

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

Cálculo de tamaño muestral en ensayos clínicos
mediante simulación: aplicaciones en biomedicina

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Mario Reviriego Eíros

DIRIGIDA POR

Antonio Murciano Cespedosa

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Biológicas



TESIS DOCTORAL

**Cálculo de tamaño muestral en ensayos clínicos
mediante simulación: aplicaciones en
Biomedicina.**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Mario Reviriego Eíros

DIRECTOR

Antonio Murciano Cespedosa

Agradecimientos

A Antonio, el director de esta tesis, por su ayuda y amistad histórica.
Besos y abrazos.

A Rosa, de Secretaría, por ayudar siempre a recorrer el camino. Un beso.

A Batán y al rugby, que forjan principios y carácter.

إلى مروان على ضحكته المعديّة وروح الدعابة والصدّاقة الحميمة. عناق أبدي.

A Antonio, Luis Clemente y Álex, mis hermanos bataneros.
Os quiero.

A mis hermanos Guillermo y Pablo, por todos estos años de conversaciones y alegrías compartidas. Las penas tampoco se olvidan, pero se suavizan poco a poco.
Os quiero y lo sabéis.

A mis padres, sin cuyo apoyo y amor nunca habría llegado donde estoy.
Mamá: allá donde estés sé que hoy sonreirás y hablarás a los demás de mí con orgullo.
Te echo mucho de menos.
Papá: gracias por todo lo que siempre has hecho por mí, sin grandes alharacas, pero sin detenerte. Disfruto de cada momento a tu lado.
Os quiero desde y para siempre.

A Miguel, Mario, Marina y Elisa, mis hijos e hijas.
Es imposible no quererlos y añorarlos cada segundo.
Me hacéis sentir constantemente que todo merece la pena en esta vida si estáis en ella.
Os adoro sin cesar.

A Úrsula, el amor de mi vida.
Todo sabe mejor desde que te conozco. Espero saber corresponder a todo tu amor y entrega.
Gracias por tu inteligencia y saber, que nunca he dejado de sentir a mi alrededor.
Gracias por tu mirada y tu sonrisa, que dan alegría de existir.
Gracias por tus abrazos y tus besos, nada da más calor.
Gracias por tu eterno soporte.
Gracias por ti.
Te amo.

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	1
1. Introducción.....	2
1.1. Contexto y justificación	2
1.2. Objetivos.....	4
1.2.1. Objetivo general.....	4
1.2.2. Objetivos específicos.....	5
1.2.3. Relevancia de los objetivos	5
2. Marco Teórico	6
2.1. Marco Teórico del contexto estadístico	6
2.1.1. Fundamentos estadísticos del cálculo de tamaño muestral	6
2.1.2. Nivel de significación (α)	6
2.1.3. Potencia estadística ($1-\beta$).....	7
2.1.4. Tamaño del efecto esperado	7
2.1.5. Variabilidad de los datos	8
2.1.6. Fórmulas estadísticas para el cálculo de tamaño muestral	8
2.1.7. Limitaciones de los métodos tradicionales	9
2.1.8. Métodos alternativos para el cálculo de tamaño muestral	10
2.1.9. Aplicaciones y limitaciones de los métodos alternativos.....	13
2.2. Marco Teórico del contexto biomédico.....	14
3. Metodología.....	17
3.1. Diseño del marco metodológico	17
3.1.1. Diseño del perfil muestral.....	17
3.1.2. Enfoque cuantitativo basado en simulación	18
3.1.3. Selección de casos clínicos	18
3.1.3.1. Evaluación de la relación colesterol total/HDL como predictor de riesgo cardiovascular.....	19
3.1.3.2. PCR como marcador inflamatorio o como mediador patogénico directo en la ateromatosis carotídea	25

3.1.3.3. Evaluación de la relación $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ como Biomarcador en la Enfermedad de Alzheimer y su utilidad diferencial frente a la Demencia Frontotemporal	30
3.1.4. Diseño del proceso de simulación.....	37
3.1.5. Validación del enfoque	38
3.1.6. Consideraciones éticas y prácticas.....	38
3.1.7 Herramientas y software	39
3.2. Proceso de simulación	41
3.2.1. Elección de los parámetros de diseño.....	41
3.2.2. Generación de datos por simulación.	42
3.2.3. Evaluación de la potencia estadística	45
3.2.4. Determinación del tamaño muestral óptimo	45
3.2.5. Consideraciones prácticas.....	46
3.2.6. Flujo de los experimentos de simulación.....	46
3.2.6.1. Flujo de simulación para muestras normales bivariantes independientes.....	48
3.2.6.2. Flujo de simulación para muestras normales bivariantes pareadas.....	50
3.3.8. Código fuente en R de las rutinas de simulación.	55
3.3.8.1. Simulación para muestras normales bivariantes independientes.	55
3.3.8.2. Simulación para muestras normales bivariantes pareadas.....	61
4. Resultados	65
4.1. Aplicación en un caso teórico.	65
4.1.1. Simulación para t_y constante y correlación variable.....	67
4.1.2. Simulación para t_y variable y correlación constante.....	75
4.2. Aplicación en casos clínicos	82
4.2.1. Cálculo del tamaño muestral por simulación para la evaluación de la relación colesterol total/HDL como predictor de riesgo cardiovascular.....	82
4.2.2. Cálculo del tamaño muestral por simulación para la evaluación de la relación PCR/HDL-C como predictor de ateromatosis carotídea.	87

4.2.3. Cálculo del tamaño muestral por simulación para la evaluación de la relación $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ como Biomarcador en la Enfermedad de Alzheimer y su Utilidad Diferencial frente a la Demencia Frontotemporal..... 92

5. Discusión96
6. Conclusiones110
7. Limitaciones y recomendaciones.....112
8. Referencias bibliográficas.....113

Resumen

Esta tesis doctoral propone un enfoque metodológico basado en simulación computacional para el cálculo del tamaño muestral mínimo en ensayos clínicos, cuando los métodos tradicionales resultan inaplicables debido a la complejidad del diseño del estudio, la incertidumbre de parámetros clave o la propia formulación del parámetro clínico a estudio. El trabajo revisa los fundamentos estadísticos clásicos y presenta alternativas como los métodos basados en el valor de la información y los diseños adaptativos. El núcleo metodológico se centra en simulaciones Montecarlo, con desarrollo de algoritmos en R para evaluar la potencia estadística en diferentes escenarios. Se aplican estos métodos a casos teóricos y clínicos, destacando los cálculos para biomarcadores como la relación de un cociente matemático entre variables, PCR/HDL-C, colesterol total/HDL y $A\beta 1-42/A\beta 1-40$, en contextos de aterosclerosis y enfermedades neurodegenerativas. Los resultados muestran que el enfoque propuesto permite superar el problema actual en el cálculo optimizado del tamaño muestral cuando el parámetro a estudio se formula como un cociente de valores bioquímicos, físicos o fisiológicos, con diferentes grados de correlación supuesta, contribuyendo a la validez estadística y garantizando la eficiencia en la investigación clínica.

Abstract

This doctoral thesis proposes a methodological approach based on computer simulation for calculating the minimum sample size in clinical trials, particularly when traditional methods are inapplicable due to the complexity of the study design, uncertainty in key parameters, or the formulation of the clinical parameter under investigation. The work reviews classical statistical foundations and presents alternatives such as value-of-information methods and adaptive designs. The methodological core focuses on Montecarlo simulations, with the development of algorithms in R to evaluate statistical power across different scenarios. These methods are applied to theoretical and clinical cases, highlighting calculations for biomarkers expressed as mathematical ratios between variables, such as PCR/HDL-C, total cholesterol/HDL, and $A\beta 1-42/A\beta 1-40$, in contexts of atherosclerosis and neurodegenerative diseases. The results show that the proposed approach overcomes current challenges in optimized sample size calculation when the parameter under study is formulated as a ratio of biochemical, physical, or physiological values, with varying degrees of assumed correlation, thereby contributing to statistical validity and ensuring efficiency in clinical research.

1. Introducción

1.1. Contexto y justificación

El cálculo del tamaño muestral es un componente fundamental en el diseño de estudios en investigación clínica, ya que determina la capacidad de un estudio para detectar diferencias o efectos clínicamente relevantes con una precisión estadística adecuada (Chow, Shao, & Wang, 2008). Un tamaño muestral insuficiente puede conducir a una baja potencia estadística, aumentando el riesgo de cometer un error Tipo II (falso negativo), es decir, no detectar un efecto que realmente existe (Freiman, Chalmers, Smith, & Kuebler, 1978). Por el contrario, un tamaño muestral excesivo no solo implica un uso ineficiente de recursos, sino que también puede detectar diferencias estadísticamente significativas, pero clínicamente irrelevantes, lo que plantea dilemas éticos al exponer a más participantes de los necesarios a intervenciones experimentales (Rendón-Macías & Villasís-Keever, 2017).

La importancia del tamaño muestral radica en su impacto directo sobre la validez interna y externa de un estudio. La validez interna se refiere a la capacidad de un estudio para establecer conclusiones causales correctas, mientras que la validez externa se relaciona con la generalización de los resultados a la población objetivo (Hulley, Cummings, Browner, Grady, & Newman, 2013). Un tamaño muestral adecuado garantiza que los resultados sean precisos y replicables, lo que es esencial para la toma de decisiones clínicas basadas en evidencia (Schulz & Grimes, 2005). Por ejemplo, en ensayos clínicos aleatorizados, un cálculo riguroso del tamaño muestral es crucial para demostrar la eficacia de una intervención y justificar su implementación en la práctica clínica (Moher et al., 2010).

Sin embargo, en ciertos escenarios, el cálculo directo del tamaño muestral no es factible debido a la complejidad del diseño del estudio, la falta de información previa sobre parámetros clave (como la variabilidad de los datos o la magnitud del efecto esperado), o la naturaleza de la población bajo estudio (Hee et al., 2017). Este es el caso en investigaciones sobre enfermedades raras, donde la disponibilidad de participantes es limitada, o en estudios piloto, donde el objetivo principal es explorar la viabilidad de un diseño antes de realizar un ensayo a gran escala (Wilson, Hooper, Brown, Farrin, & Walwyn, 2021). En estos contextos, los métodos tradicionales basados en fórmulas estadísticas estándar pueden no resultar de aplicación, lo que subraya la necesidad de enfoques alternativos para determinar el tamaño muestral.

Uno de los desafíos más significativos en la investigación clínica moderna es la creciente complejidad de los diseños de estudio, que a menudo involucran múltiples variables de resultado, comparaciones entre varios grupos, o análisis de subpoblaciones específicas (Julious, 2009). Estas complejidades dificultan la aplicación de fórmulas estándar y requieren métodos más flexibles, como simulaciones por ordenador o enfoques bayesianos, que permitan incorporar la incertidumbre en los parámetros de diseño y adaptar el tamaño muestral durante la ejecución del estudio (Spiegelhalter, Abrams, & Myles, 2004). Además, en estudios observacionales retrospectivos, donde el tamaño muestral está determinado por la disponibilidad de datos históricos, el cálculo *a priori* del tamaño muestral no es posible, lo que exige un enfoque *post hoc* para evaluar la potencia estadística y la precisión de las estimaciones (Kim & Seo, 2013).

La justificación del tamaño muestral no solo es un requisito metodológico, sino también ético. Los comités de ética en investigación y las agencias reguladoras exigen que los protocolos de estudio incluyan una justificación detallada del tamaño muestral, basada en consideraciones estadísticas y clínicas (Rendón-Macías & Villasís-Keever, 2017). Un cálculo inadecuado puede comprometer la integridad científica del estudio y plantear riesgos innecesarios para los participantes, lo que subraya la importancia de utilizar métodos rigurosos y transparentes para determinar el tamaño muestral (Friedman, Furberg, & DeMets, 2010).

En síntesis, el cálculo del tamaño muestral es un paso crítico en la planificación de estudios clínicos, con implicaciones tanto metodológicas como éticas. Mientras que los métodos tradicionales basados en fórmulas estadísticas son adecuados para muchos diseños de los estudios, existen escenarios en los que estos métodos no son aplicables, lo que requiere del desarrollo y la implementación de enfoques alternativos.

Esta tesis se ha centrado en el uso de métodos de simulación para la obtención del tamaño muestral mínimo necesario, en casos donde su directo no es posible, contribuyendo así a la mejora de la validez y eficiencia de la investigación clínica.

1.2. Objetivos

El objetivo principal del presente trabajo de tesis fue el **desarrollo de un método de cálculo del tamaño muestral mínimo, basado en simulación, y aplicable a casos en los que la situación experimental no posibilita el uso de fórmulas estándar**, contribuyendo, por tanto, a la optimización del diseño de estudios clínicos y a la mejora de la validez estadística de sus resultados. Este objetivo se alinea con la necesidad de abordar situaciones en las que los métodos tradicionales de cálculo de tamaño muestral mínimo resultan insuficientes o inaplicables, como en estudios de enfermedades raras, ensayos fase I, o investigaciones con diseños complejos que involucran múltiples variables de resultado (Hee et al., 2017; Wilson et al., 2021).

1.2.1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo de investigación fue **proponer y validar un enfoque metodológico, basado en simulación, para el cálculo del tamaño muestral mínimo en estudios clínicos donde los métodos tradicionales resultan inaplicables**. Con este enfoque se buscó superar las limitaciones de las fórmulas estándar, que requieren del conocimiento de una serie de supuestos específicos sobre parámetros como la variabilidad de los datos, la magnitud del efecto esperado o las tasas de sucesos, condiciones que a menudo no están disponibles, o son inciertas, en las etapas iniciales de la investigación. Mediante el uso de simulaciones computacionales, se ha pretendido generar estimaciones sobre el tamaño muestral mínimo más precisas y adaptativas, considerando la incertidumbre inherente a los parámetros de diseño y las particularidades de cada estudio.

1.2.2. Objetivos específicos

Para alcanzar el objetivo general, se definieron los siguientes objetivos específicos:

- 1. Revisión de los fundamentos estadísticos de cálculo del tamaño muestral mínimo y sus limitaciones en contextos complejos.**
- 2. Identificación de entornos biomédicos en los que el cálculo directo del tamaño muestral mínimo no es aplicable y selección del marco específico de trabajo estadístico.**
- 3. Proposición de una metodología de trabajo, basada en simulación computacional, para la determinación del tamaño muestral mínimo en casos complejos.**
- 4. Aplicación de la metodología de simulación propuesta al cálculo del tamaño mínimo para cocientes entre variables, en algún grado correlacionadas, y validación de su eficacia.**
- 5. Puesta en práctica del modelo de simulación para el cálculo del tamaño muestral mínimo para el tres biomarcadores cociente de interés biomédico.**

1.2.3. Relevancia de los objetivos

La relevancia de estos objetivos se centró en su potencial para abordar brechas metodológicas en la investigación clínica, particularmente en contextos donde los métodos tradicionales de cálculo de tamaño muestral son insuficientes. Con el desarrollo y validación de un enfoque alternativo, esta investigación fue diseñada para contribuir a la mejora de la calidad y la eficiencia de los estudios clínicos, facilitando la generación de evidencia robusta y confiable para la toma de decisiones en salud (Moher et al., 2010).

Además, la aplicación de estos métodos en casos prácticos se planteó para demostrar su utilidad en escenarios reales, promoviendo su adopción en la comunidad científica.

En resumen, en los objetivos de esta investigación se buscó, no solo avanzar en el conocimiento metodológico sobre el cálculo de tamaño muestral, sino también proporcionar herramientas prácticas que puedan ser utilizadas por investigadores y profesionales de la salud para mejorar el diseño y la ejecución de estudios clínicos en contextos complejos y desafiantes.

2. Marco Teórico

2.1. Marco Teórico del contexto estadístico

La consecución del **Objetivo 1** de esta tesis (“Revisión de los fundamentos estadísticos de cálculo del tamaño muestral mínimo y sus limitaciones en contextos complejos”) requirió de una revisión exhaustiva sobre los métodos estadísticos tradicionales para el cálculo del tamaño mínimo de muestra, basados en el nivel de significación (α), la potencia estadística ($1-\beta$) y el tamaño del efecto esperado. El análisis de las limitaciones de la metodología tradicional existente se diseñó a fin de configurar un escenario de aplicabilidad para el abordaje de situaciones experimentales en las que no resulta posible demostrar la satisfacción de los supuestos. (Friedman et al., 2010).

2.1.1. Fundamentos estadísticos del cálculo de tamaño muestral

El cálculo del tamaño muestral es un proceso estadístico que busca determinar el número mínimo de participantes necesario para detectar un efecto o diferencia clínicamente relevante con una probabilidad predefinida (Chow, Shao, & Wang, 2008). Este cálculo se basa en principios estadísticos fundamentales, que incluyen el nivel de significación, la potencia estadística, el tamaño del efecto esperado y la variabilidad de los datos. A continuación, se describen estos conceptos clave y su relación con el diseño de estudios clínicos.

2.1.2. Nivel de significación (α)

El nivel de significación, denotado como α , representa la probabilidad de cometer un error Tipo I, es decir, rechazar la hipótesis nula cuando esta es verdadera (Freiman et al., 1978). En la mayoría de los estudios clínicos, se establece un valor de $\alpha = 0.05$, lo que implica un riesgo del 5% de concluir que existe un efecto cuando en realidad no lo hay (Moher et al., 2010). Este umbral es arbitrario, pero ampliamente aceptado en la comunidad científica como un equilibrio entre la sensibilidad y la especificidad de las pruebas estadísticas (Altman, 1991). Un nivel de significación más estricto (por ejemplo, $\alpha = 0.01$) reduce el riesgo de falsos

positivos, pero requiere de un tamaño muestral mayor para mantener la potencia estadística (Lachin, 1981).

2.1.3. Potencia estadística (1- β)

La potencia estadística, definida como $1-\beta$, es la probabilidad de detectar un efecto verdadero de cierta magnitud, es decir, rechazar correctamente la hipótesis nula cuando esta es falsa (Cohen, 1988). Una potencia del 80% ($\beta = 0.20$) es comúnmente aceptada en investigación clínica, aunque en algunos contextos se prefiere una potencia del 90% para aumentar la robustez de los hallazgos (Schulz & Grimes, 2005).

En lógica, una potencia insuficiente aumenta el riesgo de cometer un error Tipo II (falso negativo), lo que podría llevar a conclusiones erróneas sobre la ineficacia de una intervención cuando en realidad existe un efecto (Freiman et al., 1978). La potencia estadística está directamente relacionada con el tamaño del efecto esperado y con el tamaño de la muestra de modo que, para detectar efectos más pequeños o aumentar la potencia, se requiere de un mayor número de individuos en el estudio (Julious, 2009).

2.1.4. Tamaño del efecto esperado

El tamaño del efecto es una medida cuantitativa de la magnitud de la diferencia o asociación que se espera detectar en el estudio (Cohen, 1988). En estudios comparativos, puede expresarse como una diferencia de medias, un riesgo relativo, una *odds ratio* u otras medidas, dependiendo del tipo de variable de resultado (Chow et al., 2008).

Resulta muy necesario observar que la definición del tamaño del efecto esperado ha de basarse en consideraciones clínicas y no solo estadísticas, ya que diferencias estadísticamente significativas podrían no tener relevancia clínica (Leyva De Los Rios, 2021). Por ejemplo, en un ensayo clínico, el tamaño del efecto podría corresponder a la reducción mínima en la tasa de mortalidad que se considera clínicamente importante (Friedman et al., 2010).

A nivel general, cuanto menor sea el tamaño del efecto que se espera detectar, mayor será el tamaño muestral necesario para alcanzar la potencia estadística deseada (Julious, 2009).

2.1.5. Variabilidad de los datos

La variabilidad de los datos, medida habitualmente mediante la desviación estándar en variables cuantitativas, o la proporción esperada en variables categóricas, es un factor crítico en el cálculo del tamaño muestral (Altman, 1991). Una mayor variabilidad en la población requiere de un tamaño muestral mayor para distinguir el efecto de la dispersión (Lachin, 1981). Como ejemplo, en un estudio que compara dos medias, la fórmula para el tamaño muestral incluye la desviación estándar de la variable de salida, que refleja la dispersión de los datos alrededor de su media. En ausencia de datos previos, los investigadores pueden recurrir a estudios piloto o revisiones de la literatura para estimar la variabilidad esperada (Rendón-Macías & Villasís-Keever, 2017).

2.1.6. Fórmulas estadísticas para el cálculo de tamaño muestral

Las fórmulas utilizadas para calcular el tamaño muestral mínimo varían según el diseño del estudio y el tipo de variable de resultado.

A continuación, se presentan algunos ejemplos comunes:

1. Comparación de dos medias:

Para comparar las medias de dos grupos independientes, la fórmula básica es:

$$n = \frac{(z_{\alpha/2} + z_{\beta})^2 \cdot \sigma^2}{d^2}$$

Donde:

- $z_{\alpha/2}$ y z_{β} son los valores críticos de la distribución normal para los niveles de significación y potencia deseados.
- σ^2 es la varianza de la variable de resultado.
- d es la diferencia mínima clínicamente importante que se desea detectar.

2. Comparación de dos proporciones:

Para comparar dos proporciones, la fórmula es:

$$n = \frac{(z_{\alpha/2} + z_{\beta})^2 \cdot [p_1(1 - p_1) + p_2(1 - p_2)]}{(p_1 - p_2)^2}$$

Donde p_1 y p_2 son las proporciones esperadas en cada grupo.

3. Estimación de una media o proporción:

Para estimar una media con un margen de error máximo (E), la fórmula es:

$$n = \frac{z_{\alpha/2}^2 \cdot \sigma^2}{E^2}$$

Para una proporción, se utiliza:

$$n = \frac{z_{\alpha/2}^2 \cdot p(1 - p)}{E^2}$$

Donde p es la proporción esperada.

2.1.7. Limitaciones de los métodos tradicionales

Aunque las fórmulas anteriores son ampliamente utilizadas, presentan varias limitaciones.

En primer lugar, dependen de supuestos que pueden no cumplirse en la práctica, como la normalidad de los datos o la homogeneidad de las varianzas (Lachin, 1981).

En segundo lugar, requieren de estimaciones precisas de parámetros como la desviación típica o las proporciones esperadas, que a menudo se basan en datos preliminares o literatura previa, introduciendo incertidumbre en el cálculo (Julious, 2009).

Finalmente, estos métodos no son aplicables en diseños complejos, como estudios de no inferioridad, equivalencia o con múltiples variables de resultado, lo que subraya la necesidad de enfoques alternativos (Cook et al., 2019).

En resumen, los fundamentos estadísticos del cálculo de tamaño muestral se basan en principios bien establecidos, pero su aplicación práctica está sujeta a limitaciones que deben ser consideradas en el diseño de estudios clínicos.

La comprensión de estos conceptos es esencial para garantizar que los estudios tengan la potencia estadística necesaria para detectar efectos clínicamente relevantes, al tiempo que se optimizan los recursos y se minimizan los riesgos para los participantes.

2.1.8. Métodos alternativos para el cálculo de tamaño muestral

En situaciones donde los métodos tradicionales de cálculo de tamaño muestral no son aplicables debido a la complejidad del diseño del estudio, la falta de información previa o la naturaleza de la población bajo investigación, es necesario recurrir a aproximaciones alternativas.

Estos métodos buscan superar las limitaciones de las fórmulas estándar, proporcionando herramientas más flexibles y adaptativas para determinar el tamaño muestral necesario. A continuación, se describen los principales enfoques alternativos.

Enfoque basado en la precisión de la estimación

Este enfoque se centra en garantizar que las estimaciones de los parámetros de interés tengan un margen de error aceptable, en lugar de basarse en la potencia para detectar una diferencia específica (Cook et al., 2019). En lugar de fijar un nivel de significación y un poder estadístico, el investigador define la precisión deseada, como el ancho máximo del intervalo de confianza (IC) para la estimación del efecto. Por ejemplo, en un estudio piloto, el objetivo podría ser estimar la tasa de respuesta con un IC del 95% y un margen de error de $\pm 5\%$. La fórmula para calcular el tamaño muestral en este enfoque es:

$$n = \left(\frac{Z_{1-\alpha/2} \cdot \sigma}{E} \right)^2$$

Donde E es el margen de error máximo aceptable. Este método es particularmente útil en estudios exploratorios o de validación diagnóstica, donde el objetivo principal es obtener estimaciones precisas de parámetros como la prevalencia o la sensibilidad de una prueba (Wilson et al., 2021).

Métodos bayesianos y concepto de "aseguramiento"

Los métodos bayesianos ofrecen un marco flexible para el cálculo de tamaño muestral, incorporando información previa y permitiendo la actualización de las estimaciones a medida que se obtienen nuevos datos (Spiegelhalter et al., 2004). Un concepto clave en este enfoque es el "aseguramiento bayesiano" (*assurance*), que representa la probabilidad incondicional de que el estudio resulte positivo, considerando la incertidumbre sobre el efecto verdadero (O'Hagan & Stevens, 2001).

A diferencia de la potencia estadística tradicional, que se basa en un valor fijo del efecto, el "aseguramiento bayesiano" integra una distribución previa de posibles valores del efecto, proporcionando una estimación más robusta del tamaño muestral necesario (Berry et al., 2010).

Este enfoque es especialmente útil en estudios con alta incertidumbre sobre los parámetros de diseño, como en enfermedades raras o ensayos fase I (Braun, 2014).

Enfoque de "valor de la información" (VOI)

El enfoque de "valor de la información" (*VOI*, por sus siglas en inglés) se basa en la teoría de la decisión y busca maximizar el beneficio neto esperado de la investigación, equilibrando el coste de incorporar más participantes con el valor de la información obtenida (Claxton et al., 2015).

En este enfoque se define una función de utilidad que incorpora tanto los costes económicos, como los beneficios clínicos de reducir la incertidumbre sobre una decisión (por ejemplo, aprobar o no un tratamiento).

El tamaño muestral óptimo es aquel que maximiza el beneficio neto esperado, es decir, el punto donde el valor marginal de la información adicional iguala su coste (Willan & Pinto, 2005).

Este enfoque ha sido utilizado en evaluaciones de tecnologías sanitarias para justificar la realización de estudios adicionales y determinar su tamaño óptimo (Claxton et al., 2015).

Diseños adaptativos y re-estimación del tamaño muestral

Los diseños adaptativos permiten ajustar el tamaño muestral durante la ejecución del estudio basándose en los datos acumulados a lo largo de él (Tanaka et al., 2023). Una técnica común es la re-estimación del tamaño muestral (SSR, por sus siglas en inglés), que consiste en realizar un análisis intermedio para reevaluar los supuestos iniciales (como la variabilidad de los datos o la tasa de eventos) y ajustar el tamaño muestral en consecuencia.

Este enfoque es particularmente útil en estudios donde los parámetros de diseño son inciertos, como en ensayos fase II/III o en enfermedades con alta variabilidad en la respuesta al tratamiento (Mehta & Pocock, 2011).

Los diseños adaptativos no solo aumentan la eficiencia del estudio, sino que también reducen el riesgo de infra dimensionar o sobre dimensionar la muestra (Tanaka et al., 2023).

Simulaciones computacionales (Método de Montecarlo)

Las simulaciones por ordenador, como el método de Montecarlo, son una herramienta poderosa para el cálculo del tamaño muestral en diseños complejos donde no existen fórmulas analíticas directas (Wilson et al., 2021).

Este enfoque implica generar datos sintéticos bajo diferentes escenarios de efecto y variabilidad, y evaluar la potencia estadística o la precisión de las estimaciones para cada tamaño muestral posible (Burton et al., 2006). Como ejemplo, en un estudio con múltiples variables de resultado o análisis no paramétricos, las simulaciones permiten estimar el tamaño muestral necesario para alcanzar la potencia deseada, considerando todas las complejidades del diseño (Wilson et al., 2021).

Este método es especialmente útil en estudios genéticos, donde se realizan miles de comparaciones simultáneas, o en ensayos con diseños jerárquicos o de conglomerados (Burton et al., 2006) y obedece a una serie de principios básicos.

Se basa en la ley de los grandes números, que garantiza la convergencia de los promedios muestrales a sus valores esperados, conforme el número de simulaciones tiende al infinito y el esquema de su aplicación pasa por la definición de un modelo probabilístico que represente el fenómeno bajo estudio; la generación de una colección de datos aleatorios a partir de dicho modelo y el cálculo de los estadísticos de interés para cada muestra simulada. A partir de esta etapa, comienza un proceso de iteración un número suficientemente grande de veces que permite, finalmente, estimar los parámetros poblacionales o las características distribucionales necesarias, a partir de los resultados agregados y que se adapta a diversas situaciones, desde la estimación de probabilidades en espacios de alta dimensión hasta el ajuste de modelos bayesianos complejos.

Presenta una serie de variantes metodológicas, como los Algoritmos de Montecarlo por cadena de Markov (MCMC), capaces de extender el método clásico al muestreo de distribuciones complejas, particularmente en contextos bayesianos donde la distribución posterior no tiene una forma cerrada, contando entre sus algoritmos con el *Metropolis-Hastings*, el *Gibbs sampling* o el *Hamiltonian Montecarlo* (utilizado en plataformas como Stan), que permiten explorar espacios paramétricos de alta dimensión mediante cadenas que convergen a distribuciones objetivo (Brooks et al., 2011). El *Bootstrapping y resampling*, si bien no es un método Montecarlo en sentido estricto, comparte su filosofía al ser capaz de generar distribuciones empíricas mediante remuestreo aleatorio, lo cual permite estimar errores estándar e intervalos de confianza (Efron & Hastie, 2016).

2.1.9. Aplicaciones y limitaciones de los métodos alternativos

Los métodos alternativos han demostrado su utilidad en una amplia gama de contextos, desde estudios de enfermedades raras, hasta ensayos clínicos adaptativos (Hee et al., 2017).

Sin embargo, su implementación requiere un mayor nivel de experiencia estadística y computacional, así como una justificación rigurosa de los supuestos utilizados (Spiegelhalter et al., 2004).

Además, algunos enfoques, como los métodos bayesianos, pueden ser menos familiares para los comités de ética y las agencias reguladoras, lo que puede dificultar su aceptación en la práctica clínica (Berry et al., 2010).

A pesar de estas limitaciones, los métodos alternativos representan una herramienta valiosa para mejorar la validez y eficiencia de los estudios clínicos en contextos complejos y desafiantes.

2.2. Marco Teórico del contexto biomédico

Para el cumplimiento del **Objetivo 2** (“Identificación de entornos biomédicos en los que el cálculo directo del tamaño muestral mínimo no es aplicable y selección del marco específico de trabajo estadístico”), se realizó un análisis bibliográfico centrado en la identificación de entornos biomédicos en los que los métodos estadísticos tradicionales no pudieran ser utilizados de manera efectiva (Hee et al., 2017) requiriéndose, por tanto, de un nuevo abordaje para el cálculo estadístico del tamaño muestral mínimo.

Se realizó una exploración exhaustiva de la actual insuficiencia metodológica, particularmente en estudios destinados al conocimiento de enfermedades raras, en ensayos en fase I, en estudios piloto y análisis retrospectivos, así como en diseños complejos (estudios de no inferioridad o equivalencia) (Cook et al., 2019) que requieren, igualmente, de enfoques alternativos para la determinación del tamaño.

Para validar la utilidad del enfoque propuesto, se evaluó una serie de casos clínicos representativos capaces de ilustrar aquellas situaciones donde el cálculo directo del tamaño muestral mínimo no resulta factible.

En una primera determinación se fijó una relación de casos compatibles con el marco de aplicación compleja para el cálculo del tamaño muestral óptimo que, de un modo justificado, se detalla a continuación:

1. **Estudios de enfermedades raras:** En este tipo de investigaciones, la disponibilidad de participantes es limitada, lo que dificulta el uso de métodos tradicionales basados en fórmulas estadísticas (Hee et al., 2017).

En estos casos, resulta indicado el uso de simulaciones para determinar el tamaño muestral necesario, considerando que presentan una baja prevalencia y una alta variabilidad en la respuesta al tratamiento.

2. **Ensayos fase I:** En este contexto, el objetivo principal es la evaluación de la seguridad y la dosis máxima tolerada de un nuevo fármaco, sin entrar en consideraciones sobre su eficacia (Braun, 2014).

En este sentido, resulta conveniente la aplicación de métodos bayesianos adaptativos para determinar el tamaño muestral mínimo, debido a que el número de participantes suele ser pequeño y la incertidumbre sobre los parámetros de diseño es alta.

3. **Estudios piloto:** Los estudios piloto tienen como objetivo explorar la viabilidad de un diseño antes de realizar un ensayo a gran escala (Arain et al., 2010).

En estas condiciones se estima apropiado un enfoque basado en la precisión de la estimación para calcular el tamaño muestral mínimo por tener como objetivo la evaluación de la factibilidad de una nueva intervención.

4. **Análisis retrospectivos:** En esta situación, el tamaño muestral está determinado por la disponibilidad de datos históricos, lo que limita la capacidad de realizar un cálculo *a priori* (Kim & Seo, 2013).

Con esta consideración, la implementación de procesos de simulación, capaces de evaluar la potencia estadística y la precisión de las estimaciones, resulta adecuada.

5. **Factores de riesgo:** Suponen un caso especialmente relevante, debido a lo cual fueron seleccionados como caso complejo y desarrollados en profundidad en esta tesis, focalizando el contexto de estudio sobre aquellos cuyo cálculo se basa en la existencia de un cociente entre dos parámetros bioquímicos, físicos o fisiológicos, y que pudieran considerarse biomarcador de riesgo de enfermedad, de progresión de la patología o de diagnóstico diferencial entre distintas condiciones patológicas en etapas preliminares de la enfermedad en las que la discriminación, por otras vías, resulta complicada.

Así, esta revisión exhaustiva permitió la selección de un marco específico de trabajo estadístico para esta tesis, el **cálculo del tamaño mínimo de muestra**, particularizándolo sobre todas aquellas situaciones experimentales en las que el **parámetro biomédico de interés** es

calculado como el **cociente entre dos variables** bioquímicas o fisiológicas a estudio, con **diferentes grados de correlación supuesta**, y que pudiera ser **utilizado como marcador biológico de enfermedad**, con capacidad informativa sobre el pronóstico del riesgo asociado a la enfermedad, como factor de seguimiento de su progreso o como factor discriminatorio en estadios preliminares en los que la identificación de una patología concreta resulta difícilmente distinguible de otra.

3. Metodología

Para la consecución del **Objetivo 3** de este trabajo de tesis (“Proposición de una metodología de trabajo basada en simulación computacional, para la determinación del tamaño muestral mínimo en casos complejos”), se desarrolló todo el marco metodológico muestral, abordando la configuración de los elementos de un diseño.

3.1. Diseño del marco metodológico

3.1.1. Diseño del perfil muestral

El diseño del estudio es un componente crítico que determina la validez, eficiencia y viabilidad de la investigación. En este trabajo, se optó por la adopción de un enfoque cuantitativo basado en simulación para abordar el cálculo del tamaño muestral mínimo en el contexto de difícil aplicabilidad de las herramientas tradicionales. Este enfoque permite modelizar escenarios complejos y evaluar el impacto de diferentes parámetros en el tamaño muestral necesario, proporcionando una base sólida para la toma de decisiones en el diseño de estudios clínicos (Wilson et al., 2021).

En este sentido, el estudio estadístico se planteó abordando dos posibles variantes de diseño experimental, acorde a la realidad de las necesidades experimentales en investigación clínica.

De este modo, en la primera de las variantes del diseño se planteó que el estudio involucrara dos grupos muestrales independientes, siendo uno de ellos el grupo control y el otro, el grupo “tratamiento” (sobre el que realizar la simulación de la aplicación del principio activo en cuestión, con finalidad terapéutica sobre la variable denominador) para, sobre cada uno de ellos realizar mediciones del valor del cociente entre las variables numerador (X) y denominador (Y) con diferentes grados de correlación supuesta, una vez iniciado el proceso de simulación de sus valores posibles, a diferentes tamaños muestrales (n).

En la segunda de las variantes del diseño, se consideró que el estudio competiera a un grupo “tratamiento”, tomando la forma de un diseño pareado (o relacionado) clásico, en el que ambos grupos experimentales están constituidos por individuos a los que se les aplica el principio activo en cuestión y que se conforman a dos escalas temporales distintas, antes y

después de la aplicación del tratamiento. El procedimiento subsiguiente mantuvo la estructura de mediciones sobre el valor del cociente entre ambas variables, numerador (X) y denominador (Y), una vez iniciado el proceso de simulación de los valores posibles, a distintos tamaños muestrales.

3.1.2. Enfoque cuantitativo basado en simulación

El enfoque cuantitativo basado en simulación se fundamenta en la generación de datos que replican las condiciones del estudio real, permitiendo evaluar el desempeño estadístico bajo diferentes escenarios (Burton et al., 2006).

Este método fue elegido por resultar particularmente útil en contextos donde los supuestos de los métodos tradicionales no se cumplen, como el estudio de variables de resultado complejas (Chow & Chang, 2008), como el cociente objeto de esta tesis.

En paralelo, su elección se sustentó en la capacidad de las simulaciones para incorporar la incertidumbre en los parámetros de diseño, como la variabilidad de los datos o la magnitud del efecto esperado, y evaluar cómo esta incertidumbre afecta el tamaño muestral necesario. En concreto, la simulación de Montecarlo, se considera una herramienta de utilidad en la estimación del tamaño mínimo necesario bajo diferentes escenarios de variabilidad y efecto (Wilson et al., 2021).

3.1.3. Selección de casos clínicos

Una vez concretado con anterioridad el objeto de estudio estadístico, particularizado en el estudio del cociente entre dos variables bioquímicas o fisiológicas a estudio, con potencial perfil biomarcador sobre el pronóstico del riesgo asociado a la enfermedad, sobre su progreso o como factor discriminatorio, se escogieron los cocientes “Colesterol total/HDL” y PCR/HDL” en el contexto del estudio del riesgo cardiovascular, y el cociente “A β 1-42/A β 1-40” en el de la identificación y progreso de la enfermedad de Alzheimer, cuya pertinencia se justifica, pormenorizadamente, a continuación.

3.1.3.1. Evaluación de la relación colesterol total/HDL como predictor de riesgo cardiovascular.

La aterosclerosis coronaria, o enfermedad arterial coronaria (EAC), es la manifestación clínica más frecuente de la aterosclerosis, un proceso inflamatorio y degenerativo caracterizado por la acumulación de lípidos y células inflamatorias en la túnica íntima arterial (Libby et al., 2019). Se trata, por tanto, de una enfermedad inflamatoria crónica que se inicia con disfunción endotelial, promovida por factores como el estrés oxidativo, la hipercolesterolemia y la hipertensión arterial, y que constituye una de las principales causas de morbimortalidad cardiovascular a nivel mundial.

El perfil lipídico plasmático ha sido identificado como un elemento determinante del riesgo aterosclerótico, con importantes implicaciones diagnósticas, pronósticas y terapéuticas. Dentro de este perfil, el colesterol total, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las lipoproteínas de alta densidad (HDL) desempeñan funciones bioquímicas y fisiológicas distintivas que pueden promover o prevenir la progresión aterosclerótica.

El colesterol es una molécula esteroidea esencial para la síntesis de membranas celulares, hormonas esteroideas y ácidos biliares, que precisa ser transportado en plasma por lipoproteínas, complejos macromoleculares compuestos por lípidos y apolipoproteínas.

El complejo de moléculas lipoproteicas implicadas en la aterosclerosis está integrado por:

- **Lipoproteínas de baja densidad (LDL):** transportan colesterol desde el hígado hacia los tejidos periféricos. La apolipoproteína B-100 (apoB) es su componente proteico principal. La modificación oxidativa de las LDL promueve la formación de células espumosas y placas ateroscleróticas (Wang et al., 2023).
- **Lipoproteínas de alta densidad (HDL):** median el transporte reverso de colesterol desde los tejidos hacia el hígado, facilitando su excreción. La apoA-I, principal apolipoproteína de HDL, posee propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Rader & Hovingh, 2014).

El equilibrio entre ambas lipoproteínas resulta determinante en la homeostasis del colesterol.

Las LDL, al depositarse en la túnica íntima arterial y estar expuestas a oxidación, inducen la expresión de moléculas de adhesión endotelial, atrayendo monocitos que se infiltran en la túnica íntima arterial e inducen su diferenciación en macrófagos activados, capaces de captar y fagocitar las LDL oxidadas y generando células espumosas que darán lugar a la estría grasa, la etapa inicial de la aterosclerosis (Libby, 2019). Este proceso, junto con la proliferación de células musculares lisas y la síntesis de matriz extracelular, conforman la placa aterosclerótica (Libby, 2021).

En contraste, las HDL inhiben múltiples pasos de la aterogénesis a través de la estimulación del eflujo de colesterol desde las células espumosas hacia el hígado, en un proceso mediado por transportadores como ABCA1 y ABCG1. De igual modo, estimulan mecanismos antiinflamatorios por inhibición de citoquinas y por reducción de la expresión de moléculas de adhesión endotelial. En paralelo desarrollan su acción antioxidante, vía paraoxonasa-1 (PON1) y apolipoproteína A-I, que neutralizan los radicales libres y reducen la oxidación por LDL, inhibiendo así la formación de placas ateroscleróticas (Besler et al., 2011) en combinación con la inhibición de la actividad plaquetaria y la promoción de la actividad fibrinolítica (Nofer et al., 2002) lo que, unido a sus actividades antitrombóticas y vasoprotectoras (Rohatgi et al., 2014) mediante estimulación de la síntesis de óxido nítrico por la enzima eNOS, resulta en un proceso global clave para la regresión de la placa (Barter et al., 2017).

Consideraciones Terapéuticas Basadas en el Perfil Lipídico

El tratamiento farmacológico para reducir el riesgo de EAC se ha centrado principalmente en la reducción de LDL mediante estatinas o inhibidores de PCSK9 y la evidencia demuestra que una reducción en los niveles de LDL-C de forma intensa y sostenida, es altamente efectiva en la prevención de eventos cardiovasculares (Mach et al., 2020).

Un metaanálisis de Ference et al. (2017) sobre más de 300.000 participantes mostró que la reducción sostenida de LDL está asociada a una disminución proporcional del riesgo de eventos coronarios con independencia del método terapéutico utilizado. Asimismo, los datos del *Cholesterol Treatment Trialists' Collaboration* (2022) indican que cada reducción de 1 mmol/L en LDL-C reduce el riesgo de eventos cardiovasculares en aproximadamente un 22%.

En contraste, si bien los niveles bajos de colesterol HDL han sido consistentemente asociados con un mayor riesgo cardiovascular (Rosenson et al., 2023), los intentos por

aumentar el HDL como estrategia terapéutica no siempre se han traducido en reducción del riesgo (Barter et al., 2017). Pese a ello, un metaanálisis de Liu et al. (2021) encontró una asociación inversa entre los niveles de HDL y el riesgo de eventos coronarios, aunque esta relación se ha mostrado no lineal y dependiente de factores genéticos y metabólicos, sugiriendo que la funcionalidad del HDL es más relevante que su concentración cuantitativa (Rosenson et al., 2023).

Este panorama ha motivado un replanteamiento del papel de HDL como diana terapéutica directa, redirigiendo el foco hacia estrategias ligadas al empleo beneficioso de su perfil funcional (Rohatgi et al., 2014; Rosenson et al., 2020) en especial sobre pacientes que presentan patologías que cursan con disfunción HDL, como la diabetes o la enfermedad renal crónica (Barter et al., 2016). De hecho, un metaanálisis más reciente indica que ciertos subgrupos podrían beneficiarse de este tipo de estrategias, especialmente aquellos con disfunción del HDL basal (Lin et al., 2022).

En este sentido, el análisis de sus funciones cualitativas, en particular su capacidad de promoción sobre el transporte inverso de colesterol, sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antitrombóticas, resultan claves críticas en la prevención de la enfermedad cardiovascular (Rader & Hovingh, 2014) convirtiendo al colesterol HDL en un biomarcador inversamente asociado a la enfermedad cardiovascular aterosclerótica y, en consecuencia, resulta lógico que las estrategias terapéuticas actuales se centren en mejorar estas funciones más que en simplemente aumentar su concentración plasmática.

De entre estas estrategias emergentes, los inhibidores de la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP) aumentan los niveles de HDL mediante el bloqueo de la transferencia de ésteres de colesterol del HDL al LDL, pero su efecto sobre la funcionalidad del HDL ha sido controvertido, mostrando una modesta reducción de eventos cardiovasculares en el ensayo REVEAL (The REVEAL Collaborative Group, 2017) y evidenciándose una ausencia de mejoría sustancial sobre el eflujo de colesterol, pese al incremento de HDL (Lincoff et al., 2017) además de generar casos de fracaso terapéutico debido a falta de eficacia o a presentación de efectos adversos.

Los agonistas de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR), especialmente el PPAR- α (como el fenofibrato), consiguen un incremento en la expresión de genes relacionados con la funcionalidad del HDL pero un metaanálisis reciente, de Zhang et

al. (2023) demostró que los agonistas de PPAR mejoran el eflujo de colesterol y reducen los marcadores inflamatorios, aunque los beneficios cardiovasculares resultan modestos.

Las infusiones de apolipoproteína A-I recombinante o miméticos (como CSL112 o D-4F) han demostrado mejorar el eflujo de colesterol y la función antioxidante del HDL (Gille et al., 2018; Gille et al., 2021). CSL112, en particular, ha demostrado una rápida restauración de la funcionalidad del HDL en pacientes con infarto agudo de miocardio (AMGEN, 2021).

La regulación epigenética de genes relacionados con el HDL, incluyendo los microARNs que inhiben ABCA1, han mostrado en modelos animales que la inhibición de miR-33 aumenta la expresión de ABCA1 y mejora el reflujo de colesterol hacia el compartimento hepático (Rayner et al., 2011).

Adicionalmente, recientes avances basados en la edición génica y en estrategias vía ARN interferente, han permitido explorar terapias dirigidas a genes implicados en el metabolismo del HDL, como APOA1 y LCAT que, aún en fase experimental, podrían modificar cualitativamente el perfil de HDL (Voight et al., 2023).

Por último, las aproximaciones basadas en la modificación del estilo de vida, como la dieta mediterránea, el consumo de ácidos grasos monoinsaturados y el ejercicio aeróbico regular, han demostrado incrementos modestos, pero clínicamente significativos, en el HDL funcional (Estruch et al., 2018).

Revisión bioquímica y médica sobre el papel del cociente colesterol total/HDL en la evaluación del riesgo de aterosclerosis coronaria

La relación entre el colesterol total y la lipoproteína de alta densidad (HDL) ha emergido como un marcador integrado de riesgo aterogénico, superando incluso al colesterol LDL en la capacidad de predicción de eventos cardiovasculares y demostrando un mejor valor pronóstico que las fracciones lipídicas individuales (Millán et al., 2009).

Desde un punto de vista bioquímico, el colesterol total refleja la suma de las fracciones LDL, HDL y VLDL. Revisando el papel anteriormente descrito de las dos primeras fracciones en la fisiopatología de la enfermedad, resulta lógico pensar que un cociente elevado CT/HDL

refleja un predominio de lipoproteínas aterogénicas sobre las antiaterogénicas, marcando un perfil lipídico proinflamatorio.

Desde hace años, el cociente CT/HDL se ha vinculado con riesgo coronario en múltiples estudios poblacionales; de hecho, el Framingham Heart Study, observó que un cociente superior a 5 en hombres o a 4.5 en mujeres se asocia con un incremento sustancial del riesgo de enfermedad cardiovascular (Wilson et al., 1998).

Un metaanálisis reciente realizado por Tian et al. (2022), que incluyó más de 500,000 participantes, demostró que un cociente CT/HDL elevado se asocia significativamente con aumento del riesgo de infarto de miocardio y mortalidad cardiovascular, con una razón de riesgo (RR) ajustada de 1.67 (IC 95%: 1.45–1.93) para el tercil superior frente al inferior.

Adicionalmente el metaanálisis de Liu et al. (2023), con 42 estudios prospectivos, confirmó que el cociente CT/HDL es un predictor más robusto que el colesterol LDL en pacientes con y sin enfermedad cardiovascular previa. Estos hallazgos resaltan la utilidad del cociente como herramienta para estratificación de riesgo.

La siguiente tabla resume la relación entre diferentes rangos del cociente CT/HDL y el riesgo cardiovascular estimado:

Cociente CT/HDL Interpretación clínica Riesgo cardiovascular estimado

< 3.5	Perfil lipídico óptimo	Bajo
3.5 – 4.4	Riesgo moderado	Moderado
4.5 – 5.9	Riesgo elevado	Alto
≥ 6.0	Riesgo muy elevado	Muy alto

(Fuente: Adaptado de Liu et al., 2023)

Justificación del uso del cálculo del tamaño muestral necesario para el cociente Colesterol total/HDL

El colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL) ha sido tradicionalmente considerado un factor protector frente a la aterosclerosis coronaria. No obstante, los esfuerzos terapéuticos por elevar sus niveles no siempre han demostrado un beneficio clínico claro y la evidencia actual sugiere, como se indicaba, que el enfoque terapéutico futuro camine hacia estrategias de mejora de la funcionalidad del HDL en paralelo a las que ensayan el aumento sus niveles plasmáticos, por cualquiera de sus vías.

Con independencia de la estrategia terapéutica utilizada, el cociente colesterol total/HDL es un marcador bioquímico y clínico valioso para la evaluación del riesgo de aterosclerosis coronaria y su uso complementa, y en muchos casos supera, a los marcadores lipídicos tradicionales, por lo que la evidencia actual respalda su inclusión en las guías clínicas como parte integral del perfil de riesgo cardiovascular.

La elección del cociente Colesterol total/HDL como herramienta de cálculo del tamaño muestral adecuado en esta tesis, se sustenta en lo anteriormente expuesto y, el hecho de que su utilidad pueda variar según el sexo, la edad o la presencia de comorbilidades, no hace sino incidir en su enorme potencial predictivo sobre el riesgo cardiovascular y los consiguientes eventos aterogénicos, siempre que las nuevas investigaciones lo consideren de una forma integrada con biomarcadores inflamatorios y genéticos para mejorar la predicción personalizada del riesgo ateroesclerótico, particularmente en pacientes con factores de riesgo múltiples o en prevención secundaria, guiando decisiones terapéuticas como el inicio o el ajuste del tratamiento hipolipemiente (Grundy et al., 2019).

Adicionalmente resulta importante destacar que el cociente CT/HDL es de fácil cálculo, no requiere ayuno previo para la extracción de la muestra y está disponible en cualquier perfil lipídico básico, lo que lo hace especialmente útil en atención primaria (Bañuls et al., 2021).

Evaluación de la relación PCR/HDL-C como predictor de ateromatosis carotídea

Como se ha referenciado anteriormente, la aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por la acumulación de lípidos, células inflamatorias y tejido fibroso en la túnica íntima de las arterias, incluyendo las arterias carótidas (Libby et al., 2023). La ateromatosis carotídea, en particular, es un hallazgo clínico de gran relevancia debido a su asociación directa con accidentes cerebrovasculares isquémicos.

La patología se inicia con el ciclo aterosclerótico clásico, en el que la disfunción endotelial inducida por factores de riesgo clásicos como la hipertensión, dislipidemia y tabaquismo, genera un contexto considerado facilitador para la entrada de lipoproteínas aterogénicas a la túnica íntima arterial, donde son oxidadas y fagocitadas por macrófagos, dando lugar a células espumosas. La activación de células inmunes perpetúa el estado inflamatorio, contribuyendo a la progresión de la placa (Libby, 2021). El correlato histopatológico muestra una intensa infiltración de macrófagos y células T en placas carotídeas inestables, sugiriendo un papel central del contexto inflamatorio en la vulnerabilidad de la placa (van der Laan et al., 2019).

En este contexto, la identificación de biomarcadores inflamatorios, como la Proteína C Reactiva (PCR) ha transformado la evaluación del riesgo aterogénico, permitiendo una aproximación más integral a la prevención del riesgo (Gabay & Kushner, 2022) por su asociación con eventos cardiovasculares (Ridker, 2023)

3.1.3.2. PCR como marcador inflamatorio o como mediador patogénico directo en la ateromatosis carotídea

La PCR es una pentraxina circulante de 25 kDa, sintetizada en los hepatocitos en respuesta a señales inflamatorias como la IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Su principal función es la opsonización de partículas y la activación del sistema del complemento, vía C1q, lo que facilita la eliminación de patógenos y células necróticas (Sproston & Ashworth, 2018).

Sin embargo, se ha documentado que la PCR también participa en mecanismos proinflamatorios, incluyendo la activación del endotelio, la captación de LDL oxidadas

(oxLDL), y la inducción de citocinas proinflamatorias en macrófagos (Mendall et al., 2020). En este sentido, estudios *in vitro* han demostrado que la PCR puede unirse a fosfolípida en LDL oxidadas (oxLDL), promoviendo la captación por macrófagos y la formación de células espumosas en un modelo que potenciaría la polarización M1 proinflamatoria, aumentando la producción de citoquinas proaterogénicas como TNF- α y IL-1 β (Singh et al., 2020).

Diversos estudios han demostrado una asociación significativa entre niveles elevados de PCR y la presencia de placas carotídeas, así como sobre su volumen y composición (Rai et al., 2022). Un metaanálisis que incluyó más de 15.000 sujetos demostró que los niveles elevados de PCR de alta sensibilidad (PCR-hs) se asocian con un mayor riesgo de progresión de la aterosclerosis carotídea (Ridker et al., 2023) y eventos cerebrovasculares (Zhang et al., 2023). Además, la PCR se ha relacionado con características de vulnerabilidad de la placa, como el contenido lipídico central y la delgadez de la cápsula fibrosa (Wu et al., 2022).

Sin embargo, esta asociación no implica causalidad directa. Con el objetivo de dilucidar la naturaleza de la relación entre los niveles de la PCR y el contexto aterosclerótico, se revisaron varios metaanálisis.

En concreto, el metaanálisis de Zeng et al. (2023), que incluyó 26 estudios con más de 40.000 pacientes, demostró que niveles elevados de PCR se asocian con mayor grosor de la túnica íntima-media carotídea (GIM) y mayor prevalencia de placas inestables. Y uno también reciente, el de Li et al. (2023), que incluyó más de 300,000 participantes, confirmó que niveles elevados de PCR se asocian con un riesgo significativamente mayor de infarto de miocardio y muerte cardiovascular, independientemente de los factores de riesgo tradicionales.

Otro metaanálisis, el de Wang et al. (2022) evidenció que la PCR de alta sensibilidad (PCR-hs) es un predictor más robusto, y con mayor capacidad predictiva sobre eventos cardiovasculares mayores que otros marcadores inflamatorios, consolidando su valor clínico en la estratificación de riesgo. Ya en un metaanálisis anterior, el mismo grupo de Wang et al. (2021) había evaluado específicamente la estenosis carotídea, encontrándose que la PCR era capaz de predecir la progresión de la estenosis y del riesgo de accidente cerebrovascular isquémico.

Por su perfil diagnóstico y pronóstico la PCR-hs se utiliza en la práctica clínica como biomarcador de estratificación del riesgo cardiovascular en pacientes aparentemente

sanos. La American Heart Association clasifica el riesgo basado en PCR-hs como bajo (<1 mg/L), moderado (1-3 mg/L) y alto (>3 mg/L) (Pearson et al., 2003). Esta clasificación ha sido validada en múltiples cohortes epidemiológicas.

Pese a ello, las evidencias sobre un efecto causal directo permanecen contradictorias y poco concluyentes, limitando la posibilidad de utilizarla como diana terapéutica específica sin considerar otros factores inflamatorios interrelacionados.

Revisión sobre el papel del cociente PCR/HDL en la evaluación del riesgo de ateromatosis carotídea

Como se ha presentado, la ateromatosis carotídea es una expresión local de la aterosclerosis sistémica caracterizada por el engrosamiento de la íntima y la formación de placas ateromatosas en las arterias carótidas, un proceso íntimamente relacionado con fenómenos inflamatorios, disfunción endotelial, y alteraciones lipídicas (Ross, 1999).

La identificación precoz de sujetos en riesgo de ateromatosis carotídea es fundamental para la prevención de eventos isquémicos relacionados con fenómenos inflamatorios, disfunción endotelial y alteraciones del perfil lipídico, siendo la detección de biomarcadores compuestos, aquellos que relacionan dos variables de interés en el contexto de estudio, una herramienta en valor creciente.

El cociente entre la PCR, como marcador inflamatorio, y el HDL, conocido por su papel como protector vascular, fue defendido hace años como un mejor biomarcador predictivo del riesgo cardiovascular que cada marcador por separado (Kannel et al., 2008).

Como se indicaba, la elevación de los niveles de la PCR refleja una activación sistémica del sistema inmunoinflamatorio, que participa en la disfunción endotelial, oxidación de LDL y activación de células endoteliales (Ridker, 2016) mientras que los niveles de colesterol HDL parecen resaltar el contexto antiinflamatorio, antioxidante y antitrombótico cuando la variable no se encuentra en niveles bajos.

Por este motivo, el cociente HDL-C parece integrar tanto información sobre inflamación sistémica como la potencial capacidad del organismo para la protección vascular. Un valor elevado refleja simultáneamente un estado inflamatorio activo y una baja defensa

endotelial, lo que podría explicar su mejor capacidad predictiva en comparación con ambos parámetros de forma aislada (Nambi et al., 2009).

La evidencia clínica ha evaluado la relación entre este cociente y la progresión de la aterosclerosis carotídea, mediante el grosor de la túnica íntima-media (IMT) o mediante la detección de presencia de placas demostrándose, en un estudio prospectivo con más de 2.000 sujetos, que el cociente PCR/HDL-C se asociaba significativamente con el incremento del IMT carotídeo y con la presencia de placas estables e inestables, incluso tras hacer un ajuste por factores de riesgo tradicionales (Liao et al., 2020).

Evaluated en el contexto de los pacientes con diabetes tipo 2, otro estudio evidenció que el cociente elevado estaba relacionado con un mayor número de placas carotídeas y mayor estenosis, independientemente del control glucémico o del colesterol LDL (Zhao et al., 2021) y un metaanálisis focalizado en pacientes con enfermedad carotídea (Hernández-Díaz et al., 2022) mostró que este cociente tenía una correlación significativa con el número y la complejidad de las placas ateroscleróticas carotídeas evaluadas mediante ecografía Doppler.

En esta línea, el metaanálisis reciente (Wang et al., 2023), que incluyó 14 estudios prospectivos con más de 25.000 participantes, concluyó que un cociente PCR/HDL-C elevado se asociaba con un riesgo aumentado de eventos cardiovasculares mayores (HR: 1.68; IC 95%: 1.42-1.95) y mayor prevalencia de ateromatosis carotídea, con un valor predictivo superior al de la PCR o HDL-C solos.

En suma, el cociente entre PCR y colesterol HDL representa un biomarcador prometedor de riesgo aterogénico en ateromatosis carotídea, integrando aspectos inflamatorios y lipídicos y la evidencia actual, incluyendo estudios prospectivos y metaanálisis recientes, respalda su inclusión progresiva en la evaluación clínica del riesgo cardiovascular.

Justificación del uso del cálculo del tamaño muestral necesario para el cociente PCR/HDL

Como se ha presentado, la ateromatosis carotídea representa una de las principales manifestaciones de la enfermedad aterosclerótica y constituye un factor de riesgo significativo en el curso de eventos cerebrovasculares. La inflamación sistémica de bajo grado ha sido reconocida como un componente clave en la patogénesis de la aterosclerosis.

En este contexto, la Proteína C Reactiva (PCR), tradicionalmente considerada como un biomarcador inflamatorio, ha emergido como un potencial mediador activo en la progresión de la ateromatosis. Por tanto, su integración en la práctica clínica permite una mejor estratificación del riesgo y abre la puerta al desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas a la modulación inflamatoria y, aunque en sí misma no es un objetivo terapéutico directo, su reducción mediante estatinas, inhibidores de IL-1 β , o cambios en el estilo de vida, se ha asociado con una disminución del riesgo cardiovascular (Ridker et al., 2017).

En este contexto, la implementación del cociente PCR/HDL-C como marcador rutinario representa el aporte de un valor pronóstico adicional en la práctica clínica debido a que su medición resulta accesible, económica y no presenta exigencias adicionales a su propia disponibilidad en laboratorios clínicos convencionales.

Su elección como contexto biomédico de aplicación en esta tesis se justifica por lo expuesto anteriormente y por su potencial empleo en el seguimiento terapéutico y la estratificación del riesgo en pacientes con factores de riesgo intermedios, resultando particularmente interesante para dilucidar si los tratamientos antiinflamatorios o aquellos que elevan el HDL funcional, reducen este cociente y modifican el pronóstico clínico.

Una vez más, la elección del cociente como herramienta para un cálculo apriorístico del tamaño muestral adecuado, permitirá implementar, de inicio, las condiciones experimentales de diseño necesarias para establecer un sistema de evaluación precoz y para garantizar estadísticamente el seguimiento del riesgo, optimizando la detección de pacientes de alto riesgo y posibilitando la guía hacia estrategias terapéuticas personalizadas.

3.1.3.3. Evaluación de la relación A β 1-42/A β 1-40 como Biomarcador en la Enfermedad de Alzheimer y su utilidad diferencial frente a la Demencia Frontotemporal

La enfermedad de Alzheimer (EA) se ha convertido en la causa más frecuente de demencia a nivel mundial, lo que supone un importante problema de salud pública, con una prevalencia creciente en el contexto del envejecimiento poblacional, que se incrementa con la edad, duplicándose cada 5 años después de los 65.

Fue descrita por primera vez por Alois Alzheimer en 1906 tras el análisis post-mortem del cerebro de una paciente con deterioro cognitivo progresivo (Lane et al., 2018) y actualmente, la EA afecta a más de 55 millones de personas en todo el mundo (World Health Organization [WHO], 2023).

A nivel general supone una neurodegeneración patológica progresiva, caracterizada por la acumulación anormal de beta-amiloide (A β 1-42 y A β 1-40) y proteína tau hiperfosforilada, que deriva en sintomatología cognitiva, conductual y funcional, caracterizada por deterioro cognitivo, pérdida de memoria, así como acumulaciones anatómicas neuropatológicas en placas seniles y ovillos neurofibrilares.

Actualmente, el diagnóstico clínico se basa en criterios como los propuestos por el National Institute on Aging and Alzheimer's Association (NIA-AA) (Jack et al., 2018).

Los factores de riesgo incluyen edad avanzada, sexo femenino, bajo nivel educativo, hipertensión, diabetes tipo 2, sedentarismo y antecedentes familiares (Livingston et al., 2020) y se estima que el 60-70% de los casos de demencia son atribuibles a la enfermedad de Alzheimer.

De entre ellos, existen formas familiares (<1%) asociadas a mutaciones autosómicas dominantes en los genes APP, PSEN1 y PSEN2. La forma esporádica se vincula fuertemente al alelo ϵ 4 del gen APOE (apolipoproteína E), que aumenta el riesgo y disminuye la edad de inicio (Liu et al., 2013) y estudios genéticos recientes han identificado nuevos loci asociados mediante GWAS (Kunkle et al., 2019).

A nivel clínico la enfermedad cursa inicialmente con déficit de memoria episódica, seguido de alteraciones en el lenguaje, praxias, funciones ejecutivas y comportamiento y,

llegado a fases avanzadas, las manifestaciones derivan en pérdida irreversible de la autonomía funcional. Este complejo sintomatológico se asienta sobre una serie de bases neuropatológicas características, que incluyen placas seniles extracelulares compuestas de péptidos beta-amiloide (especialmente A β 1-42) y ovillos neurofibrilares intracelulares formados por proteína tau hiperfosforilada (De Strooper & Karran, 2016), que pueden ser visualizados in vivo mediante PET, con trazadores de amiloide y tau (Villemagne et al., 2015). La disfunción sináptica participada de un contexto neuroinflamatorio y la pérdida neuronal progresiva constituyen otros eventos clave en la neuropatología de la enfermedad y en el agravamiento de los síntomas percibidos.

Hasta 2024 los tratamientos farmacológicos aprobados incluyen inhibidores de la colinesterasa (donepezilo, rivastigmina) y memantina, un antagonista de NMDA.

Entre las terapias emergentes, se ha aprobado por la FDA la utilización de inmunoterapia pasiva, mediante anticuerpos monoclonales dirigidos contra A β para facilitar su eliminación, como Aducanumab, con resultado de reducción significativa de las placas (Cummings et al., 2021), Lecanemab, dirigido a protofibrillas de A β (van Dyck et al., 2023) y Donanemab, dirigido a formas fibrilares de A β que, parece haber reportado avances modestos sobre el rendimiento cognitivo (Mintun et al., 2021).

A diferencia de la pasiva, la inmunoterapia activa estimula el sistema inmune del paciente para producir anticuerpos contra A β . Aunque los primeros ensayos (AN1792) fueron interrumpidos por efectos adversos, existen nuevas vías en desarrollo, como ABvac40, centrado en A β 1-40 como objetivo terapéutico (Castillo et al., 2017) por participar en la formación de depósitos difusos (Yamada, 2015) y porque su acumulación en los vasos cerebrales puede contribuir a la disfunción endotelial y al deterioro cognitivo, justificando así su abordaje terapéutico específico.

Además, se han implementado estrategias como el uso de nanopartículas para liberar anticuerpos anti-A β en el cerebro o edición génica CRISPR para modificar la expresión de APP. En este sentido, en modelos animales de EA, las nanopartículas funcionalizadas con anticuerpos anti-A β han demostrado reducir la carga de placas amiloides y mejorar el desempeño cognitivo (Kreuter et al., 2019). Asimismo, un estudio reciente de Park et al. (2022) demostró que la edición del gen *App* en modelos transgénicos de EA mediante CRISPR-Cas9

encapsulado en nanopartículas lipídicas permitió una disminución efectiva del A β cerebral y se tradujo en una mejora de la función cognitiva.

También en desarrollo, las estrategias basadas en péptidos bloqueadores de la oligomerización de A β 1-42, como los derivados del segmento KLVFF, que interfieren en la formación de agregados tóxicos (Yang et al., 2022).

Papel de los péptidos A β 1-42 y A β 1-40

En el contexto de investigación continúa siendo necesaria la detección de biomarcadores tempranos de la enfermedad y, entre los principalmente estudiados hasta el momento, se encuentran los péptidos beta-amiloideos A β 1-42 y A β 1-40, que han recibido especial atención por su implicación dual como indicadores diagnósticos y como elementos patogénicos, debido a que su acumulación temprana constituye uno de los eventos patológicos iniciales.

Los péptidos A β , A β 1-42 y A β 1-40, derivan del procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloide (APP), por acción de las secretasas β y γ . A β 1-40 es el fragmento más abundante en el líquido cefalorraquídeo (LCR), mientras que A β 1-42, aunque menos frecuente, presenta mayor hidrofobicidad y agregación, lo que favorece su deposición en el parénquima cerebral (Haass et al., 2022) con formación de placas neuríticas (Selkoe & Hardy, 2016) por lo que ha sido considerado potencialmente más neurotóxico que A β 1-40 y la disminución de su recuento en LCR, manifestación del inicio de su tendencia a depositar, precede a los síntomas clínicos, sugiriendo su participación temprana en la cascada amiloide. Las formas oligoméricas de A β 1-42 son altamente neurotóxicas y afectan la sinapsis y la función neuronal (Benilova et al., 2012).

La importancia del cociente A β 1-42 /A β 1-40

La medición de A β 1-42 y A β 1-40 en LCR, o mediante PET amiloide, permite identificar a los individuos con perfil neuropatológico en etapas preclínicas.

La producción desbalanceada de A β 1-42 sobre A β 1-40, de un modo que reduce la detección de A β 1-42 en LCR, combinada con niveles normales de A β 1-40, indica acumulación cerebral de amiloide, favoreciendo la formación de oligómeros y placas, lo que desencadena una cascada de eventos neurotóxicos: disfunción sináptica, estrés oxidativo, neuroinflamación y muerte neuronal (Karran & De Strooper, 2022).

Debido a ello, la comprensión de la dinámica entre A β 1-42 y A β 1-40 ha impulsado el desarrollo de terapias dirigidas a modular su producción o facilitar su eliminación. En este sentido, las terapias que implican anticuerpos monoclonales se diseñan de un modo que permite reconocer formas agregadas de A β , mostrando eficacia en la reducción de placas, aunque con resultados clínicos mixtos (van Dyck et al., 2023).

El hecho de que A β 1-42 y A β 1-40 desempeñen un papel central, tanto en la fisiopatología como en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, ha llevado a estudiar el potencial diagnóstico de su cociente A β 1-42/A β 1-40, permitiendo profundizar en la comprensión de su dinámica, como punto de partida para la apertura de vías terapéuticas más eficaces.

En condiciones fisiológicas, A β 1-40 podría desempeñar funciones neuroprotectoras, antiangiogénicas o antimicrobianas. Sin embargo, el desequilibrio entre la producción y el aclaramiento de estos péptidos, en especial el aumento relativo de A β 1-42, favorece la patogénesis de la enfermedad (Selkoe & Hardy, 2016) ya que, como se indicaba, resulta clave en la formación de placas seniles, uno de los signos neuropatológicos distintivos de la enfermedad de Alzheimer y su medición en líquido cefalorraquídeo (LCR) se ha convertido en un estándar en el diagnóstico. Sin embargo, su concentración absoluta puede verse influenciada por factores preanalíticos y por la variabilidad interindividual.

En este sentido, se ha comprobado que el uso del cociente A β 1-42 y A β 1-40, incrementa la especificidad diagnóstica por su capacidad para, no sólo reflejar el depósito cerebral de A β 1-42 (Janelidze et al., 2016), sino también para evidenciar las variaciones individuales en la producción global de péptidos amiloides (Blennow & Zetterberg, 2018) y, en consecuencia, para brindar nuevas oportunidades en el manejo clínico del paciente.

Desde el punto de vista de la patogenia de la enfermedad, una disminución del cociente A β 1-42/A β 1-40 sugiere un secuestro del A β 1-42 en depósitos insolubles en el parénquima

cerebral. Este fenómeno ocurre incluso en fases preclínicas, cuando los síntomas cognitivos aún no son evidentes, indicando un proceso patológico incipiente (Sutphen et al., 2018).

El cociente bajo se asocia, además, con una mayor progresión hacia deterioro cognitivo leve (DCL) y hacia la enfermedad de Alzheimer (Palmqvist et al., 2019) en individuos asintomáticos, lo que resalta su valor predictivo y su relevancia para el ensayo intervenciones tempranas (Schindler et al., 2019).

La validación de este cociente, en estudios recientes, como el biomarcador más estable y correlacionado con la carga amiloide cerebral detectable por PET (Palmqvist et al., 2019; Hansson et al., 2023) y la facilidad para su detección en plasma, como alternativa diagnóstica no invasiva, han arrojado prometedores resultados por su correlación con los datos obtenidos en LCR y los debidos a imágenes cerebrales (Ashton et al., 2021), situándolo como un biomarcador robusto, no sólo para la detección temprana de la enfermedad (Palmqvist et al., 2019) sino también como un punto clave en la evaluación diferencial diagnóstica respecto a otras demencias (Janelidze et al., 2016).

La enfermedad de Alzheimer y la demencia frontotemporal (DFT) son dos de las principales causas de demencia en adultos mayores y de mediana edad, respectivamente. Ambas patologías presentan superposiciones clínicas y neuropatológicas, lo que complica su diagnóstico diferencial.

La DFT constituye un grupo heterogéneo de trastornos con degeneración focal del lóbulo frontal y/o temporal, asociada frecuentemente a acumulación de tau o TDP-43, pero con poca o nula participación del amiloide (Bang et al., 2015). De hecho, los pacientes suelen presentar niveles normales de $A\beta 1-42$ y del cociente $A\beta 1-42/A\beta 1-40$, ya que la vía amiloide no está involucrada en la mayoría de sus variantes neuropatológicas (Skillbäck et al., 2014).

En contraste, en los pacientes con enfermedad de Alzheimer, los niveles de $A\beta 1-42$ en LCR disminuyen considerablemente debido a su acumulación en el parénquima cerebral, mientras que $A\beta 1-40$ no varía significativamente (Lewczuk et al., 2015), lo cual ha motivado la inclusión del cociente $A\beta 1-42/A\beta 1-40$ como una herramienta discriminatoria en aquellas etapas iniciales en las que el diagnóstico entre la enfermedad de Alzheimer y la DFT resulta complicado, como demostró un estudio de Hansson et al. (2018) reportando una precisión diagnóstica superior al 90% al utilizar este cociente en una cohorte multicéntrica.

Justificación del uso del cálculo del tamaño muestral necesario para el cociente A β 1-42/A β 1-40

Actualmente, el cociente A β 1-42/A β 1-40 es utilizado en combinación con otros biomarcadores (como tau fosforilada y neurofilamento de cadena ligera) para mejorar la precisión diagnóstica y monitorizar la progresión de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, persisten desafíos como la estandarización de técnicas de cuantificación y la accesibilidad de pruebas plasmáticas en entornos clínicos (Blennow et al., 2022), la normalización de los métodos de análisis y de los umbrales diagnósticos, que aún requieren validación internacional (Ashton et al., 2021).

En este escenario, resulta previsible que las investigaciones futuras se dirijan al establecimiento de valores de referencia por edad, genotipo APOE y otras comorbilidades, así como a explorar el potencial de los oligómeros A β como marcadores patogénicos más específicos, para lo que actualmente se investiga el papel de la microbiota, la barrera hematoencefálica y la proteómica en la progresión de la enfermedad.

En este contexto, el cociente A β 1-42/A β 1-40 representa una herramienta diagnóstica y pronóstica fundamental por su capacidad para reflejar con precisión los depósitos cerebrales de amiloide y anticipar el deterioro cognitivo, lo que lo convierte en un pilar clave para el diagnóstico temprano y la estratificación de pacientes en ensayos clínicos.

El cociente A β 1-42/A β 1-40 ha sido seleccionado en esta tesis, como marco fisiopatológico contextual, por considerarse un biomarcador robusto en el diagnóstico precoz y la monitorización de los posibles cambios en los niveles de ambos péptidos en respuesta a las diferentes estrategias terapéuticas, con un objetivo fijado en poder realizar intervenciones tempranas y un horizonte en la modificación del curso clínico de la enfermedad y en el avance hacia la medicina personalizada.

Tras la elección justificada de tres biomarcadores cociente, en este trabajo de tesis se diseñó, como se expone a continuación, una metodología basada en computación que permitiera generar una colección de datos sintéticos para modelizar el comportamiento de cada uno de estos parámetros cociente, bajo el supuesto de que consiguiera simular la variación de

los datos de la variable denominador (Y) por efecto de cualquiera de los tratamientos expuestos o de los que, eventualmente pudieren implementarse a futuro.

Asimismo, el protocolo recoge, como se detalla en epígrafes posteriores, el posible impacto secundario sobre la variable numerador (X) en función de diferentes grados de correlación propuesto y analiza, finalmente, la consecuencia total de estas variaciones simuladas sobre el parámetro cociente con potencial biomarcador.

3.1.4. Diseño del proceso de simulación

El proceso de simulación aplicado sobre las variables de los biomarcadores cociente, fue concebido conforme a las siguientes etapas:

1. **Definición de los parámetros de diseño:** Se tuvo en cuenta la necesidad de especificación de los parámetros clave, como el nivel de significación (α), la potencia estadística ($1-\beta$) deseada, el tamaño del efecto esperado y la variabilidad de los datos.
2. **Generación de datos:** Se tuvo, una vez más, en consideración la capacidad de los datos obtenidos por simulación para replicar las condiciones de un estudio real, utilizando distribuciones estadísticas apropiadas (la distribución normal para variables continuas, la distribución binomial para variables categóricas o el incremento de la complejidad en el caso de variables normales bivariantes) (Burton et al., 2006).
3. **Evaluación de la potencia estadística:** Se reflexionó sobre la metodología a la que usualmente se acude para la evaluación de la potencia estadística necesaria o para la obtención de una determinada precisión en las estimaciones para diferentes tamaños de muestra. Entre estos métodos se encuentran las pruebas de hipótesis, los intervalos de confianza o determinados análisis bayesianos (Wilson et al., 2021).

En esta tesis se eligió la utilización de contrastes de hipótesis en el escenario de mayor complejidad analítica, el de ausencia de normalidad en el cociente entre las variables implicadas en el estudio, trabajando sobre una función de distribución normal bivalente generada a partir de las mismas.

4. **Determinación del tamaño muestral óptimo:** En la fase final, se proyectó la consecución del cálculo del tamaño muestral mínimo necesario para alcanzar el objetivo general del estudio, teniendo en consideración las exigencias estadísticas para un diseño garante, así como las restricciones prácticas y éticas aconsejables.

3.1.5. Validación del enfoque

Se tuvo en cuenta, adicionalmente que, ante la necesidad de validación del enfoque propuesto, se compararían los resultados de las simulaciones con los obtenidos mediante métodos tradicionales en casos donde ambos enfoques resultaran de aplicación (Wilson et al., 2021), conforme al consejo bibliográfico. Se contempló, además, la posible implementación de un análisis de sensibilidad para evaluar el modo en que los cambios en los parámetros de diseño afectarían al cálculo del tamaño muestral necesario (Burton et al., 2006). Este procedimiento de doble validación garantizaría, en caso necesario, la robustez y confiabilidad del enfoque basado en simulación.

3.1.6. Consideraciones éticas y prácticas

Como se indicaba, el diseño del presente estudio incluyó las consideraciones éticas y prácticas necesarias, como la minimización del riesgo para los participantes y la optimización del uso de recursos (Friedman et al., 2010). En particular, se aseguró que el tamaño muestral calculado fuera el mínimo necesario para alcanzar los objetivos del estudio, evitando la inclusión innecesaria de participantes y el desperdicio de recursos (Rendón-Macías & Villasís-Keever, 2017).

En resumen, en el diseño del estudio propuesto se apostó por un enfoque cuantitativo basado en simulación sobre una selección de casos clínicos representativos, proporcionando una metodología robusta y flexible para el cálculo del tamaño muestral en contextos complejos con la intención, no solo de superar las limitaciones de los métodos tradicionales, sino también con la de proporcionar una mejora sustancial en la validez y la eficiencia de la investigación clínica en un entorno sometido a incertidumbre.

3.1.7 Herramientas y software

En el cálculo del tamaño muestral mediante métodos alternativos, como las simulaciones computacionales, se observó el requerimiento del uso de herramientas y software especializados que permitieran modelar escenarios complejos y realizar análisis estadísticos avanzados. Debido a ello, se realizó un trabajo de análisis justificado sobre la elección de la herramienta de software más adecuada a la generación de los algoritmos requeridos en el proceso, basado en las características que, a continuación, se detallan.

Software estadístico para simulaciones

1. **R:**

R es un lenguaje de programación y entorno de software libre ampliamente utilizado para análisis estadísticos y simulaciones (R Core Team, 2023). Su flexibilidad y la disponibilidad de paquetes especializados lo convierten en una herramienta ideal para implementar métodos de simulación (Burton et al., 2006). Además, R permite la personalización de algoritmos y la integración con otras herramientas, lo que facilita la adaptación a diseños de estudio complejos (Wilson et al., 2021).

Por la idoneidad de este perfil, R fue la herramienta computacional seleccionada para la elaboración de esta tesis doctoral y, sobre este lenguaje, se desarrollaron una serie de algoritmos personalizados para el cálculo del tamaño muestral mínimo en casos donde los métodos tradicionales no resultaban de aplicables, conforme a los objetivos.

2. **Python:**

Python es otro lenguaje de programación popular en la investigación científica, gracias a su sintaxis sencilla y la disponibilidad de bibliotecas para análisis estadísticos (Van Rossum & Drake, 2009).

3. **G*Power:**

GPower es una herramienta gratuita y fácil de usar para el cálculo de tamaño muestral y potencia estadística en diseños de estudio comunes, como pruebas t, ANOVA y regresiones (Faul et al., 2007). Aunque no está diseñado específicamente para simulaciones, *GPower* puede utilizarse para validar los resultados obtenidos mediante métodos más avanzados (Chow et al., 2008).

Consideraciones prácticas

En todo momento se tuvo en cuenta que el uso de herramientas y software especializados requiere un alto nivel de experiencia estadística y computacional y que, por tanto, resulta vital la colaboración con bioestadísticos o expertos en análisis de datos para garantizar la correcta implementación de los métodos propuestos (Friedman et al., 2010). A este respecto, resultó particularmente idóneo el perfil del autor de esta tesis, por su dilatada experiencia estadística y su cualificada formación bioinformática.

Resulta, de igual modo, importante documentar detalladamente los algoritmos y los supuestos utilizados, para facilitar la replicabilidad y la transparencia de los resultados (Rendón-Macías & Villasís-Keever, 2017), procedimiento que también recoge el presente documento.

En resumen, el uso de herramientas y software especializados, como R, junto con el desarrollo de algoritmos personalizados, permitió abordar el cálculo del tamaño muestral, en casos complejos, en el orden de prelación que describe el entorno de esta tesis.

3.2. Proceso de simulación

Para el abordaje del **Objetivo 4** (“Aplicación de la metodología de simulación propuesta al cálculo del tamaño mínimo para cocientes entre variables y validación de su eficacia”) y una vez diseñado el procedimiento metodológico al completo, conforme a lo descrito anteriormente, se puso en marcha el proceso de simulación, una metodología clave en este trabajo para la superación de la deficiente aplicabilidad de la metodología estadística tradicional en el cálculo de tamaños mínimos. El procedimiento de simulación se basó en la generación de datos sintéticos, capaces de replicar las condiciones de un estudio real, en su contexto, permitiendo evaluar el desempeño estadístico bajo diferentes escenarios y, finalmente, determinar el tamaño muestral mínimo necesario para biomarcadores cociente como los descritos anteriormente, inicialmente de un modo teórico para, a continuación, abordar los tres casos clínicos problema, una vez justificada debidamente su elección durante el proceso metodológico.

A continuación, se describe el proceso de simulación en detalle, conforme a lo descrito en su diseño en dos perfiles, uno para el análisis y cálculo del tamaño en variantes muestrales independientes y otro para variantes relacionadas.

3.2.1. Elección de los parámetros de diseño

1. **Nivel de significación (α):** Refleja la probabilidad de cometer un error Tipo I, generalmente fijado en 0.05 (Freiman et al., 1978) y así acordado para esta tesis.
2. **Potencia estadística ($1-\beta$):** Configura la probabilidad de detectar un efecto verdadero, comúnmente establecido en 80% o 90% (Cohen, 1988). En este trabajo de tesis, se seleccionó una potencia del 80%.
3. **Tamaño del efecto esperado:** Dibuja la magnitud de la diferencia que se considera clínicamente relevante (Chow et al., 2008). En este caso, se optó por la elección de un tamaño fijo de 0.15 con coeficientes de correlación de 0.1 0.2 y 0.3 en las variables bivariantes, en un caso, y en otros casos, se optó por una lección de coeficiente de correlación fijo, de 0.25 y tamaños de efecto variable de 0.1, 0.2 y 0.3. este proceso se realizó tanto para el diseño de perfil independiente como para el de perfil relacionado.

4. **Variabilidad de los datos:** Se evidencia estadísticamente mediante la desviación estándar de las variables y en este trabajo de tesis quedó reflejada en una matriz de varianzas y covarianzas.

La elección de los valores, para estos parámetros, conforme a la realidad necesaria, se basó en la literatura previa, estudios piloto o consultas con expertos, y resultó esencial para la generación de datos sintéticos que replicaran las condiciones de un estudio real.

3.2.2. Generación de datos por simulación.

Una vez definidos los parámetros de diseño, se procedió al procedimiento de generación de datos simulados, utilizando las distribuciones estadísticas apropiadas, que incluyó las siguientes etapas:

1. **Selección de la función de distribución de las variables empleadas en simulación:**

Al presentar las variables a estudio un perfil continuo, se optó por la elección de distribuciones de probabilidad normal y normal bivalente, teniendo en cuenta que, en el entorno clínico, las variables involucradas en cocientes de interés diagnóstico se encuentran relacionadas entre sí, en mayor o menor medida. La adopción de esta decisión, derivada de la necesidad de aplicabilidad funcional al contexto biomédico, exigió de la generación de una serie de replicas muestra de tamaño n , con distribución Normal bivalente para las variables, como estrategia metodológica.

Así:

Siendo X e Y variables aleatorias normales de media y varianza respectivas μ_x , μ_y , σ_x , σ_y y correlación ρ .

A partir de la propiedad que permite obtener una variable aleatoria continua mediante la combinada de la inversa de distribución con una variable uniforme $(0,1)$; $X = F_x^{-1}(U)$, $U \sim Uni(0,1)$ se siguieron los siguientes pasos iterándolos para $i: 1, 2, \dots, n$:

1. Generación de 1 valor aleatorio de la variable X :

$x_i = F_X^{-1}(U)$ $X = F_X^{-1}(U)$, donde $U \sim Uni(0,1)$ y F_X^{-1} es la inversa de la función de distribución de X .

2. Generación de un valor de Y :

$y_i = F_{Y|x_i}^{-1}(U)$, donde $F_{Y|x_i}^{-1}$ es la inversa de la función de distribución de la variable Y condicionada a x_i , $Y_{|x_i} \sim N(\mu_{Y|x_i}, \sigma_{Y|x_i})$, donde:

$$\mu_{Y|x_i} = \mu_Y + \rho \frac{\sigma_Y}{\sigma_X} (x_i - \mu_X); \quad \sigma_{Y|x_i}^2 = \sigma_Y^2 (1 - \rho^2)$$

2. **Especificación de los parámetros de la distribución:** En la generación de los datos de simulación, se hizo necesario disponer de los datos de la media y la desviación estándar para la distribución normal, así como la media, el coeficiente de correlación, y la matriz de varianzas y covarianzas, en el caso de la distribución normal bivalente.

Los valores seleccionados para estos parámetros, o los de sus correspondientes estimadores muestrales, fueron los aceptados en la literatura científica y basados en datos empíricos previos y permitieron la construcción de la matriz de varianzas y covarianzas en el caso necesario.

Así, disponiendo de dos variables aleatorias X e Y , y conociendo:

- σ_x : desviación típica de X .
- σ_y : desviación típica de Y .
- ρ_{xy} : coeficiente de correlación entre X e Y .

Pudo calcularse con sencillez la covarianza entre X e Y como:

$$Cov(X, Y) = \rho_{xy} \cdot \sigma_x \cdot \sigma_y$$

Y pudo construirse la matriz de varianzas y covarianzas de la siguiente forma:

$$\begin{bmatrix} \sigma_x^2 & Cov(X, Y) \\ Cov(X, Y) & \sigma_y^2 \end{bmatrix}$$

Resultando obvio que esta matriz es simétrica puesto que $Cov(X, Y) = Cov(Y, X)$.

3. **Generación de muestras aleatorias:** Se generaron múltiples muestras aleatorias de diferentes tamaños, utilizando el software estadístico R (Wilson et al., 2021), con la función `rnorm()` para la generación de datos de una distribución normal, y la función `mvnorm()` para la normal bivalente.

3.2.3. Evaluación de la potencia estadística

Con los datos de simulación generados, se procedió a la evaluación del desempeño estadístico mediante:

1. **Pruebas de hipótesis:** para evaluar la detección del efecto esperado en cada muestra mediante la comparación entre cocientes, tanto aquellos derivados de datos simulados al completo como los correspondientes a los tres supuestos biomarcadores sujetos a información muestral derivada de la bibliografía, se implementó el test de rangos con signo de Wilcoxon, en el diseño de perfil pareado y el test de Brunner-Manzel en el diseño de perfil independiente, en condiciones no paramétricas de ausencia de normalidad y de homocedasticidad.
2. **Cálculo de intervalos de confianza:** Se calcularon intervalos de confianza para estimar la precisión de las estimaciones del tamaño del efecto.
3. **Cálculo de la potencia estadística:** Finalmente, se determinó la proporción de muestras en las que fue posible detectar el efecto esperado, lo que proporcionó una estimación de la potencia estadística para cada tamaño muestral (Cohen, 1988).

3.2.4. Determinación del tamaño muestral óptimo

La fase final del proceso de simulación fue la determinación del tamaño muestral óptimo en casos en los que la variable de interés biomédico se configura mediante el cociente de dos variables aleatorias de perfil bioquímico, conforme a los objetivos fijados para esta tesis.

Así fue identificado, mediante simulación, el tamaño mínimo necesario entendido como el tamaño muestral más pequeño que permite alcanzar la potencia estadística deseada y fijada, en este estudio, al 80%.

Finalmente, no se consideró pertinente la realización de un análisis de sensibilidad, pero sí se procedió a un procedimiento de validación de los datos obtenidos por simulación, preliminarmente, mediante comparación con los métodos tradicionales para garantizar la validez del enfoque propuesto. Esta validación sobre datos preliminares conforma el único contexto en el que ambas metodologías, la clásica y la propuesta, resultaban aplicables. Sin embargo, el procedimiento de validación sobre el cálculo del tamaño mínimo de muestra, a

partir de un marcador cociente, no resulta de aplicación, al tratarse de un contexto en el que este tamaño muestral no puede calcularse por métodos directos, un problema cuya resolución configura el objetivo general de esta tesis.

3.2.5. Consideraciones prácticas

Durante todo el proceso de simulación se tuvieron en cuenta las exigencias inherentes al mismo, como el alto nivel de conocimiento estadístico e informático, así como un manejo cuidadoso de los supuestos utilizados, resaltando lo importante de una documentación detallada de cada paso del proceso, desde la definición de los parámetros de diseño hasta la validación de los resultados, a fin de garantizar la transparencia y replicabilidad de los hallazgos (Rendón-Macías & Villasís-Keever, 2017), mejorando la validez y eficiencia de los estudios clínicos, y contribuyendo a la adopción de métodos avanzados en la práctica investigadora.

3.2.6. Flujo de los experimentos de simulación.

Los diferentes procedimientos de simulación se aplicaron sobre los cocientes de las variables X e Y como factores de interés clínico sobre los supuestos reales anteriormente detallados, y que conforman los resultados de esta tesis.

El proceso de simulación se inicia proporcionando al programa en R los siguientes datos:

- Media de X e Y .
- Matriz de varianzas y covarianzas de las variables X e Y .
- Nivel de significación (α).
- Potencia deseada ($1-\beta$).
- Tamaño muestral inicial.
- Número de repeticiones a realizar en cada ciclo.
- Magnitud del efecto a simular.

A continuación, se continúa con la generación de nuevos valores para las variables X e Y , simulando la posible aplicación de un tratamiento que modificara los valores de Y con finalidad terapéutica.

La siguiente etapa requiere del cálculo de un cociente X/Y basado en los valores de las variables previos a la simulación de la aplicación del tratamiento terapéutico y de idéntico cálculo del cociente X/Y basado en los valores obtenidos tras la simulación de la aplicación del tratamiento terapéutico.

Para la verificación subsiguiente de la existencia de diferencias entre ambos cocientes se utilizaron dos aproximaciones estadísticas en función del diseño elegido, de modo que el contraste sobre la comparación de cocientes requirió del uso de la prueba de Brunner-Manzel para el diseño de perfil independiente, y la prueba de rangos con signo de Wilcoxon, en el caso del diseño pareado.

Ambas técnicas se detallan en el apartado 3.3.7 de esta tesis.

En cada ciclo de simulación se efectúa el recuento de los casos en los que la prueba detecta diferencias entre el primer cociente X/Y y el segundo (el que representa la aplicación de un tratamiento).

La potencia alcanzada se calcula con el cociente:

$$Potencia = \frac{\text{Número de tests significativos}}{\text{Número total de tests}}$$

En caso de que la potencia alcanzada no iguale o supere la solicitada en los parámetros iniciales, se incrementa el tamaño muestral y se repiten las iteraciones

3.2.6.1. Flujo de simulación para muestras normales bivariantes independientes.

INICIO

- Cargar y verificar instalación de paquetes:
 - tidyverse, MASS, ggplot2, lawstat
- Limpiar entorno: `rm(list = ls())`
- Cerrar gráficos abiertos: `dev.off()`
- Crear y fijar directorio de salida

DEFINICIÓN DE PARÁMETROS

- Establecer:
 - Nivel de significación: $\alpha = 0.05$
 - Potencia deseada: $\text{potencia} = 0.80$
 - Medias ($\mu_1 = 10$, $\mu_2 = 20$), desviaciones ($\sigma_1 = 3$, $\sigma_2 = 6$)
 - Correlación ($\text{correlación} = 0.2$)
- Crear:
 - Vector de medias y matriz de covarianza para `mvrnorm()`
- Fijar:
 - Tamaño muestral inicial: $\text{tam_muestral} = 10$
 - Incremento: $\text{increm_tm} = 1$
 - Repeticiones por simulación: $\text{grupos} = 4000$
- Definir efecto esperado:
 - $\text{Dif_Media_Y} = 0.15$
 - $\text{sd_Y} = 0.224$
- Inicialización:
 - Potencias , Tam_muestrales , P_valores , $\text{Potencia_simulacion}$
 - Contador de ciclos

BUCLE PRINCIPAL while (Potencia_simulacion < potencia)

Inicio del bucle:

- Generar errores aleatorios para X e Y

- Inicializar contador de diferencias significativas

BUCLE INTERNO for (i in 1:grupos)

- Simular efecto de tratamiento sobre Y: efecto_y
 - Truncar valores negativos a 0
- Generar dos muestras normales multivariadas independientes (base1, base2)
- Modificar segunda muestra para incluir efecto
- Calcular cocientes: coc1, coc2
- Crear df_test con los cocientes y grupos
- Aplicar test de Brunner-Munzel:
 - `brunner.munzel.test(coc1, coc2)`
- Extraer p_val
- Contar como diferencia significativa si $p_val < \alpha$
- Guardar p_val en la lista

Fin del bucle interno:

- Calcular $Potencia_simulación = \frac{\text{Número de tests significativos}}{\text{Número total de tests}}$
- Guardar `Potencia_simulación` y `tam_muestral`
- Si no se alcanza la potencia deseada, aumentar tamaño muestral

SALIDA DE RESULTADOS

- Crear `Tabla_potencias` con tamaños y potencias
- Crear nombre de archivo con fecha y tipo de simulación
- Guardar tabla en .csv: `write_csv`
- Representar gráficamente la curva de potencia con `ggplot2`
- Guardar imagen PNG: `ggsave`

FIN

3.2.6.2. Flujo de simulación para muestras normales bivariantes pareadas.

INICIO

- Cargar y verificar los paquetes: tidyverse, MASS, ggplot2, lawstat, coin.
- Limpiar entorno: `rm(list = ls())`.
- Cerrar gráficas activas.
- Crear y establecer directorio de trabajo para guardar los resultados.

DEFINICIÓN DE PARÁMETROS

- Establecer:
 - Nivel de significación: $\alpha = 0.05$
 - Potencia deseada: $\text{potencia} = 0.80$
 - Medias ($\mu_1 = 10, \mu_2 = 20$), desviaciones ($\sigma_1 = 3, \sigma_2 = 6$)
 - Correlación ($\text{correlación} = 0.2$)
- Crear:
 - Vector de medias y matriz de covarianza para `mvrnorm()`
- Fijar:
 - Tamaño muestral inicial: $\text{tam_muestral} = 10$
 - Incremento: $\text{incred_tm} = 1$
 - Repeticiones por simulación: $\text{grupos} = 4000$
- Definir efecto esperado:
 - $\text{Dif_Media_Y} = 0.15$
 - $\text{sd_Y} = 0.224$
- Inicializar:
 - $\text{Potencias}, \text{Tam_muestrales}, \text{P_valores}, \text{Potencia_simulacion}$
 - $\text{Variable_pareado} = \text{TRUE}$

BUCLE PRINCIPAL while (Potencia_simulacion < potencia)

Inicio del bucle:

- Generar errores aleatorios para X e Y: `azar_x, azar_y`

- Inicializar contador de diferencias significativas

BUCLE INTERNO for (i in 1:grupos)

- Simular efecto de tratamiento sobre Y: efecto_y
 - Truncar valores negativos a 0
- Generar datos pareados con mvnorm
- Modificar la segunda variable simulando tratamiento:
 - $x2 = base1[,1] + azar_x$
 - $y2 = base1[,2] * (1 + efecto_y) + azar_y$
- Calcular cocientes: coc1 = x/y, antes y después del tratamiento
- Construir df_test con cocientes y grupos
- Aplicar test de rangos con signo de Wilcoxon:
 - wilcox_test(Cocientes ~ Grupo, paired = TRUE,)
- Extraer p_val
- Contar como diferencia significativa si p_val < alfa
- Guardar p_val en la lista

Fin del bucle interno:

- Calcular $Potencia_simulación = \frac{Número\ de\ tests\ significativos}{Número\ total\ de\ tests}P$
- Guardar Potencia_simulación y tamaño muestral
- Si no se alcanza la potencia deseada, aumentar tamaño muestral

SALIDA DE RESULTADOS

- Crear Tabla_potencias con tamaños y potencias
- Crear nombre de archivo con fecha y tipo de simulación
- Guardar tabla en .csv: write_csv
- Representar gráficamente la curva de potencia con ggplot2
- Guardar imagen PNG: ggsave

FIN

3.3.7. Pruebas de Brunner-Manzel y de Rangos con signo de Wilcoxon.

En muchas situaciones experimentales los datos obtenidos no siguen una distribución normal por lo que resulta imposible la utilización de pruebas paramétricas como la basada en el estadístico t de Student.

En esos casos, se debe recurrir a pruebas no paramétricas. La prueba de Brunner-Manzel se escogió para la realización de comparaciones entre cocientes en condiciones de ausencia de normalidad y de homocedasticidad, mientras que la prueba de rangos con signo de Wilcoxon se empleó como alternativa a la prueba t para muestras relacionadas o pareadas (Wilcoxon, 1945).

La prueba **Brunner-Manzel** fue introducida por Edgar Brunner y Ulrich Munzel en el año 2000 como una alternativa a la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney (WMW), cuyo supuesto de igualdad de distribuciones bajo la hipótesis nula limita su aplicabilidad.

Su desarrollo se basa en la estadística de rangos, pero ajustada mediante estimadores de varianza heterogéneos, siguiendo la línea del trabajo previo sobre modelos de probabilidad ordenada para datos no normales (Brunner, Munzel & Puri, 1999) y fue concebido en el marco de modelos de probabilidad ordenada (*probabilistic index models*), donde se evalúa la probabilidad de que un valor aleatorio tomado de un grupo exceda uno tomado del otro.

Es decir, $P(X < Y) + 0.5P(X = Y)$, que se conoce como el *valor efecto* o *efecto de dominio estocástico*.

Su fundamento matemático descansa sobre un modelo de comparación estocástica:

Sean $X_1, \dots, X_m \sim F$ y $Y_1, \dots, Y_n \sim G$ dos muestras independientes.

El parámetro de interés es:

$$\theta = P(X < Y) + \frac{1}{2}P(X = Y)$$

La hipótesis nula contrastar es:

$H_0: \theta = 0.5$

Lo que implica que no hay orden estocástico entre F y G .

El **estadístico de prueba** se define como:

$$T_{BM} = \frac{\hat{\theta} - 0.5}{\hat{\sigma}_\theta}$$

donde $\hat{\theta}$ es un estimador de la probabilidad concordante entre grupos, y $\hat{\sigma}_\theta$ es el error estándar estimado bajo varianzas heterogéneas.

Este **estimador $\hat{\theta}$** se calcula a partir de los rangos combinados de ambas muestras.

Sea R_{ij} el rango del j -ésimo valor de la i -ésima muestra en el conjunto combinado. Entonces,

$$\hat{\theta} = \frac{1}{mn} \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n \left[I(X_i < Y_j) + \frac{1}{2} I(X_i = Y_j) \right]$$

Donde $I(\cdot)$ es la función indicadora.

Finalmente, el Teorema de Brunner-Munzel (Brunner & Munzel, 2000) se formula como:

Bajo la hipótesis nula $H_0: \theta = 0.5$, y sin requerir igualdad de varianzas o distribuciones, el estadístico T_{BM} tiene asintóticamente una distribución t de Student con grados de libertad ajustados, dado por:

$$df = \frac{(\hat{\sigma}_\theta^2)^2}{\frac{\hat{\sigma}_1^4}{m(m-1)} + \frac{\hat{\sigma}_2^4}{n(n-1)}}$$

Donde $\hat{\sigma}_1$ y $\hat{\sigma}_2$ son estimaciones de la desviación típica dentro de cada grupo.

La prueba de **rangos con signo de Wilcoxon** se aplica a muestras pareadas o relacionadas. Evalúa si las diferencias entre pares de observaciones tienen una mediana distinta de cero, siendo una alternativa a la prueba t de muestras relacionadas o pareadas cuando no se cumple el supuesto de normalidad (Wilcoxon, 1945).

Siendo X_i y Y_i dos muestras relacionadas de tamaño n se calcula la diferencia $D_i = X_i - Y_i$, se eliminan los valores cero y se ordenan los valores absolutos $|D_i|$ asignándoles entonces rangos.

Se suma el total de rangos con signo positivo T^+ y T^- . El estadístico W es:

$$W = \min(T^+, T^-)$$

Cuando n es mayor de 25 se puede aproximar a una distribución normal:

$$Z = \frac{W - \mu_W}{\sigma_W}$$

con:

$$\mu_W = \frac{n(n+1)}{4}$$

$$\sigma_W = \sqrt{\frac{n(n+1)(2n+1)}{24}}$$

Ambas pruebas ofrecen soluciones robustas cuando los datos no cumplen el supuesto de normalidad.

3.3.8. Código fuente en R de las rutinas de simulación.

3.3.8.1. Simulación para muestras normales bivariantes independientes.

```
#####  
# ACCIONES INICIALES #  
#####  
  
# Cargar paquetes necesarios  
  
# Verificar si cada paquete está instalado; si no, lo instala  
  
if (!requireNamespace("tidyverse", quietly = TRUE)) {  
  install.packages("tidyverse")  
}  
if (!requireNamespace("MASS", quietly = TRUE)) {  
  install.packages("MASS")  
}  
if (!requireNamespace("ggplot2", quietly = TRUE)) {  
  install.packages("ggplot2")  
}  
if (!requireNamespace("lawstat", quietly = TRUE)) {  
  install.packages("lawstat")  
}  
  
# Cargar los paquetes  
  
library(tidyverse) # Conjunto de paquetes para manipulación de datos  
library(MASS)      # Contiene la función mvrnorm() para generar datos  
multivariados normales  
library(ggplot2)   # Para visualización  
library(lawstat)   # Contiene el test de Brunner-Munzel  
  
# Borrar todas las variables del entorno  
  
rm(list = ls())  
  
# Cerrar todas las gráficas anteriores (en caso de estar abiertas)  
  
try(dev.off(dev.list()["RStudioGD"]), silent = TRUE)
```

```

try(dev.off(), silent = TRUE)

# Crear y establecer el directorio de salida para guardar resultados

mi_directorio <- "C:/SALIDAS"
if (!dir.exists(mi_directorio)) {
  dir.create(mi_directorio, recursive = TRUE)
}

setwd(mi_directorio)

#####
# DEFINICIÓN DE PARÁMETROS INICIALES      #
#####

alfa <- 0.05      # Nivel de significación para el test
potencia <- 0.80  # Potencia deseada de la prueba

# Parámetros de la variable normal bivalente simulada

mu1 <- 10         # Media de la primera variable
mu2 <- 20         # Media de la segunda variable
sigma1 <- 3       # Desviación típica de la primera variable
sigma2 <- 6       # Desviación típica de la segunda variable
correlacion <- 0.2 # Correlación entre las dos variables

# Vector de medias y matriz de covarianzas para la generación de datos

media <- c(mu1, mu2)
covarianza <- matrix(c(sigma1^2, correlacion * sigma1 * sigma2,
  correlacion * sigma1 * sigma2, sigma2^2),
  nrow = 2, byrow = TRUE)

tam_muestral <- 10 # Tamaño de muestra inicial por grupo
increment_tm <- 1  # Incremento en el tamaño muestral por iteración

grupos <- 4000     # Número de repeticiones de la simulación por tam
muestral

Dif_Media_Y <- 0.15 # Diferencia de medias esperada en la variable Y
sd_Y <- 0.04       # Desviación estándar para la variabilidad en Y

```

```

#set.seed(123)          # Semilla para reproducibilidad

# Inicialización de objetos de resultados

Potencia_simulacion <- 0
Potencias <- tibble(Potencia = double())          # Almacena potencias
obtenidas
Tam_muestrales <- tibble(Tam_muestral = double()) # Almacena tamaños
muestrales usados
P_valores <- vector("list", grupos)              # Guarda todos los p-
valores por simulación

pareado <- FALSE      # Indicador de diseño pareado (no se usa en este
código)
ciclos <- 0           # Contador de ciclos de simulación

#####
# BUCLE PRINCIPAL DE SIMULACIÓN          #
#####

while (Potencia_simulacion < potencia) {

  # Generar errores aleatorios para X y Y, proporcionales a la media y
varianza

  azar_x <- rnorm(tam_muestral, mean = media[1]/100, sd =
sqrt(covarianza[1,1])/100)
  azar_y <- rnorm(tam_muestral, mean = media[2]/100, sd =
sqrt(covarianza[2,2])/100)

  diferencias <- 0 # Contador de simulaciones donde p < alfa (rechazo de
H0)

  for (i in seq_len(grupos)) {

    # Simular efecto del tratamiento o diferencia de media en Y

    efecto_y <- rnorm(tam_muestral, mean = Dif_Media_Y, sd = sd_Y)

    # Evitar valores negativos del efecto

```

```

for (i in 1:tam_muestral) {
  if (efecto_y[i] < 0) {
    efecto_y[i] <- 0
  }
}

# Generar dos muestras multivariadas normales independientes

base1 <- mvrnorm(tam_muestral, mu = media, Sigma = covarianza)
base2 <- mvrnorm(tam_muestral, mu = media, Sigma = covarianza)

# Modificar la segunda muestra para incluir el efecto

x2 <- base2[, 1] + azar_x
y2 <- base2[, 2] * (1 + Dif_Media_Y) + azar_y

# Calcular cocientes entre variables X e Y

coc1 <- base1[, 1] / base1[, 2]
coc2 <- x2 / y2

# Construir tabla con los cocientes y su grupo correspondiente

df_test <- tibble(
  Cocientes = c(coc1, coc2),
  Grupo = factor(rep(c(0, 1), each = tam_muestral))
)

# Aplicar el test de Brunner-Munzel a los cocientes por grupo

test <- brunner.munzel.test(
  x = df_test$Cocientes[df_test$Grupo == 0],
  y = df_test$Cocientes[df_test$Grupo == 1]
)

p_val <- test$p.value # Extraer el valor p

# Contar como diferencia si el p-valor es significativo

if (p_val < alfa) {
  diferencias <- diferencias + 1
}

```

```

    }

    # Guardar el p-valor y tamaño muestral usado
    P_valores[[i]] <- tibble(p_valor = p_val, Tam_muestral = tam_muestral)
  }

  # Calcular la potencia como proporción de rechazos de H0

  Potencia_simulacion <- diferencias / grupos

  # Guardar los resultados

  Potencias <- add_row(Potencias, Potencia = Potencia_simulacion)
  Tam_muestrales <- add_row(Tam_muestrales, Tam_muestral = tam_muestral)

  # Si no se alcanza la potencia deseada, incrementar el tamaño muestral

  if (Potencia_simulacion < potencia) {
    tam_muestral <- tam_muestral + increm_tm
  }

  ciclos <- ciclos + 1 # Aumentar contador de ciclos
}

#####
# GUARDAR TABLA DE RESULTADOS #
#####

Tabla_potencias <- tibble(
  Tam_muestral = Tam_muestrales$Tam_muestral,
  Potencia = Potencias$Potencia
)

# Construir el nombre del archivo de salida con marca de tiempo

fecha <- format(Sys.time(), "%Y%m%d_%H%M%S")
tipo <- ifelse(pareado, "pareado", "indep")
nombre_archivo <- paste0("Tabla_potencias_Simul_", tipo, "_", fecha)

# Guardar tabla en CSV

```

```

write_csv(Tabla_potencias, file = paste0(nombre_archivo, ".csv"))

#####
# GRÁFICA FINAL DE LA CURVA DE POTENCIA #
#####

ggplot(Tabla_potencias, aes(x = Tam_muestral, y = Potencia)) +
  geom_point(color = "blue", size = 2) +
  geom_line(color = "darkblue") +
  labs(title = "Curva de potencia simulada",
        x = "Tamaño muestral", y = "Potencia estadística") +
  theme_minimal()

# Guardar la gráfica como imagen PNG
ggsave(filename = paste0(nombre_archivo, ".png"), width = 8, height = 6)

```

3.3.8.2. Simulación para muestras normales bivariantes pareadas.

```
#####
# ACCIONES INICIALES                               #
#####

# Cargar paquetes necesarios

# Verificar si cada paquete está instalado; si no, lo instala

if (!requireNamespace("tidyverse", quietly = TRUE)) {
  install.packages("tidyverse")
}
if (!requireNamespace("MASS", quietly = TRUE)) {
  install.packages("MASS")
}
if (!requireNamespace("ggplot2", quietly = TRUE)) {
  install.packages("ggplot2")
}
if (!requireNamespace("lawstat", quietly = TRUE)) {
  install.packages("lawstat")
}
if (!requireNamespace("coin", quietly = TRUE)) {
  install.packages("coin")
}

# Cargar los paquetes

library(tidyverse) # Conjunto de paquetes para manipulación de datos
library(MASS)      # Contiene la función mvnrm() para generar datos
multivariados normales
library(ggplot2)   # Para visualización
library(lawstat)  # Contiene el test de Brunner-Munzel
library(coin)     # Contiene el test de Wilcoxon

# Borrar todas las variables previas del entorno
rm(list = ls())

# Cerrar gráficas abiertas en la sesión
try(dev.off(dev.list()["RStudioGD"]), silent = TRUE)
try(dev.off(), silent = TRUE)

# Definir y crear (si no existe) el directorio de salida para guardar los
resultados
mi_directorio <- "C:/SALIDAS"
if (!dir.exists(mi_directorio)) {
  dir.create(mi_directorio, recursive = TRUE)
}
setwd(mi_directorio) # Establecer el directorio de trabajo

#####
# DEFINICIÓN DE PARÁMETROS INICIALES                #
#####

alfa <- 0.05      # Nivel de significación estadística
potencia <- 0.80  # Potencia deseada de la simulación

# Parámetros de distribución de las variables simuladas

mu1 <- 10         # Media de la variable X
mu2 <- 20         # Media de la variable Y
```

```

sigma1 <- 3          # Desviación típica de X
sigma2 <- 6          # Desviación típica de Y
correlacion <- 0.2  # Correlación entre X y Y

# Vector de medias y matriz de covarianza para mvnorm

media <- c(mu1, mu2)
covarianza <- matrix(c(sigma1^2, correlacion * sigma1 * sigma2,
                       correlacion * sigma1 * sigma2, sigma2^2),
                     nrow = 2, byrow = TRUE)

tam_muestral <- 10  # Tamaño muestral inicial
increment_tm <- 1   # Incremento del tamaño muestral por iteración
grupos <- 4000      # Número de repeticiones por tamaño muestral

Dif_Media_Y <- 0.15 # Diferencia media relativa en Y (efecto simulado)
sd_Y <- 0.04        # Desviación del efecto en Y

#set.seed(123)      # Semilla para asegurar reproducibilidad

# Inicialización de estructuras para guardar resultados

Potencia_simulacion <- 0
Potencias <- tibble(Potencia = double())
Tam_muestrales <- tibble(Tam_muestral = double())
P_valores <- vector("list", grupos) # Lista para almacenar p-valores por
simulación

pareado <- TRUE     # El test que se usará será pareado (wilcoxon pareado)

ciclos <- 0         # Contador de ciclos de simulación

#####
# BUCLE DE SIMULACIÓN
#####

# Se repite hasta alcanzar la potencia deseada (ej., 80 %)

while (Potencia_simulacion < potencia) {

  # Introducir pequeñas perturbaciones aleatorias a X e Y para romper
  simetría perfecta

  azar_x <- rnorm(tam_muestral, mean = media[1]/100, sd =
sqrt(covarianza[1,1])/100)
  azar_y <- rnorm(tam_muestral, mean = media[2]/100, sd =
sqrt(covarianza[2,2])/100)

  diferencias <- 0 # Contador de simulaciones donde se detecta diferencia
significativa

  for (i in seq_len(grupos)) {

    # Generar el efecto aleatorio de tratamiento (modifica la media de Y)

    efecto_y <- rnorm(tam_muestral, mean = Dif_Media_Y, sd = sd_Y)

    # Forzar que ningún efecto sea negativo
    for (i in 1:tam_muestral) {
      if (efecto_y[i] < 0) {
        efecto_y[i] <- 0
      }
    }
  }
}

```

```

    }
  }

  # Generar datos pareados (misma base para X e Y)

  base1 <- mvrnorm(tam_muestral, mu = media, Sigma = covarianza)

  # Aplicar efecto de tratamiento y ruido a la segunda medición

  x2 <- base1[, 1] + azar_x
  y2 <- base1[, 2] * (1 + efecto_y) + azar_y

  # Calcular cocientes de X/Y antes y después del tratamiento

  coc1 <- base1[, 1] / base1[, 2]
  coc2 <- x2 / y2

  # Construir base de datos con los cocientes y su asignación de grupo

  df_test <- tibble(
    Cocientes = c(coc1, coc2),
    Grupo = factor(rep(c(0, 1), each = tam_muestral))
  )

  # Aplicar el test de Wilcoxon pareado

  test <- Wilcox.test(Cocientes ~ Grupo, data = df_test,
    alternative = "two.sided",
    paired = pareado)

  p_val <- test$p.value # Extraer el p-valor

  # Si el p-valor es menor que alfa, se considera diferencia
  significativa

  if (p_val < alfa) {
    diferencias <- diferencias + 1
  }

  # Guardar el p-valor de esta simulación

  P_valores[[i]] <- tibble(p_valor = p_val, Tam_muestral = tam_muestral)
}

# Calcular la potencia como proporción de diferencias detectadas

Potencia_simulacion <- diferencias / grupos

# Guardar los resultados de esta iteración

Potencias <- add_row(Potencias, Potencia = Potencia_simulacion)
Tam_muestrales <- add_row(Tam_muestrales, Tam_muestral = tam_muestral)

# Si aún no se alcanza la potencia deseada, incrementar el tamaño
muestral

if (Potencia_simulacion < potencia) {
  tam_muestral <- tam_muestral + increm_tm
}

ciclos <- ciclos + 1 # Actualizar contador de iteraciones

```

```

}

#####
# GUARDAR TABLA DE RESULTADOS          #
#####

# Crear tabla resumen con tamaños muestrales y potencias

Tabla_potencias <- tibble(
  Tam_muestral = Tam_muestrales$Tam_muestral,
  Potencia = Potencias$Potencia
)

# Generar nombre del archivo de salida con marca de tiempo

fecha <- format(Sys.time(), "%Y%m%d %H%M%S")
tipo <- ifelse(pareado, "pareado", "indep")
nombre_archivo <- paste0("Tabla_potencias_Simul_", tipo, "_", fecha)

# Guardar resultados en CSV

write_csv(Tabla_potencias, file = paste0(nombre_archivo, ".csv"))

#####
# GRAFICA FINAL                          #
#####

# Graficar la curva de potencia simulada

ggplot(Tabla_potencias, aes(x = Tam_muestral, y = Potencia)) +
  geom_point(color = "blue", size = 2) +
  geom_line(color = "darkblue") +
  labs(title = "Curva de potencia simulada",
       x = "Tamaño muestral", y = "Potencia estadística") +
  theme_minimal()

# Guardar la gráfica en archivo PNG

ggsave(filename = paste0(nombre_archivo, ".png"), width = 8, height = 6)

```

4. Resultados

El **objetivo 4** se alcanzó mediante la implementación del modelo de simulación sobre el cociente de las dos variables sometidas a simulación, a fin de evidenciar su utilidad y precisión en comparación con los métodos tradicionales.

4.1. Aplicación en un caso teórico.

Se suponen dos variables X e Y de interés terapéutico y cuyo cociente constituye un factor de riesgo conocido en una determinada patología.

Son valores conocidos por la literatura científica o estudios previos:

- Media de X e Y : μ_x y μ_y .
- Desviaciones típicas de X e Y : σ_x y σ_y .
- Correlación entre X e Y : ρ_{xy} .

Se considera un factor de riesgo diagnóstico el cociente:

$$FR = \frac{X}{Y}$$

Se supone un tratamiento T con efecto conocido sobre Y que denominaremos t_y . Este efecto se representa como un incremento porcentual de la variable Y .

Se asume que tanto X como Y siguen una distribución normal de media μ_i y desviación típica σ_i .

Se pueden generar colecciones de valores de X e Y que sigan una normal bivalente con las medias correspondientes y la matriz de varianzas y covarianzas:

$$\begin{bmatrix} \sigma_x^2 & \rho_{xy}\sigma_x\sigma_y \\ \rho_{xy}\sigma_x\sigma_y & \sigma_y^2 \end{bmatrix}$$

Se genera una primera colección de tamaño muestral $tm=10$ y una segunda que simula la aplicación del tratamiento t_y .

Para esta segunda colección se simula el efecto del azar sobre las variables X e Y como una distribución Normal de media $\mu_i/100$ y desviación típica $\sigma_i/100$.

El efecto del tratamiento se calcula en base a una distribución Normal de media t_y y desviación típica 0,1 que se añade, junto al azar, a cada uno de los valores originales de Y .

Así se dispondrá de las siguientes colecciones de valores:

- X_1 e Y_1 : valores de las variables en ausencia del tratamiento
- Se calcula el cociente FR_1 :

$$FR_1 = \frac{X_1}{Y_1}$$

- X_2 e Y_2 : valores de las variables tras la aplicación del tratamiento, teniendo la forma:

$$X_2 = X_1 + \text{azar}$$

$$Y_2 = Y_1 + \text{azar} + \text{efecto}$$

- Se calcula el cociente FR_2 :

$$FR_2 = \frac{X_2}{Y_2}$$

Se define la potencia deseada en el experimento como P . Se utiliza $P = 80\%$.

Se simula, en primera instancia, un diseño experimental para muestras independientes y, a continuación, la segunda variante del diseño para muestras pareadas.

Se generan los datos de simulación y se comparan estadísticamente los cocientes mediante test no parámetros para cubrir la ausencia de normalidad en los cocientes.

Se repite el proceso durante c ciclos conservando los valores de detección de significación en las diferencias frente al número de pruebas totales, calculando la potencia como:

$$\text{Potencia de simulación} = \frac{\text{Número de tests significativos}}{\text{Número total de tests}}$$

En caso de que la potencia de simulación sea menor que P , se incrementa en una unidad el tamaño muestral y se repite el proceso de simulación y análisis estadístico.

4.1.1. Simulación para t_y constante y correlación variable.

Se utilizaron como parámetros de la simulación:

- Media de X e Y : $\mu_x = 10$ y $\mu_y = 20$.
- Desviaciones típicas de X e Y : $\sigma_x = 3$ y $\sigma_y = 6$.
- $t_y = 15\%$ de incremento sobre la variable Y .
- correlaciones 0,1, 0,2 y 0,3 en cada simulación.

La simulación arrancó con un tamaño muestral de 10 individuos.

Se realizaron 3000 repeticiones para cada uno de los tamaños muestrales en ambos perfiles de diseño experimental.

Resultados para el diseño de muestras independientes con correlación 0,1 y tamaño de efecto 0,15.

Tam_muestral	Potencia	Tam_muestral	Potencia
10	0,1233	84	0,5323
12	0,1163	86	0,5547
14	0,1387	88	0,5617
16	0,1390	90	0,5713
18	0,1597	92	0,5833
20	0,1650	94	0,5793
22	0,1763	96	0,5977
24	0,1957	98	0,6093
26	0,2100	100	0,6190
28	0,2290	102	0,6203
30	0,2443	104	0,6320
32	0,2500	106	0,6507
34	0,2493	108	0,6387
36	0,2573	110	0,6643
38	0,2680	112	0,6533
40	0,2920	114	0,6673
42	0,2863	116	0,6743
44	0,3433	118	0,6683
46	0,3293	120	0,6697
48	0,3523	122	0,7040
50	0,3623	124	0,7143
52	0,3653	126	0,7103
54	0,3757	128	0,7197
56	0,3840	130	0,7340
58	0,4060	132	0,7160
60	0,4180	134	0,7317
62	0,4163	136	0,7463
64	0,4423	138	0,7420
66	0,4427	140	0,7523
68	0,4343	142	0,7503
70	0,4610	144	0,7617
72	0,4680	146	0,7827
74	0,4903	148	0,7830
76	0,4950	150	0,7800
78	0,5090	152	0,7910
80	0,5170	154	0,8057
82	0,5223		

Tabla 1: Tamaño de muestra y potencia asociada para este caso. Se alcanza la potencia deseada ($P=0,8$) para un tamaño muestral de 154 individuos.

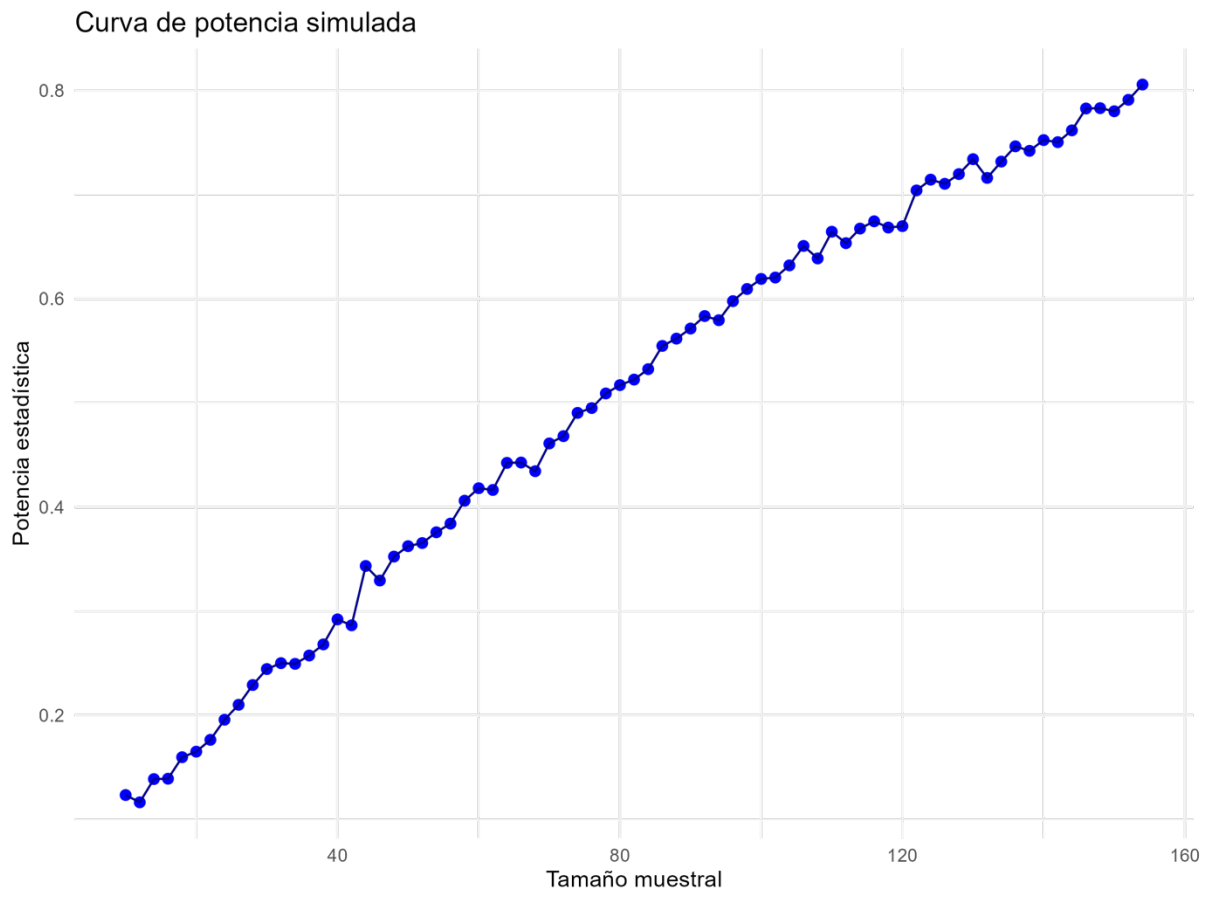


Figura 1: Evolución de la potencia conforme al incremento del tamaño muestral.

Resultados para el diseño de muestras independientes con correlación 0,2 y tamaño de efecto 0,15.

Tam_muestral	Potencia	Tam_muestral	Potencia
10	0,1290	76	0,53467
12	0,1247	78	0,55367
14	0,1447	80	0,56400
16	0,1503	82	0,56967
18	0,1717	84	0,58067
20	0,1763	86	0,60200
22	0,1923	88	0,61100
24	0,2130	90	0,62067
26	0,2330	92	0,63333
28	0,2480	94	0,63400
30	0,2590	96	0,65200
32	0,2690	98	0,65633
34	0,2670	100	0,67100
36	0,2843	102	0,66767
38	0,2990	104	0,67800
40	0,3207	106	0,69867
42	0,3197	108	0,69200
44	0,3703	110	0,71000
46	0,3577	112	0,70700
48	0,3837	114	0,71467
50	0,3933	116	0,73067
52	0,3947	118	0,71800
54	0,4090	120	0,72167
56	0,4237	122	0,74833
58	0,4487	124	0,76100
60	0,4593	126	0,76367
62	0,4590	128	0,76533
64	0,4863	130	0,77800
66	0,4747	132	0,76533
68	0,4723	134	0,78133
70	0,5037	136	0,79033
72	0,5147	138	0,78767
74	0,5353	140	0,80000

Tabla 2: Tamaño de muestra y potencia asociada para este caso. Se alcanza la potencia deseada ($P=0,8$) para un tamaño muestral de 140 individuos.

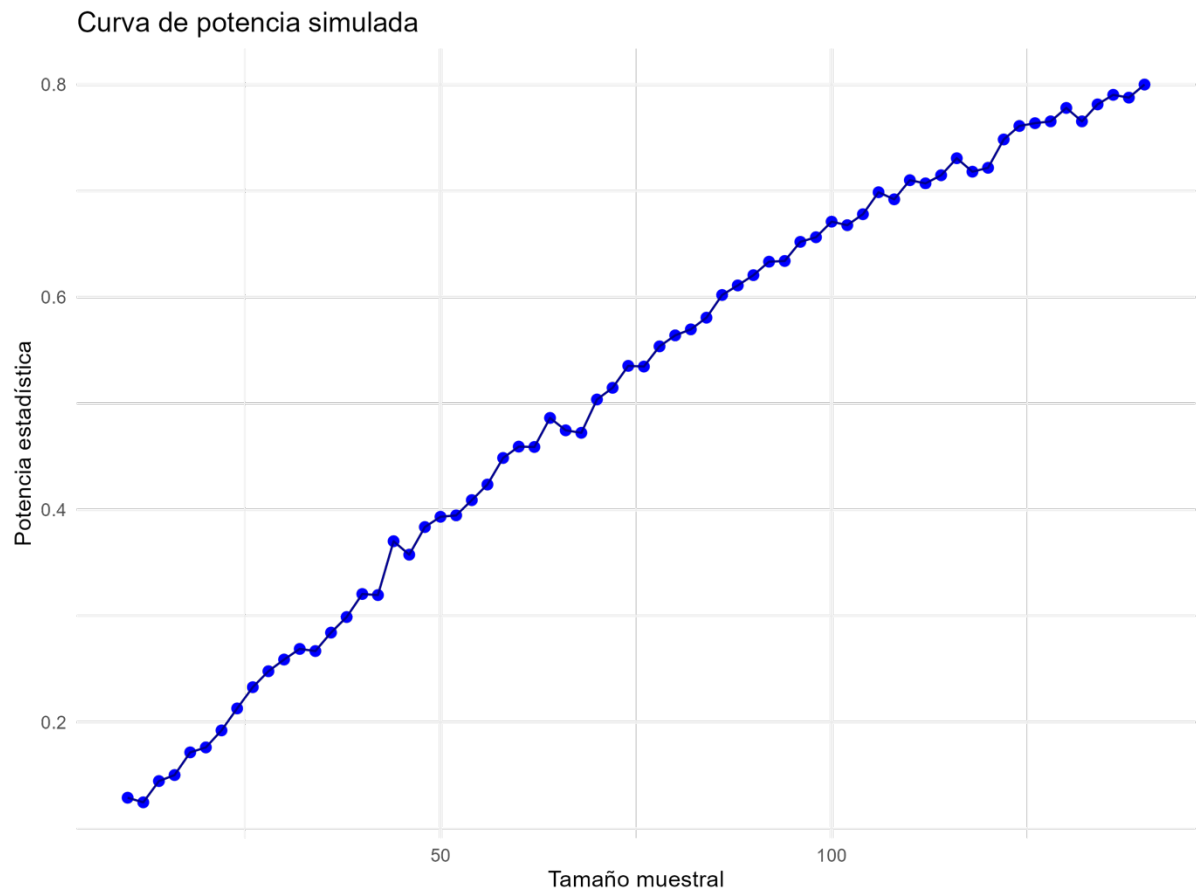


Figura 2: Evolución de la potencia conforme al incremento del tamaño muestral.

Resultados para el diseño de muestras independientes con correlación 0,3 y tamaño de efecto 0,15.

Tam_muestral	Potencia	Tam_muestral	Potencia
10	0,13375	68	0,54175
12	0,14025	70	0,566
14	0,154	72	0,5655
16	0,1685	74	0,577
18	0,18325	76	0,605
20	0,19125	78	0,61925
22	0,22425	80	0,618
24	0,2335	82	0,6245
26	0,2355	84	0,637
28	0,26575	86	0,653
30	0,27375	88	0,65925
32	0,29825	90	0,67
34	0,31075	92	0,6695
36	0,322	94	0,67375
38	0,3285	96	0,69975
40	0,36575	98	0,7075
42	0,3685	100	0,71625
44	0,396	102	0,72875
46	0,41625	104	0,73425
48	0,42475	106	0,74475
50	0,42325	108	0,7505
52	0,436	110	0,754
54	0,46925	112	0,7805
56	0,4695	114	0,76875
58	0,4975	116	0,7715
60	0,50125	118	0,78075
62	0,50325	120	0,792
64	0,532	122	0,80825
66	0,55425		

Tabla 3: Tamaño de muestra y potencia asociada para este caso. Se alcanza la potencia deseada ($P=0,8$) para un tamaño muestral de 122 individuos.

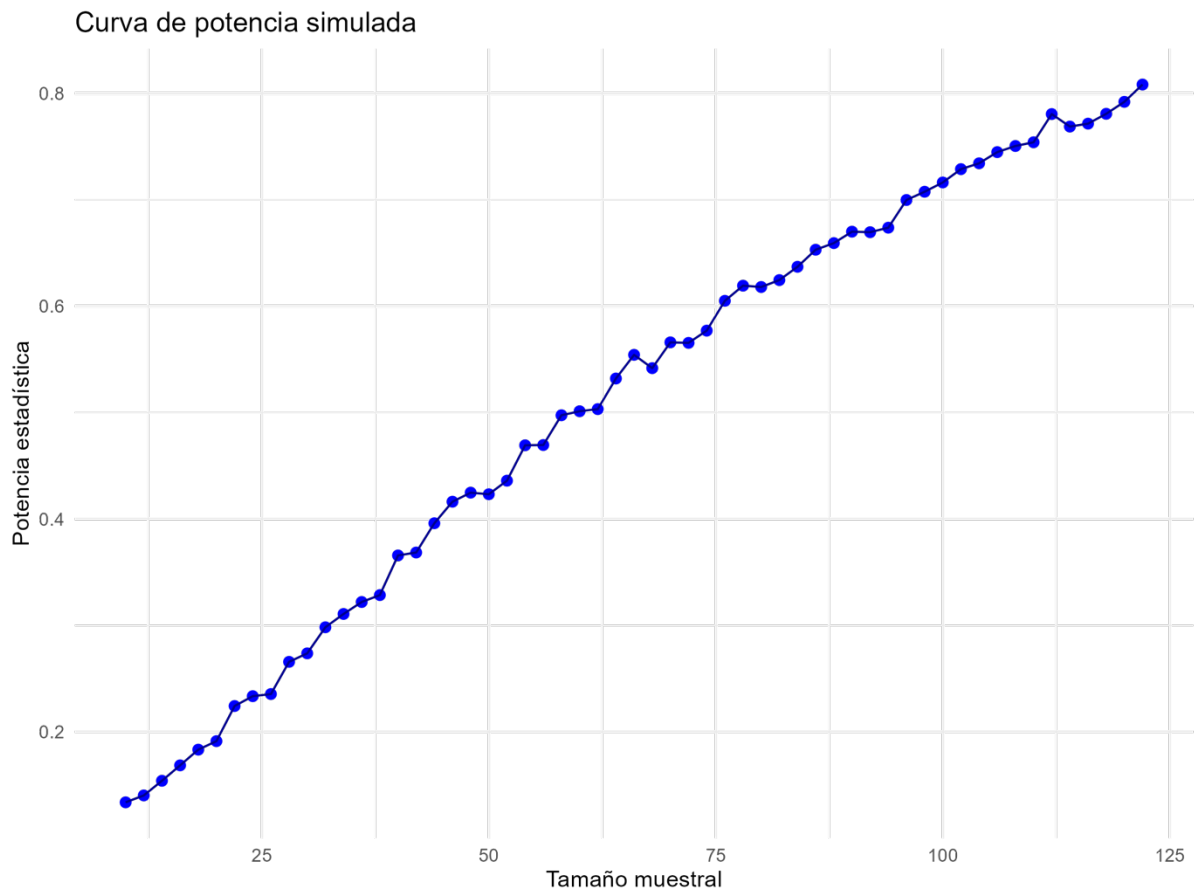


Figura 3: Evolución de la potencia conforme al incremento del tamaño muestral.

Resultados para el diseño de muestras pareadas con correlaciones 0.1, 0.2 y 0.3 y tamaño de efecto 0,15.

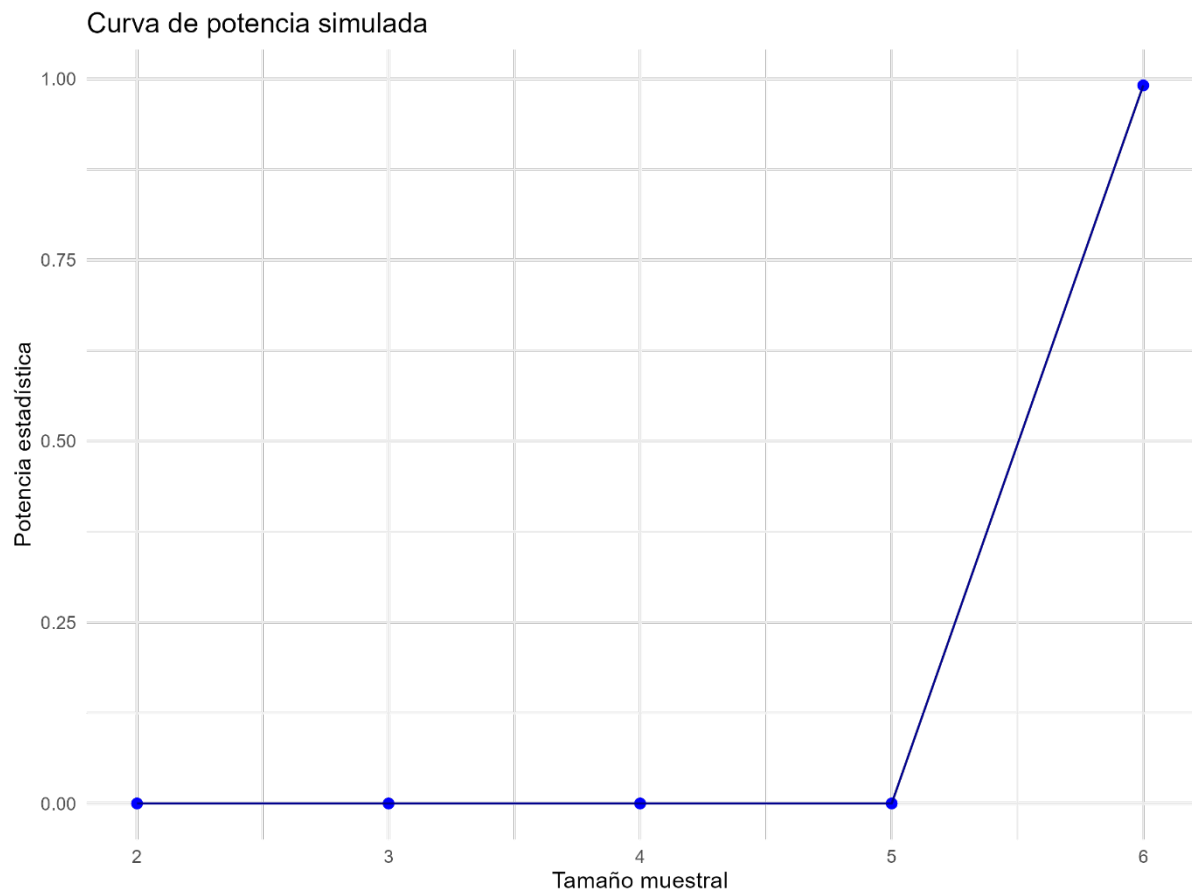


Figura 4: En los experimentos pareados se alcanzaron los valores deseados de potencia con un tamaño muestral de 6 individuos.

4.1.2. Simulación para t_y variable y correlación constante.

Se utilizarán como parámetros de la simulación:

- Media de X e Y : $\mu_x = 10$ y $\mu_y = 20$.
- Desviaciones típicas de X e Y : $\sigma_x = 3$ y $\sigma_y = 6$.
- $t_y = 10\%$, 20% y 30% de incremento sobre la variable Y en cada simulación.
- correlación: $0,25$ en cada simulación.

La simulación arranca con un tamaño muestral de 10 individuos.

Se realizarán 3000 repeticiones para cada uno de los tamaños muestrales.

Resultados para el diseño de muestras independientes con correlación 0,25 y tamaño de efecto 0,10.

Tam_muestral	Potencia	Tam_muestral	Potencia	Tam_muestral	Potencia
10	0,0950	98	0,3790	186	0,6323
12	0,0843	100	0,3813	188	0,6320
14	0,0980	102	0,4033	190	0,6360
16	0,0947	104	0,3870	192	0,6377
18	0,1163	106	0,4240	194	0,6517
20	0,1113	108	0,4253	196	0,6430
22	0,1130	110	0,4270	198	0,6500
24	0,1283	112	0,4147	200	0,6560
26	0,1383	114	0,4347	202	0,6650
28	0,1627	116	0,4263	204	0,6560
30	0,1553	118	0,4413	206	0,6597
32	0,1563	120	0,4327	208	0,6697
34	0,1610	122	0,4553	210	0,6810
36	0,1687	124	0,4733	212	0,6673
38	0,1700	126	0,4697	214	0,6880
40	0,1807	128	0,4710	216	0,7007
42	0,1777	130	0,4910	218	0,7050
44	0,2227	132	0,4863	220	0,6917
46	0,2057	134	0,4867	222	0,7043
48	0,2170	136	0,4910	224	0,6997
50	0,2230	138	0,4877	226	0,7143
52	0,2333	140	0,5097	228	0,7023
54	0,2327	142	0,5120	230	0,7290
56	0,2403	144	0,5243	232	0,7293
58	0,2440	146	0,5380	234	0,7293
60	0,2607	148	0,5403	236	0,7360
62	0,2680	150	0,5373	238	0,7370
64	0,2797	152	0,5520	240	0,7310
66	0,2747	154	0,5547	242	0,7410
68	0,2680	156	0,5793	244	0,7383
70	0,2720	158	0,5587	246	0,7457
72	0,2890	160	0,5750	248	0,7470
74	0,3123	162	0,5727	250	0,7447
76	0,3047	164	0,5660	252	0,7673
78	0,3177	166	0,5770	254	0,7553
80	0,3197	168	0,5883	256	0,7537
82	0,3180	170	0,6070	258	0,7693
84	0,3223	172	0,6007	260	0,7613
86	0,3420	174	0,6160	262	0,7713
88	0,3577	176	0,6137	264	0,7900
90	0,3693	178	0,6033	266	0,7773
92	0,3733	180	0,6153	268	0,7737
94	0,3660	182	0,6063	270	0,8063
96	0,3670	184	0,6130		

Tabla 4: Tamaño de muestra y potencia asociada para este caso. Se alcanza la potencia deseada (P=0,8) para un tamaño muestral de 270 individuos.

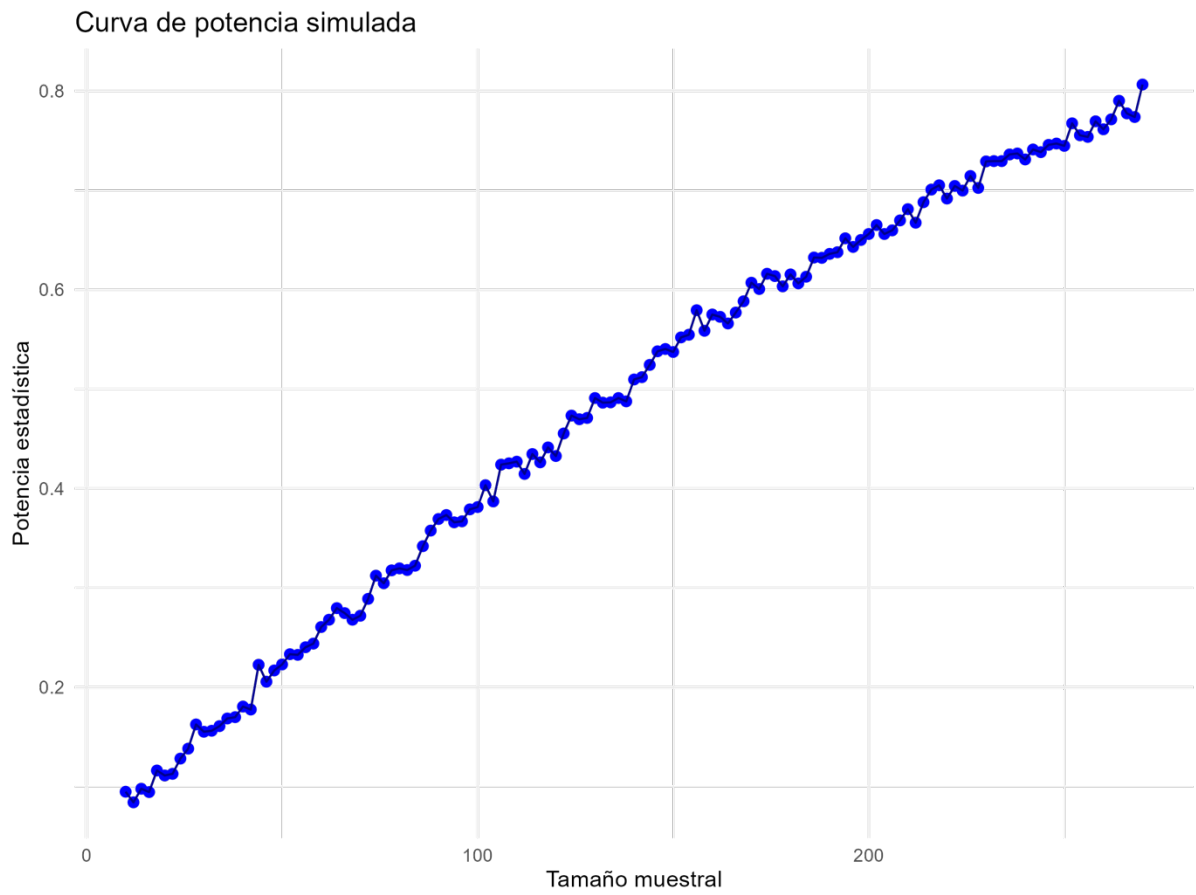


Figura 5: Evolución de la potencia conforme al incremento del tamaño muestral.

Resultados para el diseño de muestras independientes con correlación 0,25 y tamaño de efecto 0,20.

Tam_muestral	Potencia	Tam_muestral	Potencia
10	0,1817	46	0,5750
12	0,1893	48	0,6010
14	0,2233	50	0,6253
16	0,2367	52	0,6350
18	0,2677	54	0,6363
20	0,2943	56	0,6590
22	0,3127	58	0,6797
24	0,3440	60	0,6913
26	0,3713	62	0,7037
28	0,3953	64	0,7357
30	0,4283	66	0,7337
32	0,4303	68	0,7353
34	0,4597	70	0,7603
36	0,4787	72	0,7663
38	0,4960	74	0,7890
40	0,5097	76	0,7933
42	0,5170	78	0,8193
44	0,5733		

Tabla 5: Tamaño de muestra y potencia asociada para este caso. Se alcanza la potencia deseada ($P=0,8$) para un tamaño muestral de 78 individuos.

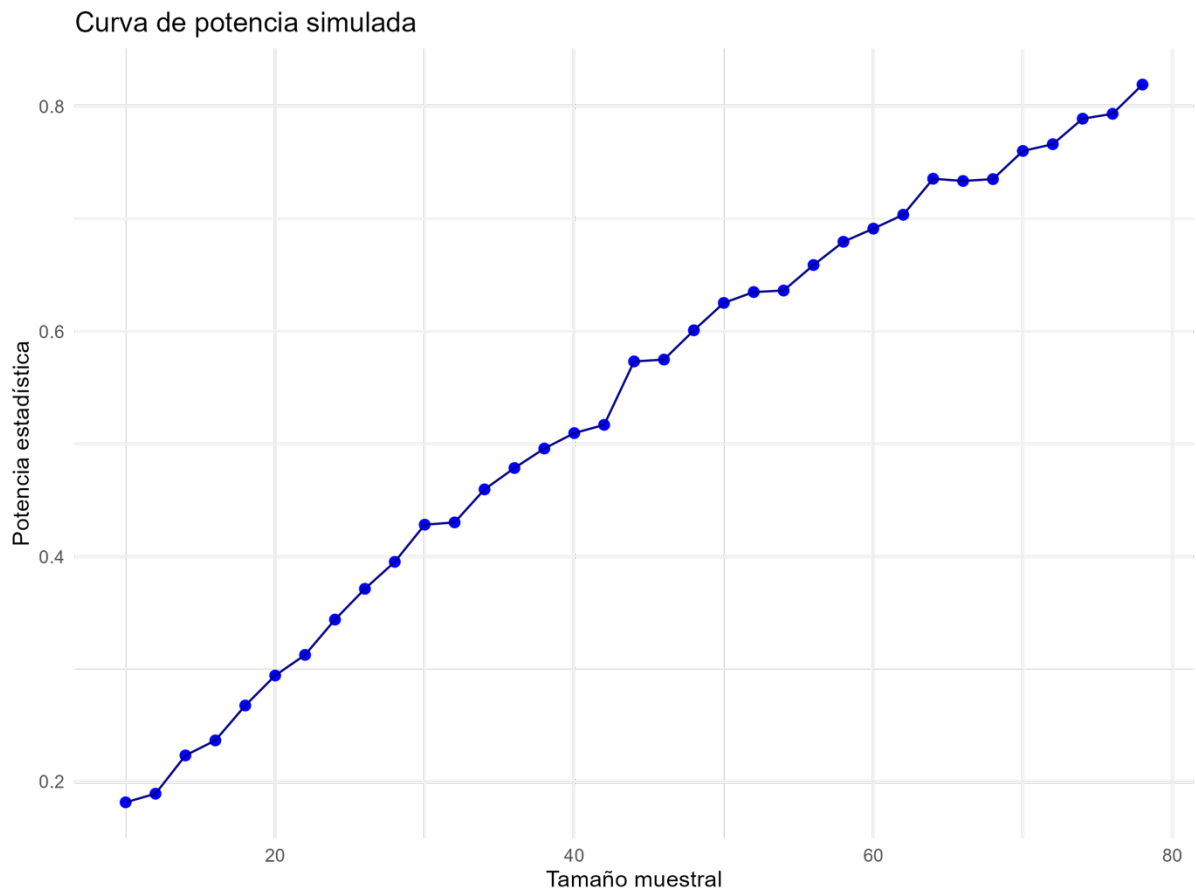


Figura 6: Evolución de la potencia conforme al incremento del tamaño muestral.

Resultados para el diseño de muestras independientes con correlación 0,25 y tamaño de efecto 0,30.

Tam_muestral	Potencia	Tam_muestral	Potencia
10	0,2920	25	0,6293
11	0,3050	26	0,6427
12	0,3267	27	0,6597
13	0,3590	28	0,6820
14	0,3877	29	0,6847
15	0,4030	30	0,6983
16	0,4417	31	0,7157
17	0,4617	32	0,7270
18	0,4787	33	0,7330
19	0,5010	34	0,7610
20	0,5263	35	0,7703
21	0,5393	36	0,7890
22	0,5603	37	0,7933
23	0,5780	38	0,8077
24	0,6153		

Tabla 6: Tamaño de muestra y potencia asociada para este caso. Se alcanza la potencia deseada ($P=0,8$) para un tamaño muestral de 38 individuos.

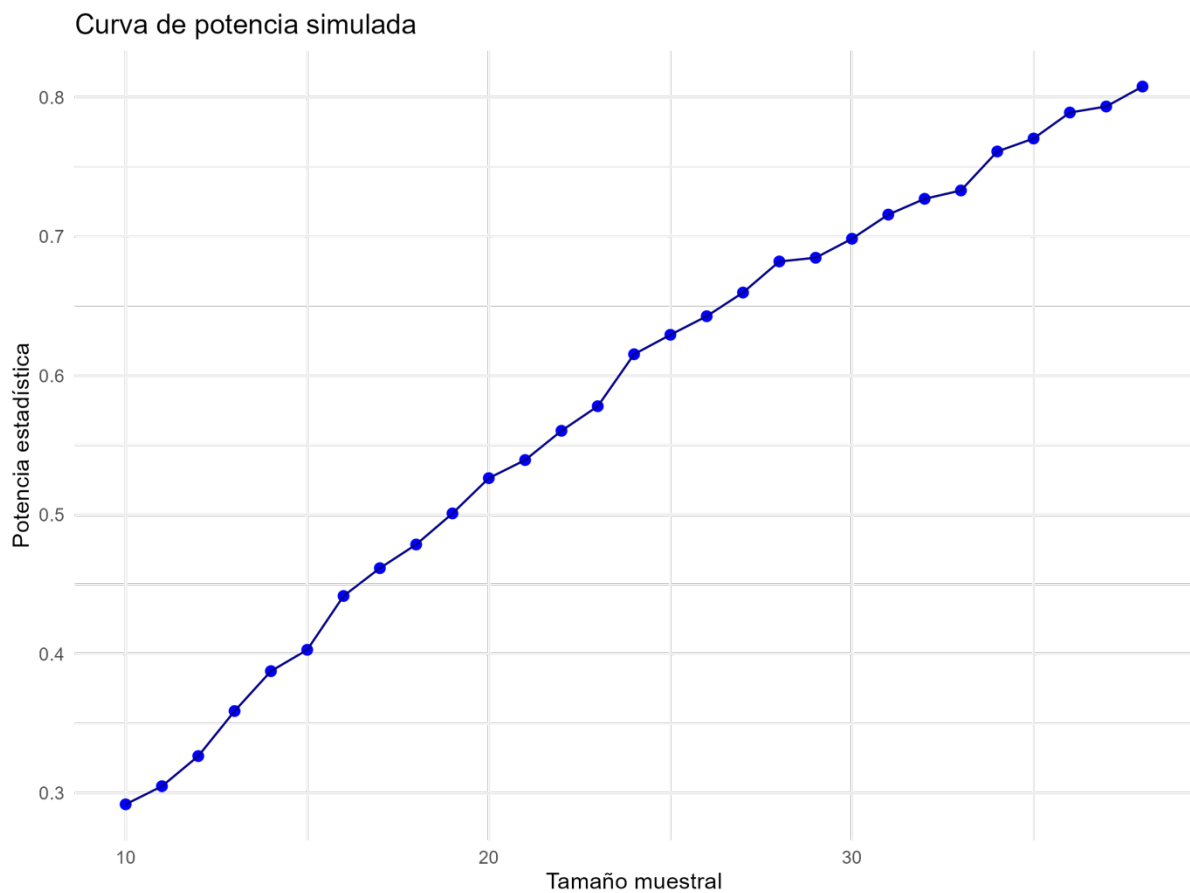


Figura 7: Evolución de la potencia conforme al incremento del tamaño muestral.

Resultados para el diseño de muestras pareadas con correlación 0.25 y tamaños de efecto 0.10, 0.20 y 0.30

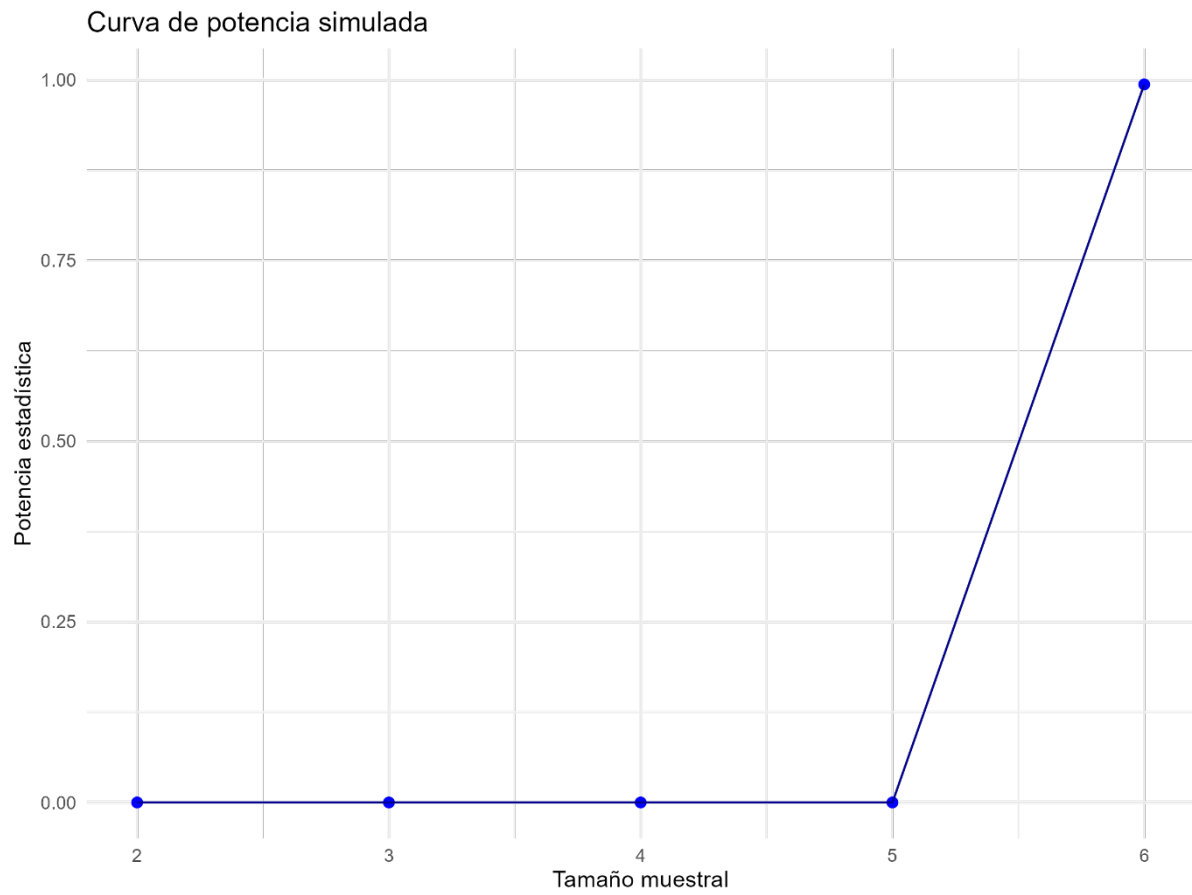


Figura 8: En los experimentos pareados se alcanzaron los valores deseados de potencia con un tamaño muestral de 6 individuos.

4.2. Aplicación en casos clínicos

Finalmente, para alcanzar el **Objetivo 5**, se verificó el progreso del modelo propuesto como alternativa de cálculo, y objeto de esta tesis, en términos de superación de las actuales restricciones metodológicas para la determinación del tamaño muestral mínimo. Esta determinación se aplicó sobre tres marcadores biomédicos reales y con potencial predictivo y/o diagnóstico, derivados del cociente entre dos variables con diferentes grados de vinculación posible en términos de correlación estadística, y condiciones experimentales que imposibilitan la asunción de normalidad probabilística, *a priori*.

4.2.1. Cálculo del tamaño muestral por simulación para la evaluación de la relación colesterol total/HDL como predictor de riesgo cardiovascular.

En el caso del colesterol total (CT), los valores de referencia son:

- Media en adultos sanos: 190 - 200 mg/dL
- Desviación típica: 35 - 40 mg/dL
- Valores de referencia clínicos (NCEP, 2002; OMS):
Deseable: < 200 mg/dL
Límite alto: 200–239 mg/dL
Alto: \geq 240 mg/dL

Para el colesterol de alta densidad (HDL):

- Media en adultos sanos:
Hombres: 50 mg/dL
Mujeres: 60 mg/dL
- Desviación típica: 12 - 15 mg/dL
- Valores clínicos recomendados:
Bajo (riesgo cardiovascular aumentado):
Hombres: < 40 mg/dL
Mujeres: < 50 mg/dL
Protector (riesgo cardiovascular menor):

Ambos sexos: ≥ 60 mg/dL

Para el caso del cociente CT/HDL, los valores de referencia son:

- Media (promedio): 4.0 - 4.5
- Desviación estándar (DE): 1.0 – 1.2

Se ha estudiado la correlación entre CT y HDL, estimándose un valor de r de Pearson entre 0,25 y 0,35 (Carroll et al., 2012).

Esta correlación es baja, pues el procedimiento de cálculo de CT se basa en la fórmula de Friedewalde:

$$CT = LDL + HDL + \frac{\text{Triglicéridos}}{5}$$

Como el colesterol HDL es una fracción del CT, influye poco en el valor total. Además, el HDL puede variar de manera independiente respecto al LDL y los triglicéridos por factores genéticos, dieta o actividad física.

En este trabajo de simulación se ha considerado como supuesto científico el desarrollo de terapias para el descenso de la ratio CT/HDL sobre un modelo murino con predisposición genética al desarrollo de altos niveles de CT. Se consideran los valores medios iniciales descritos anteriormente y se asume que el posible efecto de un principio activo de diseño suponga un incremento del 15% en la concentración de HDL en plasma.

En este modelo, el vector de medias utilizado sería (225, 55) y la matriz de varianzas y covarianzas:

$$\begin{bmatrix} 1225 & 141,75 \\ 141,75 & 182,25 \end{bmatrix}$$

Se simularon ambos diseños experimentales (muestras independientes y pareadas) con los mismos parámetros:

- $t_y = 15\%$ de incremento sobre la variable Y .
- tamaño muestral inicial = 10
- 3000 repeticiones para cada uno de los tamaños muestrales

Diseño de muestras independientes

Los resultados obtenidos fueron:

Tam_muestral	Potencia	Tam_muestral	Potencia
10	0,1925	33	0,5704
11	0,1967	34	0,5826
12	0,2012	35	0,5996
13	0,2710	36	0,6042
14	0,2806	37	0,6418
15	0,2978	38	0,6392
16	0,3092	39	0,6458
17	0,3350	40	0,6504
18	0,3562	41	0,6820
19	0,3684	42	0,6906
20	0,3886	43	0,7060
21	0,4090	44	0,7024
22	0,4298	45	0,7162
23	0,4404	46	0,7188
24	0,4422	47	0,7220
25	0,4654	48	0,7274
26	0,4722	49	0,7542
27	0,4894	50	0,7584
28	0,5140	51	0,7648
29	0,5302	52	0,7746
30	0,5434	53	0,7760
31	0,5594	54	0,7934
32	0,5778	55	0,8048

Tabla 7: resultados obtenidos en el ensayo de muestras independientes para el cociente CT/HDL. La potencia deseada, 0.80, se alcanza para un tamaño muestral de 55 individuos.

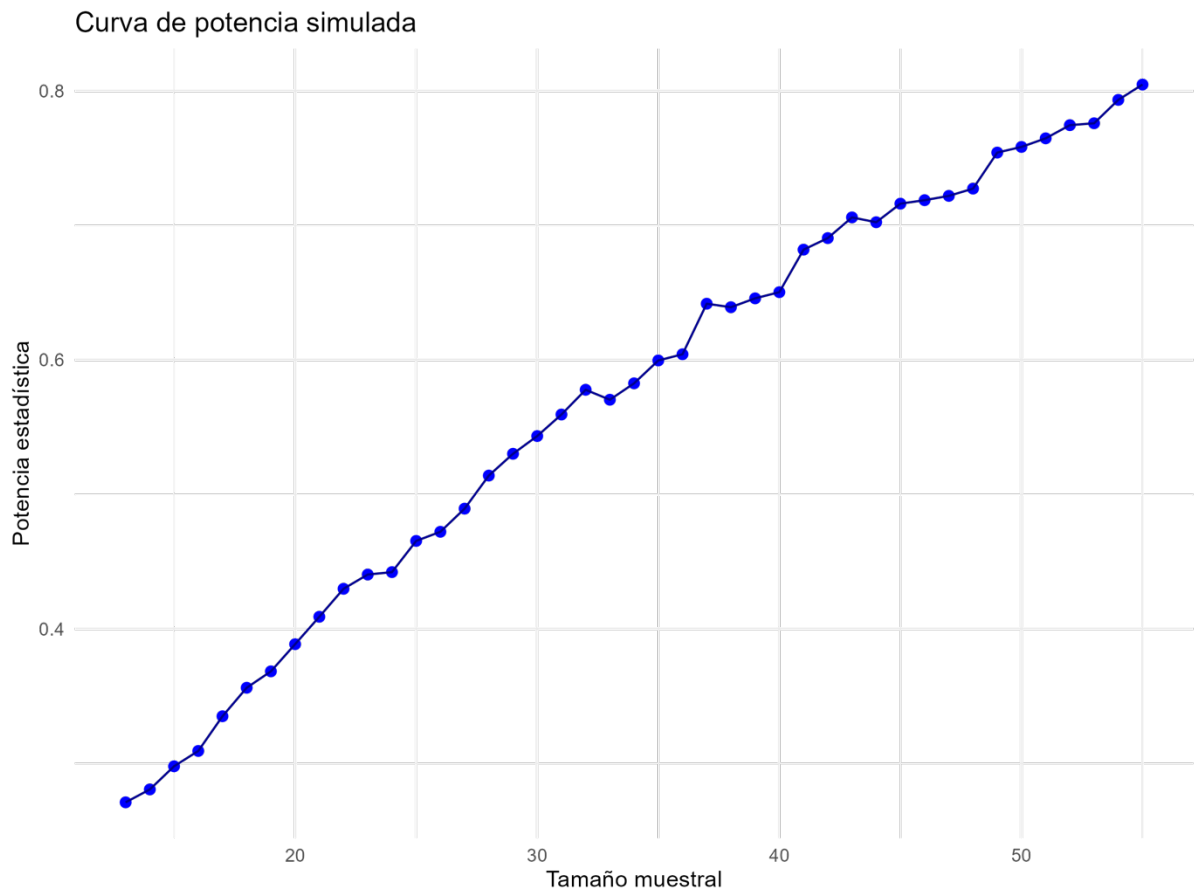


Figura 9: Gráfica de potencia para el cálculo de tamaño muestral mínimo para el cociente CT/HDL correspondiente al diseño de muestras independientes

Diseño de muestras pareadas

Los resultados obtenidos fueron:

Tam_muestral	Potencia	Tam_muestral	Potencia
2	0	5	0,0000
3	0,0000	6	0,9993

Tabla 8: resultados obtenidos en el ensayo de muestras pareadas para el cociente CT/HDL. La potencia deseada, mayor o igual a 0.80, se alcanza para un tamaño muestral de 6 individuos

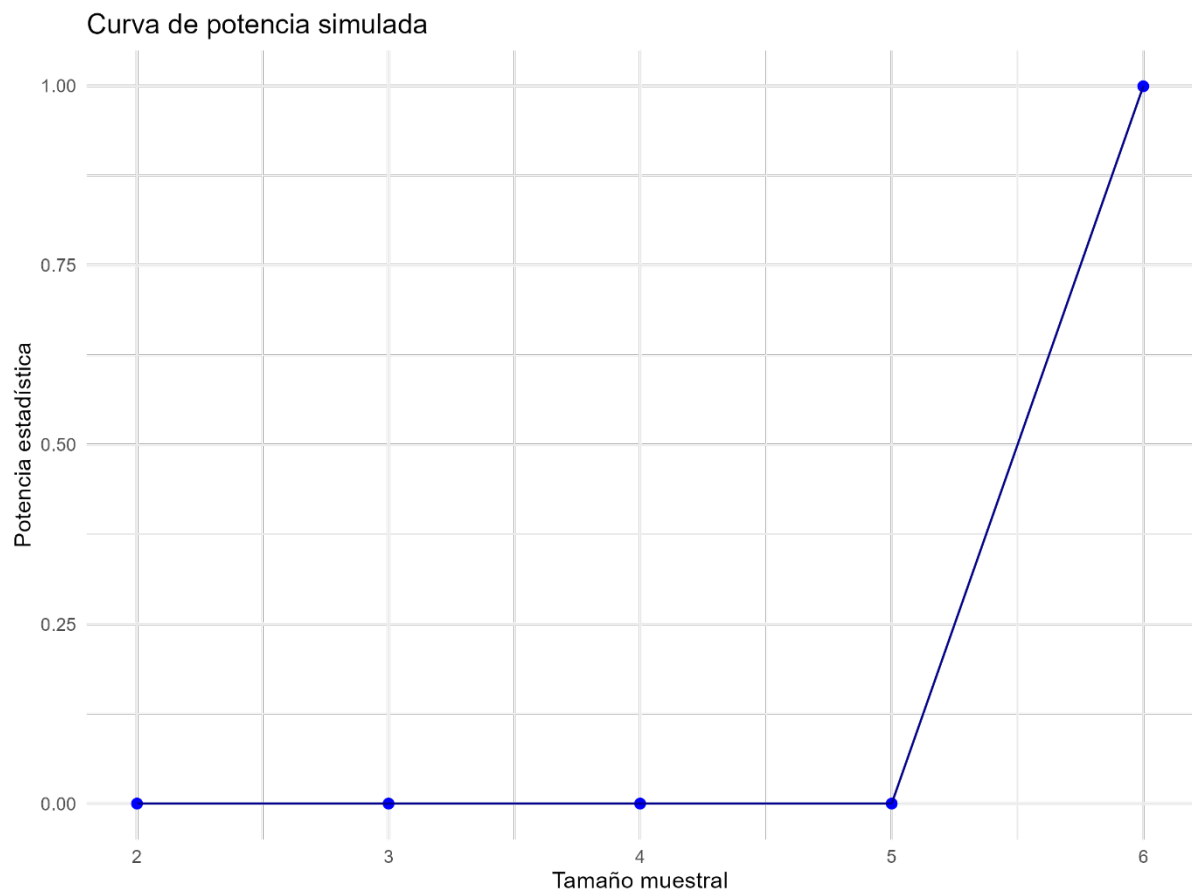


Figura 10: Gráfica de potencia para el cálculo de tamaño muestral mínimo para el cociente CT/HDL correspondiente al diseño de muestras pareadas.

4.2.2. Cálculo del tamaño muestral por simulación para la evaluación de la relación PCR/HDL-C como predictor de ateromatosis carotídea.

En el caso de la Proteína C Reactiva, los valores de referencia son:

- Media en adultos sanos: 0,8 – 2,9 mg/L (se utilizará 1,65 en la simulación)
- Desviación típica: 1,0 – 1,5 mg/dL (se utilizará 1,25 en la simulación)
- Valores de referencia clínicos en categorías de riesgo cardiovascular (AHA/CDC, 2003):
Bajo riesgo: < 1 mg/L
Riesgo intermedio: 1,0 – 3,0 mg/L
Alto riesgo: \geq 3,0 mg/L

Para el colesterol de alta densidad (HDL):

- Media en adultos sanos (se utilizará la media entre la de hombres y la de mujeres a efectos de simulación sin tener en consideración el sexo; 55):
Hombres: 50 mg/dL
Mujeres: 60 mg/dL
- Desviación típica: 12 - 15 mg/dL (se utilizará 13,5 en la simulación)
- Valores clínicos recomendados:
Bajo (riesgo cardiovascular aumentado):
Hombres: < 40 mg/dL
Mujeres: < 50 mg/dL
Protector (riesgo cardiovascular menor):
Ambos sexos: \geq 60 mg/dL

Para el caso del cociente PCR/HDL, los valores de referencia estimados son:

- Media: 0,02 – 0,05 mg/L por mg/dL
- Desviación típica: 1,0 – 1,2 mg/L por mg/dL

Estos valores suelen ser pequeños puesto que este cociente tiene unidades compuestas (mg/L \div mg/dL).

Al considerarse esta relación como un marcador compuesto de inflamación (representado por la PCR) y de protección cardiovascular (HDL), valores altos del cociente sugieren un mayor riesgo cardiovascular. Así, los valores asociados a los niveles de riesgo son:

Riesgo cardiovascular bajo: $<0,03$

Riesgo cardiovascular intermedio: $0,03 - 0,08$

Riesgo elevado: $> 0,08 - 0,1$

Riesgo Cardiovascular muy alto (posible inflamación crónica): $> 0,10$

El valor de correlación medido como la r de Pearson entre la PCR y el colesterol HDL toma valores de $-0,45$ a $-0,25$ (en la simulación se utilizará $-0,35$).

En este trabajo de simulación se ha considerado como supuesto científico el desarrollo de terapias para el descenso de la ratio PCR/HDL sobre un modelo murino con predisposición genética al desarrollo de altos niveles de CT. Se consideran los valores medios iniciales descritos anteriormente y se asume que el posible efecto de un principio activo de diseño suponga un incremento del 15% en la concentración de HDL en plasma.

En este modelo, el vector de medias utilizado sería $(1,65, 55)$ y la matriz de varianzas y covarianzas:

$$\begin{bmatrix} 1,56 & -5,906 \\ -5,906 & 182,25 \end{bmatrix}$$

Se simularon ambos diseños experimentales (muestras independientes y pareadas) con los mismos parámetros:

- $t_y = 15\%$ de incremento sobre la variable Y .
- tamaño muestral inicial = 10
- 3000 repeticiones para cada uno de los tamaños muestrales

Diseño de muestras independientes

Los resultados obtenidos fueron:

Tam_muestral	Potencia	Tam_muestral	Potencia	Tam_muestral	Potencia
12	0,0625	267	0,3933	522	0,6245
17	0,0675	272	0,3938	527	0,65175
22	0,0793	277	0,3933	532	0,64325
27	0,0835	282	0,4045	537	0,6425
32	0,0870	287	0,3855	542	0,644
37	0,0965	292	0,4088	547	0,65325
42	0,1043	297	0,4085	552	0,65375
47	0,1068	302	0,41175	557	0,66525
52	0,1020	307	0,4155	562	0,6655
57	0,1248	312	0,42525	567	0,65875
62	0,1320	317	0,442	572	0,68225
67	0,1250	322	0,429	577	0,683
72	0,1353	327	0,44025	582	0,6915
77	0,1295	332	0,4525	587	0,681
82	0,1528	337	0,44375	592	0,69075
87	0,1523	342	0,45975	597	0,7005
92	0,1555	347	0,4605	602	0,689
97	0,1658	352	0,4775	607	0,6945
102	0,1883	357	0,48	612	0,7
107	0,1680	362	0,4795	617	0,72875
112	0,1865	367	0,4975	622	0,709
117	0,1880	372	0,49425	627	0,717
122	0,1953	377	0,50725	632	0,7055
127	0,2050	382	0,51875	637	0,733
132	0,2015	387	0,50525	642	0,71875
137	0,2168	392	0,5085	647	0,73225
142	0,2300	397	0,52075	652	0,72475
147	0,2313	402	0,52125	657	0,745
152	0,2288	407	0,5325	662	0,74275
157	0,2488	412	0,53475	667	0,73525
162	0,2530	417	0,54125	672	0,73875
167	0,2628	422	0,5395	677	0,7515
172	0,2610	427	0,5645	682	0,74525
177	0,2528	432	0,54975	687	0,74925
182	0,2738	437	0,554	692	0,75325
187	0,2878	442	0,5605	697	0,7575
192	0,2903	447	0,58175	702	0,76925
197	0,3048	452	0,566	707	0,77
202	0,3000	457	0,559	712	0,7675
207	0,2893	462	0,59375	717	0,77725
212	0,2955	467	0,59175	722	0,76475
217	0,3203	472	0,59475	727	0,784
222	0,3428	477	0,588	732	0,78375
227	0,3288	482	0,6025	737	0,77575
232	0,3288	487	0,61475	742	0,781
237	0,3373	492	0,59825	747	0,7995
242	0,3573	497	0,6205	752	0,78625
247	0,3498	502	0,601	757	0,79325
252	0,3715	507	0,61525	762	0,80125
257	0,3535	512	0,63625		
262	0,3805	517	0,6215		

Tabla 9: resultados obtenidos en el ensayo de muestras independientes para el cociente PCR/HDL. La potencia deseada, 0.80, se alcanza para un tamaño muestral de 762 individuos.

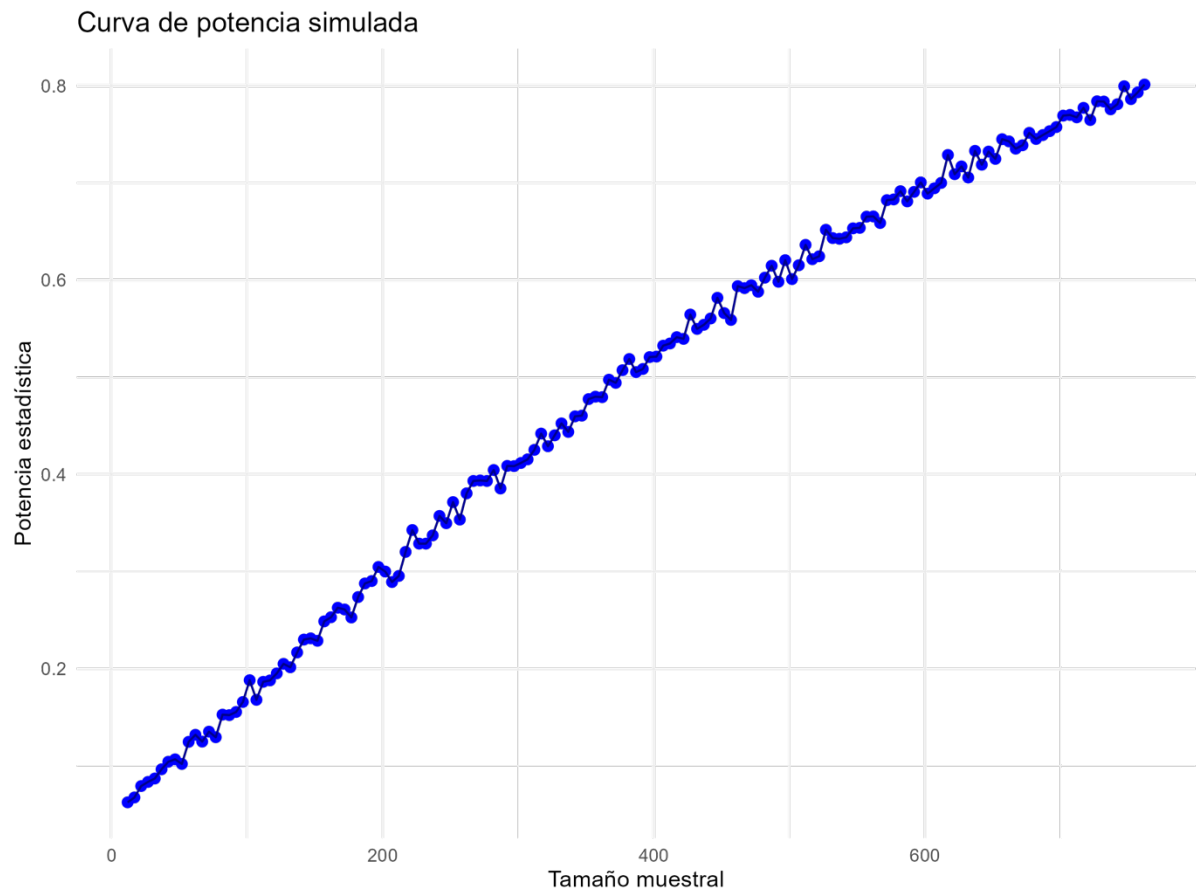


Figura 11: Gráfica de potencia para el cálculo de tamaño muestral para el cociente PCR/HDL correspondiente al diseño de muestras independientes

Diseño de muestras pareadas

Los resultados obtenidos fueron:

Tam_muestral	Potencia	Tam_muestral	Potencia
2	0,0000	6	0,4740
3	0,0000	7	0,0689
4	0,0000	8	0,7756
5	0,0000	9	0,0837

Tabla 10: resultados obtenidos en el ensayo de muestras pareadas para el cociente PCR/HDL. La potencia deseada, 0.80, se alcanza para un tamaño muestral de 9 individuos.

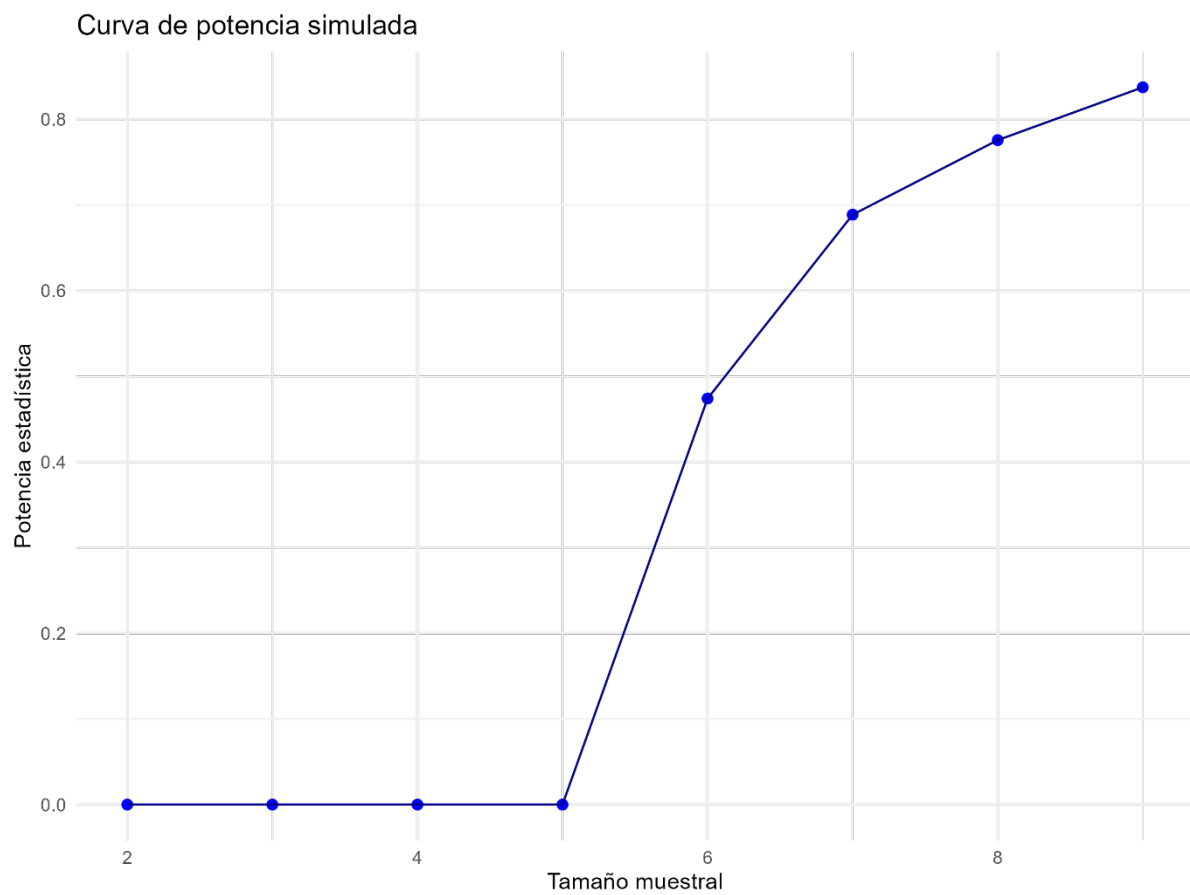


Figura 12: Gráfica de potencia para el cálculo de tamaño muestral para el cociente PCR/HDL correspondiente al diseño de muestras pareadas

4.2.3. Cálculo del tamaño muestral por simulación para la evaluación de la relación A β 1-42/A β 1-40 como Biomarcador en la Enfermedad de Alzheimer y su Utilidad Diferencial frente a la Demencia Frontotemporal.

En este trabajo de simulación se ha considerado un supuesto científico del desarrollo de terapias para la disminución de la ratio A β 1-42/A β 1-40 sobre un modelo murino con predisposición genética al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Se consideran los valores medios iniciales descritos en la tabla 1 y se asume que el posible efecto de un principio activo de diseño suponga un incremento del 15% en la concentración de A β 40 en plasma.

	Valores medios	Unidades	Desv típica
A β 1-40	153,6	pg/ml	46,7
A β 1-42	68,7	Pg/ml	24,2

Tabla 11: valores medios de A β 40 y A β 42 en plasma (técnica menos invasiva que en líquido cefaloraquídeo) de enfermos de enfermedad de Alzheimer (basado en Mayeux et al., 2003). En el mismo trabajo se define el coeficiente de correlación entre ambas variables como $r = 0.22$ ($p_valor=0.001$).

En este modelo, el vector de medias utilizado sería (153.6, 68.7) y la matriz de varianzas y covarianzas:

$$\begin{bmatrix} 585,64 & 248,63 \\ 248,63 & 2180,89 \end{bmatrix}$$

Se simularon ambos diseños experimentales (muestras independientes y pareadas) con los mismos parámetros:

- $t_y = 15\%$ de incremento sobre la variable Y .
- tamaño muestral inicial = 10
- 3000 repeticiones para cada uno de los tamaños muestrales

Diseño de muestras independientes

Los resultados obtenidos fueron:

Tam_muestral	Potencia	Tam_muestral	Potencia
12	0,1102	90	0,5410
14	0,1287	92	0,5392
16	0,1408	94	0,5595
18	0,1455	96	0,5763
20	0,1690	98	0,5747
22	0,1670	100	0,5868
24	0,1942	102	0,5847
26	0,2000	104	0,6138
28	0,2103	106	0,5975
30	0,2192	108	0,6197
32	0,2333	110	0,6157
34	0,2532	112	0,6320
36	0,2563	114	0,6433
38	0,2672	116	0,6445
40	0,2725	118	0,6572
42	0,2918	120	0,6577
44	0,3093	122	0,6760
46	0,3193	124	0,6802
48	0,3215	126	0,6902
50	0,3325	128	0,6925
52	0,3450	130	0,6905
54	0,3647	132	0,7040
56	0,3735	134	0,7058
58	0,3830	136	0,7122
60	0,3912	138	0,7250
62	0,3938	140	0,7210
64	0,4232	142	0,7225
66	0,4225	144	0,7372
68	0,4392	146	0,7412
70	0,4383	148	0,7418
72	0,4478	150	0,7590
74	0,4715	152	0,7685
76	0,4665	154	0,7653
78	0,4827	156	0,7705
80	0,4943	158	0,7805
82	0,5082	160	0,7923
84	0,5052	162	0,7825
86	0,5277	164	0,7950
88	0,5358	166	0,81083

Tabla 12: resultados obtenidos en el ensayo de muestras independientes para el cociente $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$. La potencia deseada, 0.80, se alcanza para un tamaño muestral de 166 individuos.

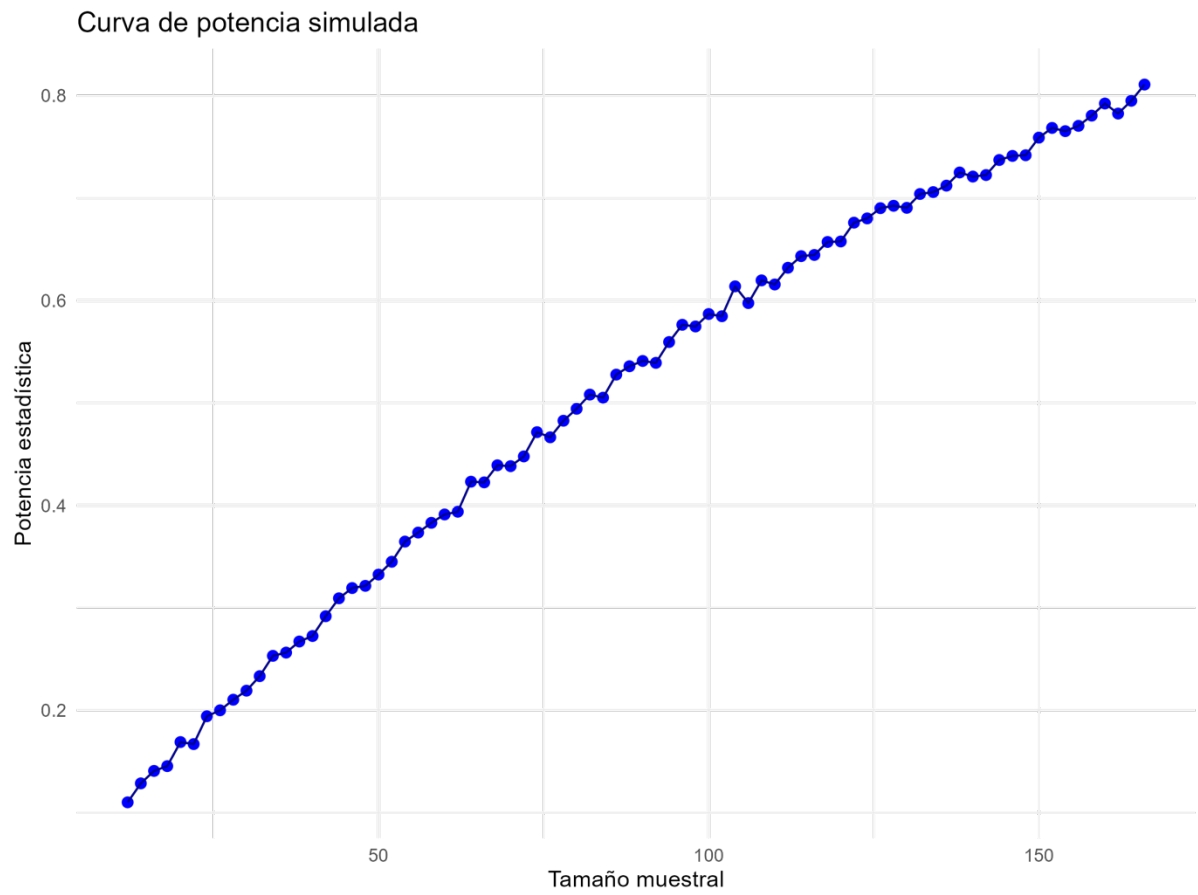


Figura 13: Gráfica de potencia para el cálculo de tamaño muestral para el cociente $A\beta 1-42/A\beta 1-40$. correspondiente al diseño de muestras independientes

Diseño de muestras pareadas

Los resultados obtenidos fueron:

Tam_muestral	Potencia	Tam_muestral	Potencia
2	0,0000	5	0,0000
3	0,0000	6	0,0000
4	0,0000		

Tabla 13: resultados obtenidos en el ensayo de muestras pareadas para el cociente $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$. La potencia deseada, mayor o igual a 0.80, se alcanza para un tamaño muestral de 6 individuos.

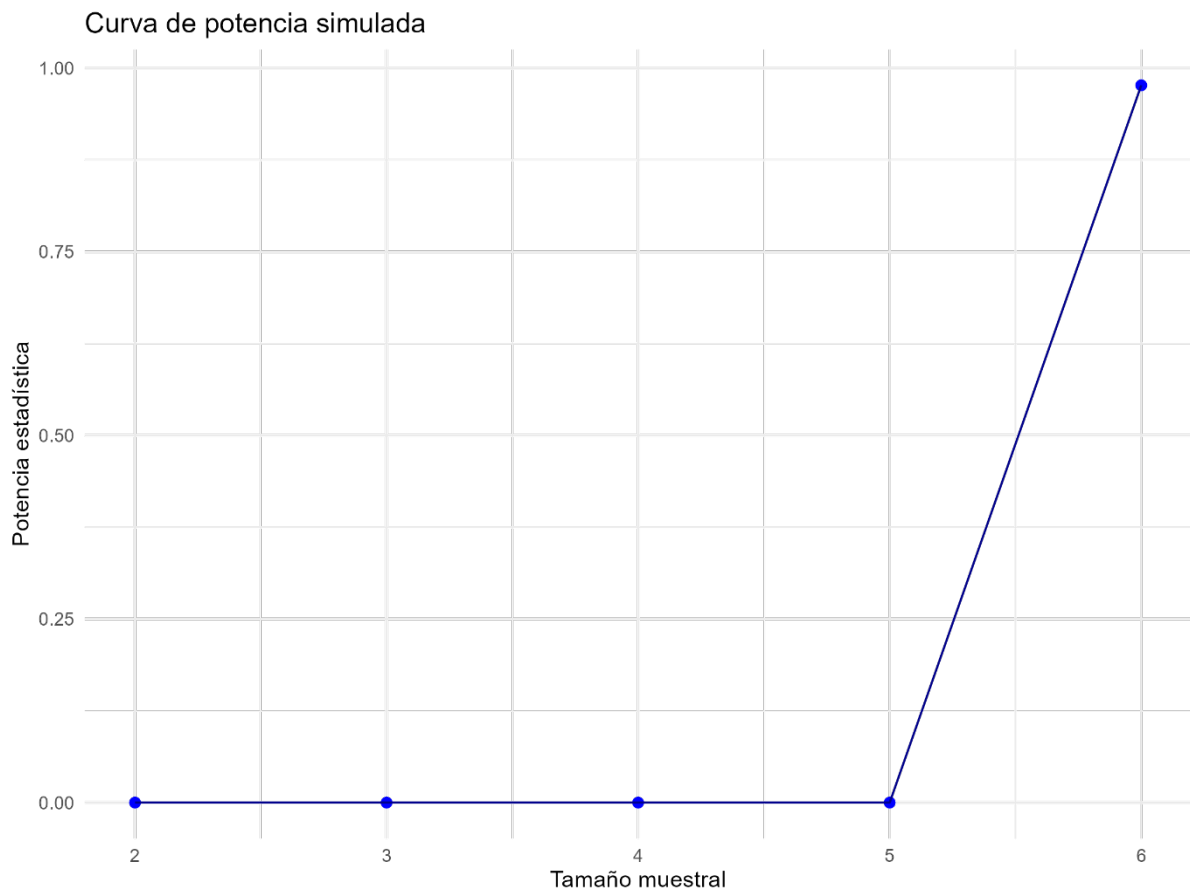


Figura 14: Gráfica de potencia para el cálculo de tamaño muestral para el cociente $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ correspondiente al diseño de muestras pareadas

5. Discusión

La principal idea que subraya esa tesis es la máxima de que diseño experimental constituye uno de los pilares fundamentales en la investigación científica, y uno de sus elementos esenciales es la determinación adecuada del tamaño muestral mínimo necesario para alcanzar conclusiones válidas, fiables y replicables, observando cuidadosamente las implicaciones éticas, científicas y estadísticas en su cálculo, con énfasis en su impacto sobre la validez interna y externa de los experimentos.

Sobre esta idea general, se desarrolló toda una metodología basada en que el concepto de tamaño muestral mínimo, referido al número mínimo de unidades experimentales que se requieren para responder adecuadamente a las preguntas de investigación planteadas, reduciendo al mínimo los errores de interpretación (Gigerenzer et al., 2004), impacta directamente en la viabilidad y la fiabilidad del diseño y en que, por tanto, la disposición de un tamaño muestral inadecuado podría tener consecuencias metodológicas y éticas graves, conduciendo a resultados espurios o no concluyentes, e implicando desperdicio de recursos o, en estudios con seres vivos, sufrimiento innecesario (Moher et al., 2010).

Desde una perspectiva científica, en esta tesis se ha tenido constantemente en cuenta que el tamaño muestral define, en gran medida, la capacidad del experimento para detectar diferencias reales o efectos significativos. De hecho, en los procedimientos experimentales, en los que se manipulan deliberadamente las variables para observar sus efectos, el tamaño de la muestra afecta directamente la solidez de las inferencias causales (Kraemer & Blasey, 2015). De este modo, un experimento dependiente de una muestra con tamaño infra valorado, podría resultar incapaz de distinguir entre el ruido aleatorio y los efectos reales, comprometiendo así su validez interna.

Paralelamente, como se referenciaba, un tamaño muestral adecuado permite generalizar los resultados más allá del entorno del experimento, un procedimiento conocido como validez externa, a la que anteriormente se aludía, y que resulta esencial en disciplinas como la biología, la medicina o la psicología, donde se espera que los hallazgos sean aplicables a poblaciones más amplias (Faber & Fonseca, 2014).

Como se indicaba, en el contexto de la investigación biomédica, el tamaño muestral también representa una cuestión ética. El principio de no maleficencia, consagrado en la Declaración de Helsinki, exige que ningún individuo o animal sea expuesto a procedimientos experimentales innecesarios. Una muestra sobredimensionada puede implicar riesgos injustificados, mientras que una muestra insuficiente puede llevar a conclusiones erróneas que perjudiquen a futuras intervenciones clínicas (Kilkenny et al., 2010).

Desde este punto de vista, el tamaño muestral mínimo, cuyo cálculo es el objeto de esta tesis, representa un equilibrio entre el rigor científico y la responsabilidad ética, y las guías internacionales, como las normas ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments), subrayan la obligación de justificar adecuadamente el número de sujetos utilizados en experimentos con animales (Percie du Sert et al., 2020).

La solidez científica a la que sea aludía, debe trabajar, en paralelo, con la necesidad de que el diseño resulte también factible en términos logísticos y económicos y, en este sentido, el cálculo del tamaño muestral mínimo permite planificar adecuadamente los recursos necesarios (tiempo, personal, materiales), evitando el desperdicio de fondos y reduciendo la duración de los estudios sin comprometer la calidad de los datos obtenidos (Dell et al., 2002).

Así, para la determinación del tamaño muestral mínimo necesario, en esta tesis se eligió un entorno de cálculo que solventara las actuales necesidades metodológicas relativas a su determinación cuando el parámetro presenta una configuración en cociente entre variables con diferentes grados de correlación supuesta.

El problema esencial que resuelve esta tesis se relaciona con la distribución del cociente $Z = \frac{X}{Y}$, donde X e Y son variables normales correlacionadas; a diferencia de X o Y , el cociente no sigue una distribución normal ni se puede aproximar fácilmente a ella (Marsaglia, 1965).

De hecho, si $X \sim N(\mu_x, \sigma_x^2)$ y $Y \sim N(\mu_y, \sigma_y^2)$, y ambas están correlacionadas ($\rho \neq 0$), entonces Z tiene una distribución muy compleja, con colas pesadas y comportamiento asimétrico (Geary, 1930; Hinkley, 1969). Esto impide el uso de pruebas clásicas como la t de Student o la z de Wald.

En estudios como el realizado en esta tesis, en los que se pretende comparar cocientes entre dos grupos (por ejemplo, $\frac{X_1}{Y_1}$ y $\frac{X_2}{Y_2}$), los métodos paramétricos usuales no se pueden emplear directamente por diferentes motivos:

- No existe una fórmula cerrada para la distribución de la diferencia de cocientes de normales correlacionadas.
- La transformación del cociente no estabiliza la varianza como ocurre con otras variables (por ejemplo, la transformación logarítmica sólo ayuda parcialmente).
- La varianza del cociente depende no sólo de las medias y varianzas de X e Y, sino también de su correlación mutua (Hinkley, 1969).

Por tanto, el cálculo de potencia estadística y su tamaño muestral asociado no puede realizarse con fórmulas simples como las usadas para situaciones usuales como la verificación de la diferencia entre medias.

Esta estrecha asociación entre el tamaño muestral y concepto de la potencia estadística, o poder estadístico, que representa la capacidad de un estudio para detectar un efecto real cuando este existe, se evidencia especialmente en los resultados de esta tesis.

Los resultados obtenidos para el modelo teórico evidencian que el tamaño muestral requerido varía considerablemente según la correlación entre las variables y el diseño experimental (pareado o independiente).

De hecho, en sintonía con lo esperado por coincidencia con la bibliografía, en los escenarios simulados con correlaciones más altas, el tamaño muestral necesario para alcanzar una potencia del 80% fue menor (*Tabla 14*), lo que coincide con hallazgos previos sobre la eficiencia estadística en diseños con variables correlacionadas (Cohen, 1988; Altman, 1991).

Correlación	Tamaños muestrales para potencia 80%	
	Independiente	Pareado
0.1	154	6
0.2	140	6
0.3	122	6

Tabla 14: tamaños muestrales necesarios para alcanzar una potencia del 80% con tamaño de efecto fijo (15%) y correlación variable en diseños independientes y pareado en el **modelo teórico**.

Asimismo, el diseño pareado mostró ventajas significativas en la obtención de la potencia deseada a menores tamaños muestrales, frente al diseño independiente en las condiciones estudiadas (*Tabla 14*), lo que sugiere que la elección del diseño debe basarse en criterios científicos además de estadísticos.

En los resultados obtenidos también se mostró con claridad que el tamaño muestral requerido disminuye de forma notable, en el modelo de perfil independiente, a medida que aumenta el tamaño del efecto, si se mantiene constante la correlación entre las variables (*Tabla 15*).

En condiciones de correlación fija (por ejemplo, $\rho=0.25$), se observó que las diferencias más amplias entre los cocientes de variables bivariantes normales fueron detectadas con mayor facilidad, permitiendo alcanzar una potencia estadística del 80% con un número significativamente menor de observaciones. Este patrón es coherente con la teoría clásica de la potencia estadística, donde el tamaño muestral es inversamente proporcional al cuadrado del tamaño del efecto (Cohen, 1988; Casella & Berger, 2002). Además, estos hallazgos refuerzan la importancia de realizar estimaciones precisas del tamaño del efecto esperado durante la etapa de planificación del estudio, ya que una subestimación puede conducir a estudios con baja potencia, mientras que una sobrestimación puede provocar sobredimensionamiento innecesario (Button et al., 2013).

Tamaño Efecto	Tamaños muestrales para potencia 80%	
	Independiente	Pareado
0.1	270	6
0.2	78	6
0.3	38	6

Tabla 15: tamaños muestrales necesarios para alcanzar una potencia del 80% con tamaño de efecto variables y correlación fija (0.25) en diseños independientes y pareado en el **modelo teórico**.

De este modo, es posible inferir que el cálculo del tamaño muestral pudiera repercutir en la obtención de una baja potencia estadística, traducida en una alta probabilidad de desestimar efectos importantes, y, por tanto, minimizar la fiabilidad de los hallazgos (Cohen, 1992).

De igual modo, es necesario poner de manifiesto que este cálculo afecta directamente a la precisión de las estimaciones, debido a que existe una relación inversamente proporcional entre el tamaño y la amplitud del intervalo de confianza. En esta tesis han sido calculados todos los intervalos de confianza necesarios mediante la estimación del percentil de las distribuciones empíricas de los parámetros, teniendo en cuenta que su uso ha sido avalado por otros estudios, como los que implican la estimación de la tasa de supervivencia ajustada a covariables en modelos de riesgos proporcionales de Cox con efectos aleatorios (Austin et al., 2022).

De este modo, ha sido posible verificar, de forma consistente con la teórica estadística, que el infradimensionamiento del tamaño muestral produce intervalos de confianza amplios, que dificultan la interpretación de los resultados mientras que un correcto dimensionamiento muestral, en términos de tamaño, permite hacer más estrechas y precisas de los parámetros de interés, lo cual resulta esencial en la toma de decisiones basada en evidencia (Biau et al., 2008).

Una de las principales aportaciones metodológicas de esta tesis ha sido la implementación y validación de un algoritmo en R para la generación de datos bivariantes, empleando matrices de varianza y covarianza que reflejan relaciones empíricas entre las variables clínicas de interés. Este enfoque ha resultado especialmente relevante en el modelo aplicado a cocientes de relevancia clínica. Los elegidos para este trabajo de tesis fueron

PCR/HDL, colesterol total/HDL y A β 1-42/A β 1-40, parámetros cuya distribución y comportamiento no podían ser modelados adecuadamente mediante supuestos paramétricos clásicos (Berry et al., 2010; Braun, 2014).

Así, tanto en las simulaciones obtenidas para el modelo teórico, anteriormente comentadas, como en aquellas realizadas sobre los tres cocientes biomédicos, como se comenta posteriormente, ha podido constatarse que la relevancia del cálculo del tamaño muestral es inherente a su evolución histórica, desde sus orígenes en la teoría de la probabilidad clásica, hasta la formulación moderna basada en el poder estadístico, o potencia, el error de tipo I y el error de tipo II, de modo que en el desarrollo de nuevos métodos formales, como en el caso del cálculo expuesto en esta tesis para la determinación del tamaño muestral mínimo, ha sido necesario acudir a las profundas raíces matemáticas del concepto, en especial a la teoría de la probabilidad y la inferencia estadística (Hinkelmann & Kempthorne, 2008).

En sintonía con lo argumentado, en este trabajo de tesis se procedió al estudio analítico de la noción de probabilidad, esencial para el cálculo del tamaño muestral y que históricamente se remonta a los trabajos de Gerolamo Cardano en el siglo XVI, hasta su formulación, durante los siglos XVII y XVIII por Pierre-Simon Laplace y Jakob Bernoulli, quien enunció uno de los primeros resultados clave, La Ley de los Grandes Números (Bernoulli, 1713), que establece que la media de los resultados de muchos ensayos independientes converge a la esperanza matemática, donde subyace la idea de que una muestra suficientemente grande puede representar a la población.

En paralelo, Abraham de Moivre introdujo una forma temprana del Teorema Central del Límite, anticipando que la distribución de la media muestral se aproxima a la normal conforme aumenta el tamaño muestral (de Moivre, 1738). Tras su refinamiento por Laplace y su posterior demostración rigurosa por Lyapunov y Lindeberg en el siglo XIX, se constituyó el fundamento de la inferencia estadística moderna.

Sobre estas bases, la formalización del concepto de tamaño muestral surgió en paralelo al desarrollo de la teoría de la estimación y las pruebas de hipótesis en el siglo XX, especialmente gracias a los trabajos de Ronald A. Fisher, Jerzy Neyman y Egon Pearson. Fisher (1925), quien introdujo el análisis de varianza (ANOVA) y el diseño experimental sistemático, pero fueron Neyman y Pearson, quienes formularon el marco moderno de las pruebas

estadísticas con los conceptos de error tipo I (α), error tipo II (β) y potencia estadística ($1-\beta$) (Neyman & Pearson, 1933).

En la idea de que el tamaño muestral puede ser calculado *a priori* para controlar estos errores, una de las contribuciones más significativas al diseño experimental, descansa la relevancia de la consecución del objetivo principal de este proyecto de tesis, el desarrollo de una metodología que, mediante técnicas de simulación, fuera capaz de abordar la determinación del tamaño muestral mínimo necesario, cuando el parámetro de interés resulta de un cociente entre dos variables, con diferentes grados de correlación, y cuyo cálculo no había sido abordado hasta el momento, observando que de su correcto dimensionamiento depende la estimación precisa de parámetros, un aspecto de especial relevancia cuando estos indicadores de tipo cociente se utilizan frecuentemente para evaluar asociaciones entre factores de exposición y desenlaces clínicos, o para predecir eventos futuros.

La metodología desarrollada para esta tesis implicó, de inicio, la obtención de las pertinentes colecciones de datos, implementándose la simulación por el método Montecarlo, enfocada en el cálculo de los tamaños muestrales necesarios para alcanzar una potencia deseada, por su idoneidad de su adecuación a contextos especialmente complejos, o en condiciones no paramétricas, debido a su capacidad para usar la aleatoriedad en la aproximación de soluciones numéricas, extendiendo la lógica clásica a la incorporación de distribuciones previas o estructuras jerárquicas (Lachin, 2011) y superando las limitaciones de tratamiento de otras técnicas determinísticas.

Así, la solución computacional por simulación empleada en este trabajo ha aprovechado la evolución del Método de Montecarlo, desde sus orígenes en el proyecto Manhattan en la década de 1940, hasta convertirse en un pilar del análisis estadístico moderno (Metropolis & Ulam, 1949), permitiendo estimar la distribución de probabilidad necesaria, los valores esperados, los errores estándar, los intervalos de confianza, y la potencia estadística a partir de datos simulados.

Como se indicaba, este contexto de especial flexibilidad permitió la generación de grandes colecciones de datos, adaptados a la necesidad del supuesto y aplicable a las especiales condiciones que requiere el abordaje de los biomarcadores cociente elegidos como supuesto problema por su capacidad diagnóstica y pronóstica, en este trabajo de tesis y que, ampliando

su espectro funcional, resulta de aplicación en amplia variedad de disciplinas en el entorno de las ciencias de la vida como la genética, la epidemiología, la neurociencia y la farmacología (Robert & Casella, 2013).

Durante el desarrollo metodológico se observó especialmente la precisión en la estimación que, en el método Montecarlo depende del número de réplicas N y que, en este trabajo de tesis, se fijaron en 3000, incrementándolo a 4000 en aquellos escenarios susceptibles de ser afectados por una mayor variabilidad, ya que el error estándar de la media, $\frac{s}{\sqrt{N}}$, se reduce en una tasa de $\frac{1}{\sqrt{N}}$, donde N es el número de réplicas (Fishman, 2013).

La idea fundamental del procedimiento fue la aproximación de valores esperados, probabilidades u otras métricas mediante la media aritmética de múltiples réplicas simuladas del proceso:

$$\mathbb{E}[f(X)] \approx \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N f(X_i)$$

Donde:

- $\mathbb{E}[f(X)]$ es la esperanza matemática (o valor esperado) de la función $f(X)$.
- $X_i \sim P(X)$ implica que cada X_i es una muestra generada aleatoriamente siguiendo la distribución de probabilidad $P(X)$.
- $f(X)$ es una función de interés que transforma los valores de X .
- N es el número de réplicas o muestras.
- $\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N f(X_i)$ es el promedio muestral de la función aplicada a cada muestra.

Adicionalmente, y como evidencian los resultados, el contexto elegido para esta tesis, donde no se disponía de fórmulas cerradas para calcular el tamaño muestral mínimo necesario, el método de Montecarlo ha permitido, además, estimar empíricamente la potencia estadística mediante múltiples simulaciones, bajo configuraciones no paramétricas o con supuestos violados.

En este sentido, en el contexto de la biomedicina, como el abordado en esta tesis, los datos suelen ser incompletos, ruidosos o de distribución no estándar y el uso del método de Montecarlo ha permitido evaluar la robustez de las pruebas estadísticas y calcular potencias estadísticas en escenarios clínicos realistas (Carpenter et al., 2017). De hecho, en biomedicina se emplea para comparar la sensibilidad de pruebas diagnósticas simulando distribuciones sesgadas o asimétricas (Lachin, 2021).

En concreto, en este trabajo la estimación del tamaño muestral mínimo necesario para detectar un efecto requirió del uso de la prueba de comparación de Brunner-Munzel, bajo condiciones de heterocedasticidad en el diseño de perfil independiente y de la prueba de Rangos con signo de Wilcoxon, para el diseño de perfil relacionado, o pareado, obteniéndose una potencia ligada a la evolución del comportamiento del tamaño mínimo y de las condiciones problema, para cada uno de los perfiles de diseño.

Así, bajo el supuesto de homocedasticidad aplicable al método de Wilcoxon, bajo las condiciones del modelo pareado, se realizaron las réplicas mencionadas para la comparación de dos grupos cociente con varianzas iguales, calculándose la potencia como la proporción de veces que se consiguió alcanzar la significación estadística al nivel $\alpha=0.05$.

En este sentido, y en sintonía con obtenido en el modelo teórico, los resultados de tamaño muestral mínimo obtenidos para los tres cocientes biomarcadores problema, pusieron de manifiesto que la potencia deseada, y fijada en el 80%, se consiguió alcanzar a umbrales de tamaño sensiblemente menores cuando se implementa un modelo de diseño de perfil pareado que cuando el modelo presenta un perfil independiente. Estas diferencias entre modelos de diseño, respecto al tamaño mínimo necesario para el alcance de la potencia, se reprodujeron para los tres diferentes niveles de correlación analizados, y obtenidos de la bibliografía biomédica.

Haciendo un análisis de las diferencias entre cocientes, se verificó que, en idénticas condiciones de potencia deseada, el tamaño mínimo de muestra necesario fue de 6 individuos para los cocientes colesterol total/HDL y A β 1-42/A β 1-40, mientras que el cociente PCR/HDL requirió de 9 individuos para alcanzar la potencia establecida, un resultado que, en cualquiera de los tres casos, resulta sobresalientemente menor que el necesario en un modelo de perfil independiente (*Tablas 16, 17 y 18*).

Ratio CT/HDL

Tam. Efecto	0,15
Correlación	0,3

Tam. muestrales para potencia 80%	
Independiente	Pareado
55	6

Tabla 16: tamaños muestrales necesarios para alcanzar una potencia del 80% con tamaño de efecto 0.15 en diseños independientes y pareado para el cociente Colesterol Total/HDL en los modelos independiente y pareado, respectivamente.

Ratio PCR/HDL

Tam. Efecto	0,15
Correlación	-0,35

Tam. muestrales para potencia 80%	
Independiente	Pareado
762	9

Tabla 17: tamaños muestrales necesarios para alcanzar una potencia del 80% con tamaño de efecto 0.15 en diseños independientes y pareado para el cociente PCR/HDL. en los modelos independiente y pareado, respectivamente.

Ratio A β 1-42/A β 1-40

Tam. Efecto	0,15
Correlación	0,22

Tam. muestrales para potencia 80%	
Independiente	Pareado
166	6

Tabla 18: tamaños muestrales necesarios para alcanzar una potencia del 80% con tamaño de efecto 0.15 en diseños independientes y pareado para el cociente A β 1-42/A β 1-40. en los modelos independiente y pareado, respectivamente.

De forma consistente con la literatura, los resultados verifican que una de las principales ventajas de los modelos pareados, frente a los diseños con muestras independientes, radica en su superioridad en términos de potencia estadística, especialmente cuando se analizan diferencias intraindividuales, o efectos antes y después.

La lógica de estos resultados permite explicar que, en un diseño pareado, cada unidad experimental actúa como su propio control, lo que permite moderar explícitamente la variabilidad inter sujeto y, por tanto, reducir el error estándar de la estimación de la diferencia. Esta reducción de la variabilidad residual mejora la relación entre señal y ruido, lo que resulta un elemento clave en el incremento de la potencia estadística y, por tanto, de la probabilidad de detectar un efecto verdadero cuando realmente existe (Cumming, 2014), tanto con muestras de tamaño más pequeño como con efectos de menor magnitud (Maxwell & Delaney, 2004).

Por tanto, cuando resulta compatible con la viabilidad muestral y los requerimientos del contexto de estudio, el empleo de modelos pareados representa una estrategia estadísticamente más eficiente y sensible que los modelos basados en muestras independientes.

Con idéntico procedimiento para la verificación de la potencia, se procedió, en esta ocasión en condiciones de violación del supuesto de homocedasticidad, a la implementación del método de Brunner-Manzel para la comparación de dos grupos cociente con varianzas distintas en el modelo independiente, cuyos resultados, en comparativa con el modelo diseño pareado, en idénticas condiciones de tamaño de efecto, correlación y potencia, se ven reflejados en las tablas anteriores, enfocadas en el análisis de los tres cocientes respectivos y cuya discusión se sustenta en lo anteriormente expuesto.

La elección de la prueba de Brunner-Munzel en el diseño de perfil independiente, se basó en su competencia para la comparación de dos poblaciones bajo la hipótesis de ausencia de orden estocástico, sin requerimiento de igualdad de varianzas ni de formas de distribución, un contexto particularmente adecuado para el objetivo de esta tesis, dentro de los supuestos no paramétricos, y que permite evaluar si una observación aleatoria de un grupo es estocásticamente mayor que una observación aleatoria del otro grupo, una medida conocida como la probabilidad de superioridad estocástica (Brunner & Munzel, 2000).

La selección de esta prueba en condiciones de independencia permitió superar la imposibilidad de implementación del Wilcoxon-Mann-Whitney (WMW) o Test de rangos con signos de Wilcoxon, pese a su amplia utilización, debido a que presupone que $F=G$ bajo la hipótesis nula. Cuando esta condición no se cumple, como ocurre bajo las condiciones de independencia de esta tesis, en la que existe presencia de diferentes formas de distribución y heterocedasticidad, la prueba WMW podría rechazar falsamente la hipótesis de partida, o no detectar diferencias relevantes (Neubert & Brunner, 2007), mientras que, como se ha comprobado en los resultados, la prueba de Brunner-Munzel mantiene su validez bajo tales circunstancias. Por ello, ha resultado fundamental para establecer la validez asintótica, sin los supuestos restrictivos de la prueba MWM, en aquellas comparaciones en las que existía un supuesto de independencia en la comparación entre grupos cociente.

A modo de resumen, se aporta una reflexión sintética sobre el comportamiento de ambas pruebas en condiciones no paramétricas, enfocada en su capacidad de adaptación a determinadas características muestrales:

Característica	WMW	Brunner-Munzel
Supone homocedasticidad	Sí	No
Supone igualdad de forma de distribución	Sí	No
Apropiada cuando $n_1 \neq n_2$	No (se debilita)	Sí
Basada en probabilidad estocástica	No	Sí
Uso en biomedicina	Frecuente	En crecimiento

Tabla 19: Modificado de Neubert & Brunner, 2007; Bathke et al., 2009.

De hecho, las condiciones exigentes de este trabajo de tesis se reproducen sistemáticamente en el contexto biomédico, en el que los datos presentan frecuentemente distribuciones no normales, heterocedasticidad y presencia de valores atípicos y, requieren de métodos estadísticos robustos que permitan afrontar la necesaria comparación entre grupos independientes.

Así, en estudios previos, que requerían de la comparación de biomarcadores en muestras de alta heterogeneidad (Hollander et al. (2020) aplicaron la prueba de Brunner-Munzel para comparar niveles de IL-6 entre pacientes, con y sin sepsis, debido a que la distribución de IL-6 presentó alta asimetría y heterocedasticidad, reportando un valor $T=3.2$, $p<0.01$, lo que apoyó una diferencia significativa.

En el mismo sentido, en estudios con tamaño muestral pequeño, como ocurre en ensayos clínicos de fase I, la prueba de Brunner-Munzel mostró ser más robusta que la prueba de rangos con signo de Wilcoxon (WMW) (Hothorn et al. (2008) demostrando, mediante simulación, que la prueba mantiene mejor el nivel de significación en presencia de varianzas desiguales.

En estudios de comparación de tiempos de respuesta entre grupos de tratamiento con diferente dispersión, el uso de Brunner-Munzel evitó errores tipo I o tipo II, que sí cometía la prueba MWM (Konietschke et al., 2012). Como ejemplo, en un estudio de farmacocinética donde se compararon los tiempos de absorción de un fármaco en dos grupos con distintas características metabólicas, la prueba de Brunner-Munzel detectó diferencias significativas que la de WMW no logró identificar, por la presencia de varianzas desiguales (Neuhaeuser & Brunner, 2007).

En estas condiciones resulta descartable el uso de la prueba WMW, debido a que presupone que las dos muestras tienen la misma forma y varianza, lo cual limita su aplicabilidad (Neubert & Brunner, 2007) en diseños independientes, manteniendo su fortaleza analítica en el diseño de perfil relacionado, como avalan los análisis de potencia en los resultados de esta tesis.

En suma, se ha verificado que la prueba de Brunner-Munzel constituye una evolución importante en la estadística no paramétrica moderna, especialmente en investigaciones médicas y biológicas, donde los supuestos clásicos son frecuentemente violados. Su desarrollo matemático, sustentado en teorías de orden estocástico y teoremas asintóticos, la posiciona como una herramienta imprescindible en la comparación robusta de dos muestras independientes en condiciones de desigualdad de varianzas, asimetría en la distribución y trabajo con tamaños muestrales pequeños o desequilibrados.

A modo de reflexiones finales, el presente trabajo ha demostrado la utilidad y aplicabilidad de un enfoque basado en simulaciones para el cálculo del tamaño muestral en contextos clínicos complejos. Los métodos tradicionales, si bien siguen siendo fundamentales

en estadística médica, presentan limitaciones importantes en estudios con estructuras no convencionales, cuando el análisis compete a múltiples variables interdependientes o cuando se trabaja con parámetros derivados, como cocientes entre variables bioquímicas (Julious, 2009; Lachin, 1981).

En este contexto, el uso de simulaciones Montecarlo ha permitido modelar escenarios teóricos, incorporando incertidumbre en parámetros clave y estableciendo tamaños muestrales óptimos con mayor realismo.

Además, la aplicación de esta metodología a casos reales, como la relación PCR/HDL-C en ateromatosis carotídea o $A\beta 1-42/A\beta 1-40$ en enfermedades neurodegenerativas refuerza su potencial traslacional. En ambos casos, el uso de simulaciones ha permitido obtener estimaciones robustas del tamaño muestral necesario para futuros ensayos clínicos, superando las limitaciones derivadas de la falta de datos previos o de la complejidad de los biomarcadores implicados, tanto en escenarios de diseño independientes, como en variantes de diseño relacionadas.

Desde un punto de vista ético, esta aproximación también representa un avance sustancial, al permitir una estimación más precisa del número mínimo de participantes necesarios, minimizando el riesgo de exposición innecesaria a tratamientos experimentales y optimizando el uso de recursos, en línea con las recomendaciones de buenas prácticas clínicas.

Así los resultados obtenidos, no solo validan el enfoque metodológico propuesto, sino que también invitan a reconsiderar el papel de las simulaciones como herramienta complementaria —y en ocasiones preferente— frente a los métodos tradicionales en Biomedicina.

En definitiva, se ha verificado que el cálculo del tamaño muestral mínimo resulta enormemente más eficiente en el alcance de la potencia deseada cuando es posible implementar, por el perfil del estudio, un modelo pareado respecto al modelo independiente, como resulta consistente con lo esperable, incluso a distintos niveles de correlación, por su capacidad para absorber las diferencias interindividuales incluso a tamaños de efecto pequeños.

Por lo expuesto y alcanzados todos sus objetivos particulares, se considera satisfecho el objetivo general de esta tesis.

6. Conclusiones

- El método desarrollado en esta tesis consigue solventar las dificultades inherentes al cálculo del tamaño muestral mínimo sobre parámetros cociente entre variables correlacionadas en diferente grado, mediante la incorporación explícita de la incertidumbre sobre los mismos, obteniéndose un modelo que permite abordar relaciones complejas entre variables y adaptar el diseño a escenarios clínicos realistas, sobre un modelo teórico en dos perfiles de diseño experimental.
- El modelo apoya el hecho de que, cuando las condiciones experimentales lo permiten, la implementación de un perfil de diseño pareado optimiza el tamaño muestral necesario para alcanzar la potencia estadística deseada frente a modelos de perfil independiente.
- La validación de esta metodología, a través de aplicaciones clínicas concretas —como los biomarcadores A β 1-42/A β 1-40, colesterol total/HDL y PCR/HDL-C— demuestra su utilidad para perfeccionar el diseño de estudios en neurología y cardiología además de resultar extrapolable a otros campos biomédicos.
- Desde una perspectiva ética, este enfoque contribuye a garantizar la eficiencia del diseño experimental, minimizando la exposición de los pacientes y mejorando la relación beneficio-riesgo de los ensayos.
- Adicionalmente, esta tesis ha puesto de manifiesto que el enfoque basado en simulaciones computacionales constituye una alternativa válida, robusta y flexible para el cálculo del tamaño muestral mínimo *a priori* en contextos clínicos complejos, donde los métodos tradicionales resultan inaplicables.
- Se ha verificado que la implementación en R de los algoritmos específicos para simulación refuerza el potencial de esta herramienta como recurso accesible, reproducible y adaptable por parte de investigadores clínicos y bioestadísticos.

- En este contexto de alta complejidad analítica, se ha constatado que la prueba de Brunner-Munzel representa una herramienta valiosa y poco explotada en biomedicina, frente a las limitaciones de la prueba MWM, en presencia de heterocedasticidad o formas de distribución distintas, proporcionando inferencias más válidas y robustas, y se considera que su inclusión sistemática en los análisis estadísticos biomédicos podría mejorar la calidad y fiabilidad de los resultados.

7. Limitaciones y recomendaciones

- Se recomienda incorporar rutinas de simulación en la fase de planificación de ensayos clínicos, especialmente en estudios piloto, investigaciones con biomarcadores novedosos o diseños adaptativos.
- Resulta aconsejable que los comités éticos y agencias reguladoras fomenten el uso de métodos de simulación bien documentados como complemento a los cálculos tradicionales de tamaño muestral.
- Sería deseable desarrollar paquetes específicos en R que estandaricen y faciliten la implementación de estos procedimientos, promoviendo su adopción más amplia en la investigación clínica. Ese es el caso de la herramienta desarrollada en este trabajo.
- Futuros trabajos deberían explorar la extensión de este enfoque a modelos multivariantes más complejos y al contexto bayesiano, ampliando así su aplicabilidad y precisión.

8. Referencias bibliográficas.

1. Altman, D. G. (1991). *Practical statistics for medical research*. Chapman & Hall.
2. Alzheimer's Association. (2023). 2023 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 19(4), 1–112.
3. Arain, M., Campbell, M. J., Cooper, C. L., & Lancaster, G. A. (2010). What is a pilot or feasibility study? A review of current practice and editorial policy. *BMC Medical Research Methodology*, 10(1), 67. DOI: 10.1186/1471-2288-10-67.
4. Arnaiz, P., Acevedo, M., Barja, P., Leiva, E., & Durán, E. (2010). Relación colesterol total a HDL y colesterol no HDL: los mejores indicadores lipídicos de aumento de grosor de la íntima media carotídea. *Revista Médica de Chile*, 138(6), 629–637. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872010000600003>
5. Ashton, N. J., Janelidze, S., Al Khleifat, A., Leuzy, A., van der Ende, E. L., Karikari, T. K., ... & Zetterberg, H. (2021). A multicentre validation study of the diagnostic value of plasma neurofilament light. *Nature Communications*, 12(1), 3400. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23014-w>
6. Austin, P. C., Harrell, F. E., & van Klaveren, D. (2022). Graphical calibration curves and the integrated calibration index (ICI) for survival models. *Statistics in Medicine*, 41(15), 2906–2924. <https://doi.org/10.1002/sim.9352>
7. Bang, J., Spina, S., & Miller, B. L. (2015). Frontotemporal dementia. *The Lancet*, 386(10004), 1672–1682.
8. Barter, P. J., Nicholls, S., Rye, K. A., Anantharamaiah, G. M., Navab, M., & Fogelman, A. M. (2016). Antiinflammatory properties of HDL. *Circulation Research*, 118(1), 127–142. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306316>
9. Barter, P., Gotto, A. M., LaRosa, J. C., Maroni, J., Szarek, M., Grundy, S. M., ... & Treating to New Targets Investigators. (2007). HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. *New England Journal of Medicine*, 357(13), 1301–1310. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa064278>
10. Barter, P., Gotto, A. M., LaRosa, J. C., Maroni, J., Szarek, M., Grundy, S. M., ... & Treating to New Targets Investigators. (2017). HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. *New England Journal of Medicine*, 357(13), 1301–1310. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa064278>

11. Bathke, A. C., Brunner, E., & Konietzschke, F. (2009). Testing nonparametric hypotheses in factorial designs. *Journal of Statistical Planning and Inference*, 139(2), 517-525. <https://doi.org/10.1016/j.jspi.2008.06.019>
12. Bernoulli, J. (1713). *Ars Conjectandi*. Basilea: Thurnisius.
13. Berry, D. A., Carlin, B. P., Lee, J. J., & Müller, P. (2010). Bayesian adaptive methods for clinical trials. CRC Press.
14. Besler, C., Luscher, T. F., & Landmesser, U. (2011). Molecular mechanisms of vascular effects of High-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease. *EMBO Molecular Medicine*, 4(4), 251–268. <https://doi.org/10.1002/emmm.201200278>
15. Biau, D. J., Kerneis, S., & Porcher, R. (2008). Statistics in brief: the importance of sample size in the planning and interpretation of medical research. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 466(9), 2282–2288. <https://doi.org/10.1007/s11999-008-0346-9>
16. Bisoendial, R. J., Boekholdt, S. M., Vergeer, M., Stroes, E. S., & Kastelein, J. J. (2010). C-reactive protein is a mediator of cardiovascular disease. *European Heart Journal*, 31(17), 2087-2091. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq139>
17. Black, S., Kushner, I., & Samols, D. (2004). C-reactive Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 48487–48490. <https://doi.org/10.1074/jbc.R400025200>
18. Blennow, K., & Zetterberg, H. (2018). Biomarkers for Alzheimer’s disease: current status and prospects for the future. *Journal of Internal Medicine*, 284(6), 643–663. <https://doi.org/10.1111/joim.12816>
19. Blennow, K., Hampel, H., Weiner, M., & Zetterberg, H. (2010). Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 6(3), 131–144. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.4>
20. Braun, T. M. (2014). The current and future use of Bayesian methods in cancer clinical trials. *Statistics in Medicine*, 33(25), 4421–4433.
21. Braun, T. M. (2014). The current design of oncology phase I clinical trials: progressing from algorithms to statistical models. *Chinese Clinical Oncology*, 3(1), 2. DOI: 10.3978/j.issn.2304-3865.2014.02.01.
22. Brooks, S., Gelman, A., Jones, G. L., & Meng, X. L. (2011). *Handbook of Markov Chain Monte Carlo*. CRC Press.
23. Brunner, E., & Munzel, U. (2000). The nonparametric Behrens-Fisher problem: Asymptotic theory and a small-sample approximation. *Biometrical Journal*, 42(1),

- 17–25. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4036\(200001\)42:1<17::AID-BIMJ17>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4036(200001)42:1<17::AID-BIMJ17>3.0.CO;2-U)
24. Brunner, E., Munzel, U., & Puri, M. L. (1999). Rank-score procedures for factorial designs. *Journal of the American Statistical Association*, 94(446), 887–900. <https://doi.org/10.1080/01621459.1999.10474188>
25. Burton, A., Altman, D. G., Royston, P., & Holder, R. L. (2006). The design of simulation studies in medical statistics. *Statistics in Medicine*, 25(24), 4279–4292.
26. Button, K. S., Ioannidis, J. P., Mokrysz, C., Nosek, B. A., Flint, J., Robinson, E. S., & Munafò, M. R. (2013). Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(5), 365–376. <https://doi.org/10.1038/nrn3475>
27. Carpenter, B., Gelman, A., Hoffman, M. D., Lee, D., Goodrich, B., Betancourt, M., ... & Riddell, A. (2017). Stan: A probabilistic programming language. *Journal of Statistical Software*, 76(1), 1–32. <https://doi.org/10.18637/jss.v076.i01>
28. Carroll, M. D., Kit, B. K., Lacher, D. A., & Yoon, S. S. (2012). Total and HDL cholesterol in adults: United States, 2011–2012. *NCHS Data Brief*, (132), 1–8.
29. Casella, G., & Berger, R. L. (2002). *Statistical Inference* (2nd ed.). Duxbury Press.
30. Castillo, E., Leon, J., & Wight, T. (2017). Immunotherapy for Alzheimer’s disease: From anti-A β to Tau-based vaccines. *Current Alzheimer Research*, 14(5), 484–492. <https://doi.org/10.2174/1567205013666160919150322>
31. Cheng, S. T., Lin, H. C., Kwok, T., et al. (2022). Diabetes and Risk of Alzheimer’s Disease: A Meta-analysis of Prospective Cohort Studies. *Journal of Alzheimer’s Disease*, 88(4), 1189–1204.
32. Chow, S. C., & Chang, M. (2008). Adaptive design methods in clinical trials: a review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 3(1), 11.
33. Chow, S. C., Shao, J., & Wang, H. (2008). *Sample size calculations in clinical research*. CRC Press.
34. Claxton, K., Palmer, S., Longworth, L., & Bojke, L. (2015). Informing decisions in the UK: The role of value of information analysis. *Pharmacoeconomics*, 33(2), 105–111.
35. Claxton, K., Sculpher, M., Palmer, S., & Culyer, A. J. (2015). Causes for concern: Is NICE failing to uphold its responsibilities to all NHS patients? *Health Economics*, 24(1), 1–7.

36. Cohen, J. (1988). *Statistical power analysis for the behavioral sciences* (2nd ed.). Lawrence Erlbaum.
37. Cohen, J. (1992). A power primer. *Psychological Bulletin*, 112(1), 155–159. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.112.1.155>
38. Cook, J. A., Julious, S. A., Sones, W., et al. (2019). Practical help for specifying the target difference in sample size calculations for RCTs: the DELTA2 five-stage study, including a workshop. *Health Technology Assessment*, 23(60). NIHR Journals Library.
39. Cousins, K. A. Q., et al. (2020). Plasma A β 42/40 ratio in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Neurology*, 95(12), e1657–e1669.
40. Cumming, G. (2014). *The New Statistics: Why and How*. *Psychological Science*, 25(1), 7–29. <https://doi.org/10.1177/0956797613504966>
41. Cummings, J., Aisen, P., DuBois, B., Frölich, L., Jack, C. R., Jones, R., ... & Scheltens, P. (2021). Aducanumab: Appropriate use recommendations. *Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, 8(4), 398–410. <https://doi.org/10.14283/jpad.2021.41>
42. Danesh, J., Wheeler, J. G., Hirschfield, G. M., Eda, S., Eiriksdottir, G., Rumley, A., ... & Pepys, M. B. (2004). C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *New England Journal of Medicine*, 350(14), 1387-1397. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032804>
43. de la Cruz, J. P., Guerrero, A., & Medina, M. (2020). Relación proteína C reactiva/colesterol HDL como marcador inflamatorio-lipídico para predecir riesgo cardiovascular. *Revista Española de Cardiología Clínica*, 25(4), 210–218.
44. De Meyer, G., et al. (2010). Diagnosis-independent Alzheimer disease biomarker signature in cognitively normal elderly people. *Archives of Neurology*, 67(8), 949–956. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2010.179>
45. de Moivre, A. (1738). *The Doctrine of Chances* (3rd ed.). London: Millar.
46. Dell, R. B., Holleran, S., & Ramakrishnan, R. (2002). Sample size determination. *ILAR Journal*, 43(4), 207–213. <https://doi.org/10.1093/ilar.43.4.207>
47. Devaraj, S., Du Clos, T. W., & Jialal, I. (2009). The effects of CRP on endothelium and its relevance to atherothrombosis. *Current Atherosclerosis Reports*, 11(2), 134–138. <https://doi.org/10.1007/s11883-009-0021-2>
48. Efron, B., & Hastie, T. (2016). *Computer Age Statistical Inference*. Cambridge University Press.

49. Egan, M. F., Kost, J., Tariot, P. N., Aisen, P. S., Cummings, J. L., Vellas, B., ... & Sandrock, A. (2019). Randomized trial of verubecestat for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 378(18), 1691–1703. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706441>
50. Eisenhardt, S. U., Habersberger, J., Murphy, A., Chen, Y. C., Woollard, K. J., Bassler, N., ... & Peter, K. (2009). Dissociation of pentameric to monomeric C-reactive protein on activated platelets localizes inflammation to atherosclerotic plaques. *Circulation Research*, 105(2), 128-137. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.197313>
51. Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M. I., Corella, D., Arós, F., ... & Martínez-González, M. A. (2018). Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet supplemented with extra-virgin olive oil or nuts. *New England Journal of Medicine*, 378(25), e34. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1800389>
52. Faber, J., & Fonseca, L. M. (2014). How sample size influences research outcomes. *Dental Press Journal of Orthodontics*, 19(4), 27–29. <https://doi.org/10.1590/2176-9451.19.4.027-029.ebo>
53. Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A. G., & Buchner, A. (2007). G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*, 39(2), 175–191.
54. Ference, B. A., Ginsberg, H. N., Graham, I., Ray, K. K., Packard, C. J., Bruckert, E., ... & Catapano, A. L. (2017). Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. *European Heart Journal*, 38(32), 2459–2472. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx144>
55. Ferreira, S. T., Lourenco, M. V., Oliveira, M. M., & De Felice, F. G. (2015). Soluble amyloid- β oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 191. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00191>
56. Fisher, R. A. (1925). *Statistical Methods for Research Workers*. Edinburgh: Oliver and Boyd.
57. Fishman, G. S. (2013). *Montecarlo: Concepts, Algorithms, and Applications*. Springer.
58. Fleiss, J. L., Levin, B., & Paik, M. C. (2003). *Statistical methods for rates and proportions*. Wiley.
59. Freiman, J. A., Chalmers, T. C., Smith, H., & Kuebler, R. R. (1978). The importance of beta, the type II error, and sample size in the design and interpretation of the

- randomized control trial: survey of 71 “negative” trials. *New England Journal of Medicine*, 299(13), 690–694. <https://doi.org/10.1056/NEJM197809282991304>
60. Friedman, L. M., Furberg, C. D., & DeMets, D. L. (2010). *Fundamentals of clinical trials* (4th ed.). Springer.
61. Gabay, C., & Kushner, I. (1999). Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *New England Journal of Medicine*, 340(6), 448–454. <https://doi.org/10.1056/NEJM199902113400607>
62. Geary, R. C. (1930). The frequency distribution of the quotient of two normal variates. *Journal of the Royal Statistical Society*, 93(3), 442–446.
63. Gelman, A., Hill, J., & Vehtari, A. (2020). *Regression and Other Stories*. Cambridge University Press.
64. Gigerenzer, G., Krauss, S., & Vitouch, O. (2004). The null ritual: What you always wanted to know about significance testing but were afraid to ask. En D. Kaplan (Ed.), *The Sage Handbook of Quantitative Methodology for the Social Sciences* (pp. 391–408). SAGE.
65. Gille, A., Easton, R., D’Andrea, D., Wright, S. D., & Shear, C. L. (2018). CSL112 enhances biomarkers of reverse cholesterol transport after acute myocardial infarction: The AEGIS-I trial. *European Heart Journal*, 39(1), 127–135. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx731>
66. Gómez-Marcos, M. A., Recio-Rodríguez, J. I., Patino-Alonso, M. C., et al. (2015). Índices lipídicos e inflamatorios como predictores de aterosclerosis subclínica en mujeres posmenopáusicas. *Atherosclerosis*, 242(1), 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.07.001>
67. Gorelick, P. B., Scuteri, A., Black, S. E., et al. (2011). Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: A statement for healthcare professionals from the AHA/ASA. *Stroke*, 42(9), 2672–2713.
68. Grundy, S. M., Stone, N. J., Bailey, A. L., Beam, C., Birtcher, K. K., Blumenthal, R. S., ... & Yeboah, J. (2019). 2018 AHA/ACC Guideline on the Management of Blood Cholesterol. *Journal of the American College of Cardiology*, 73(24), e285–e350. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.11.003>
69. Haass, C., & Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(2), 101–112. <https://doi.org/10.1038/nrm2101>

70. Hansson, O., Seibyl, J., Stomrud, E., Zetterberg, H., Trojanowski, J. Q., Bittner, T., ... & Blennow, K. (2018). CSF biomarkers of Alzheimer's disease concord with amyloid- β PET and predict clinical progression: A study of fully automated immunoassays in BioFINDER and ADNI cohorts. *Alzheimer's & Dementia*, 14(11), 1470–1481. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.01.010>
71. Hee, S. W., Willis, A., & Dimairo, M. (2017). Replacing standard sample size calculations with simulation-based design. *Trials*, 18, 498.
72. Hee, S. W., Willis, A., Tudur Smith, C., Day, S., Miller, F., Madan, J., ... & Stallard, N. (2017). Does the low prevalence affect the sample size of interventional clinical trials of rare diseases? An analysis of data from the aggregate analysis of ClinicalTrials.gov. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 12(1), 44. DOI: 10.1186/s13023-017-0597-1.
73. Hernández-Díaz, S., Martínez-González, M. Á., Delgado-Rodríguez, M., & Pérez-Gómez, B. (2022). Inflammatory markers and carotid atherosclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis*, 348, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2022.02.011>
74. Hinkelmann, K., & Kempthorne, O. (2008). *Design and Analysis of Experiments: Introduction to Experimental Design* (Vol. 1). Wiley.
75. Hinkley, D. V. (1969). On the ratio of two correlated normal random variables. *Biometrika*, 56(3), 635–639. <https://doi.org/10.1093/biomet/56.3.635>
76. Hollander, M., Wolfe, D. A., & Chicken, E. (2020). *Nonparametric statistical methods* (3rd ed.). John Wiley & Sons.
77. Hothorn, L. A., & Kluxen, F. M. (2008). Nonparametric analysis of longitudinal animal data in preclinical toxicology. *Journal of Biopharmaceutical Statistics*, 18(2), 244–256. <https://doi.org/10.1080/10543400701705934>
78. Howard, G., Sharrett, A. R., Heiss, G., Evans, G. W., Chambless, L. E., Riley, W. A., & Burke, G. L. (1993). Carotid artery intimal-medial thickness distribution in general populations as evaluated by B-mode ultrasound. *Stroke*, 24(9), 1297–1304. <https://doi.org/10.1161/01.STR.24.9.1297>
79. HPS3/TIMI55-REVEAL Collaborative Group. (2017). Effects of anacetrapib in patients with atherosclerotic vascular disease. *New England Journal of Medicine*, 377(13), 1217–1227. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706444>

80. Hui, W., Gel, Y. R., Gastwirth, J. L. (2008). lawstat: An R package for law, public policy and biostatistics. *Journal of Statistical Software*, 28(3), 1–26. <https://doi.org/10.18637/jss.v028.i03>
81. Hulley, S. B., Cummings, S. R., Browner, W. S., Grady, D., & Newman, T. B. (2013). *Designing clinical research*. Lippincott Williams & Wilkins.
82. Jack, C. R., Bennett, D. A., Blennow, K., Carrillo, M. C., Dunn, B., Haeberlein, S. B., & Silverberg, N. (2018). NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 14(4), 535–562. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.018>
83. Janelidze, S., et al. (2021). Head-to-head comparison of 8 plasma amyloid- β 42/40 assays in Alzheimer disease. *JAMA Neurology*, 78(11), 1375–1382.
84. Janelidze, S., Mattsson, N., Palmqvist, S., Smith, R., Beach, T. G., Serrano, G. E., ... & Hansson, O. (2021). Plasma P-tau181 in Alzheimer's disease: relationship to other biomarkers, differential diagnosis, neuropathology and longitudinal progression to Alzheimer's dementia. *Nature Medicine*, 26(3), 379–386. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-01044-7>
85. Janelidze, S., Mattsson, N., Palmqvist, S., Smith, R., Beach, T. G., Serrano, G. E., ... & Hansson, O. (2016). CSF A β 1-42/A β 1-40 and A β 42/A β 38 ratios: Better diagnostic markers of Alzheimer disease. *Neurology*, 87(11), 1093–1101. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003071>
86. Julious, S. A. (2009). *Sample sizes for clinical trials*. CRC Press.
87. Kang, J., Khera, A. V., & Greenland, P. (2021). Biomarker ratios and statistical power: Implications for clinical trials. *Statistical Methods in Medical Research*, 30(8), 1797–1810. <https://doi.org/10.1177/09622802211005928>
88. Kannel, W. B., Wilson, P. W. F., & Nam, B. H. (2008). Risk stratification of atherosclerotic cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis Reports*, 10(6), 453–458. <https://doi.org/10.1007/s11883-008-0073-z>
89. Karran, E., & De Strooper, B. (2022). The amyloid cascade hypothesis: Are we poised for success or failure? *Journal of Neurochemistry*, 162(2), 124–141. <https://doi.org/10.1111/jnc.15534>
90. Keene, D., Price, C., Shun-Shin, M. J., Francis, D. P. (2014). Effect on cardiovascular risk of high-density lipoprotein targeted drug treatments niacin, fibrates, and CETP

- inhibitors: meta-analysis of randomised controlled trials including 117 411 patients. *BMJ*, 349, g4379. <https://doi.org/10.1136/bmj.g4379>
91. Khan, A., & Rayner, G. D. (2003). Robustness to non-normality of common tests for the many-sample location problem. *Journal of Applied Mathematics and Decision Sciences*, 7(4), 187–206.
 92. Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M., & Altman, D. G. (2010). Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology*, 8(6), e1000412. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>
 93. Kim, J., & Seo, B. S. (2013). How to calculate sample size and why. *Clinics in Orthopedic Surgery*, 5(3), 235–242. DOI: 10.4055/cios.2013.5.3.235.
 94. Kong, X., Zhang, Y., Hua, Y., & Sun, H. (2017). Association of the C-reactive protein to HDL-C ratio with carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. *Journal of Diabetes and its Complications*, 31(3), 479–485. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2016.11.010>
 95. Konietschke, F., Hothorn, L. A., & Brunner, E. (2012). Rank-based multiple test procedures and simultaneous confidence intervals. *Electronic Journal of Statistics*, 6, 738–759. <https://doi.org/10.1214/12-EJS691>
 96. Kosciak, R. L., et al. (2016). Biomarker ratios predict longitudinal cognitive decline in asymptomatic aging. *Neurobiology of Aging*, 45, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.06.011>
 97. Kraemer, H. C., & Blasey, C. M. (2015). *How many subjects? Statistical power analysis in research*. SAGE Publications.
 98. Kuvin, J. T., Patel, A. R., Sliney, K. A., Pandian, N. G., Rand, W. M., Udelson, J. E., & Karas, R. H. (2003). Relation between high-density lipoprotein cholesterol and peripheral vasomotor function. *The American Journal of Cardiology*, 92(3), 275–279. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(03\)00645-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(03)00645-2)
 99. Lachin, J. M. (1981). Introduction to sample size determination and power analysis for clinical trials. *Controlled Clinical Trials*, 2(2), 93–113.
 100. Lachin, J. M. (2021). *Biostatistical Methods: The Assessment of Relative Risks* (3rd ed.). Wiley.
 101. Lehmann, E. L., & Romano, J. P. (2005). *Testing Statistical Hypotheses* (3rd ed.). Springer.

102. Lewczuk, P., Lelental, N., Spitzer, P., Maler, J. M., & Kornhuber, J. (2015). Amyloid beta 42/40 cerebrospinal fluid concentration ratio in the diagnostics of Alzheimer's disease: validation of two novel assays. *Journal of Alzheimer's Disease*, 43(1), 183–191. <https://doi.org/10.3233/JAD-141371>
103. Leyva De Los Rios, C. D. (2021, 14 de enero). Significancia estadística versus significancia clínica. *Estudiantes por la Mejor Evidencia (Cochrane)* [Blog]. Recuperado de <https://exme.cochrane.org/blog/2021/01/14/significancia-estadistica-versus-significancia-clinica/>
104. Li, Y., Liu, X., Wu, X., et al. (2023). Association of high-sensitivity C-reactive protein with risk of cardiovascular events: A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis*, 371, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2023.01.009>
105. Liao, Y., Wang, Y., Lin, H., Chen, J., Zhang, Y., & Zhu, X. (2020). Ratio of high-sensitivity C-reactive protein to high-density lipoprotein cholesterol levels is associated with carotid atherosclerosis in middle-aged and elderly individuals: A cross-sectional study. *Lipids in Health and Disease*, 19, 114. <https://doi.org/10.1186/s12944-020-01255-7>
106. Libby, P. (2019). The changing landscape of atherosclerosis. *Nature*, 592(7855), 524–533. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1072-1>
107. Libby, P. (2021). Inflammation in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 41(8), 1786–1790. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.121.316000>
108. Libby, P., Ridker, P. M., & Hansson, G. K. (2023). Inflammation in atherosclerosis: From pathophysiology to practice. *Journal of the American College of Cardiology*, 82(5), 421-440. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2023.05.010>
109. Libby, P., Ridker, P. M., & Maseri, A. (2002). Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 105(9), 1135–1143. <https://doi.org/10.1161/hc0902.104353>
110. Lin, Y., Yang, Z., Zhang, C., Du, Y., Liang, C., & Tang, W. (2022). HDL-targeted therapies and cardiovascular outcomes: an updated systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Lipidology*, 16(5), 678–692. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2022.06.005>
111. Lincoff, A. M., Nicholls, S. J., Riesmeyer, J. S., Barter, P. J., Brewer, H. B., Fox, K. A. A., ... & Nissen, S. E. (2017). Evacetrapib and cardiovascular outcomes in

- high-risk vascular disease. *New England Journal of Medicine*, 376(20), 1933–1942.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1609581>
112. Liu, X., Wang, Y., Cao, L., Li, X., & Zhang, H. (2021). High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Heart Association*, 10(14), e019868.
<https://doi.org/10.1161/JAHA.120.019868>
 113. Liu, Y., Zhang, M., Zhang, H., Wang, X., & Li, H. (2023). Total cholesterol to HDL-cholesterol ratio as a predictor of cardiovascular risk: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Atherosclerosis*, 380, 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2023.01.014>
 114. Lorenz, M. W., Markus, H. S., Bots, M. L., Rosvall, M., & Sitzer, M. (2012). Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation*, 115(4), 459–467.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.044594>
 115. Itman, D. G. (1991). *Practical statistics for medical research*. Chapman & Hall.
 116. Mach, F., Baigent, C., Catapano, A. L., Koskinas, K. C., Casula, M., Badimon, L., ... & Tokgozoglul, L. (2020). 2019 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias. *European Heart Journal*, 41(1), 111–188.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz455>
 117. Mann, H. B., & Whitney, D. R. (1947). On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *The Annals of Mathematical Statistics*, 18(1), 50-60.
 118. Marsaglia, G. (1965). Ratios of normal variables and ratios of sums of uniform variables. *Journal of the American Statistical Association*, 60(309), 193–204.
<https://doi.org/10.2307/2283132>
 119. Mattsson, N., Zetterberg, H., Hansson, O., et al. (2014). CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *JAMA*, 302(4), 385–393.
 120. Maxwell, S. E., & Delaney, H. D. (2004). *Designing Experiments and Analyzing Data: A Model Comparison Perspective* (2nd ed.). Psychology Press.
 121. Mayeux, R., Honig, L. S., Tang, M. X., Manly, J., Stern, Y., Schupf, N., & Mehta, P. D. (2003). Plasma A β 40 and A β 42 and Alzheimer's disease: relation to age,

- mortality, and risk. *Neurology*, 61(9), 1185–1190.
<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000091890.32140.8f>
122. Mehta, C., & Pocock, S. J. (2011). Adaptive increase in sample size when interim results are promising: A practical guide with examples. *Statistics in Medicine*, 30(28), 3267–3284.
 123. Mendall, M. A., Patel, P., Asante, M., Ballam, L., Morris, J., Strachan, D., & Camm, A. J. (2020). C-reactive protein: A link between inflammation, hypertension and atherosclerosis. *QJM: An International Journal of Medicine*, 113(10), 707–712.
<https://doi.org/10.1093/qjmed/hcaa128>
 124. Metropolis, N., & Ulam, S. (1949). The Montecarlo Method. *Journal of the American Statistical Association*, 44(247), 335–341. <https://doi.org/10.2307/2280232>
 125. Mintun, M. A., Lo, A. C., Duggan Evans, C., Wessels, A. M., Ardayfio, P. A., Andersen, S. W., ... & Sims, J. R. (2021). Donanemab in early Alzheimer’s disease. *New England Journal of Medicine*, 384(18), 1691–1704.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2100708>
 126. Moher, D., Hopewell, S., Schulz, K. F., et al. (2010). CONSORT 2010 Explanation and Elaboration: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *Journal of Clinical Epidemiology*, 63(8), e1–e37. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2010.03.004>
 127. Morgan, M. G., Henrion, M., & Small, M. (2022). *Uncertainty: A Guide to Dealing with Uncertainty in Quantitative Risk and Policy Analysis*. Cambridge University Press.
 128. Nambi, V., Ballantyne, C. M., Hoogeveen, R. C., Folsom, A. R., Chambless, L. E., Boerwinkle, E., & Rosamond, W. D. (2009). Novel markers for the prediction of cardiovascular events in middle-aged adults. *Circulation*, 119(25), 2859–2867.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.816181>
 129. Neubert, K., & Brunner, E. (2007). A studentized permutation test for the non-parametric Behrens–Fisher problem. *Computational Statistics & Data Analysis*, 51(10), 5192–5204. <https://doi.org/10.1016/j.csda.2006.05.024>
 130. Neuhaeuser, M., & Brunner, E. (2007). Permutation methods in the Behrens–Fisher problem with unequal variances: A simulation study. *Biometrical Journal*, 49(6), 937–947. <https://doi.org/10.1002/bimj.200610356>

131. Neyman, J., & Pearson, E. S. (1933). On the problem of the most efficient tests of statistical hypotheses. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A*, 231(694–706), 289–337.
132. Nofer, J. R., Kehrel, B., Fobker, M., Levkau, B., Assmann, G., & van Leuven, F. (2002). HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis*, 161(1), 1–16. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(01\)00651-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(01)00651-7)
133. O'Hagan, A., & Stevens, J. W. (2001). Bayesian assessment of sample size for clinical trials of cost-effectiveness. *Medical Decision Making*, 21(3), 219–230.
134. Ovod, V., et al. (2017). Amyloid β concentrations and stable isotope labeling kinetics of human plasma specific to central nervous system amyloidosis. *Alzheimer's & Dementia*, 13(8), 841–849.
135. Pace, L., & Salvani, A. (1997). *Principles of Statistical Inference from a Neo-Fisherian Perspective*. World Scientific.
136. Palmqvist, S., et al. (2015). Detailed comparison of amyloid PET and CSF biomarkers for identifying early Alzheimer disease. *Neurology*, 85(14), 1240–1249.
137. Palmqvist, S., Janelidze, S., Quiroz, Y. T., Zetterberg, H., Lopera, F., Stomrud, E., ... & Hansson, O. (2019). Discriminative accuracy of plasma A β 1-42/A β 1-40, phosphorylated tau, and neurofilament light for Alzheimer disease. *JAMA Neurology*, 77(12), 1499–1509. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.4201>
138. Palmqvist, S., Janelidze, S., Stomrud, E., Zetterberg, H., Karl, J., Zink, K., ... & Hansson, O. (2019). Performance of fully automated plasma assays as screening tests for Alzheimer disease-related β -amyloid status. *JAMA Neurology*, 76(9), 1060–1069. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.1632>
139. Pasceri, V., Willerson, J. T., & Yeh, E. T. H. (2000). Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation*, 102(18), 2165–2168. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.102.18.2165>
140. Pearson, T. A., Mensah, G. A., Alexander, R. W., et al. (2003). Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice. *Circulation*, 107(3), 499–511. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000052939.59093.45>
141. Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., ... & MacCallum, C. J. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for

- reporting animal research. *PLoS Biology*, 18(7), e3000410.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>
142. R Core Team (2023). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
143. Rader, D. J., & Hovingh, G. K. (2014). HDL and cardiovascular disease. *The Lancet*, 384(9943), 618–625. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61217-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61217-4)
144. Rai, A. S., Verma, H. K., & Misra, A. (2022). High-sensitivity C-reactive protein and carotid atherosclerosis: A cross-sectional study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 16(8), OC10–OC13. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2022/53782.16661>
145. Rayner, K. J., Suárez, Y., Dávalos, A., Parathath, S., Fitzgerald, M. L., Tamehiro, N., ... & Fernández-Hernando, C. (2011). MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science*, 328(5985), 1570–1573. <https://doi.org/10.1126/science.1190808>
146. Rendón-Macías, M. E., & Villasís-Keever, M. A. (2017). El protocolo de investigación V: el cálculo del tamaño muestral. *Revista Alergia México*, 64(2), 220–227. <https://doi.org/10.29262/ram.v64i2.267>
147. Ridker, P. M. (2003). C-reactive protein: a simple test to help predict risk of heart attack and stroke. *Circulation*, 108(12), e81–e85.
148. Ridker, P. M. (2016). From C-Reactive Protein to Interleukin-6 to Interleukin-1: Moving Upstream to Identify Novel Targets for Atheroprotection. *Circulation Research*, 118(1), 145–156. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306656>
149. Ridker, P. M. (2023). Inflammation and cardiovascular disease: moving from markers to mechanisms. *European Heart Journal*, 44(1), 48–58. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac716>
150. Ridker, P. M., Everett, B. M., Thuren, T., MacFadyen, J. G., Chang, W. H., Ballantyne, C., ... & CANTOS Trial Group. (2017). Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *New England Journal of Medicine*, 377(12), 1119–1131. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1707914>
151. Ridker, P. M., Rifai, N., Rose, L., Buring, J. E., & Cook, N. R. (2000). Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the

- prediction of first cardiovascular events. *New England Journal of Medicine*, 344(26), 1959–1965. <https://doi.org/10.1056/NEJM200006293422601>
152. Robert, C. P., & Casella, G. (2013). *Montecarlo Statistical Methods* (2nd ed.). Springer.
 153. Rohatgi, A., Khera, A., Berry, J. D., Givens, E. G., Ayers, C. R., Wedin, K. E., ... & de Lemos, J. A. (2014). HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. *New England Journal of Medicine*, 371(25), 2383–2393. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1409065>
 154. Rosenson, R. S., Brewer Jr, H. B., Ansell, B. J., Barter, P., Chapman, M. J., Heinecke, J. W., ... & Tall, A. R. (2023). Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*, 20, 165–178. <https://doi.org/10.1038/s41569-022-00783-7>
 155. Sato, N., et al. (2003). Differential effects on A β 42 and A β 40 by gamma-secretase modulators. *Journal of Neurochemistry*, 84(4), 860–867.
 156. Schindler, S. E., et al. (2019). High-precision plasma β -amyloid 42/40 predicts current and future brain amyloidosis. *Neurology*, 93(17), e1647–e1659.
 157. Schulz, K. F., & Grimes, D. A. (2005). Sample size calculations in randomised trials: Mandatory and mystical. *The Lancet*, 365(9467), 1348–1353.
 158. Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*, 8(6), 595–608. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>
 159. Singh, U., Dasu, M. R., Yancey, P. G., & Jialal, I. (2020). C-reactive protein induces monocyte chemoattractant protein-1 release and monocyte recruitment via Fc γ receptors in human aortic endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(6), 1186–1192. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.200980>
 160. Skillbäck, T., Mattsson, N., Blennow, K., & Zetterberg, H. (2014). CSF biomarkers for differential diagnosis of dementias: A large-scale international multicenter study. *Alzheimer's & Dementia*, 10(2), 212–221. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.01.028>
 161. Spiegelhalter, D. J., Abrams, K. R., & Myles, J. P. (2004). *Bayesian approaches to clinical trials and health-care evaluation*. Wiley.

162. Sproston, N. R., & Ashworth, J. J. (2018). Role of C-reactive protein at sites of inflammation and infection. *Frontiers in Immunology*, 9, 754. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00754>
163. Tall, A. R., & Rader, D. J. (2017). The trials and tribulations of CETP inhibitors. *Circulation Research*, 122(1), 106–112. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311978>
164. Tanaka, Y., Orihara, S., & Moriya, J. (2023). Application of sample size re-estimation in clinical trials: A systematic review. *Contemporary Clinical Trials Communications*, 33, 101076. DOI: 10.1016/j.conctc.2022.101076.
165. The REVEAL Collaborative Group. (2017). Effects of anacetrapib in patients with atherosclerotic vascular disease. *New England Journal of Medicine*, 377(13), 1217–1227. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706444>
166. Thijssen, E. H., et al. (2020). Diagnostic value of plasma phosphorylated tau181 in Alzheimer’s disease and frontotemporal lobar degeneration. *Nature Medicine*, 26, 387–397.
167. Tian, Y., Song, Y., Li, M., Zhang, J., & Wang, X. (2022). Association between total cholesterol to HDL-C ratio and cardiovascular outcomes: A systematic review and meta-analysis. *Lipids in Health and Disease*, 21, 85. <https://doi.org/10.1186/s12944-022-01638-6>
168. Toledo, J. B., et al. (2017). Cardiovascular risk factors, cerebrovascular disease, and pathologic diagnosis of Alzheimer’s disease. *Journal of Alzheimer’s Disease*, 55(2), 467–475.
169. van der Laan, A. M., Piek, J. J., & Arslan, F. (2019). Vulnerable plaque, vulnerable patient: The role of inflammation in atherosclerosis. *European Heart Journal*, 40(33), 2615–2623. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz210>
170. van Dyck, C. H., Swanson, C. J., Aisen, P., Bateman, R. J., Chen, C., Gee, M., ... & Reiman, E. M. (2023). Lecanemab in early Alzheimer’s disease. *New England Journal of Medicine*, 388(1), 9–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2212948>
171. Van Rossum, G., & Drake, F. L. (2009). *Python 3 Reference Manual*. Scotts Valley, CA: CreateSpace.
172. Voight, B. F., Skowronski, A. A., Yang, J., Wang, S., & Goldstein, J. L. (2023). Genetic modulation of HDL metabolism: emerging targets and therapeutic

- perspectives. *Nature Medicine*, 29, 845–857. <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02346-1>
173. Wang, C., Wang, L., & Wu, J. (2016). Ratio of high-sensitivity C-reactive protein to HDL-cholesterol and its association with atherosclerosis in patients with hypertension. *Clinica Chimica Acta*, 452, 144–148. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.11.010>
174. Wang, D., Liu, S., Wang, J., & Zhang, Y. (2023). LDL oxidation and atherosclerosis: mechanisms and clinical implications. *Journal of Lipid Research*, 64(1), 100278. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2022.100278>
175. Wang, H., Luo, Z., Liu, X., & Qiao, Y. (2021). Association between C-reactive protein and progression of carotid atherosclerosis: A meta-analysis. *Angiology*, 72(4), 326–333. <https://doi.org/10.1177/0003319720930602>
176. Wang, X., Zhang, M., Zhou, Y., Liu, C., & Zhang, Y. (2023). Prognostic value of the CRP/HDL-C ratio in cardiovascular disease: A meta-analysis. *Clinical Cardiology*, 46(1), 12–21. <https://doi.org/10.1002/clc.23985>
177. Wang, Y., Mandelkow, E., & Mandelkow, E. M. (2021). Tau in physiology and pathology. *Nature Reviews Neuroscience*, 23(1), 22–35. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00539-y>
178. Wang, Z., Du, R., Wu, L., et al. (2022). High-sensitivity C-reactive protein and cardiovascular outcomes: An updated meta-analysis of prospective cohort studies. *International Journal of Cardiology*, 358, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2022.04.038>
179. Wensley, F., Gao, P., Burgess, S., et al. (2011). Association between C reactive protein and coronary heart disease: Mendelian randomisation analysis based on individual participant data. *BMJ*, 342, d548. <https://doi.org/10.1136/bmj.d548>
180. Wilcoxon, F. (1945). Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics Bulletin*, 1(6), 80-83.
181. Willan, A. R., & Pinto, E. M. (2005). The value of information and optimal clinical trial design. *Statistics in Medicine*, 24(12), 1791–1806.
182. Wilson, D. T., Hooper, R., Brown, J., Farrin, A. J., & Walwyn, R. E. A. (2021). Efficient and flexible simulation-based sample size determination for clinical trials with multiple design parameters. *Statistical Methods in Medical Research*, 30(3), 799–815. DOI: 10.1177/0962280220975790.

183. Wilson, E. C. F., Hooper, L., Brown, T. J., Farrin, A. J., & Walwyn, R. (2021). Simulation-based methods for sample size calculation in complex intervention trials. *BMC Medical Research Methodology*, 21, 57.
184. Wilson, P. W. F., Abbott, R. D., & Castelli, W. P. (1998). High density lipoprotein cholesterol and mortality: The Framingham Heart Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 8(6), 737–741. <https://doi.org/10.1161/01.atv.8.6.737>
185. Wu, Y., Zhang, H., Yang, Y., et al. (2022). Association between high-sensitivity C-reactive protein and carotid plaque vulnerability: A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis*, 348, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2022.02.009>
186. Yang, T., Li, S., Xu, H., & Walsh, D. M. (2022). Recent advances in targeting amyloid-beta for therapy of Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 19(5), 377–390. <https://doi.org/10.2174/1567205019666210917141615>
187. Zeng, L., Chen, B., Zeng, C., & Zhang, Y. (2023). High-sensitivity C-reactive protein and carotid atherosclerosis: A meta-analysis. *Journal of Clinical Lipidology*, 17(1), 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2022.11.005>
188. Zhang, X., Sun, L., Guo, J., et al. (2023). High-sensitivity C-reactive protein and carotid atherosclerosis: A meta-analysis of prospective studies. *Stroke*, 54(1), 76–84. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.122.039456>
189. Zhang, Y., Wu, Y., Wang, X., Zhang, D., Zhou, J., & Liu, J. (2023). Effects of PPAR agonists on HDL functionality: A meta-analysis. *Journal of Clinical Lipidology*, 17(2), 156–167. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2022.12.001>
190. Zhao, J., Li, F., Liu, Y., & Chen, R. (2022). Neuroprotective effects of X compound in ischemic stroke patients: A randomized controlled trial. *Journal of Neurological Sciences*, 443, 120497. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2022.120497>
191. Zhao, X., Zhang, H., Li, M., & Wu, Y. (2021). High-sensitivity C-reactive protein to HDL-cholesterol ratio is associated with carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 179, 109006. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109006>
192. Zlokovic, B. V. (2011). Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(12), 723–738.