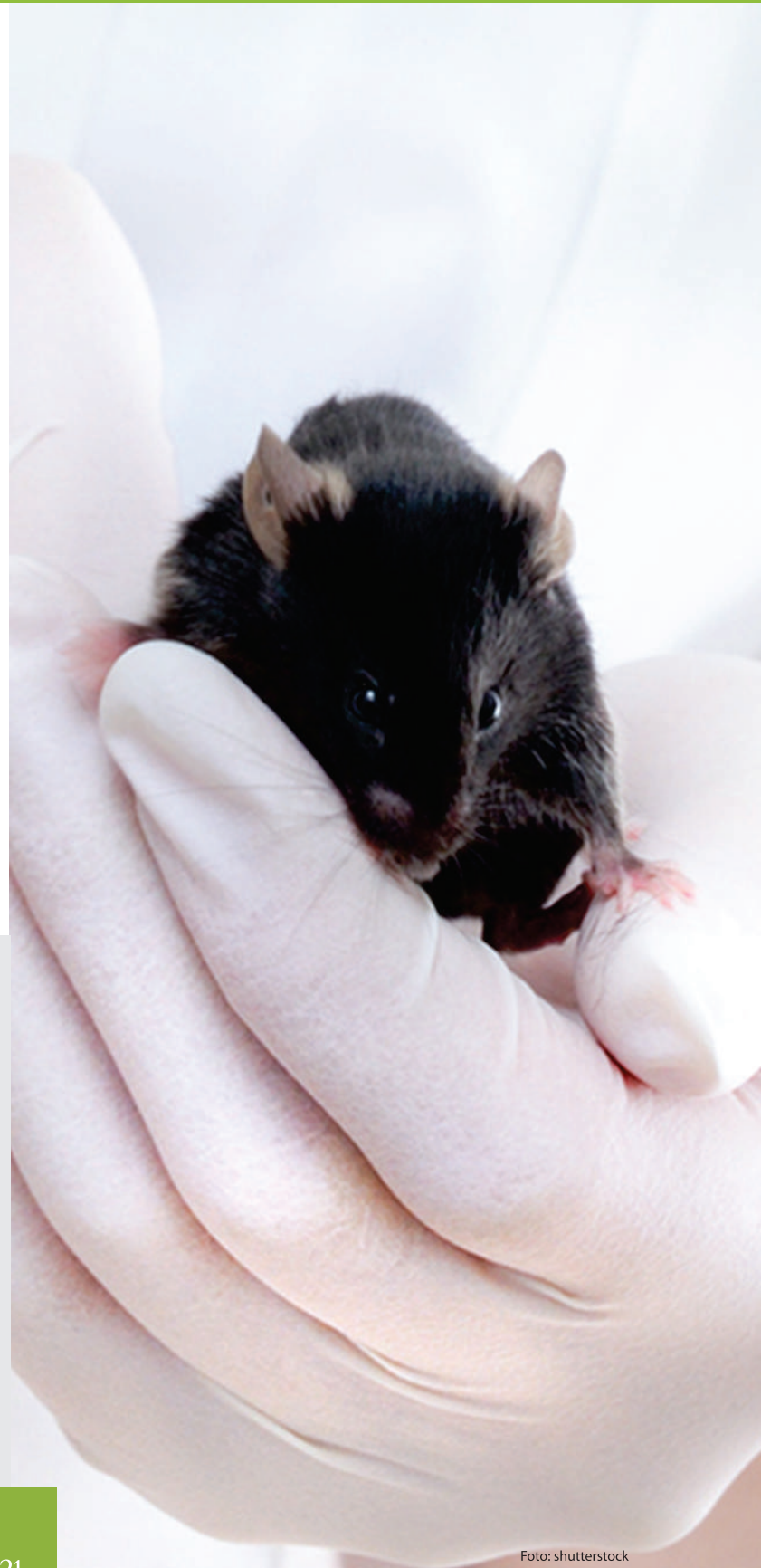


Foto: shutterstock

La replicación justificada de procedimientos: Una oportunidad de mejora

A. Pastor, J. Morales y A.M. Mayoral

Universidad Miguel Hernández de Elche

Introducción. ¿Puede estar justificada la replicación de experimentos con animales?

En la legislación europea y nacional, la reducción de los animales usados aparece como un objetivo primordial. Concretamente, en el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, se establece que deben reducirse al mínimo los animales usados, siempre que no se comprometan los objetivos del estudio (matiz clave). Asimismo, se añade allí que los investigadores deben aplicar medidas que eviten la repetición injustificada de procedimientos, lo que deja abierta la puerta a la replicación justificada de experimentos previos.

Es habitual, a la hora de llevar a cabo un estudio, optar por un número de animales excesivamente bajo (en una encuesta reciente realizada a partir de 76 estudios influyentes en animales, la mitad usaba 5 o menos animales por grupo) que ni siquiera se deriva de un cálculo previo basado en un diseño eficiente para obtener una potencia estadística razonable. Y lo peor de todo es que estos estudios están publicados y se siguen publicando a día de hoy, lo que es uno de los principales motivos de la falta de reproducibilidad de los experimentos.

En experimentación animal, así como en muchas otras áreas de investigación, son frecuentes los estudios basados en la comparación de tratamientos, dosis, variedades, grupos, etc. Tradicionalmente se han replicado numerosos estudios de este tipo, en ocasiones reproduciendo fielmente las condiciones de experimentación (y hablamos entonces de réplicas exactas, más fáciles de realizar en estudios de laboratorio), y otras veces aceptando o introduciendo variaciones más o menos críticas (a las que nos referimos como réplicas inexactas).

El objetivo ético es no realizar réplicas exactas salvo que sean necesarias debido a los objetivos del estudio o a otros motivos justificados. Las réplicas inexactas generan menos problemas éticos pues cambian los escenarios y se buscan comparaciones o

mejoras, constituyendo además uno de los métodos más habituales en la investigación actual (aspecto que también genera debate porque no todas las réplicas inexactas tienen un fin que justifique el uso de animales). Las posibilidades que ofrece la replicación de estudios científicos son amplias: la corroboración de conclusiones, la mejora en la eficiencia de las conclusiones, la identificación de poblaciones o tratamientos distintos, e incluso la consideración de hipótesis adicionales que conduzcan a experimentos exitosos en cuanto a la validación de nuevos tratamientos o productos efectivos. Si nos centramos en las más críticas, las réplicas exactas, deberíamos usarlas siempre con dos de los fines mencionados: corroborar conclusiones y, sobre todo, mejorar la eficiencia de las mismas. Aun así, no en todos los casos está justificado y los comités de ética deben evaluar cada situación de manera individual.

En cualquier caso, la valía de la replicación en la experimentación científica es incuestionable, así como la necesidad de llevar a cabo buenas prácticas que garanticen la reproducibilidad de los estudios que se llevan a cabo y que puedan derivar en futuras teorías científicas confirmadas. Este aspecto de la reproducibilidad de los estudios científicos es si cabe aún más crítico en la actualidad, cuando la investigación científica financiada con fondos públicos ha de hacerse pública y los métodos, resultados y conclusiones son más accesibles, y más notoria la falta de rigor al ejecutar un estudio.

El objetivo de este artículo es presentar al investigador las posibilidades que ofrece un tratamiento bayesiano del análisis estadístico incorporando toda la información disponible sobre estudios previos antes de replicar. Esta información proporcionará herramientas decisorias al investigador, antes de replicar, con las que valorar si es viable, y en qué grado, replicar el estudio previo desde el punto de vista de conseguir conclusiones susceptibles de ser publicadas, esto es, que proporcionen resultados significativos y además garanticen una potencia estadística aceptable. Varias posibilidades del análisis bayesiano de réplicas se pueden consultar en Bayarri y Mayoral (2002), así como en Bayarri y Martínez-Mayoral (1997).

Este uso de la estadística bayesiana para la replicación es sólo una de las múltiples aplicaciones y beneficios que proporciona este modo de proceder con el análisis estadístico. Las técnicas estadísticas bayesianas son, por ejemplo, las herramientas óptimas para proceder en la investigación desde un punto de vista secuencial, incorporando datos a medida que se consiguen y permitiendo parar al investigador en el momento en que se satisfacen sus objetivos para reconocer un hallazgo científico (para ampliar información, consultar Ghosh and Sen, 1991).

¿Estadística Bayesiana e información previa?

En estadística frecuentista (la usada habitualmente para analizar los resultados experimentales) los parámetros que nos interesan, como la media o proporción poblacional por ejemplo, son cantidades desconocidas cuyo valor queremos descubrir (aproximar) a través de datos que provienen de mediciones variables en una muestra de la población. La probabilidad ayuda a estimar (aproximar) modelizando cómo se produce la variabilidad en las observaciones, y ésta está fundamentada en las leyes de los grandes números y en la asunción de que un mismo experimento se pudiera reproducir infinitas veces en idénticas condiciones. Las conclusiones se derivan en términos de estimaciones (estim), intervalos de confianza (ic) y valores p . Su interpretación es, respectivamente, (estim) un valor aproximado del parámetro, (ic) un intervalo sobre el que nos garantizan que si repitiéramos el proceso de observación infinitas veces, en el 95% de los intervalos de confianza que construyéramos del mismo modo capturarían el valor del parámetro (si bien no sabemos si nuestro ic concreto es uno de ellos o por el contrario es uno de los 5% restantes que no contienen el valor que buscamos), y (valor p) la probabilidad (entendida como el % de veces en infinitas pruebas de muestreo) de rechazar una hipótesis nula a favor del efecto que buscamos y con esa decisión equivocarnos.

En estadística bayesiana la probabilidad se entiende como una herramienta para hablar sobre incertidumbre, y no como un resultado de la repetición continuada de un experimento. Tanto sobre lo que observamos (datos) como sobre lo que desconocemos (parámetros), cuantificamos nuestra certidumbre/incertidumbre en términos de probabilidad. Y todo aquello que aporta información modifica nuestro conocimiento (certidumbre) sobre lo desconocido simplemente aplicando el Teorema de Bayes. Las conclusiones vienen dadas en términos de distribuciones de probabilidad, que cuentan cuál es nuestro conocimiento e incertidumbre, bien sobre los parámetros desconocidos, bien sobre los predecibles observables.

Si bien la tradición estadística es genuinamente frecuentista, cada vez gana más peso la estadística bayesiana en el análisis bioestadístico para la experimentación científica (Moyé, 2008); de hecho, la FDA acepta ya esta praxis en estudios clínicos (<http://goo.gl/SVcl5>). El modo "bayesiano" de hacer estadística permite extraer el máximo provecho a toda la información previa existente antes de plantear un nuevo estudio. Asimismo, permite derivar conclusiones en términos de los efectos que realmente interesan (que son los parámetros desconocidos en las poblaciones estudiadas) y no en términos de estadísticos de contraste y de su distribución bajo una hipótesis que es falsa en el caso de que realmente exista el efecto que se busca.

En estadística bayesiana se incorpora toda la información disponible, al igual que toda la incertidumbre existente según el tamaño de muestra que se haya utilizado en estudios previos. Así, estudios previos con tamaños muestrales altos serán muy fiables, y su información (datos) pesarán mucho y darán mucha precisión a las predicciones que se realizan con ellos, y estudios previos con muy pocos datos aportarán mayor incertidumbre a las predicciones que podemos obtener sobre resultados futuros.

Cuando vamos a replicar siempre tenemos información previa, reportada en el/los estudio/s previo/s. Generalmente, disponemos del estadístico de contraste, el tamaño de la muestra, una medida del error y el valor p obtenido. La base de la inferencia bayesiana es la modelización de incertidumbre a través de distribuciones de probabilidad, y como es de esperar por su nombre, la utilización del Teorema de Bayes.

Al modelizar en frecuentista sólo se utiliza la verosimilitud, dada por la distribución del estadístico (de contraste) en función de los parámetros desconocidos y de interés para detectar efectos de tratamientos. Al modelizar en bayesiano, toda la incertidumbre existente se plasma en distribuciones de probabilidad. Así, el desconocimiento sobre los parámetros "desconocidos" se expresa en términos de incertidumbre-distribución de probabilidad para ellos, distribución a la que nos referimos como "a priori" por cuanto que es la información existente antes de tomar datos. El Teorema de Bayes resuelve el problema de cómo combinar datos (verosimilitud) e información previa sobre los parámetros desconocidos (a priori), proporcionando distribuciones actualizadas sobre los parámetros de interés en base a las que podemos cuantificar la información y certidumbre que los datos han aportado sobre los parámetros de interés. Estas distribuciones de probabilidad que se consiguen tras incorporar la información de los datos se denominan "distribuciones posteriores". De esta manera, podemos concluir sobre cuál es la probabilidad de que un tratamiento provoque un efecto

relevante sin tener que pasar por valores p o distribuciones del estadístico que son falsas si tal efecto es real. Asimismo, esta forma de trabajar, permite predecir resultados futuros en base a toda la información que han aportado los datos existentes sobre los parámetros de interés.

Sin embargo, en este artículo nos vamos a concentrar en la situación tradicional de la experimentación científica, cuyos hallazgos se publican fundamentalmente en base a resultados significativos, esto es, en base a haber conseguido concluir a favor de que existe un efecto del tratamiento considerado tras rechazar un contraste planteado al respecto.

En este contexto, en el que el investigador continuará realizando sus análisis estadísticos desde un punto de vista frecuentista basado en significatividades y potencia estadística, proponemos el uso de la estadística bayesiana como una herramienta de apoyo a la decisión de llevar a cabo o no la replicación de un estudio previo. Con la información que proporciona dicho estudio, podremos predecir el resultado de la réplica e incluso el tamaño del efecto de interés, con la certidumbre/incertidumbre que nos aporta la fiabilidad del estudio previo, que estará en función del tamaño de muestra utilizado y sus resultados.

Podemos facilitar al investigador una valoración de las garantías que tiene, en base a la información disponible, de conseguir resultados significativos en la réplica y además, de lograr suficiente potencia estadística. Ejemplificamos esta solución a través de un caso real relativo a la comparación de un grupo tratamiento y otro control a partir de unos datos disponibles en un estudio en desarrollo.

Recordemos que obtener resultados significativos equivale a rechazar la ausencia de efecto.

Un caso práctico

Consideramos para ilustrar los procedimientos presentados, un estudio de replicación planteado a partir de otro previo en el que se pretendía la identificación de un efecto tratamiento al confrontar datos de un grupo control y de un tratamiento ante el supuesto de normalidad y homogeneidad de varianzas. Planteamos el contraste de supremacía del tratamiento sobre el control (hipótesis alternativa) a través de un contraste unilateral basado en el estadístico t de Student.

El estudio previo contenía dos muestras, tratamiento y control, cada una de ellas de tamaño $n=6$. Las pruebas de

normalidad y homogeneidad de varianzas resultaron satisfactorias a un nivel de significación de 0.05. El valor del estadístico t de contraste para identificar supremacía del tratamiento sobre el control a través del tamaño del efecto resultó de 0.852 y el valor p de 0.2069. Así, la estimación del tamaño del efecto tratamiento (diferencia de efectos estandarizada) con esos datos es $d=0.4543$, obtenida a partir del estadístico de contraste y su distribución (una t de Student descentrada).

Las preguntas que surgen a la hora de proponer una réplica son las siguientes:

1. Con $n=6$ datos en cada muestra, ¿qué potencia estadística se consigue asumiendo un tamaño medio del efecto (0.5)?, ¿de qué tamaño de muestra es preciso partir para conseguir una potencia estadística razonable (0.8) asumiendo un tamaño medio del efecto (0.5)?, ¿y para otros tamaños posibles del efecto, pequeño y grande (0.2 y 0.8)?
2. En base a la información disponible en el estudio previo, ¿qué indicios y garantías tenemos para asegurar que al replicar conseguiremos una potencia estadística razonable (del orden de 0.7 o 0.8)?
3. En base a la información disponible en el estudio previo, ¿sería factible conseguir resultados significativos en una réplica incrementando el tamaño de muestra?, ¿con qué garantías?
4. Concluyendo, en base a la información disponible en el estudio previo, ¿es recomendable llevar a cabo la réplica?, ¿qué garantías tenemos de obtener conclusiones susceptibles de publicación?

Vayamos dando respuesta a estas preguntas:

1. Como se observa en la Figura 1, serían preciso en torno a $n=50$ datos en cada grupo (tratamiento y control), para aproximarse a una potencia en torno a 0.8 (a significación 0.05). La potencia estadística que se consigue con 50 sujetos en cada grupo asumiendo un tamaño del efecto similar al estimado en el estudio previo ($d=0.4543$) es de 0.73 (razonable). No obstante, fiarse de una estimación del tamaño del efecto obtenida con sólo 6 observaciones puede ser, cuanto menos, arriesgado, así como presumir que la magnitud del efecto del tratamiento es de 0.5. Si esa magnitud fuera inferior, en torno a 0.2, el tamaño de muestra preciso para conseguir potencia 0.8 sería de $n=310$ datos en cada grupo.

Incorporamos a continuación la información del estudio previo con un análisis bayesiano, sin ninguna premisa

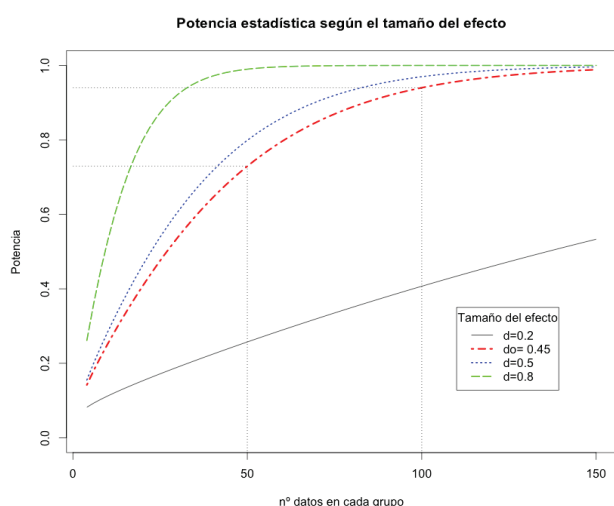


Figura 1.- Potencia estadística frecuentista en función del tamaño de muestra necesario al replicar, para resolver el contraste unilateral a favor de un efecto del tratamiento. Curvas para diferentes magnitudes del tamaño del efecto (0.2, 0.5, 0.8 y similar a la estimada con el estudio previo 0.45).

anterior sobre la magnitud del tamaño del efecto (d) en la réplica ni en el estudio previo (mínima información *a priori*), pero asumiendo que la réplica es exacta.

- Lo que sabemos sobre el tamaño del efecto en la réplica (en base a su distribución posterior) es que su valor está en torno a 0.495, pero con una desviación típica (medida de la certidumbre en ese valor) de 1.5278 (muy alto, pero razonable puesto que proviene de un estudio con sólo $n=6$ datos). En lugar de comprometernos a un único valor para el cálculo de la potencia, utilizamos toda la incertidumbre existente para "predecir valores plausibles de la potencia estadística". Así, tras incorporar los datos del estudio previo, calculamos y representamos en la Figura 2 la potencia esperada en función del número de datos (nr) que se planifique para cada grupo (tratamiento y control) en la réplica. Así, con $nr=50$ la potencia esperada es tan sólo de 0.55, y para $nr=100$ se queda en tan sólo 0.58.

Incluso podemos calcular con qué probabilidad podemos conseguir una potencia razonable (0.7 o 0.8) en función del tamaño de la réplica y en base a la información previa. En la Figura 3 observamos que la probabilidad (garantías) de obtener una potencia estadística de al menos 0.8 en la réplica con $nr=50$ datos es tan sólo de 0.5 y de 0.52 para conseguir una potencia de 0.7. Incluso con un tamaño de muestra $nr=100$ la probabilidad de conseguir potencia 0.7 es sólo de 0.56. Estamos diciendo que

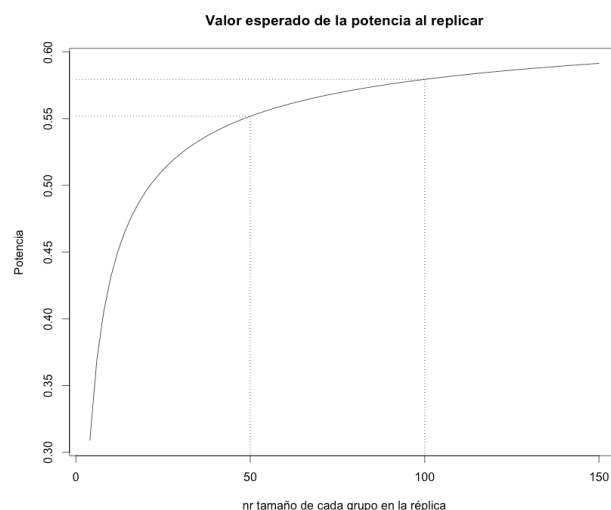


Figura 2.- Valor esperado de la potencia estadística (frecuentista) en función del número de datos (nr) en cada grupo al replicar, incorporando la información del estudio previo.

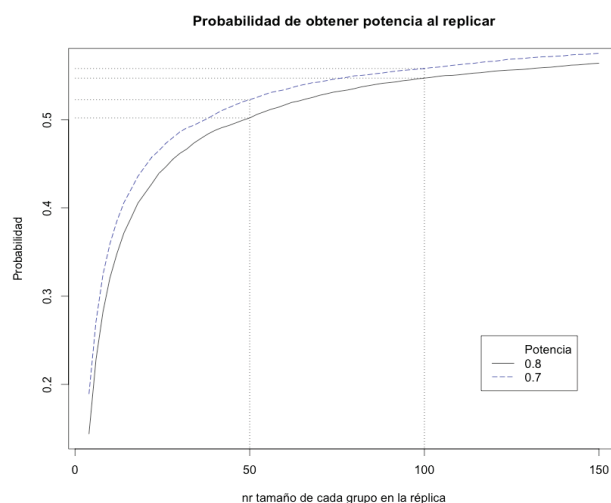


Figura 3.- Probabilidad de obtener potencia estadística suficiente en función del número de datos (nr) en cada grupo al replicar. Se ha incorporado la información del estudio previo.

planificando la réplica con $nr=50$ (incluso con $nr=100$) datos en cada grupo, será cuestión de cara o cruz que el investigador consiga una potencia estadística razonable, teniendo en cuenta lo que se observó en el estudio previo.

- Puesto que en bayesiano podemos predecir el resultado de la réplica (y en consecuencia del estadístico de contraste) incorporando la información del estudio previo, podemos

asimismo predecir la probabilidad de obtener resultados significativos, esto es, de rechazar la hipótesis nula a favor de un efecto tratamiento sobre el control. En la Figura 4 se representa la probabilidad de obtener resultados significativos en función del tamaño de muestra de la réplica. Observamos que para $n_r=50$ la probabilidad de obtener resultados significativos (a nivel de significación de 0.05) es tan sólo de 0.55 y para $n_r=100$ llega a 0.58. De nuevo, prácticamente es cuestión de cara o cruz, que con $n_r=50$ datos, el investigador obtenga resultados significativos con los que poder consolidar y publicar su estudio.

4. En base a la información aportada por el estudio previo, un estudio carente de las características deseables respecto a reproducibilidad (tamaño de muestra excesivamente pequeño, resultados no significativos, potencia estadística muy pobre), será cuestión de cara o cruz que en el caso de llevar a cabo una réplica, ésta resulte exitosa desde el punto de vista de la publicación del estudio: obtener significatividad y garantizar potencia suficiente.

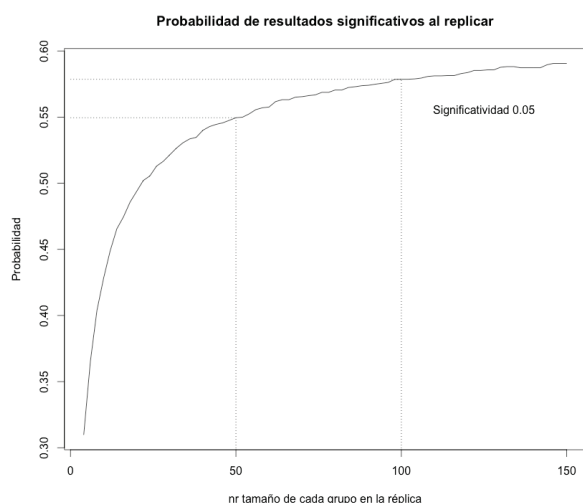


Figura 4.- Probabilidad de conseguir resultados significativos (con un nivel de significación de 0.05) en función del número de datos (nr) en cada grupo al replicar.

Conclusiones

Ante la incertidumbre de un investigador para replicar un estudio previo, se han presentado dos herramientas valiosas para ayudar a la toma de la decisión, en términos de las garantías (probabilidad) existentes de conseguir resultados exitosos, esto es, susceptibles de publicación: la probabilidad de obtener resultados significativos y la probabilidad de obtener una potencia estadística razonable.

Estudios previos pobres, como el que se ha presentado en este artículo, aportarán poca información sobre la réplica y en consecuencia unas garantías escasas de éxito. Estudios previos más rigurosos y reproducibles aportarán sin duda mucha información valiosa y en consecuencia, nos ayudarán a reducir el tamaño de la muestra necesario para replicar que nos proporciona la estadística frecuentista (buscando valores altos de la potencia estadística, esto es, de la probabilidad de detectar un efecto real). Es de remarcar que cualquier cálculo previo del tamaño de la muestra necesario en un estudio para obtener potencia pasa por comprometer al investigador con la magnitud del efecto del tratamiento que espera encontrar, magnitud que por lo general desconoce ante la experimentación con un tratamiento novedoso. Tal compromiso es innecesario implementando la predicción bayesiana que hemos mostrado en este artículo.

Las ventajas del uso de herramientas estadísticas bayesianas no sólo facilita la indagación de la réplica usando la información disponible, sino que permitirá siempre llevar a cabo experimentos más eficientes desde el punto de vista del tamaño de la muestra por cuanto facilitará la incorporación secuencial de datos/observaciones conforme se vayan consiguiendo.

Desde la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH) se está trabajando en implementar, en un entorno web sencillo, una aplicación para facilitar el cálculo del tamaño de muestra necesario en un estudio, así como otras herramientas de ayuda a la toma de decisiones para replicar y para incorporar información disponible de un modo secuencial. Se espera contar con dicha aplicación en un futuro próximo, que quedará accesible en la web del Órgano Evaluador de Proyectos de la UMH (<http://oep.umh.es>).

BIBLIOGRAFÍA

- Bayarri M.J. y Martínez-Mayoral A.M. *Diseño y análisis bayesianos de réplicas en la experimentación científica*. *Qüestiió* 1997, 21: 59-97.
- Bayarri M.J. and Martínez-Mayoral A.M. *Bayesian Design of Successful Replications*. *The American Statistician* 2002, 56: 207-14.
- Ghosh B.K. and Sen P.K. *Handbook of Sequential Analysis*. Marcel Dekker, Inc. 1991.
- Moyé L.A. *Elementary Bayesian Biostatistics*. Chapman & Hall/CRC 2008.

Formación como herramienta de mejora de la reproducibilidad de los artículos científicos

A. Pastor, J. Morales y A.M. Mayoral
Universidad Miguel Hernández de Elche

Introducción

En 2005, John P. A. Ioannidis, profesor de la Facultad de Medicina de Stanford publicaba en *PLoS Medicine* un artículo con este nombre: *Why Most Published Research Findings Are False?* Esta publicación tuvo repercusión entre la comunidad internacional de estadísticos, pero no tanto entre los científicos de otras áreas. Ioannidis defiende que la probabilidad de que un hallazgo científico sea cierto depende, entre otras muchas cosas, de la potencia y de los sesgos estadísticos. El concepto de potencia estadística en muchos artículos científicos ni aparece (ni siquiera lo solicitan muchos editores) y sesgos se cometen muchos. La realidad es que se producen fallos en todo el proceso, desde que se realiza el diseño del experimento hasta que se interpretan los resultados.

Si nos centramos en los estudios con animales encontramos los siguientes problemas: el número mínimo de animales por grupo es insuficiente, los ensayos no son ciegos ni los animales se asignan a un grupo experimental de manera aleatoria ("*When Mice Mislead*", 2013), falta de estandarización de procedimientos y de calibración de instrumentos de medida, falta de publicación de los datos en crudo (sin eliminar individuos que se salen de la media), correcto análisis e interpretación de los resultados, correcta revisión de los artículos, sesgo de publicación de resultados positivos, etc. El resultado final es que un porcentaje bajo de los artículos científicos son reproducibles (Prinz, 2011) y esto ha hecho sonar las alarmas en los últimos años (*Nature* ya ha tomado medidas para mejorar la reproducibilidad de los artículos publicando un *checklist* de obligado cumplimiento). La situación es preocupante y requiere que se tomen medidas. Un resumen muy bueno de estos problemas de reproducibilidad se puede encontrar en el artículo publicado en *The Economist*, "*Unreliable research – Trouble at the lab*".

La confianza en la ciencia y en la conducta de los investigadores es fundamental para que haya una fructífera interacción entre la comunidad científica y entre dicha comunidad y la sociedad.

Causas de la escasa reproducibilidad de los artículos científicos:

A grandes rasgos, podríamos agrupar las causas en:

1. **Problemas éticos:** Gran problema de nuestra sociedad actual y que también afecta a la ciencia. Principalmente referido a la falta de integridad.
2. **Diseño experimental y análisis e interpretación de los datos:** Actualmente no hay una buena coordinación entre estadísticos e investigadores. El resultado es que un número de publicaciones elevado contiene errores de diversa gravedad. El hecho de que las revistas científicas no tengan revisores estadísticos contribuye a agravar el problema, ya que se publican artículos que no debieran. Tampoco se hace una buena revisión estadística en muchos de los comités evaluadores (éticos, agencias financiadoras, etc.).
3. **Estandarización/Sistemas de Calidad:** Es imposible que exista una buena reproducibilidad si los procedimientos no están estandarizados. Los investigadores tienen que aspirar a trabajar bajo normas BPL (para estandarizar condiciones y procedimientos) y si no es posible, al menos, conocer sus principios e intentar aplicarlos con la mayor profundidad posible. Otros sistemas de calidad también ayudan a mejorar los procesos de manera general, como pueden ser las distintas ISO o AAALAC, en el caso específico de los animalarios. Registrar las condiciones en las que se realiza el estudio es igual de importante y algo que no debemos descartar aunque nuestros recursos económicos sean limitados. Por ejemplo, quizás no podamos tener un ajuste fino de la humedad ambiental, pero sí podemos medirla y registrarla de manera muy económica. En estos aspectos, la industria farmacéutica lleva años de ventaja a los centros públicos de investigación. No todo es trasladable pero conocer el funcionamiento de esta industria nos brinda herramientas que sirven para proponer mejoras en nuestros centros de trabajo.

La formación como herramienta de mejora

Para atajar un problema es vital la concienciación de que ese problema existe. Es deber de todos transmitir lo que está sucediendo e intentar sensibilizar a los órganos directivos de nuestros centros para que se impliquen y tomen medidas.

Podemos abordar el problema de la baja reproducibilidad de los artículos desde muchas perspectivas, pero lo más importante para alcanzar la meta es que exista una buena coordinación entre todos los implicados a nivel interno y externo. Consideramos que muchas de las soluciones vendrán gracias al trabajo en colaboración.

Los comités de ética de los centros tienen mucho que decir aquí porque en ellos se reúnen científicos y especialistas de distintas áreas y a menudo dependen de los vicerrectorados de investigación (en el caso de las universidades) o estructuras directivas análogas. Esa posición les facilita el poder discutir las posibles soluciones y presionar para conseguir esa implicación necesaria.

La formación como solución es una propuesta global que puede ayudarnos allí donde está el problema. Quizás lo más complicado sea mejorar la integridad en la investigación, ya que la falta de ética se produce por distintos factores, no sólo por desconocimiento. No obstante, incluso los problemas de integridad pueden mejorar ostensiblemente introduciendo estudios de ética en todos los niveles de la educación superior.

Paralelamente, deberían establecerse políticas que premien la calidad de los artículos frente a la cantidad (ahora mismo hay una carrera absurda por la consecución del mayor número de artículos en el menor tiempo posible, que ayuda bien poco a la calidad e integridad de la investigación), que premien a los investigadores íntegros y no queden impunes aquellos que tengan conductas reprobables, así como que mejoren los sistemas de control y revisión de los artículos científicos.

Plan de formación

Actualmente se están introduciendo estudios de ética en algunas universidades españolas a distintos niveles: grado, postgrado y formación continua de investigadores.

Es necesario ser capaces de dar respuesta a las necesidades actuales de formación y nuestra propuesta es la creación de un sistema de formación modular que se adapte a las distintas áreas de conocimiento. En el caso español estas áreas podrían ser: artes y humanidades, ciencias, ciencias de la salud, ingeniería y arquitectura, y ciencias sociales y jurídicas. Las implicaciones éticas que surgen dentro de las distintas áreas de la salud requieren incluso de una especialización mayor.

Distintas universidades españolas están considerando la introducción de estudios de ética a distintos niveles. La Universidad del País Vasco, por ejemplo, está estudiando la introducción de estudios de ética a nivel de grado, en los grados que así lo han demandado (previa consulta).

La Universidad Miguel Hernández de Elche, por ejemplo, está creando un curso *online* de doctorado llamado "Bases de la investigación científica", que iniciará el próximo curso académico, con el que se pretende dotar al alumno que va a comenzar su doctorado o máster, de numerosas herramientas que le servirán en su desarrollo profesional. Entre las materias abordadas se han incluido estudios de ética. El curso no está terminado pero es de acceso libre y gratuito (cuenta ya con 74 vídeos) y se puede encontrar en YouTube (<http://goo.gl/REyAEz>).

De la misma manera que se introducen estudios de ética deberían introducirse (o mejorarse) estudios sobre diseño experimental y estadística, y sobre sistemas de calidad y estandarización. Estos estudios son fundamentales en los planes de formación de los cursos de postgrado ya que los alumnos son jóvenes y están receptivos a este tipo de información.

Los investigadores senior tienen una gran responsabilidad ya que son el ejemplo a seguir, especialmente cuando son tutores de tesis de jóvenes investigadores, por lo que no deberían quedarse atrás en cuanto a conocimientos en estos aspectos. Para abordar este sector universitario, la mejor manera es plantear cursos de perfeccionamiento o formación continua. No debemos olvidar la importancia de las tareas habituales de asesoramiento que llevan a cabo los comités (de ética y otros) o, de manera individual, a través de los especialistas en salud y bienestar animal, estadísticos, etc.

Para crear los contenidos de un plan de formación en ética nuestra recomendación es buscar información en planes homólogos existentes en centros de educación superior de otros países y tener muy en cuenta la guía de ALLEA: *Ethics Education in Science*.

Respecto a la formación en estandarización y sistemas de calidad podemos apoyarnos en los servicios de calidad o unidades de garantía de calidad de nuestros centros y en empresas acreditadoras de sistemas de calidad, ya que ofrecen planes de formación muy buenos. Siempre es útil también asesorarse por otros compañeros que ya hayan conseguido aquellos sellos de calidad que pretendemos obtener.

Para abordar un plan de formación en diseño experimental, lo ideal es contar con investigadores del área en cuestión y con estadísticos con experiencia en el campo. Es importante tener en cuenta que, a día de hoy, se está tratando mejor el apartado

estadístico en los artículos sobre ensayos clínicos en humanos que los que se hacen en animales. Tras estudiar cómo mejorar el diseño y la estadística en experimentación animal proponemos un sistema de diseño y desarrollo experimental al que hemos bautizado como "Lean Research". El objetivo es ambicioso: reducir animales, reducir costes y acelerar la investigación.

Lean Research

El problema que vemos en el Órgano Evaluador de Proyectos de la UMH, y que apostamos a que es extensible a otros muchos comités de ética, es que la estadística frecuentista no resuelve bien el cálculo del tamaño muestral necesario porque se basa en "adivinar" el tamaño del efecto esperado, teniendo en cuenta experiencias previas. En función del tamaño del efecto, el número de animales por grupo necesario varía una barbaridad. Por lo tanto, este tipo de cálculos *a priori* nos dan poca información y son muy "moldeables". Además, algunos investigadores repiten experimentos cuando creen ver tendencias (sin un análisis estadístico) y, en muchos casos, nos encontramos con que el experimento podría haber finalizado antes, ahorrando tiempo, dinero y vidas animales.

"Lean Startup" es una manera de abordar el lanzamiento de negocios y productos que se basa en aprendizaje validado, experimentación científica e iteración en los lanzamientos del producto para acortar los ciclos de desarrollo, medir el progreso y ganar valiosa retroalimentación de los clientes. De esta manera las compañías, especialmente *startups*, pueden diseñar sus productos o servicios para cubrir la demanda de su base de clientes, sin necesitar grandes cantidades de financiación inicial o grandes gastos para lanzar un producto (Fuente: Wikipedia).

La aproximación que proponemos al diseño experimental, la hemos llamado "Lean Research" porque se basa en los principios de "Lean Startup": probar con un tamaño muestral contenido, medir y decidir qué camino seguir. De esta manera, se asume un riesgo moderado (económico y ético, al reducir el número de animales empleado) y permite, aplicando la estadística bayesiana, predecir qué pasaría si se aumentara el tamaño muestral. Todo esto está mejor explicado en el artículo presente en este mismo número de la revista Animales de Laboratorio: *La replicación justificada de procedimientos: Una oportunidad de mejora*.

El proceso comienza con el cálculo del tamaño muestral para una significatividad y potencia deseadas y un tamaño del efecto esperado. Posteriormente, se hace un primer ensayo o estudio piloto en el que debemos usar un 10% del número de animales que nos ha proporcionado el cálculo anterior, con un mínimo de 10 animales por grupo (si el 10% sigue siendo inviable una buena

aproximación es hacer el estudio con 10 animales por grupo, no se recomienda hacerlo con menos). El camino a seguir queda más claro en el diagrama de flujo de la Figura 1.

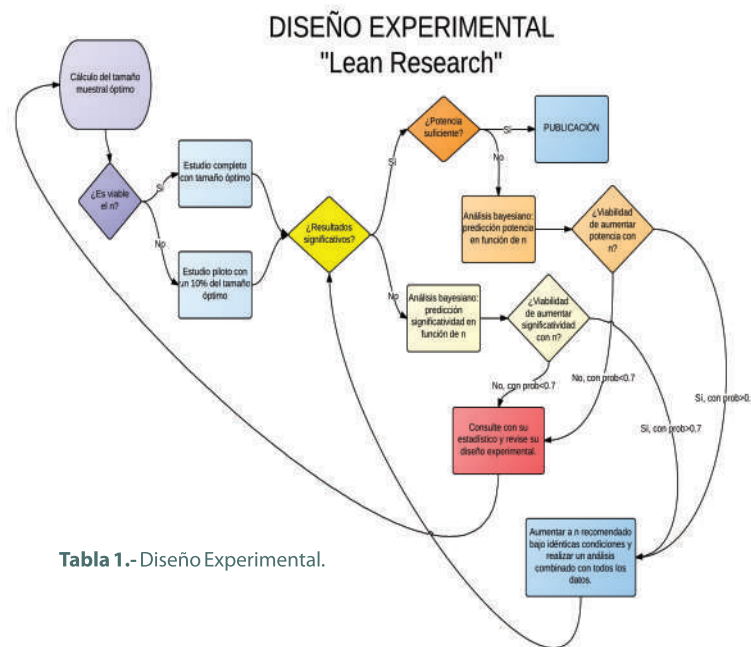


Tabla 1.- Diseño Experimental.

BIBLIOGRAFÍA

- Alsheikh-Ali A.A., Qureshi W., Al-Mallah M.H., and Ioannidis J.P.A. *Public Availability of Published Research Data in High-Impact Journals*. PLoS One 2011, 6(9): e24357. DOI: 10.1371/journal.pone.002435.
- Bayarri M.J. y Martínez-Mayoral A.M. *Diseño y análisis bayesianos de réplicas en la experimentación científica*. *Questiú* 1997, 21: 59-97.
- Bayarri M.J. and Martínez-Mayoral A.M. *Bayesian Design of Successful Replications*. *The American Statistician* 2002, 56: 207-14.
- *Enhancing reproducibility* (Editorial). *Nature Methods* 2013, 10(5): 367.
- *Ethics Education in Science*. ALLEA.
- http://www.allea.org/Content/ALLEA/Statement_Ethics_Edu_web_final_2013_10_10.pdf.
- Ghosh B.K. and Sen P.K. *Handbook of Sequential Analysis*. Marcel Dekker, Inc. 1991.
- Begley C.G. and Ellis L.E. *Drug development: Raise standards for preclinical cancer research*. *Nature* 2012, 483: 531-33.
- Ioannidis J.P. *Why most published research findings are false?* PLoS Med. 2005, 2(8): e124.
- Moyé L.A. *Elementary Bayesian Biostatistics*. Chapman & Hall/CRC 2008.
- Prinz F., Schlange T., and Asadullah K. *Believe it or not: how much can we rely on published data on potential drug targets?* *Nat. Rev. Drug Discov.* 2011, 10: 712.
- *Trouble at the lab*. *The Economist* 2013, 19 de Octubre.
- Vasilevsky et al. *On the reproducibility of science: unique identification of research resources in the biomedical literature*. *PeerJ* 2013, 1:e148. DOI 10.7717/peerj.148.
- *When Mice Mislead*. *Science* 2013, 342: 922-23.



Foto: shutterstock

Un modelo al lado de los humanos

Unos mililitros de la sangre de este conejo, hacen que en un servicio de microbiología de un hospital general español, los facultativos especialistas puedan diagnosticar de manera eficaz y más rápida pacientes con Leishmaniosis



www.secal.es

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.

$$N = 24$$

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

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

$X = 24 / [(80/100) \times (80/100)] = 37.5$ 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%.

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

Si lo multiplicamos por el número de grupos obtendremos entonces la N total del procedimiento: **$9 \times 4 = 36$ 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:

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

Incidencia A= 100 - 10% = 90%

X= 5 / (90/100) = 5.55 \Rightarrow 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:

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

Incidencia A= 100 - 20% = 80%

X= 5 / (80/100) = 6.25 \Rightarrow 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.

Cuando la trazabilidad es una necesidad **SOURALIT** es su garantía

SOURALIT

Madera no resinosa

Mínima presencia de polvo

Gran capacidad de absorción

Presentaciones irradiadas envasadas al vacío

Análisis microbiológicos y físico-químicos de los lotes entregados



El des-engaño de las células STAP

Lluís Montoliu

Centro Nacional de Biotecnología

El día 2 de julio de 2014 la prestigiosa revista *Nature* anunció la retirada de dos trabajos científicos que habían sido publicados apenas cinco meses antes, tras constatar y confirmar las múltiples acusaciones de alteración y manipulación de datos que se habían acumulado sobre ellos. Este es un resumen personal de un muy desgraciado incidente que, lejos solamente de haberse llevado por delante la credibilidad de la persona hallada culpable de dichas manipulaciones, puede haber afectado, de forma irreversible, el prestigio de los investigadores, centros de investigación e instituciones implicadas, sin olvidar la innegable responsabilidad de la revista, que no detectó ninguna de estas múltiples alteraciones (algunas muy evidentes y de fácil detección), y que aceptó publicar unos resultados llamados a revolucionar la biomedicina regenerativa que, sin embargo, nunca jamás debieron ser publicados.

El día 30 de enero de 2014 dos manuscritos aparecieron publicados en *Nature*, un artículo [1] y una carta [2] (*letter*), firmados por un grupo de investigadores japoneses y americanos. En ambos casos la primera autora de los trabajos era la misma investigadora, Haruko Obokata, mientras que la responsabilidad científica de los mismos recaía en Charles Vacanti y Teruhiko Wakayama, investigadores del Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, en Boston, Massachusetts (USA) y del RIKEN Center for Developmental Biology en Kobe (Japón), respectivamente. Haruko Obokata había estado trabajando en ambas instituciones y retornado a Japon, al CDB de Kobe, tras una estancia en Boston.

Lo sorprendente del caso no era, solamente, que una misma investigadora lograra colocar dos manuscritos en el mismo número de *Nature* (algo que ocurre muy pocas veces), sino los resultados de los trabajos. En esencia, los artículos parecían demostrar que una célula somática, de bazo, del linaje hematopoyético, expuesta a una solución ligeramente ácida (pH=5.7) durante un breve espacio de tiempo (25 minutos) se convertía espontáneamente en otra célula con características y capacidad pluripotentes, lo cual, en el ratón, se podía comprobar

fácilmente mediante la obtención de quimeras que acababan transmitiendo el genotipo de dichas células a través de la línea germinal y eran capaces de colonizar no solamente los diversos tejidos del embrión en gestación sino también la placenta, algo que habitualmente no se observa con las células embrionales pluripotentes troncales (ES) o inducidas (iPS). Los autores de estos artículos probaron diferentes tipos de estímulos inductores de pluripotencia, aunque finalmente centraron su estudio en el tratamiento ligeramente ácido, procedimiento simple donde los haya, de ahí que estas sorprendentes células recibieron el nombre de células STAP, abreviación, en inglés, correspondiente a células con pluripotencia adquirida debido a estímulos (*Stimulus-Triggered Acquisition of Pluripotency*).

Estas células STAP generaron de inmediato una expectación formidable en la comunidad científica. Aparentemente se había conseguido la inducción de la pluripotencia sin factores de reprogramación, sin transferencia nuclear, sin tratamiento de las células con ningún fármaco ni el uso de ningún virus portador de los genes de reprogramación de Yamanaka, simplemente exponiéndolas a un tratamiento ligeramente ácido, lo cual, tendría, de ser cierto, una trascendencia descomunal en biomedicina regenerativa. Por ello, no fue nada sorprendente el constatar que multitud de investigadores especialistas en células troncales pluripotentes de todo el mundo pusieran a trabajar sus laboratorios para intentar reproducir estos increíbles resultados de Obokata y colaboradores. Y, rápidamente, se conoció la no reproducibilidad de estos experimentos, a través de blogs especializados [3] y de comentarios remitidos a la propia revista *Nature*. Ningún laboratorio conseguía obtener las células STAP que Obokata había descrito. Este hecho, por sí solo, aunque preocupante, no debería ser estrictamente problemático y podría explicarse debido a dificultades intrínsecas del método o a una descripción no exhaustiva ni pormenorizada del protocolo. Sin embargo, las sospechas de que algo no estaba bien empezaron a acumularse cuando se descubrieron diversos errores y manipulaciones en las figuras de los trabajos publicados.

La institución RIKEN, equivalente a nuestro CSIC, inició una investigación interna de estas alteraciones detectadas. De forma paralela, la propia revista *Nature*, que no había detectado estas alteraciones en su proceso de filtro y revisión editorial, también

inició otra investigación interna. El resultado del comité de investigación interna en RIKEN, hecho público a finales de marzo [4], fue incontestable. Haruko Obokata fue hallada culpable de errores, reutilizaciones de texto e imágenes de otras publicaciones sin permiso ni referencia, manipulaciones y fabricaciones de diversas figuras de los dos artículos y, por ello, el informe concluyó que Haruko Obokata era culpable de un comportamiento científico inadecuado (*research misconduct*), mientras que el resto de investigadores RIKEN implicados no eran objeto de la misma calificación, aunque se llevaron un reproche serio, en toda regla, por su falta de supervisión adecuada de la investigación que llevaba a cabo Haruko Obokata y por permitir y/o no haber impedido que dichas alteraciones llegaran a ser publicadas. El informe concluía también recomendando la retirada de ambas publicaciones. Haruko Obokata rechazó la acusación de conducta inapropiada y recurrió, sólo admitiendo algunos errores y negándose inicialmente a retirar sus publicaciones, algo que acabaría admitiendo ante todas las evidencias acumuladas y tras reafirmarse RIKEN en sus conclusiones en un segundo informe [5], tras el recurso presentado por la investigadora.

Las alteraciones y manipulaciones encontradas son múltiples y diversas, y pueden encontrarse fácilmente en la profusa información que sobre este caso hay en Internet. Además, *Nature*, en su nota editorial anunciando la retirada de los artículos [6] ha decidido mantener el acceso *online* a los mismos, por lo que cualquiera puede comprobar estas manipulaciones. Solamente me referiré a un par de ejemplos, uno de cada trabajo, para subrayar la gravedad de las mismas. En el panel "i" de la figura 1 del artículo en *Nature*, la figura central en la que pretendidamente se demuestra la obtención de células STAP a partir del tratamiento ácido de esplenocitos, que representa un gel de electroforesis de agarosa, con análisis de DNA genómico de diversas células mediante PCR, el carril que contiene el control positivo fue añadido posteriormente, a partir de otro gel, y ajustado para dar a entender, falsamente, que la imagen correspondía a un mismo gel y a un solo experimento. En su defensa, Haruko Obokata apunta, sorprendentemente, que ignoraba que no podían manipularse las figuras de esta manera y que lo hizo para ilustrar mejor el mensaje que quería transmitir en esa figura.

En relación a la carta en *Nature*, el segundo de los trabajos publicados, donde se detallaba la contribución de las STAP cells en la generación de quimeras y la transmisión de su genotipo mediante línea germinal, los análisis genéticos posteriores han demostrado que se usaron células distintas a las descritas [7]. El investigador Teruhiko Wakayama, responsable del segundo trabajo y famoso por sus múltiples trabajos en embriología

molecular y, en particular, por haber clonado ratones por vez primera en 1998 [8], remitió a Haruko Obokata una línea de ratones con el gen indicador GFP integrado en el cromosoma 18. Obokata preparó, supuestamente, STAP cells a partir de esplenocitos de dichos ratones y se las devolvió de nuevo a Wakayama, para que éste realizara los experimentos de generación de quimeras con ellas y demostrara su capacidad de colonizar todos los tejidos del embrión en desarrollo, incluida la línea germinal. Sin embargo, a posteriori, Wakayama constató, con ayuda de laboratorios independientes especialistas en análisis genéticos, que las células que Obokata le había retornado tenían el gen indicador GFP en el cromosoma 15, siendo por lo tanto de una procedencia distinta a la esperada y descrita en las publicaciones. Esta inesperada constatación por parte de Wakayama le reafirmó en su voluntad de retirar los trabajos, siendo uno de los primeros co-autores en solicitarlo. Por su parte, Obokata, argumentó, a través de su abogado, que no era posible dicha mezcla o error. De cualquier manera, solamente esta alteración/error/manipulación, lo que quiera que haya sido, es más que suficiente para retirar los dos artículos inmediatamente y supone un descrédito total a los experimentos publicados y pone en serias dudas que las células STAP hayan podido existir alguna vez.

Esta desgraciada y triste historia tiene, en mi opinión, solamente un aspecto positivo y una lección. Tardamos dos años (2004-2006) [9] en conocer que los artículos publicados por el científico surcoreano Woo Suk Hwang sobre células troncales pluripotentes humanas eran fraudulentos. En esta ocasión apenas cinco meses han mediado entre la publicación y la retirada de los trabajos publicados, ante la presión de la comunidad científica y la evidencia de las alteraciones. La lección que podemos obtener, todos, como miembros de la comunidad científica, es que no todo vale en ciencia, que cualquier experimento debe ser realizado y finalmente descrito de acuerdo a los estrictos criterios del método y la ética científicos, y que cuando se descubren hallazgos sorprendentes, inesperados y extraordinarios no menos extraordinarios, impecables y convincentes deben ser las evidencias que hay que aportar para demostrarlos.

Finalmente, una nota resumen de todo lo acontecido. Creo que cometeríamos un grave error si simplificáramos todo este monumental des-engaño de las células STAP y lo limitáramos a la conducta inadecuada y totalmente reprochable de Haruko Obokata. Co-responsables de este despropósito son los investigadores co-autores y/o autores principales de estos trabajos, quienes creyeron los experimentos presentados por su joven colaboradora, resultando engañados, aunque debieron

haber supervisado, monitorizado, comprobado y revisado las evidencias presentadas por esta investigadora, habiendo podido detectar las alteraciones incluidas en los manuscritos antes de ser remitidas a su publicación. Co-responsables son también, en parte, los centros de investigación e instituciones involucradas, al no haber funcionado los mecanismos de formación ética y respeto a las normativas internas de investigación, que claramente se incumplieron en este caso. Y, por último, co-responsable es la revista *Nature* [10], a través de los editores y revisores involucrados, quienes debieron haber detectado igualmente estas alteraciones antes de aceptar publicar estos resultados, por sorprendentes y potencialmente importantes que pudieran parecer.

"Yoshiko Sasai acabó suicidándose el 5 de Agosto de 2014, colgándose en las escaleras del propio centro Riken CDB en Kobe, probablemente incapaz de aguantar la presión y apesadumbrado por el caso."

BIBLIOGRAFÍA

1. Obokata H., Wakayama T., Sasai Y., et al. *Stimulus-triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency*. Nature 2014, 505(7485): 641-7.
2. Obokata H., Sasai Y., Niwa H., et al. *Bidirectional developmental potential in reprogrammed cells with acquired pluripotency*. Nature 2014, 505(7485): 676-80.
3. Paul Knoepfer Lab Stem Cell Blog: <http://www.ipscell.com/>
4. Conclusiones de la investigación interna sobre este caso encargada por RIKEN <http://www3.riken.jp/stap/e/f1document1.pdf>
5. Respuesta de RIKEN al recurso presentado por Haruko Obokata. <http://www3.riken.jp/stap/e/p2document14.pdf>
6. http://www.nature.com/news/stap-retracted-1.15488?WT.ec_id=NATURE-20140703
7. <http://www.nature.com/news/gene-tests-suggest-acid-bath-stem-cells-never-existed-1.15425>
8. Wakayama T., Perry A.C., Zuccotti M., et al. *Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei*. Nature 1998, 394(6691): 369-74.
9. http://www.sciencemag.org/site/feature/misc/webfeat/hwang2005/science_statement.pdf
10. <http://www.nature.com/news/research-integrity-cell-induced-stress-1.15507>



PRINCIPIOS ÉTICOS EN INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA CON MODELOS ANIMALES

1

SE DEBE EVITAR EL USO DE ANIMALES CUANDO EXISTA UN MÉTODO ALTERNATIVO QUE PROPORCIONE RESULTADOS SATISFATORIOS.



www.secal.es



Granja
San
Bernardo

*Minimal Disease
Level Rabbits*

New Zealand White Rabbit.
Total absence of all important rabbit disease germens
with specific sanitary garantees.

Ask our most recent guarantee table at
www.granjasanbernardo.com

Ciento Cincuenta

Javier Fidalgo

Socio-director en Ocelata consultores

Hace unos años, una pequeña empresa me preguntó si podía ayudarle a mejorar el orden en su organización. Hasta entonces, había ido creciendo, como suele ser, respondiendo a las necesidades del momento e intuiciones del dueño. Él veía claro la necesidad de estandarizar la manera de trabajar, definir los perfiles laborales, elaborar procedimientos y, en fin, poner por escrito lo que su empresa hacía y cómo debía hacerse.

Como yo tenía larga experiencia en sistemas de gestión, sabía lo que él tenía en mente. También sabía que se equivocaba en la que era su premisa inicial: *es posible ordenar el comportamiento de toda la organización si se detalla por escrito cuál debería ser éste.*

En realidad no se consigue orden escribiendo cómo deben hacerse las cosas y consignando a quienes trabajan en la empresa a que sigan lo escrito.

En primer lugar, porque es imposible detallar por escrito toda la complejidad que concurre al llevar a cabo un trabajo. Éste es producto de interacciones muy complejas entre personas que incluyen acciones, percepciones, simplificaciones cognitivas, construcciones mentales, pensamientos, etc. Todas estas cosas subyacentes *se expresan en formas de hacer* que parecen engañosamente simples.

En segundo lugar, porque ese orden deseado emerge sobre todo de una autorregulación que puede ser guiada, eso sí, por normas escritas, muchas o muy pocas. Si se confía en la capacidad de autorregulación del grupo y se le transfiere la autoridad necesaria, pocas normas serán necesarias. En cambio, si se piensa que el grupo precisa una regulación externa, habrá que crear y mantener toda una literatura normativa.

Parece cierto que en un entorno tipo laboratorio, donde una pequeña variación en una acción puede tener graves consecuencias, definir por escrito la forma de hacer ciertas cosas para guiar el comportamiento (y reducir el error humano), suele ser muy necesario. Pero se puede ir mucho más allá regulando en exceso.

En este artículo quiero exponer alguna idea sobre las posibilidades de mantener el número de regulaciones explícitas, de procedimientos escritos, tan bajo como sea posible; también sobre los límites de la capacidad de autogestión de un grupo sin recurrir a una sobrerregulación externa que, en lugar de ayudar, sólo añade *ruido*¹ para quienes deban llevar a cabo la tarea encomendada.

Robin Dunbar² es un antropólogo conocido por sus estudios en organización social de primates superiores y humanos. Hace años sugirió que los humanos podemos establecer genuinos vínculos sociales con un limitado número de personas. Según su propuesta, esta restricción, relacionada con el volumen de nuestro neocórtex, define el tamaño de un *grupo humano cohesionado* y que resulta ser de 150 individuos. En la práctica, el número 150 aparece continuamente como característica de una *organización social cohesionada*. Por ejemplo, atendiendo a las investigaciones etnográficas, ése era el número de miembros que reiteradamente aparecía conformando los grupos en diferentes culturas de cazadores-recolectores. También, a lo largo de la historia, las unidades militares funcionales de combate se han organizado en torno a 200 individuos. A principios de los 2000, antes del auge de las redes sociales *online*, Dunbar llevó a cabo un estudio para conocer el tamaño de la red social de felicitados por Navidad de las familias inglesas. Encontró que las felicitaciones de cada familia implicaban, de media, a 153.5 personas³.

Según Dunbar, "150 parece ser el número máximo de individuos con los que podemos tener una relación social genuina, el tipo de relación que conlleva saber quiénes son y cómo se relacionan con nosotros. Dicho de otro modo, es el número de personas con el que te sentirías a gusto uniéndote a ellos para tomar algo en un bar si te los encontrases de repente"⁴.

Dunbar provee de otros ejemplos y sostiene que se puede, y de hecho se hace, organizar grupos más numerosos pero a costa de introducir normas, jerarquía, explicitar la definición de roles, etc. Lo mismo se consigue, de manera informal, si los integrantes del grupo se mantienen por debajo de 150.

Gore-Tex es una empresa americana fabricante de ese tejido que permite, sin que se te cuezan los pies, pisar charcos mante-

Factor Humano

niendo secos tus calcetines. Su fundador, W.L. Gore, para decidir el tipo de estructura organizacional que quería, optó por aquella que estimulase la innovación. Se decidió por una muy poco jerarquizada, en la que la autoridad estuviera repartida entre sus trabajadores de forma igualitaria. El objetivo era facilitar que las ideas buenas pudieran crecer sólo según el criterio de los equipos de trabajadores, sin necesidad del visto bueno de jefes. Gore además, dio permiso a los equipos para intentar cualquier cosa con tal de que no pusiera en peligro la empresa en su conjunto.

Para mantener los beneficios esperados de esa estructura, Gore decidió cuál debía ser el tamaño óptimo de cada "unidad de producción". Según Stuart Read y Robert Wiltbank, "Gore había comprobado que si se sobrepasaba ese óptimo ocurrían dos cosas. Primero, que el equipo perdía el sentido de cooperación, cambiando la responsabilidad de las decisiones desde el 'nosotros' (el equipo) al 'ellos' (un invisible burócrata anónimo). Segundo, que el rendimiento de cada persona decrecía". El tamaño óptimo decidido por Gore es de 150. Cuando un equipo de producción supera los 200, se divide en dos independientes.

Gore-Tex funciona como un sistema autorregulado en el que los líderes no son designados al margen del grupo sino que emergen de él cuando tienen suficientes seguidores.

Parece pues que mientras que no sobrepase nuestra capacidad de manejo social, los humanos somos capaces de autogestionarnos con éxito sin necesidad de explicitar muchas normas o establecer un control vigilante externo al grupo. Nos supervisamos entre nosotros y tendemos a esforzarnos por lograr y mantener el reconocimiento del grupo al que pertenecemos.

Para mi Gore-Tex es una rareza, yo no he trabajado cerca de algo parecido. Conseguir un sistema como el de Gore-Tex no debe ser sencillo. Así y todo, me parece que su ejemplo y los hallazgos de Dunbar pueden servirnos para conocer que el grupo que dirijo o al que pertenezco posee una muy alta capacidad de manejarse con inteligencia y trabajar suficientemente bien, al menos los que no sobrepasen los 150 miembros, sin necesidad de una continua supervisión.

BIBLIOGRAFÍA

1. Esta es una queja muy difundida entre quienes trabajan bajo sistemas de gestión normalizados, como el de la ISO de la serie 9000. En honor a la verdad, mucho del exceso de literatura asociado a ese tipo de sistemas de gestión es producto de una equivocada interpretación de la norma por parte de la organización, de los consultores expertos que ayudan a implantarlas y aún, es mi experiencia, de algunas empresas certificadoras.

2. Wikipedia http://es.wikipedia.org/wiki/Robin_Dunbar.
3. Bennet D. *The Dunbar Number, From the Guru of social Networks*. BusinessWeek (2013,01,10). Recuperado de <http://www.businessweek.com/articles/2013-01-10/the-dunbar-number-from-the-guru-of-social-networks#p1>
4. Dunbar R. en Gladwell. M. (2002). *The Tipping point*. (eBook Edition) New York: Little, Brown and Company. Hachette Book Group.
5. Read and Wiltbank (n.d.). *Breath of Fresh Air - the Story of Gore-Tex*. Society for Effectual Action. Recuperado de <http://www.effectuation.org/article/breath-fresh-air-story-gore-tex>.



PRINCIPIOS ÉTICOS EN INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA CON MODELOS ANIMALES

2

EL BENEFICIO FINAL DEL USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN DEBE ESTAR CLARAMENTE DEFINIDO EN CADA PROTOCOLO. LA EVALUACIÓN DE LA NECESIDAD DE SU USO DEBE REALIZARSE POR UN COMITÉ ÉTICO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.



www.secal.es

La comprensión de la muestra

Daniel Baizán Vicent

La finalidad última de la investigación es obtener unos resultados que deben ser interpretados. No todo el mundo es capaz de entender el resultado de un análisis médico, pero www.labtestsonline.es te lo va a poner más fácil.

Los resultados de los análisis clínicos suelen ser una lista de numeritos a veces indescifrable, especialmente para el público en general. Nuestro médico, tras valorar globalmente nuestra situación clínica, edad, sexo y otras exploraciones, podrá indicarnos con conocimiento de causa cómo deben ser interpretados.

Sin embargo, la aparición de las nuevas tecnologías permite el desarrollo de herramientas que pueden ayudarnos a comprenderlos mejor y conocer el objetivo de tales pruebas que nos solicitó el médico tras un examen adecuado.

No hay duda de que interpretar esos datos es una tarea ardua, y el mejor capacitado para ello es el médico que tiene en cuenta toda la información relacionada con el paciente. Por eso, para este número, os voy a mostrar una página web que nos ayuda a entender los resultados clínicos de los análisis que se realizan en sanidad.

[Labtestsonline.es](http://www.labtestsonline.es) es una web creada para ayudar a los pacientes a entender el porqué de las pruebas, en qué consisten y lo que se espera de ellas.



www.labtestsonline.es

Libros y páginas web



La definición de la página nos la otorga ella misma con un resumen muy claro: “Esta web es la traducción a la lengua española de Lab Tests Online (LTO), un servicio originado en la web de la American Association for Clinical Chemistry (AACC) cuyos derechos de traducción y adaptación a otras lenguas pertenecen a la European Diagnostic Manufacturers Association (EDMA)”.

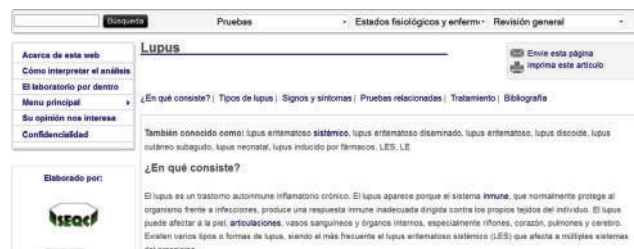
Asimismo dispone de los certificados de calidad Honcode y del Colegio de Médicos de Barcelona que garantizan rigor y seriedad. Como dice en su inicio, se trata de una web no comercial desarrollada por los especialistas del Laboratorio de Medicina. Por lo tanto, ya partimos de una base muy fiable que además se encargan sus responsables de recalcar para que quede demostrada la autenticidad y veracidad de la página sólo observando a los patrocinadores y a las personas y entidades que han hecho posible este proyecto.

Entrando de lleno en el interfaz y los usos de la página, empezamos por el idioma. Podemos encontrar hasta 17 idiomas de la página, útiles si nuestros resultados están en otro idioma, siempre realizadas por expertos de cada país.

El menú de la web es sencillo: el apartado que te introduce a la página; cómo interpretar un análisis; cómo es un laboratorio por dentro; la opinión y la confidencialidad.

“Acerca de esta web” nos lleva a entender todo lo relacionado al proyecto. Podemos encontrar los patrocinadores, las sociedades que colaboran y la explicación de los contenidos. Sólo viendo las sociedades adheridas podemos obtener una imagen global del potencial que vamos a encontrar en la web.

En segundo lugar voy a destacar la visita que nos ofrecen a un laboratorio. En este apartado tratan de mostrar el recorrido que realizan las diferentes muestras de los pacientes. Como bien dicen, normalmente el laboratorio empieza con la persona que nos recoge la muestra y termina cuando nos entregan el informe. Es un buen momento para conocer lo que se mueve *entre bambalinas*.



Ahora vamos a entrar en la parte más importante de la web y de su menú. Si por algo es importante esta web es por los cuatro apartados que ahora describimos: pruebas, estados fisiológicos, revisión general y glosario.

Sin duda estamos ante una herramienta fundamental y sencilla para entender por qué nos van a realizar una prueba o qué significará esa palabra que viene en el informe. Es frecuente consultar en la red los diagnósticos que nos realizan o las “cosas” que nos van a hacer. En esta ocasión, la explicación viene avalada por las sociedades científicas, y con una explicación muy clara.

Pongamos un ejemplo, invito a los lectores que entren en la web y lo realicen ellos. Hace un tiempo en una serie de televisión todos los síntomas podían dar como resultado el *lupus*. Pero ¿qué es el *lupus*? ¿Cuáles son sus síntomas? ¿Cómo se trata? Solución: labtestonline.es. Buscamos el *lupus* en los estados fisiológicos y se nos muestran todas las respuestas.

Quizás sea un ejemplo un tanto frívolo pero sirve para que se entiendan las posibilidades que vamos a encontrar con esta herramienta. La llamo herramienta porque se puede definir como tal dada su utilidad. Cabe señalar que toda la información se puede encontrar con un buscador en el que pongas la palabra o por orden alfabético. Si le unimos el Apartado del Glosario, tendremos un punto de encuentro virtual en el que encontraremos las respuestas a nuestras preguntas diagnósticas.

Finalmente hay que destacar que, como en las buenas páginas web, en la portada vamos a encontrar las fechas de las más recientes actualizaciones de la información de la página y noticias relacionadas con sus contenidos. Es objetivo de los autores revisar y actualizar lo necesario de todo el contenido en menos de 3 años para garantizar su actualidad e incluir los nuevos parámetros que surjan fruto de la investigación clínica.

Head office Castrop-Rauxel
Hermannstraße 2-8
44579 Castrop-Rauxel, Germany
phone +49 (0) 23 05 9 73 04-0
fax +49 (0) 23 05 9 73 04-44

Facility in Emmendingen
Fabrikstraße 2
79312 Emmendingen, Germany
phone +49 (0) 76 41 92 65-0
fax +49 (0) 76 41 47 97-2

Facility in Schönwalde
Hauptstraße 61b
16348 Wandlitz, Germany
phone +49 (0) 3 30 56 8 13-11
fax +49 (0) 3 30 56 8 13-12

BIOSCAPE
E B E C O + E H R E T F U S I O N



Full service lab animal technology

Representante en España:

Mari Carmen Viso

E-Mail maria-carmen.viso@bioscape.de

Teléfono + 34 6 55 76 38 28

Fax + 34 9 66 14 96 45

info@bioscape.de

-  Cages, racks for conventional animal husbandry
-  Ventilated systems + IVC cages
-  Individual cages
-  Cage systems
-  Transport + accessories
-  Washing, cleaning + decontamination

Conejos... ¿bloqueados?

M. F. Martín-Cancho, D. Celdrán-Bonafonte, B. Moreno, J.R. Lima, F. M. Sánchez-Margallo

Centro de Cirugía de Mínima Invasión, Jesús Usón

Para la realización de un estudio sobre el potencial terapéutico de una nueva molécula para el tratamiento quirúrgico del neumotórax, se emplearon doce conejos de raza Neozelandesa, que se dividieron de forma aleatoria en dos grupos experimentales: grupo I (n=6) toracotomía izda. + pleurodesis con la nueva molécula; y grupo II (n=6) toracotomía izda. + pleurodesis con Gentamicina (tratamiento tradicional).

La inducción anestésica de los animales se llevó a cabo mediante la administración intravenosa de Propofol (2 mg/Kg) y bloqueo neuromuscular con Vecuronio (0.1 mg/Kg). Tras la intubación se conectaron a una máquina anestésica con ventilación mecánica controlada con volumen (Leon plus; Heinen-Löwestein. Bad Ems, Alemania), ajustando el volumen tidal y la frecuencia respiratoria para conseguir una normocapnia estable de 37-39 mmHg. Se administró una dosis de Sevoflurano de 1.5 CAM. La analgesia fue proporcionada mediante infusión continua de Remifentanilo (20 µg/Kg/h).

El tiempo quirúrgico medio de la intervención fue de 43±12 min. No hubo grandes problemas técnicos durante el desarrollo quirúrgico del modelo. Las dosis de Vecuronio se repitieron cada 20-25 min aprox. Finalizada la intervención y 2.5±1.2 minutos después de la última dosis de Vecuronio, se procedió a la administración del Sugammadex (inhibidor del Vecuronio) a una dosis de 6 mg/Kg, con drenaje torácico conectado a sello de agua.

Tras recuperar movimiento respiratorio voluntario (15-20 minutos aprox.) se retiraron los tubos endotraqueales, se recuperó la presión negativa intratorácica a través del drenaje pleural, y los animales se trasladaron a la zona de cuidados post-operatorios para su observación. A los 10 minutos de retirar los tubos, 8 conejos entraron en disnea severa con debilidad en los movimientos respiratorios. Se intentó volver a intubar para conectar al respirador mecánico y para ello se procedió a administrar una nueva dosis de Vecuronio (0.1 mg/Kg) sin lograr relajación suficiente en ningún caso con resultado final de parada respiratoria y muerte.

¿Y tú qué opinas?

¿Qué habrá podido ocurrir?

¿Se podría haber corregido?

¿Habría alguna manera de evitar este problema?

SOLUCIÓN

El protocolo anestésico y los parámetros ventilatorios son correctos. Que los animales recuperaran movimientos respiratorios voluntarios durante unos 10 minutos aprox. y luego volviesen a perder esa capacidad, nos hace plantear algún error en el manejo de los bloqueantes neuromusculares y/o su inhibidor, Sugammadex.

La capacidad del Sugammadex de revertir los efectos de los bloqueantes neuromusculares no despolarizantes esteroideos varía dependiendo del agente y de la dosis. Estudios recientes indican que el uso de Sugammadex es seguro y mucho más rápido y efectivo con el Rocuronio que con el Vecuronio. Es de vital importancia la monitorización neurofisiológica cuando se emplean bloqueantes neuromusculares y se pretende extubar al animal, con dos fines:

- Ver qué dosis de Sugammadex emplear (2, 4 o 16 mg/Kg) dependiendo del grado de bloqueo.
- Evitar una recurarización residual (pensamos que el animal está ya sin efectos de los relajantes, lo trasladamos a otro sitio y se muere por apnea).

Otro aspecto fundamental que debieron tener en cuenta, es que si habían utilizado Sugammadex y el animal precisaba una reintervención urgente, no se hubiera tenido que utilizar Rocuronio o Vecuronio en esa próxima intervención, sino otro de una familia distinta como el Cisatracurio, con el que el Sugammadex presente en sangre no tiene efecto.



A modo de resumen pensamos que hubo una serie de errores metodológicos a la hora de la reversión del Vecuronio:

1. Utilizar una dosis baja de Sugammadex para revertir una dosis reciente (dentro de los 2-3 minutos posteriores a la última administración de Vecuronio). Varios autores recomiendan dosis de 16 mg/Kg. La dosis empleada (6 mg/Kg) es suficiente para permitir una recuperación momentánea de los movimientos respiratorios, pero insuficiente para evitar efectos residuales de recurarización.
2. No utilizar monitorización neurofisiológica que nos diera una valoración objetiva del grado de bloqueo. Es aconsejable utilizar la valoración de la relajación muscular mediante el "tren de cuatro".
3. Es aconsejable la utilización de Rocuronio (a la misma dosis) en lugar de Vecuronio, si estimamos posible la necesidad de bloquear su efecto inmediatamente. Parece ser, según algunos autores, que el Sugammadex es mucho más efectivo en este caso que con el Vecuronio.
4. Intentar volver a bloquear con Vecuronio para reintubar al animal. En este caso lo aconsejable hubiese sido cambiar de familia de neurobloqueantes y emplear, por ejemplo, Cisatracurio.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez-Gomez J.A. *Sugammadex, una revolución en farmacología neuromuscular*. Revista española de anestesiología y reanimación 2007,54(4):205-7.
- Alvarez-Gómez J.A., Wattwill M., Vanacker B., et al. *Reversal of vecuronium –induced shallow neuromuscular blockade is significantly faster with sugammadex compared with neostigmine*. European Journal of Anaesthesiology 2007, 24: 124-5.
- Duvaldestin P, Kuzienga K, Kjaer C.C., et al. *Sugammadex achieves fast recovery from profound neuromuscular blockade induced by rocuronium or vecuronium: A dose response study*. European Journal of Anaesthesiology 2007, 24: 123.
- Bom A., Hope F., Rutherford S., and Thomson K. *Preclinical pharmacology of sugammadex*. Journal of Critical Care 2009, 24(1): 29-35.
- Vanacker B.F., Vermeyen K.M., Struys M.M.R.F., et al. *Reversal of rocuronium-induced neuromuscular block with the novel drug sugammadex is equally effective under maintenance anesthesia with propofol or sevoflurane*. Anesthesia & Analgesia 2007, 104: 563-8.
- Bom A., Hope F. *Propranolol and Isoprenaline do not modify the sugammadex-induced fast recovery from rocuronium-induced neuromuscular blockade*. European Journal of Anaesthesiology 2007, 24: 111-2.
- M. F. Martín-Cancho, D. Celdrán-Bonafonte, B. Moreno, et al. *Estudio comparativo de seguridad y eficacia del sugammadex como reversor de los efectos de rocuronio y vecuronio en conejo*. International Congress FELASA, Barcelona 2013.
- Sorgenfrei I.F., Norrild K., Larsen P.B., et al. *Reversal of rocuronium-induced neuromuscular block by selective relaxant binding agent sugammadex: a dose-finding and safety study*. Anesthesiology 2006, 104(4):667-74.

Cómo nos ayudan las nuevas tecnologías. De la seguridad e higiene en el trabajo al bienestar animal. Medida de iluminación y ruido en nuestras instalaciones con App's para teléfono móvil

J. Martínez Palacio y C. García Ortiz
Técnicos Superiores en Prevención de Riesgos Laborales

Entre los múltiples factores de riesgo asociados a los puestos de trabajo, vamos a hablar hoy de la iluminación y el ruido.

Una iluminación adecuada es fundamental para el buen desarrollo de las tareas, evitando la fatiga y las molestias ocasionadas por la falta de luz. Igualmente, algunos problemas asociados a la luz (reflejos, parpadeos, deslumbramientos) pueden ser factores de riesgo en el trabajo.

Zona o parte del lugar de trabajo	Nivel mínimo de iluminación (Lux)
Zonas donde se ejecuten tareas con:	
1. Bajas exigencias visuales	100
2. Exigencias visuales moderadas	200
3. Exigencias visuales altas	500
4. Exigencias visuales muy altas	1.000
Áreas o locales de uso ocasional	
	50
Áreas o locales de uso habitual	
	100
Vías de circulación de uso ocasional	
	25
Vías de circulación de uso habitual	
	50

Tabla 1.- Niveles mínimos de iluminación que establece la normativa vigente (RD 486/97).

En nuestras instalaciones, la adecuación de los niveles de iluminación al bienestar animal puede actuar negativamente sobre el bienestar del trabajador (ver Tabla 1 y Figura 1). Igualmente, en muchas ocasiones, el diseño 'generalista' de las instalaciones hace que zonas destinadas al alojamiento de animales tengan una iluminación excesiva para los animales de 'tipo laboratorio'.

El ruido es una energía (caracterizada por su frecuencia e intensidad) que somos capaces de percibir. Se le considera uno de los principales 'contaminantes' laborales. De la exposición al ruido, también pueden derivarse problemas tanto desde el punto de vista del bienestar animal como del bienestar humano¹. EL INSHT lo resume en:

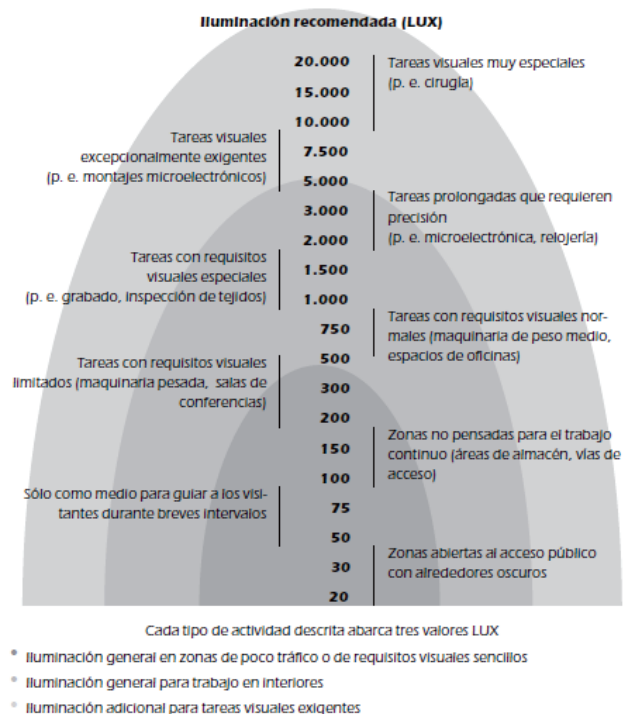


Figura 1.- Se recomiendan niveles superiores (CENTC 169, tomado de ISTATS).

- **Enfermedad:** Efectos sobre la audición. Hipoacusia o sordera laboral (RD 286/2006).
- Efectos extra-auditivos.
- **Efectos fisiológicos:** Afectan directamente al Sistema Nervioso Central y Sistema Nervioso Autónomo.
- Aumento del ritmo cardiaco.

¹Si alguno está interesado en saber más sobre los efectos del ruido, tanto en humanos como en animales, podéis consultar:
Humanos: Sencilla hoja informativa de la Agencia Europea para la Seguridad y la Salud en el Trabajo en que se analizan estos efectos, <https://osha.europa.eu/es/publications/factsheets/57>
Animales: Traducción al español de un artículo de *Laboratory Animals* en que se analizan, entre otros factores, los efectos el ruido sobre los animales, <http://secal.es/pdf/Limpieza.pdf>

- Vasoconstricción.
- Aceleración del ritmo respiratorio.
- Disminución de la actividad de los órganos digestivos.
- Reducción de la actividad cerebral.
- Efectos psicológicos: Interferencias con el sueño, alteraciones en el comportamiento, cansancio, etc.
- Interferencias con la actividad: Afecta a la realización del trabajo.

De manera general, en salud laboral medimos los decibelios ponderados en A (audibles, adaptados a las frecuencias que los humanos percibimos). La normativa actual (RD 286/2007) establece unos límites de 80 y 135 dB(A) para exposición diaria y puntual, respectivamente. Si consideramos el ruido desde el punto de vista 'animal', hay que tener en cuenta los mayores rangos de frecuencias que perciben los animales y sus distintos 'óptimos'.

En cuanto a la situación en animalarios, en los que hablamos más de condiciones de alojamiento que de riesgos derivados de la exposición, se admiten como ideales los niveles de iluminación de 350 lux a 1.5 metros del suelo (suelen traducirse en iluminaciones entre 35-75 lux en el interior de las cubetas) y un nivel sonoro inferior a 35 dB.

Hasta ahora el principal problema para evaluar y controlar estos riesgos o condiciones ambientales (según pongamos el foco en la persona o en el animal), era el elevado coste de los equipos de medida y la dificultad de disponer de ellos para realizar mediciones en condiciones de trabajo en los animalarios. Sin embargo, la evolución tecnológica ha venido en nuestra ayuda. Las nuevas generaciones de Smartphone cuentan con la posibilidad de utilizar pequeñas aplicaciones o App's. Bien basadas en sistemas Android (teléfonos convencionales) o iOS (iPhone), permiten realizar medidas tanto de niveles de iluminación como sonoros, a coste cero y sin necesidad de tener equipos especiales (aprovechan los micrófonos y sensores de luz de los teléfonos/cámaras).

Una reciente publicación 'Evaluation of smartphone sound measurement applications' de Chucrí *et al.* En la revista *Acoustical Society of America* (podéis descargarla en el siguiente enlace, <http://dx.doi.org/10.1121/1.4865269>) repasa una serie de estos programas/aplicaciones, estableciendo su validez por comparación con equipos profesionales calibrados.

Los autores encontraron del orden de 70 distintas aplicaciones Android e iOS, aunque sólo dos se presentaban en ambos soportes y provenían de fuentes no comerciales

(gratuitas). Realizaron pruebas y comparaciones entre sonómetros 'oficiales' y distintas App's para Android e iOS, y llegaron a la conclusión de que algunas de estas aplicaciones mostraban unos niveles de medida excelente que, aunque no puedan llegar a usarse como sustitutos de los sonómetros, pueden contribuir eficazmente a realizar una valoración de los niveles sonoros en el trabajo.

Por nuestra parte, y por la curiosidad que despertó este tema, en nuestro animalario descargamos diferentes App's aplicaciones para Android e iOS de medida de sonido y de iluminación, valorando su consistencia (ya que no tenemos equipos para valorar su precisión) de medida. En general todas la App's y equipos mostraron medidas bastante homogéneas, tanto en lo relativo a nivel sonoro como en iluminación. Anexo presentamos un 'Mapa de iluminación y sonido del Animalario' realizado por el personal del mismo.

Como curiosidades, destacar la mayor precisión (quizás esperable) de los sistemas iOS, especialmente en la medida de intensidad lumínica. Nuestro animalario utiliza luz fluorescente y parece que los sistemas Android captaban el parpadeo de los fluorescentes (con variaciones en la lectura de luz), que el sistema iOS (que realiza una 'fotografía' y calcula entonces la intensidad) no detectaba. Igualmente, algunos equipos Android no cuentan con sensor de luz y, lógicamente, no podían usarse para estas medidas.

También cabe destacar que algunos sonómetros facilitan la frecuencia predominante en el sonido, lo que proporciona grandes ventajas al usar estos elementos como 'control ambiental' en nuestras instalaciones.



Imagen 2.- Imagen de un iPhone midiendo intensidad lumínica y un móvil Android midiendo nivel sonoro.

5 MINUTOS SEGURIDAD EN

Bueno, ya os veo a todos en la Google Play Store y paseando con el móvil por la instalación.

Una propuesta ¿componemos un mapa sonoro y lumínico de nuestros animalarios? Podría tener interés componer una mapa

promedio con los niveles sonoros y lumínicos en las distintas instalaciones (sala de alojamiento de animales, experimentales, zonas de lavado, almacenes...). ¿Quién se anima?, desde el CIEMAT lo coordinamos (jesus.martinez@ciemat.es).

ANÚNCIATE EN ANIMALES DE LABORATORIO LA REVISTA DE LA SECAL

MÁS DE 400 SOCIOS RELACIONADOS CON EL SECTOR DE LOS ANIMALARIOS.

publicidad.revista@secal.es



Software para la gestión de animalarios



1 gestión del animalario más sencilla



2 que cumple con la nueva directiva

Tu solución para la nueva Directiva UE 2010/63

3 para cualquier tipo de animalario

desde centros individuales

a complejas redes institucionales



Bilbao • Cambridge • Lyon • Turin

T+34 94 403 69 98 • anibio@noraybio.com • www.noraybio.com

Mapa de iluminación y sonido del animalario del CIEMAT

Uso de aplicaciones Android para controlar las condiciones ambientales en una instalación de experimentación animal

N. Cano, D. Mariño, N. Landeta, E. Mariño, A. Serrano, E. de Almeida y J. Martínez-Palacio
Servicio de Animalario del CIEMAT

Aprovechando las posibilidades que ofrecen distintas aplicaciones para móvil de controlar las condiciones de iluminación y ruido en una instalación, desde la Dirección del Servicio de Animalario se nos sugirió realizar un control de estas condiciones en nuestra instalación.

El Servicio de Animalario del CIEMAT es una instalación antigua (más de 25 años), que responde a un diseño como laboratorio que se adaptó al uso como animalario. Progresivamente se han venido realizando ampliaciones, reformas y mejoras parciales, cambiando los usos y condiciones de las distintas salas.

Las medida de condiciones ambientales de luz y sonido se realizaron con un móvil Sony Xperia S y las aplicaciones Android gratuitas 'Light Meter' de Borce Trajkovski y 'Sound Meter' de SmartTools Co.

Todas las medidas se realizaron en la zona central de la sala a 1.5 metros del suelo.

Conforme a estas condiciones obtuvimos las siguientes medidas:

Salas de alojamiento de animales

Los datos obtenidos son:

- Iluminación: promedio de 3.935 lux.
- Nivel sonoro: promedio de 64.5 dB.

En el interior de las jaulas, hábitat real de los animales, estos valores se atenúan. Y esta atenuación, en el caso de la iluminación, depende de la posición y se asocia a las sombras de los elementos de cobertura (filtros, rejillas, comida...) y del resto de jaulas que conforman el rack. En cuanto al sonido, igualmente registramos atenuaciones que asociamos a los elementos de cierre (filtros) y al efecto amortiguador de la viruta.

Cabe destacar que, en este sentido, las jaulas con cobertor son las que mejores reducciones aportan en estos casos.

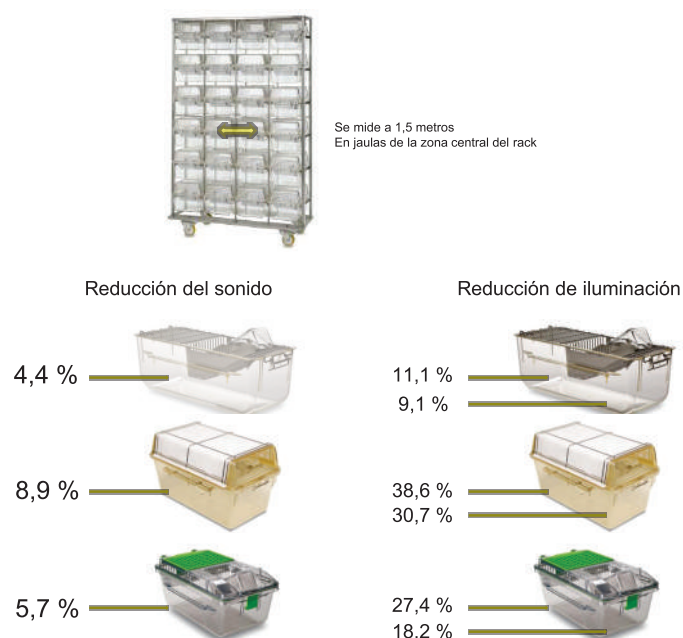


Figura 3.- Reducciones encontradas en función del tipo de jaula que se utiliza y las distintas 'zonas' de la jaula. Las imágenes se han tomado de Tecniplast (con su autorización).

Zonas de trabajo

En estas salas tomamos medidas en el centro de la sala y sobre las poyatas de trabajo (que algunas cuentan con iluminación de apoyo).

Los datos son:

- Promedio de 3.364 lux.
- Promedio de 67 dB.
- Promedio de iluminación en poyatas de 3.987 lux.

5 MINUTOS SEGURIDAD EN

En las cabinas de flujo laminar, que tiene iluminación adicional, se recogen estos datos:

- Iluminación promedio de 8.133 lux.
- Incremento de nivel de ruido (motores y flujo de aire) del 15.5% (87 dB).

En lo relativo al nivel sonoro derivado del uso de equipos de lavado:

- El lava biberones industrial genera un sonido de 90 dB.
- El túnel de lavado llega a los 102 dB.

Zonas comunes 'sin animales'

Consideramos estas zonas los pasillos y despachos/salas de descanso.

En los pasillos:

- Promedio de 1.801 lux.
- Promedio de 39 dB.

En los despachos:

- Promedio de 2.475 lux.
- Promedio de 46 dB.

Conclusiones

Es evidente que las medidas tomadas son sólo una aproximación, cuya utilidad es dar una idea general de las condiciones ambientales, sin otro valor ni trascendencia.

En lo referente a iluminación, comprobamos que los niveles obtenidos se corresponden a zonas de laboratorio (zonas de trabajo con altas exigencias visuales) y este diseño de iluminación en la instalación se ha venido manteniendo desde el diseño original.

Estos niveles de iluminación son inadecuados para el alojamiento de animales, aunque las reducciones que hemos observado en el interior de las cubetas, por uso de diferentes jaulas y las distintas posiciones en los racks, pueden minimizar el discomfort que esto produce en los animales.

De nuevo vemos una discrepancia entre las condiciones de alojamiento de animales y las condiciones de trabajo, primando en este caso el 'enfoque humano' del diseño. La iluminación en este caso sí sería adecuada a las tareas a desarrollar.

En lo relativo a nivel sonoro, sorprendentemente, los niveles resultan muy elevados en general. En algunos casos (cabinas, túnel de lavado y lava biberones) los niveles podrían resultar

perjudiciales para los trabajadores. Pero si ponderamos el tiempo de trabajo en esas condiciones, no se llegaría a niveles perjudiciales. De cualquier manera, los trabajadores disponen de 'amortiguadores de sonido' (tapones) que pueden utilizar en estos espacios.

Conocer este tema, y ser capaces de medirlo, sirve de motivación para buscar cada día las mejores condiciones de trabajo y de alojamiento de los animales.



Foto: Tomas García. Concurso de Fotografía SECAL

Alberto Pastor Campos

*Secretario del Órgano Evaluador de Proyectos en la Universidad Miguel Hernández de Elche
Veterinario especialista en salud y bienestar animal (Cat. D)*

¿Cuánto hace que es socio de SECAL y qué opinión le deja nuestro colectivo?

No recuerdo exactamente la fecha, pero creo que desde el año 2004. SECAL es una sociedad ejemplar por su intensa actividad, el valor humano y profesional de sus socios y por su compromiso con el animal de laboratorio.

¿Cree que la incorporación de un equipo interdisciplinar dentro del marco de un Órgano Habilitado mejoraría o dificultaría la valoración de los proyectos?

Cada centro es un mundo, pero de manera general considero que los comités interdisciplinares permiten que se discutan puntos de vista diferentes, que de otra manera se escapan y por ello, la evaluación final es más completa. La contrapartida es que cuando estos comités son muy grandes puede ser más complicado reunir a sus miembros y funcionar de manera ágil.

Recientemente, ha dejado su labor de veterinario responsable de uno de los animalarios de la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH) para dedicarse en exclusiva al Órgano Evaluador de Proyectos (OEP) de esta institución. ¿Qué funciones desempeña en este órgano?

La UMH es una universidad joven y dinámica con un tamaño contenido, por lo que era viable centralizar en un solo comité (Órgano Evaluador de Proyectos) los antiguos comités de ética en experimentación animal, ética en humanos y bioseguridad. Está formado por 11 personas de perfiles muy variados para poder llevar a cabo esta tarea. Creo que esto fue un acierto porque permite abordar la problemática de los proyectos desde todos los puntos de vista. Además, en 2012 la UMH comenzó un ambicioso proyecto de evaluación no sólo de la bioseguridad de los proyectos sino de los riesgos laborales y medioambientales (coordinando el OEP con el Servicio de Prevención de Riesgos Laborales y la Oficina Ambiental) de todas las actividades de investigación que se desarrollan en la UMH: proyectos de investigación, contratos y prestaciones de servicio. En Julio de



2014 comenzamos la última fase, la evaluación de los riesgos de los proyectos, contratos y prestaciones de servicio que no necesitan de una evaluación ética.

También ofrecemos un asesoramiento legal sobre la normativa actual en todos estos ámbitos, lo que previene posibles errores por desconocimiento de la abundante normativa actual.

Finalmente, el OEP también actúa de comité de resolución de conflictos y disputas entre investigadores o entre investigadores y revistas científicas.

Desde muchos sectores se critica que la práctica experimental con animales es poco rigurosa y que ésta es una de las causas de los fallos en la extrapolación de resultados. ¿Qué opinión tiene de esto? ¿Qué está fallando y cómo podemos mejorarlo?

Lamentablemente, coincido con que es poco rigurosa. No lo estamos haciendo bien y me preocupa. Y cuando digo que no lo estamos haciendo bien me refiero a todos: investigadores, revisores, editoriales, agencias financiadoras, comités científicos y éticos, personal de animalarios, etc. Todos somos parte del problema y de la solución.

Hace falta un acuerdo entre todos los implicados para llegar a un consenso y establecer mejoras. Elevar los requisitos de entrada de las agencias financiadoras y de las editoriales es un aspecto fundamental. Un sistema de calificación de los investigadores más centrado en la calidad que en la cantidad también es importante y, por supuesto, seguir avanzando en la formación de investigadores de excelencia.

¿Considera que los Códigos de Buenas Prácticas Científicas refinan el uso de animales y los resultados de las investigaciones?

Cuando no son meros documentos decorativos estoy convencido de que mejoran la investigación realizada a todos los niveles. La integridad es uno de los pilares de estos códigos. El trabajo bajo sistemas de calidad apropiados también es muy importante.

En su opinión, ¿debe ser un objetivo fundamental de todos los que estamos relacionados con el animal de laboratorio abrir las puertas a la sociedad para dar a conocer los beneficios de la investigación con animales?

Por supuesto, independientemente de que hay cosas que se pueden y se deben mejorar se está trabajando muy bien en muchos centros de investigación. Lo "malo" vende mejor que lo "bueno", es cierto, pero cometeríamos un gran error si no fuéramos capaces de transmitir los avances que se producen gracias a la experimentación animal. Todos sabemos que las asociaciones en contra de la experimentación experimental son muy activas y, bajo mi punto de vista, a día de hoy nos están ganando la partida a los que creemos en los beneficios de experimentar con animales.

En este sentido, en otros países ya han surgido asociaciones y fundaciones que tratan de transmitir a la sociedad la importancia de la experimentación animal y los beneficios que produce. Me parecen muy interesantes la iniciativa americana "Foundation for Biomedical Research" y la inglesa "Understanding Animal Research". Esta última pertenece a la red "European Animal Research Association". Creo que debería haber una asociación nacional que se encargara de estos temas en España, y no podría ser otra mejor que SECAL. Hay toda una línea de trabajo que desarrollar al respecto.

Finalmente, ¿cómo ve el futuro de la investigación con modelos animales? ¿Y el de los comités de ética?

La verdad es que es difícil predecir el futuro, pero la mejor manera de hacerlo es teniendo en cuenta los acontecimientos pasados, así que creo que se seguirán haciendo grandes esfuerzos por reducir el número de animales usados, por mejorar los derechos de los animales que se usan en investigación y por mejorar la calidad de la ciencia.

Los comités de ética cada día tendrán más funciones y requerirán (ya lo requieren, de hecho) de una estructura

administrativa con dotación presupuestaria para poder llevar a cabo de manera solvente e independiente sus cada día mayores y más importantes funciones asignadas. Su personal estará cada vez más especializado y para ello se usarán sistemas de formación continua. Hay que avanzar en la coordinación, en la creación de redes de trabajo y en la mejora del seguimiento de los procedimientos.

« El compromiso de las instituciones, de nuevo, es importante. En Reino Unido han firmado recientemente 72 instituciones públicas y privadas el "Concordat on Openness on Animal Research", con el objetivo de mejorar la transparencia en la investigación con animales (otra actividad que deberíamos promover desde SECAL). »



Powering your research development



Profesionales al servicio de la investigación

Servicios integrales para Animalarios

Externalización de servicios de Animalarios

Formación de personal

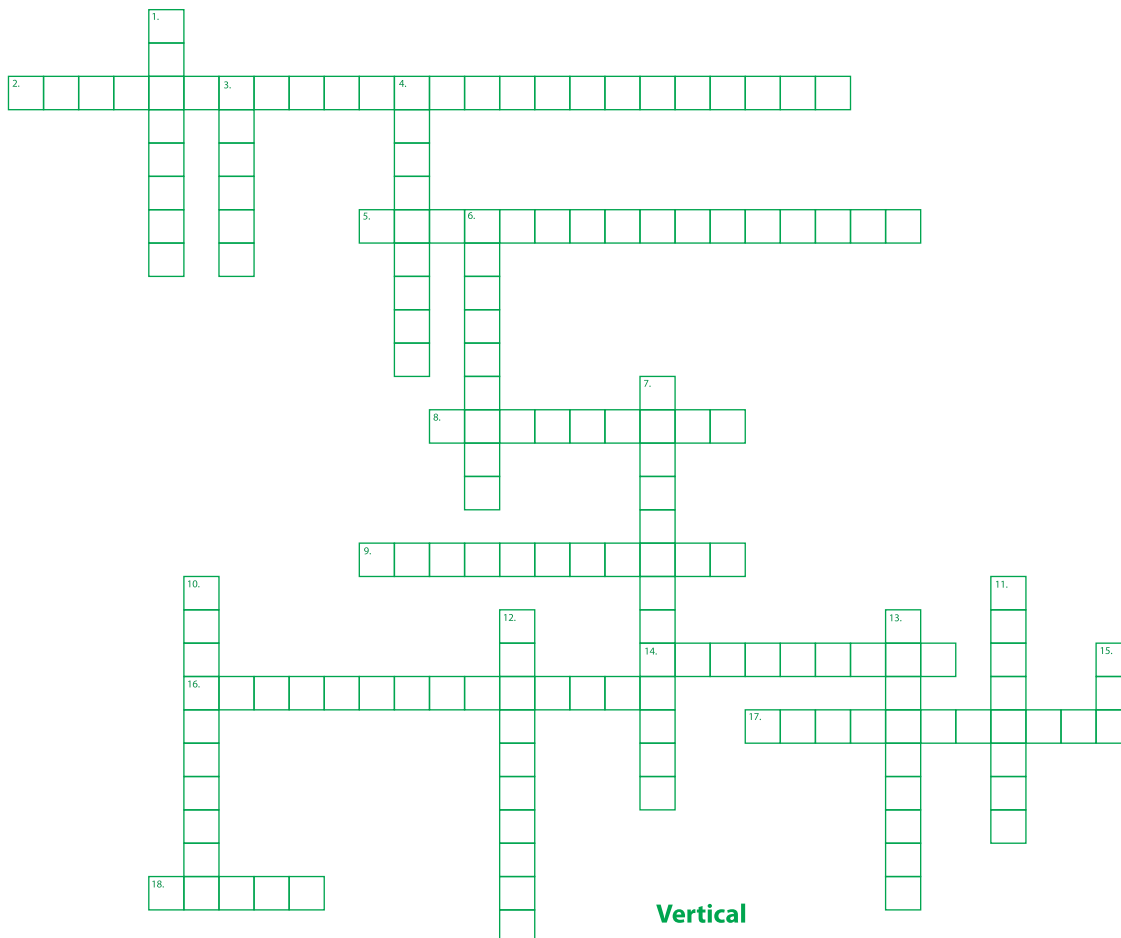
Diseño de Instalaciones

Alquiler y gestión de Instalaciones

Consultoría y Asesoramiento



www.vivotecnia-ms.com



Horizontal

2. Mejora del bienestar de los animales , tanto físico como psicológico identificando y proporcionándoles los estímulos ambientales necesarios para optimizar su calidad de vida.
5. Uno de los principios esenciales del método científico, que se refiere a la capacidad de un experimento a ser replicado.
8. Idea que puede no ser verdadera, basada en información previa. Su valor reside en la capacidad para establecer más relaciones entre los hechos y explicar por qué se producen.
9. Estudio de todos aquellos factores no genéticos que intervienen en la determinación de la ontogenia o desarrollo de un organismo.
14. Cada uno de los elementos que componen la población.
16. Estimación del número de sujetos requeridos para responder a una pregunta experimental.
17. Recuento, ordenación y clasificación de los datos obtenidos de las observaciones que permiten realizar comparaciones y sacar conclusiones.
18. Diferencia entre el mayor y el menor de los datos de una distribución estadística.

Vertical

1. Estrés celular causado por la disminución del riesgo sanguíneo y consecuente disminución del aporte de oxígeno de un tejido biológico.
3. Experimentación o mediciones realizadas en o sobre el tejido vivo en un ambiente artificial fuera del organismo, con la mínima alteración de las condiciones naturales.
4. Término que permite indicar una certeza manifiesta que resulta innegable y que no se puede dudar.
6. Cualquier estrategia que tenga como resultado el uso de un menor número de animales para obtener datos fiables.
7. Experimentación que se realiza por primera vez con el objetivo de comprobar ciertos parámetros.
10. Ciencia que estudia los tejidos, interrelacionando su estructura macroscópica, su desarrollo y sus funciones.
11. Alelo que codifica el fenotipo más común en la naturaleza (voz inglesa).
12. Representación gráfica de una variable en forma de barras.
13. Conjunto de instrucciones o normas generales para la ejecución de un procedimiento experimental (voz inglesa).
15. Técnica que permite realizar un análisis citológico, químico o microbiológico de los conductos bronquiales y alveolos pulmonares (siglas)



The Weight is Over.

No longer do you need to spend your time conditioning research models. There is now an immediate solution - Preconditioning Services from Charles River. Whether preparation for your study requires feeding special diets, aging of animals, phenotypic evaluations, or surgical manipulations, Charles River can provide you with animals preconditioned to your parameters and ready for use when they enter your facility.

For more information, please contact us at services@eu.crl.com



Referencias disponibles bajo demanda.

Rendimiento probado
de líneas celulares.

Tal como demuestran publicaciones de las más reconocidas instituciones investigadoras de todo el mundo, los modelos oncológicos de Harlan Laboratories ofrecen especificaciones de alta calidad, dietas y servicios de asistencia que pueden necesitar en su investigación contra el cáncer.

Para más información, visite nuestra Web www.harlan.com/oncology.

Modelos

Dietas

Servicios



www.harlan.com

©2010 Harlan Laboratories, Inc.
Harlan, Harlan Laboratories, Helping you do research better, and the Harlan logo are trademarks of Harlan Laboratories, Inc.