Iván Barbosa Machado Sampaio

Estadística aplicada a la experimentación animal

Editorial de la
Universidad Nacional del Sur

Iván Barbosa Machado Sampaio

Estadística aplicada a la experimentación animal

Editorial de la
Universidad Nacional del Sur

Barbosa Machado Sampaio, Ivan
Estadística aplicada a la experimentación animal. - 1a ed. - Bahía Blanca : Editorial de la Universidad Nacional del Sur. Ediuns, 2011.
290 p. ; 23,5x17,5 cm.

ISBN 978-987-1620-51-7

1. Ciencias Veterinarias. 2. Estadísticas. I. Título
CDD 636.089

Fecha de catalogación: 25/08/2011

Editorial de la Universidad Nacional del Sur
www.ediuns.uns.edu.ar
ediuns@uns.edu.ar

Red de Editoriales de
Universidades Nacionales

No se permite la reproducción parcial o total, el alquiler, la transmisión o transformación de este libro, en cualquier forma o por cualquier medio, sea electrónico o mecánico, mediante fotocopias, digitalización u otros métodos, sin el permiso previo y escrito del editor. Su infracción está penada por las leyes 11.723 y 25.446.

LIBRO UNIVERSITARIO ARGENTINO

Queda hecho el depósito que establece la ley 11.723
Bahía Blanca, Argentina

©2011 Ediuns

Índice

Prefacio v
1. Introducción 1
1.1 La estadística en la metodología científica 1
1.2 Contribución de la estadística a la experimentación 3
1.3 Principios básicos de la experimentación 4
1.3.1 Repetición de unidades experimentales 4
1.3.2 Sorteo de las unidades experimentales 4
1.3.3 Uniformidad de muestreo (animales experimentales) 5
1.3.4 Uniformidad en la aplicación del tratamiento 5
1.3.5 Uniformidad de medio 6
2. Las situaciones experimentales y las respuestas medidas 9
2.1 Situaciones experimentales 9
2.2 La respuesta medida 10
2.3 La unidad experimental 13
2.3.1 Muestra compuesta 13
2.3.2 Respuesta media de un grupo de individuos 14
2.3.3 Respuesta media de observaciones en el mismo individuo 14
3. Estadísticas descriptivas básicas 19
3.1 Consideraciones iniciales 19
3.2 Media 20
3.3 Desviación estándar 21
3.4 Coeficiente de variación 22
3.5 Tipo de distribución 24
4. Tipificación de respuestas individuales 29
5. Intervalo de confianza de una media 35
5.1 La distribución de medias 35
5.2 Aplicaciones del intervalo de confiaza de la media 38
5.2.1 Cálculo del tamaño de la muestra 38
5.2.2 El método de comparación de pares (apareamiento) 40
6. Comparación de grupos experimentales 43
7. Análisis de varianza 49
7.1 Consideraciones iniciales 49
7.2 Diseño completamente al azar 53

8. Diseño en Bloques al Azar 57
8.1 Condiciones experimentales 57
8.2 Pérdida de parcelas 63
8.2.1 Comparación de medias 67
9 Interacción de factores experimentales 69
9.1 Arreglos factoriales 69
9.2 La percepción de la interacción 72
10 Diseño en Cuadrado Latino 83
10.1 Condiciones experimentales 83
10.2 Pérdida de parcela 92
10.2.1 Las comparaciones de medias 96
11 Diseño en Parcelas Divididas 99
11.1 Condiciones experimentales 99
11.2 Las comparaciones de medias 106
11.3 Pérdida de resultados 109
12. Estudio de dispersión de frecuencia 117
12.1 Encuestas 118
12.2 Tablas de contingencia 121
12.3 Limitaciones en el uso de χ^2 130
13. Asociación de variables cuantitativas 133
13.1 Tipos de asociación 133
13.2 Correlación 134
13.2.1 Intervalo de confianza de r 137
13.3 Regresión lineal 141
13.3.1 La interpretación de los parámetros 142
13.3.2 La estimación de los parámetros 144
13.3.3 Evaluación estadística del modelo 148
13.3.3.1 Coeficiente de Determinación 149
13.3.3.2 Significancia del Coeficiente de Regresión 150
14. Análisis de Co-varianza 155
15. Diseños para respuestas de flujo continuo 165
15.1 Ensayos rotativos 165
15.2 Ensayos de reversión 172
Ocurrencia de parcelas perdidas 179
15.3 Bloques incompletos balanceados 181
Comparación de medias ajustadas 188
Ocurrencia de parcela perdida 188
16. Transformación de variables 191

16.1 Transformación logarítmica 192
16.2 Transformación angular 194
16.3 Transformación radical 197
17. Pruebas estadísticas para comparación de medias 201
17.1 Consideraciones generales 202
17.2 Las pruebas estadísticas 203
17.2.1 La prueba F 204
17.2.1.1 Contrastes ortogonales 205
17.2.2 La prueba t de Student 210
17.2.3 La prueba de Student – Newman – Keuls 211
17.2.4 La prueba de Tukey 212
17.2.5 La prueba de Scheffé 212
17.2.6 La prueba de Duncan 213
17.2.7 La prueba de Dunnett 214
17.2.8 La elección de la prueba adecuada 214
18. Pruebas estadísticas no paramétricas 221
18.1 Situaciones que demandan análisis no paramétrico 221
18.2 Prueba de Wilcoxon para diferencias entre pares ordenadas 222
18.3 Prueba de Friedman 224
18.4 Prueba de Mann & Whitney 226
18.5 Prueba de Kruskal & Wallis 227
18.6 Coeficiente de Spearman para correlación entre ordenaciones 232
Bibliografía 237
Apéndice 1: tablas estadísticas 239
Apéndice 2: Respuestas a los ejercicios propuestos 253
Índice analítico 279

Prefacio

Después de un período de nueve años trabajando en investigación agronómica, nos encontramos súbitamente frente a la experimentación animal. Había una sutil diferencia a ser considerada: nuestras unidades experimentales se movían y, paralelamente, presentaban comportamientos que exigían mayor atención en la planificación de ensayos. El movimiento de los animales hace que ellos se encuentren frecuentemente con factores que modifican sus respuestas y, por lo tanto, la variación individual encontrada es mayor, cuando se compara a la observada entre parcelas en la experimentación agrícola.

Poco énfasis se ha dado a la comprobación matemática, que de cierta manera ahuyenta a los investigadores menos intrépidos en dicha área. Sin embargo, el texto privilegia la construcción de un raciocinio lógico y deductivo, fundamental para el investigador. Él aprende a conocer mejor la variable que irá a estudiar y a identificar las posibles fuentes de variación que pueden influenciarla, bajo las condiciones de muestreo y de infraestructura disponibles para el ensayo. La situación de la Estadística, como ciencia y como instrumento de apoyo, es revelada en el Capítulo 1, donde los principios que conducirán nuestras investigaciones son también definidos. La naturaleza de la respuesta estudiada, cuando es reconocida y evaluada, puede anticipar la estrategia de análisis de los datos obtenidos (Capítulo 2). Las nociones básicas de estadística utilizadas para caracterizar esa respuesta se presentan concisamente en los Capítulos 3 y 4. Ese conocimiento ante respuestas cuantitativas, la planificación del ensayo es discutido y definido dependiendo de los factores circunstanciales que puedan intervenir durante la experimentación, generando los diseños experimentales frecuentemente utilizados en nuestra área (Capítulos 5 a 11). Las respuestas de carácter cualitativo son tratadas en el Capítulo 12.

Nociones básicas de modelos matemáticos y sus aplicaciones están incluidas en el estudio de asociación de respuestas que expresan, o no, dependencia biológica entre ellas (Capítulos 13 y 14). La capacidad de algunas respuestas animales de ser evaluadas continuamente hace del Capítulo 15 una sección casi exclusiva para la experimentación animal.

No siempre las respuestas que se obtienen alcanzan las condiciones exigidas para un análisis estadístico inmediato. Estas situaciones, no tan frecuentes, son abordadas en el Capítulo 16 donde aprenderemos a reconocerlas y analizarlas.

En los dos últimos capítulos (17 y 18), se presentan y discuten las pruebas estadísticas más frecuentes, paramétricas y no paramétricas, para que el investigador

pueda evaluar, dentro de sus objetivos, la mejor manera de comparar las medias obtenidas en sus ensayos.

Los ejercicios fueron ubicados al final de cada capítulo, con el objetivo de permitir la construcción paulatina del juicio crítico del investigador y de ampliar la casuística hasta entonces presentada.

Finalmente, el trabajo presenta dos apéndices, el primero ofrece una serie de tablas estadísticas que completan las ya insertas en el texto; el segundo, entrega las respuestas a los ejercicios que encontramos en cada capítulo.

La secuencia de los capítulos fue dictada a lo largo de varios años en la enseñanza en la asignatura Planificación y Análisis de Experimentos, en el Departamento de Zootecnia de la Universidad Federal de Minas Gerais, Brasil. En nivel de postgrado, la disciplina buscó atender los intereses de profesionales en las áreas de Biología, Fisiología, Medicina, Morfología, Parasitología, Veterinaria y Zootecnia, de las cuales, parte de la casuística coleccionada consta el presente texto. La literatura disponible presenta incontables libros calificados, pero con enfoque en la experimentación agrícola. Intentamos en este trabajo contribuir con los investigadores que utilizan animales en sus ensayos, orientándolos en cuanto a las exigencias y particularidades de este tipo de experimentación y, consecuentemente habilitándoles a la planificación de sus investigaciones y al posterior análisis estadístico de los resultados obtenidos.

Esta primera edición en castellano fue posible a través de la colaboración del Ing. Zootecnista Diego Martín González, investigador del INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) en la provincia de Chubut, Argentina, que tradujó el texto y al Dr. Hugo Laborde por sus valiosas gestiones ante la Editorial de la Universidad Nacional del Sur que acogió este texto.

Por último, este libro, concretado principalmente por el constante estímulo de nuestros compañeros y alumnos, intenta presentar el universo de la experimentación animal y de los recursos estadísticos adecuados a sus peculiaridades.

Belo Horizonte, Junio de 2011
Ivan Barbosa Machado Sampaio

Introducción

1.1. La estadística en la metodología científica

A finales de la década del ´60, se introdujeron las instalaciones de hormigón para granjas de cerdos fueron preconizadas como un avance tecnológico que permitía mayor eficiencia en el control sanitario. Después de su adopción, los productores percibieron un aumento de mortalidad de lechones antes del destete.

Advertidos, los científicos en patología comprobaron que las muertes eran causadas por la deficiencia de hierro. La incorporación de hierro a la ración, aún no accesible a los lechones, no resolvió el problema. Alternativamente, la utilización de inyecciones en dosis altas y únicas de aquel elemento fue la solución propuesta para el control de la mortalidad. En los animales tratados se observó un aumento en la incidencia de enfermedades bacterianas oportunistas, como la diarrea. Se comprobó posteriormente que el exceso de hierro en la sangre beneficiaba el crecimiento de la población bacteriana patógena concurrente, comprometiendo al animal.

Dicha anemia no existía en los lechones criados libremente o con acceso restringido a la tierra. Las infecciones bacterianas eran más frecuentes debido a las condiciones sanitarias más frágiles, pero cuando ocurrían, no comprometían tan seriamente a los lechones porque el nivel de hierro, aunque menor, era suficiente para el balance metabólico. El nivel de Fe en la sangre se mantenia por el hábito frecuente de los lechones de revolver el suelo, ingiriéndolo en pequeñas cantidades.

A partir de los hechos e informaciones antes mencionados se decidió implementar un comedero de tierra en las instalaciones cementadas para comprobar si los lechones hozarían, estableciendo así niveles adecuados de Fe en la sangre que impidieran la anemia y redujeran la ocurrencia de enfermedades bacterianas oportunistas.

Esta situación ilustra la metodología científica por la cual un fenómeno puede ser estudiado y la necesidad de la intervención estadística en el transcurrir del proceso.

Inicialmente, la observación del fenómeno: la anemia de hierro pasó a manifestarse cuando los lechones dejaron de tener acceso a la tierra. La necesidad de hierro debía suplirse por aquel elemento allí existente. Con este raciocinio deductivo, el investigador pasó a formular una hipótesis: los niveles metabólicos de hierro fueron controlados por los propios animales cuando estos tuvieron acceso a la tierra.

Los resultados también sugirieron otra hipótesis: el exceso de hierro en la sangre, provisto por la dosis única inyectable, aumentó la frecuencia y la gravedad de enfermedades bacterianas.

Hasta aquí, solo la lógica y el juicio crítico fueron citados por la metodología. La comprobación de las hipótesis formuladas dependerá de métodos esencialmente estadísticos:

a) Instalación del experimento y obtención de los resultados bajo condiciones que deseamos probar.

b) Síntesis de esos datos, para caracterizar cómo ellos se manifiestan más frecuentemente.

c) Prueba de hipótesis, donde la hipótesis formulada es confrontada con hipótesis alternativas que también podrían explicar el fenómeno, si la primera es rechazada.

d) Conclusión tentativa, en bases probabilísticas, que también exige gran parte de lógica y conocimiento técnico envuelto en el fenómeno.

La representación esquemática a continuación ilustra los pasos de la metodología científica y las intervenciones de la Estadística (E) y de la Lógica (L) en el transcurrir de una investigación.

Observación del fenómeno
↓L
Raciocinio deductivo
↓L
Formulación de hipótesis
↓E
Instalación del experimento
↓E
Obtención de resultados
↓E
Síntesis de los resultados
↓E
Prueba de hipótesis
↓E+L
Conclusión tentativa

La instalación del experimento demanda el conocimiento de técnicas experimentales relativas a la selección de los animales que serán utilizados, y a la aplicación adecuada y uniforme de los tratamientos que serán probados, así como de diseños experimentales apropiados a las condiciones restrictas de muestreos y/o de instalaciones que eventualmente surgieran (Capítulos 7 a 15).

La colecta de los resultados demanda una medida de la respuesta deseada por el medio apropiado y el conocimiento de la naturaleza de esa respuesta (Capítulos 2, 3 y 16).

La síntesis de los resultados implica la aplicación de la estadística descriptiva para cada grupo experimental, definiendo sus valores más probables (medias) y sus inestabilidades (desviaciones estándares) (Capítulo 3).

La prueba de hipótesis necesita del conocimiento de inferencia estadística y cálculo de probabilidad (Capítulos 4, 5 y 6).

Finalmente, la conclusión tentativa exigirá procedimientos estadísticos que permitan diferenciar o no los grupos experimentales, comparaciones estas amparadas por el conocimiento del investigador sobre el fenómeno estudiado. Aquí, se utilizará el proceso inductivo para, a partir de un ensayo en particular, generalizar sus resultados obtenidos (Capítulos 17 y 18).

1.2. Contribución de la estadística a la experimentación

La comprobación de un resultado experimental por la repetición de ensayos semejantes es una práctica costosa que exige tiempo, animales, alimentación e instalaciones adicionales, y por lo tanto se hace económica y prácticamente inviable.

Sin embargo, si fuera posible realizarlo, los resultados no serían absolutamente iguales entre varios ensayos. Sería posible percibir que cada grupo experimental presentaría resultados contenidos en un determinado intervalo de variación. Apuntar el verdadero valor medio entre esos resultados obtenidos no es el objetivo de la Estadística. Sin embargo, a partir de solo un experimento ella es capaz de definir no solo un intervalo donde aquel verdadero valor probablemente se encuentra, sino también su probabilidad de estar allí presente. Esta probabilidad la define el propio investigador y en la experimentación animal se utiliza un porcentaje nunca inferior a 95%. Siendo así, aunque un grupo experimental sea caracterizado por un solo valor, generalmente su media, la Estadística considera el intervalo de confianza de este valor en los procedimientos finales de comparación de grupos. La generalización de resultados a partir de un único ensayo, hecha con bases probabilísticas, solo puede ser alcanzada a través de los procedimientos de inferencia estadística. Así, de este único ensayo deberán ser definidos no solo los valores medios para cada tratamiento impuesto, sino también la estimación de la variación individual media observada dentro de los tratamientos.

Esta variación individual será la pieza fundamental utilizada en las comparaciones de los valores medios obtenidos en cada tratamiento.

1.3. Principios básicos de la experimentación

Los principios que basan la experimentación animal pretenden garantizar la estimación de la variación individual sin el concurso de otros factores que puedan infiltrarse durante el manejo del experimento. Ellos son, de igual importancia:

Repetición de unidades experimentales
Sorteo de las unidades experimentales
Uniformidad del muestreo (animales experimentales)
Uniformidad en la aplicación de los tratamientos
Uniformidad del medio

1.3.1. Repetición de unidades experimentales

Solo a través de varias respuestas para un mismo tratamiento podremos estimar la respuesta media para aquel grupo experimental, y aún más importante, la variación de respuestas individuales observadas dentro de él. Para que ambas estimaciones sean confiables, el número de repeticiones debe ser adecuadamente definido por el investigador, a partir del tipo de respuesta que estará estudiando y de la confianza con que él definirá la media de cada tratamiento.

Es preciso dejar claro que en la experimentación animal, generalmente cada individuo es una repetición. Evaluaciones conjuntas de un mismo animal, por ejemplo, dos o tres alícuotas de su suero, no suministrarán dos o tres repeticiones de la respuesta estudiada, y sí dos o tres réplicas (sin valor alguno como repeticiones experimentales) cuya media definirá la respuesta única de aquel animal. Las réplicas son utilizadas cuando la medida de una respuesta está sujeta a errores de manipulación (humana o técnica), justificando que su valor medio refleja mejor aquella respuesta para un animal.

1.3.2. Sorteo de las unidades experimentales

Cuando la muestra total disponible para el ensayo fuese uniforme (condición esta no siempre posible), es imprescindible que cada animal sea asignado a un tratamiento por sorteo. Animales que se dejan capturar más fácilmente, del lote reservado al ensayo, si son colocados en un mismo grupo experimental, pueden comprometerlo confundiendo el temperamento de ellos (o alguna patología implícita) con el efecto del tratamiento.

Sabemos que las respuestas biológicas son muy variables en magnitud, dependiendo de los individuos de donde fueron obtenidas. Por lo tanto, será preciso garantizar que cada grupo experimental tenga la misma oportunidad de contener r individuos con variaciones semejantes. Esto solo será posible a través del sorteo.

1.3.3. Uniformidad del muestreo (animales experimentales)

Parece lógico que los animales participantes de un ensayo tengan las mismas características antes de que apliquemos los tratamientos que deseamos probar. Asimismo; sexo, edad y grado de sangre traducen esta condición de uniformidad. Sin embargo, no siempre logramos tales condiciones. La dificultad de seleccionar aves por sexo, la variación de edad o de peso, grado de sangre desconocida, son situaciones comunes en nuestros experimentos. Cada factor presente en el lote disponible, en este caso heterogéneo, implica un efecto adicional sobre la respuesta medida, aumentando la variación individual ya que actúan independientemente sobre cada individuo.

¿Cómo corregir esa influencia para mantener el principio de la uniformidad? El control de esos factores por la elección de un diseño adecuado podrá ser la solución. Pero para ello, debemos observar lo siguiente: cada tratamiento deberá reunir una muestra equivalente, aunque no uniforme. Por ejemplo, si en un grupo experimental hay 6 machos y 3 hembras, todos los grupos deberán ser igualmente constituidos. Este procedimiento garantizará una comparación justa de medias y permitirá la estimación de la variación individual, una vez que el efecto de factores circunstanciales (en este caso sexo) pueda ser controlado por el análisis.

1.3.4. Uniformidad en la aplicación de los tratamientos

Muchas veces parece que un tratamiento puede ser aplicado sin mayores problemas y que los animales lo recibirán por igual. Sin embargo, la experiencia dice que no siempre eso se logra debido a algún tipo de problema técnico o de medio. Por ejemplo, en un recinto con 16 lechones (donde cada uno será una repetición) un comedero reducido no proporcionará la misma facilidad de alimentación a todos los animales del recinto. Entonces, la variación individual será mayor por contener el efecto individual que normalmente existiría sumado al efecto de la jerarquía observada entre ellos. Si los tratamientos son impuestos mediante inyecciones, el grupo control necesita recibir una de igual volumen, de material inerte (suero fisiológico). Así, todos los animales sufrirán el mismo estrés, sin que haya confusión de este con el efecto de cada tratamiento.

Los diferentes anestésicos probados en un ensayo, necesitan guardar la debida proporción dosis/peso del animal, para cada individuo. Obedecer a la misma cantidad de anestésico para animales de pesos distintos dentro del mismo tratamiento aumentará la variación individual donde, por definición, el tratamiento es aplicado por unidad de peso vivo. Este principio, por lo tanto, pretende garantizar las mismas condiciones del agente causante de respuesta sobre cada animal. Muchas veces este principio es violado, como en infecciones experimentales de ratones con 90 larvas de *Schistosoma mansoni*. El cálculo de la dosis es realizado por muestreo de gotas desde una

solución con larvas en suspensión a través de su media. La variación real de la carga parasitaria comprometerá la variación individual, siendo mayor que la verdadera. Si ese principio no es obedecido, ninguna estrategia podrá corregir el error generado, pues el factor externo activo se confunde con cada tratamiento.

1.3.5. Uniformidad del medio

Como ejemplo de las dificultades encontradas para la obtención de una muestra uniforme y en la aplicación de tratamientos, pueden ocurrir problemas de medio o temporales para la instalación de un ensayo. Todas las repeticiones no caben en un mismo recinto o no están totalmente disponibles al mismo tiempo.

El problema podrá ser resuelto si todos los tratamientos probados estuviesen siempre bajo las diversas condiciones de medio o temporales. Siendo así, cada tratamiento deberá estar igualmente representado en cada recinto o en cada tiempo. De este modo, las comparaciones de sus medias serán justas ya que los mismos estuvieron bajo las mismas condiciones. A través de un diseño adecuado, los efectos de recinto o temporales podrán ser medidos y la estimación de la variación individual será obtenida sin el efecto de los mismos.

La observación de esos principios básicos definirá un ensayo más eficiente y sensible por resultar en un valor más probable de la variación individual.

Ejercicios (Respuestas en el Apéndice 2)

1.1. Para un ensayo de nutrición que probará cuatro niveles de proteína en cerdos, la muestra disponible es de 24 lechones de una misma edad, con destete en el mismo día. De esos animales 15 son machos y los demás hembras. Obedeciendo el principio de sorteo, el investigador sorteará seis animales para cada grupo experimental. Note que por este procedimiento, un tratamiento podrá eventualmente contener animales de un solo sexo, violando así el principio de uniformidad de muestreo. ¿Cuál sería entonces el procedimiento correcto para la distribución de los animales a los tratamientos?

1.2. Tres métodos de evaluación de un metabolito de hongo (aflatoxina) serán probados en productos industriales elaborados con maíz reconocidamente contaminado. Se sabe que cada producto tiene su propia y particular cantidad de aflatoxina, dependiendo de su historia y condiciones de crecimiento del hongo. ¿Cómo distribuir los productos entre los tratamientos (métodos)?

1.3. Tres concentraciones de un extracto vegetal con reconocido poder de acción sobre la proliferación celular serán probadas sobre placas de cultivo de tejido animal en metástasis. Para cada concentración serán preparadas cinco placas obtenidas de un único cultivo madre. Critique esta técnica de preparación de las muestras.

1.4. Existen dos galpones con 10 gallineros cada uno. Cinco razas de carne (solamente machos) serán probadas. Cada gallinero es una unidad experimental, de la cual será obtenido el peso medio de las aves con 38 días de edad. Tres gallineros del segundo

galpón están ocupados con la ración que consumirán las aves durante el ensayo. ¿Cómo usted distribuiría los tratamientos en los gallineros disponibles en los dos galpones, de modo que todas las razas fueran igualmente influenciadas por dichos galpones?