Anova

Bioestatística em R

André M Ribeiro-dos-Santos

12 de Abr, 2017

ANOVA One-Way

Objetivos

- Avaliar a diferença de uma variável quantitativa entre três ou mais grupos.
- Compreender o resultado de uma ANOVA.
- Quando aplica-se uma ANOVA *one-way* ou *two-way*.
- Como investigar a diferença entre os grupos.
- Ilustrar os resultados.

Imagine ...

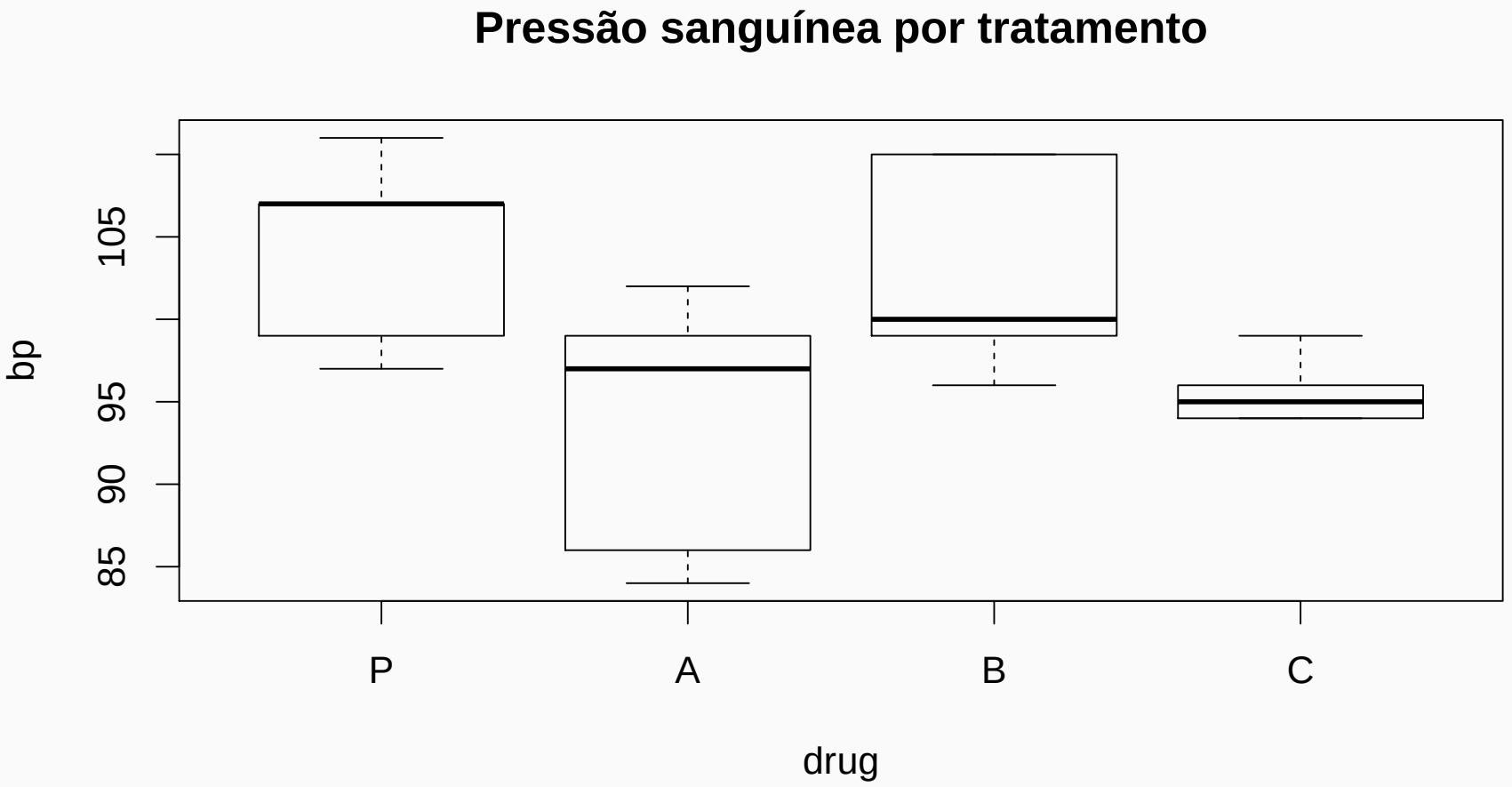
Pesquisadores buscando desenvolver uma nova droga para o tratamento de hipertensão, investigaram o efeito de três compostos sobre a pressão sanguínea de pacientes. Neste estudo eles distribuíram os pacientes entre os três medicamentos totalizando 5 pacientes por composto e 5 pacientes tratados com placebo.

Existe diferença na pressão sanguínea dos pacientes entre os tratamentos?

Table 1: Pressão sanguínea por tratamento

P	A	B	C
107	102	110	96
111	84	99	95
99	86	100	94
107	97	110	99
97	99	96	94

```
> drug <- factor(rep(1:4, each=5), labels = c("P", "A", "B", "C"))
> bp   <- c(107, 111,  99, 107, 97, 102, 84, 86, 97, 99,
+           110,  99, 100, 110, 96,  96, 95, 94, 99, 94)
> plot(bp~drug, main = "Pressão sanguínea por tratamento")
```



Avaliando o problema

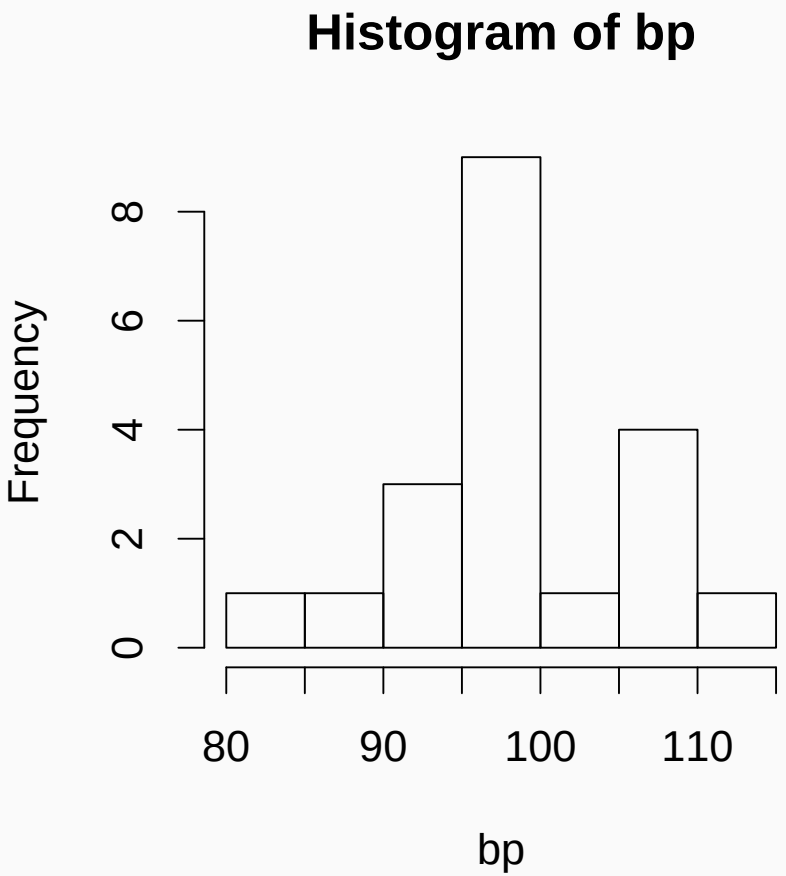
- Quais os tipos de variáveis envolvidas?
- Qual a questão que deseja-se resolver?
- Quantas categorias possui a variável qualitativa?
- Qual a distribuição da variável quantitativa?

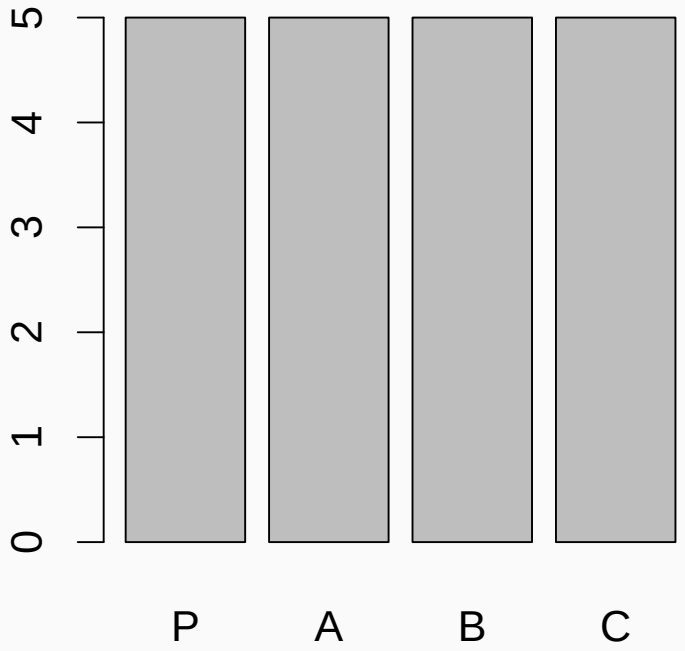
Avaliando o problema

- Quais os tipos de variáveis envolvidas? **Uma medida quantitativa e uma categórica.**
- Qual a questão que deseja-se resolver? **Saber se existe diferença entre os tratamentos.**
- Quantas categorias possui a variável qualitativa? **Quatro categorias: três compostos e o placebo**

- Qual a distribuição das variáveis?

```
> par(mfrow = c(1,2))
> hist(bp)
> plot(drug)
```





ANOVA One-Way

Quando deseja-se comparar a distribuição de uma medida quantitativa entre três ou mais grupos usa-se ANOVA (***AN****alysis* ***O****f* ***VA****riance*).

$$Ho : \hat{x}_A = \hat{x}_B = ... = \hat{x}_k$$

$$Ha : \text{Nem todas as médias são iguais}$$

$$Ha : \exists a, b \in \{A, B, ..., k\} : \hat{x}_a \neq \hat{x}_b$$

Esta análise compara a variância explicada pela média central com o obtido em cada grupo.

Calcula-se a razão do erro médio quadrático **entre os grupos** e **dentro dos grupo** para obter o valor de F.

Variação	DF	SSQ[1]	MS[2]	F
Entre	$k-1$	$SSQ(treat)$	$SSQ(treat)/(k-1)$	$MS(treat)/MS(error)$
Dentro	$n-k$	$SSQ(error)$	$SSQ(error)/(n-m)$	
Total	$n-1$	$SSQ(total)$		

$$SSQ(treat) = \sum(\hat{x} - \hat{x}_i)^2$$

$$SSQ(error) = \sum(x - \hat{x}_i)^2$$

$$SSQ(total) = SSQ(treat) + SSQ(error) = \sum(x - \hat{x})^2$$

[1] Soma do erro quadrático

[2] Erro quadrático médio.

```
> ?aov
> ## Fit an Analysis of Variance Model
> ## Description:
> ##      Fit an analysis of variance model by a call to ‘lm’ for each
> ##      stratum.
> ## Usage:
> ##      aov(formula, data = NULL, projections = FALSE, qr = TRUE,
> ##          contrasts = NULL, ...)
> ## Arguments:
> ##  formula: A formula specifying the model.
> ##     data: A data frame in which the variables specified in the
> ##           formula will be found. If missing, the variables are
> ##           searched for in the standard way.
```

```
> (model_drug <- aov(bp~drug))
```

```
## Call:
##    aov(formula = bp ~ drug)
##
## Terms:
##                     drug Residuals
## Sum of Squares  418.6     591.2
## Deg. of Freedom     3        16
##
## Residual standard error: 6.078651
## Estimated effects may be unbalanced
```

```
> summary(model_drug)
```

```
##             Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
## drug         3  418.6  139.53   3.776 0.0319 *
## Residuals   16  591.2   36.95
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Regressão com Variáveis Discretas

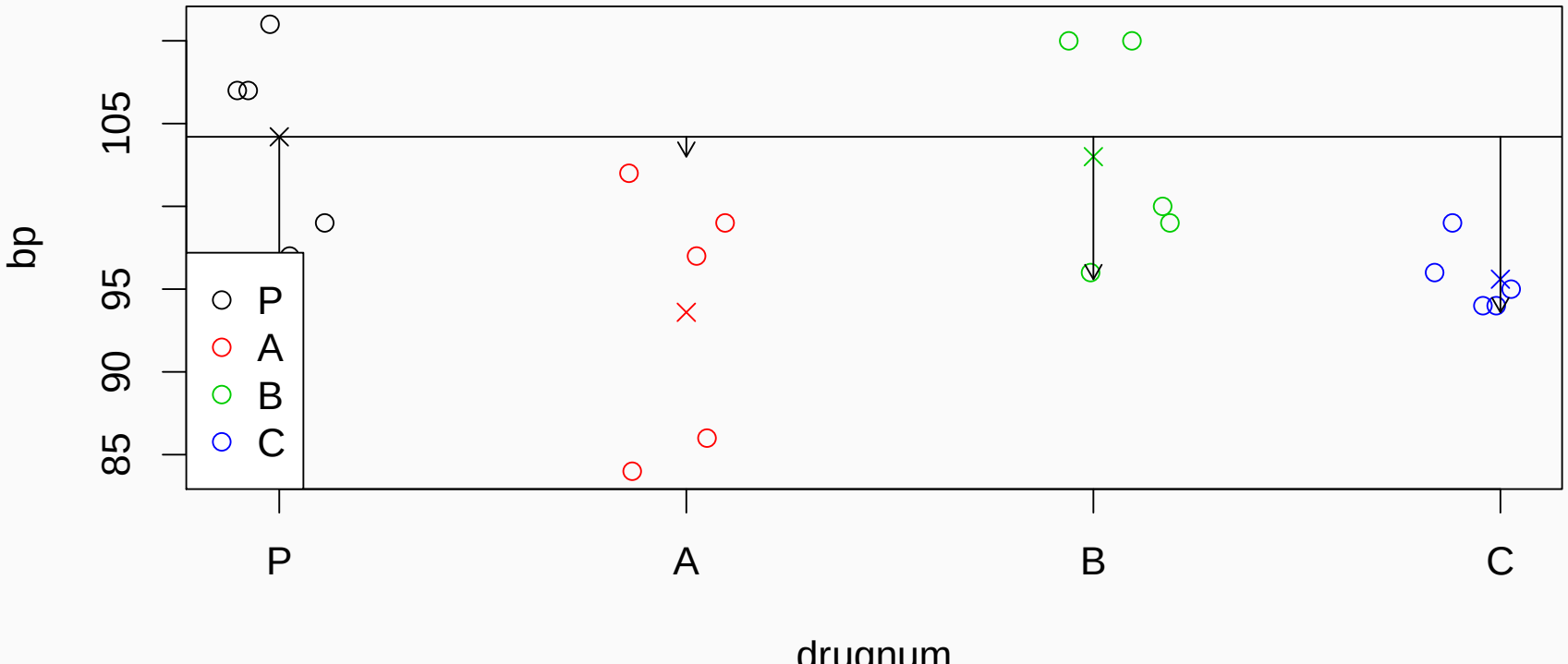
Outra forma de olhar o mesma análise é através de uma regressão linear com variáveis discretas. Neste tipo de regressão substitui-se a variável em questão por várias variáveis binárias indicado cada categórica.

Como numa regressão linear busca-se minimizar o erro, o β obtido em cada caso corresponde ao desvio da média de cada categoria em relação a uma categoria basal (quando incluso α).

```
> (model_lm <- lm(bp ~ drug))
```

```
##
## Call:
## lm(formula = bp ~ drug)
##
## Coefficients:
## (Intercept)        drugA        drugB        drugC
##       104.2        -10.6         -1.2         -8.6
```

```
> cf       <- coef(model_lm)
> drugmn   <- c(cf[1], cf[1] + cf[2:4])
> drugnum  <- jitter(as.numeric(drug))
>
> plot(bp~drugnum, col = drug, xaxt="n")
> points(1:4, drugmn, col=1:4, pch=4)
> abline(h = drugmn[1])
> arrows(1:4, drugmn[1], 1:4, drugmn[2:4], length=.1)
> axis(side = 1, at = 1:4, labels = levels(drug))
> legend("bottomleft", levels(drug), col = 1:4, pch = 1, bg = "white")
```



```
> (drugcf   <- coef(model_lm))

## (Intercept)       drugA       drugB       drugC
##       104.2       -10.6        -1.2        -8.6

> (drugmean <- c(drugcf[1], drugcf[2:4] + drugcf[1]))

## (Intercept)       drugA       drugB       drugC
##       104.2        93.6       103.0        95.6

> c(mean(bp[drug == "P"]), mean(bp[drug == "A"]),
+   mean(bp[drug == "B"]), mean(bp[drug == "C"]))

## [1] 104.2  93.6 103.0  95.6

> coef(lm(bp ~ 0 + drug))

## drugP drugA drugB drugC
## 104.2  93.6 103.0  95.6
```

```
> ssr <- sum((mean(bp) - predict(model_lm))^2)
> sse <- sum((bp - predict(model_drug))^2) # ou sum(resid(model_drug)^2)
> f   <- (ssr / (4 - 1)) / (sse / (20 - 4))
> data.frame("SSR" = ssr, "SSE" = sse, "F" = f, "P" = 1 - pf(f, 4-1, 20-4))

##     SSR   SSE        F          P
## 1 418.6 591.2 3.776274 0.03185873

> anova(model_drug)

## Analysis of Variance Table
##
## Response: bp
##           Df Sum Sq Mean Sq F value  Pr(>F)
## drug       3  418.6  139.53  3.7763 0.03186 *
## Residuals 16  591.2   36.95
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Exercícios - ANOVA One-way

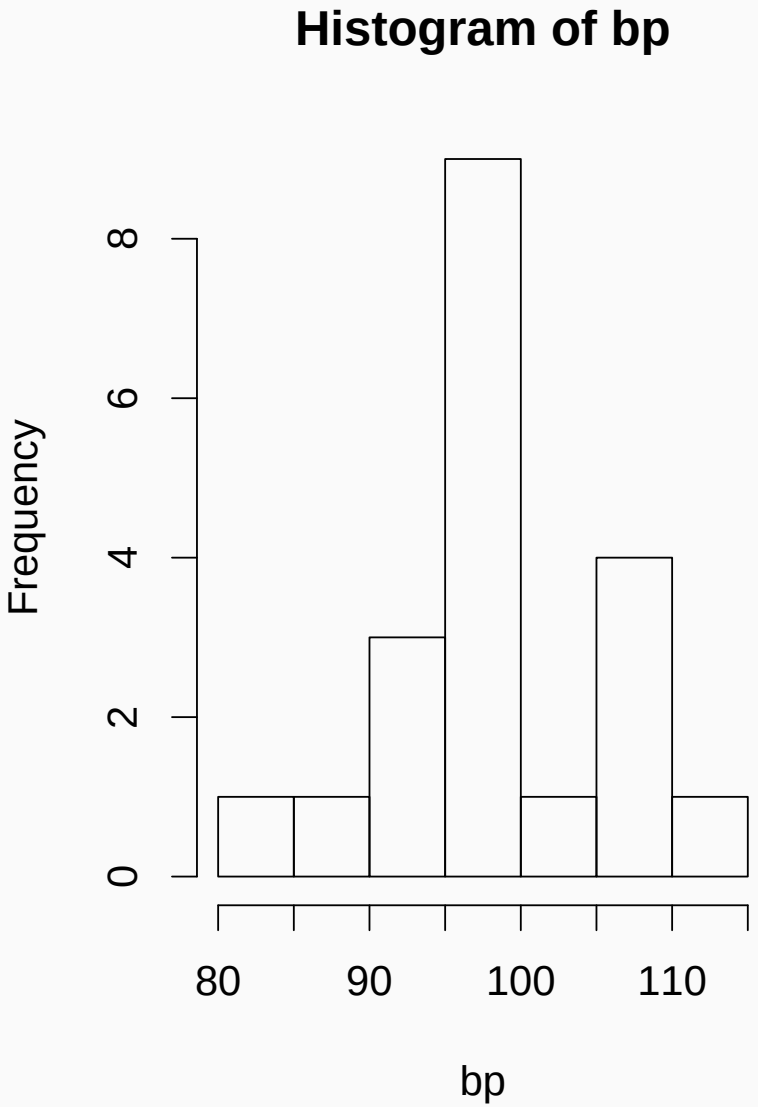
Numa pesquisa sobre o tratamento de hipertensão, os pesquisadores investigaram o efeito de três diferentes compostos. Para tanto, eles dividiram uma coorte de 64 pacientes em quatro tratamento para cada composto diferente e um recebendo placebo.

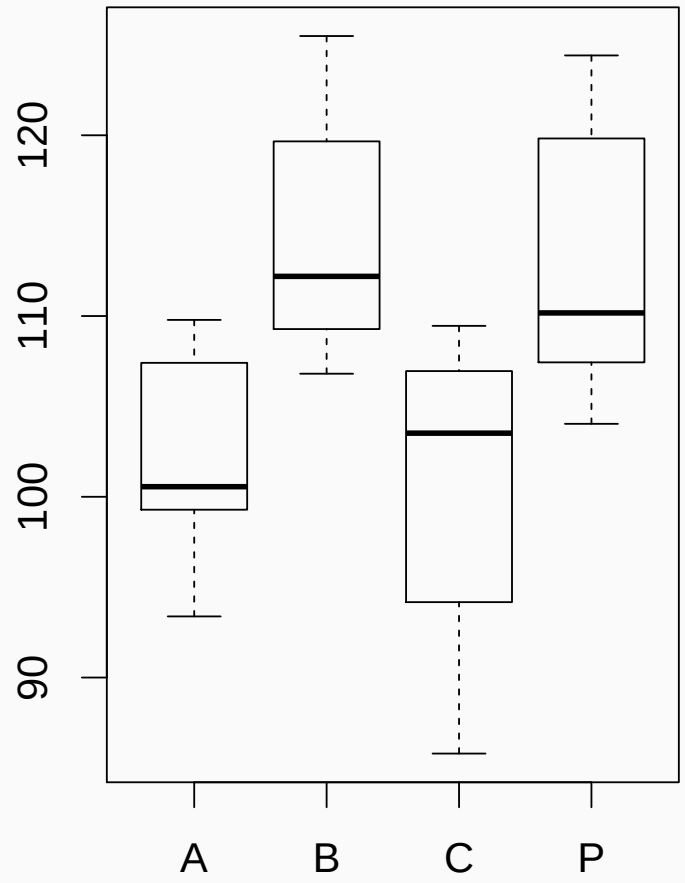
1. Ilustre a distribuição da pressão arterial entre os diferentes tratamentos.
2. Avalie se existe diferença entre os tratamentos.

```
> hbp <- read.table('hbp-treatment.tsv', header=T)
```

1. Ilustre a distribuição da pressão arterial entre os diferentes tratamentos.

```
> par(mfrow = c(1,2))
> hist(bp)
> boxplot(bp~drug, data=hbp)
```





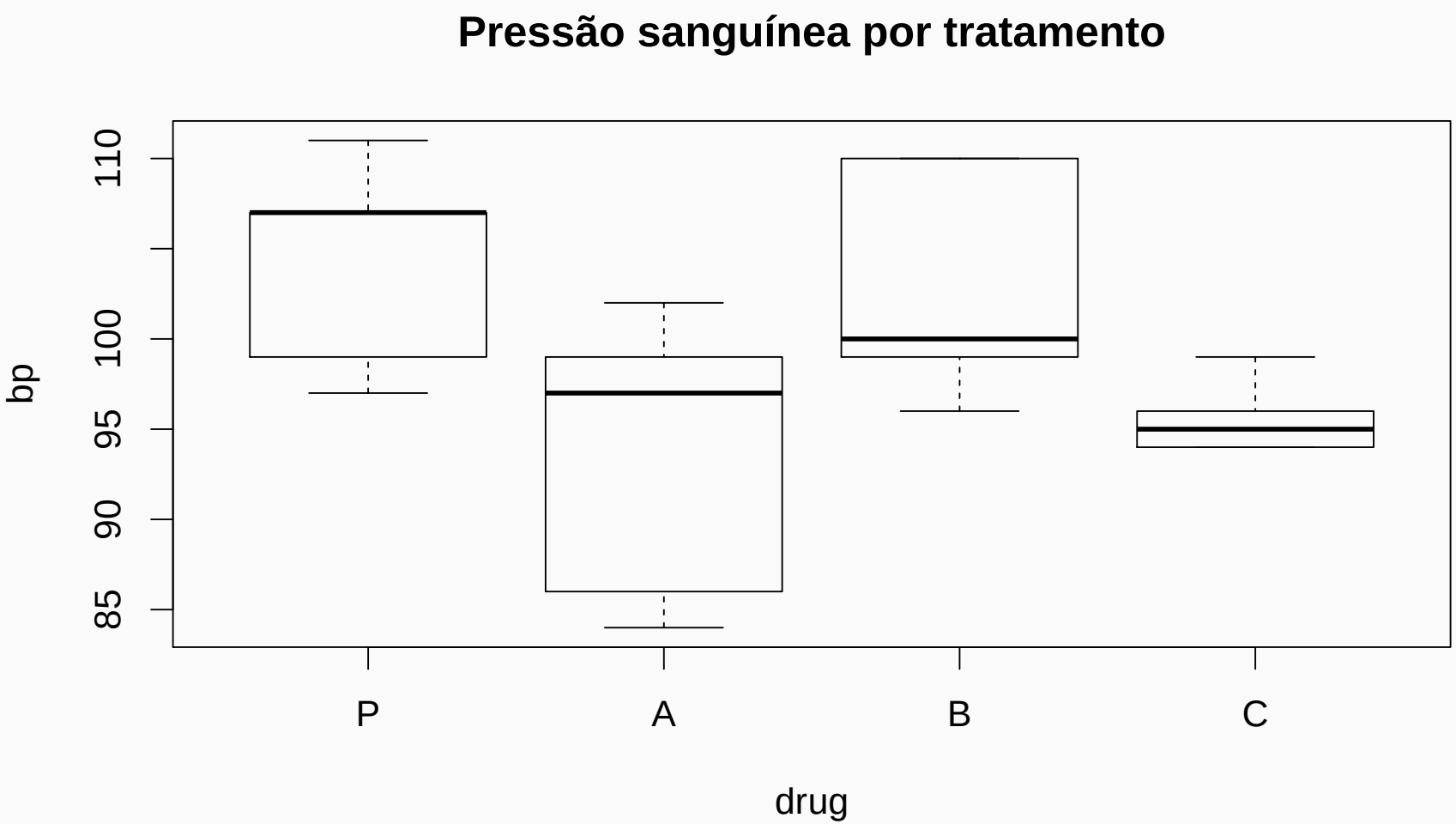
2. Avalie se existe diferença entre os tratamentos.

```
> summary(aov(bp~drug))
```

```
##             Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
## drug         3  418.6  139.53   3.776 0.0319 *
## Residuals   16  591.2   36.95
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Agora pergunta-se

Entre quais grupos da amostragem houve diferença?



Post-hoc

Para responder essa questão, poderíamos fazer uma série de testes t entre as amostras. No entanto a medida que aumentamos o número de testes também aumentamos as chances de identificar como significativo uma relação aleatória.

Para cada teste (usando $\alpha = 0.05$) admitimos uma probabilidade de identificar como significativo algo aleatório em 5% dos casos e 95% de identificar corretamente. Portanto, em dois testes temos 90.25% de chance de chamar corretamente e em três testes temos 85.74%.

Para reduzir esse tipo de erro, aplicamos correções do p-value, como **Bonferroni** e **Benjamin-Hockenberg**.

```
> p.adjust(pvalues, method = "bonf")
> p.adjust(pvalues, method = "fdr")
```

```
> pairwise.t.test(bp, drug, p.adjust.method = "bonf")


##
##  Pairwise comparisons using t tests with pooled SD
##
## data:  bp and drug
##
##   P     A     B
## A 0.084 -     -
## B 1.000 0.159 -
## C 0.239 1.000 0.433
##
## P value adjustment method: bonferroni
```

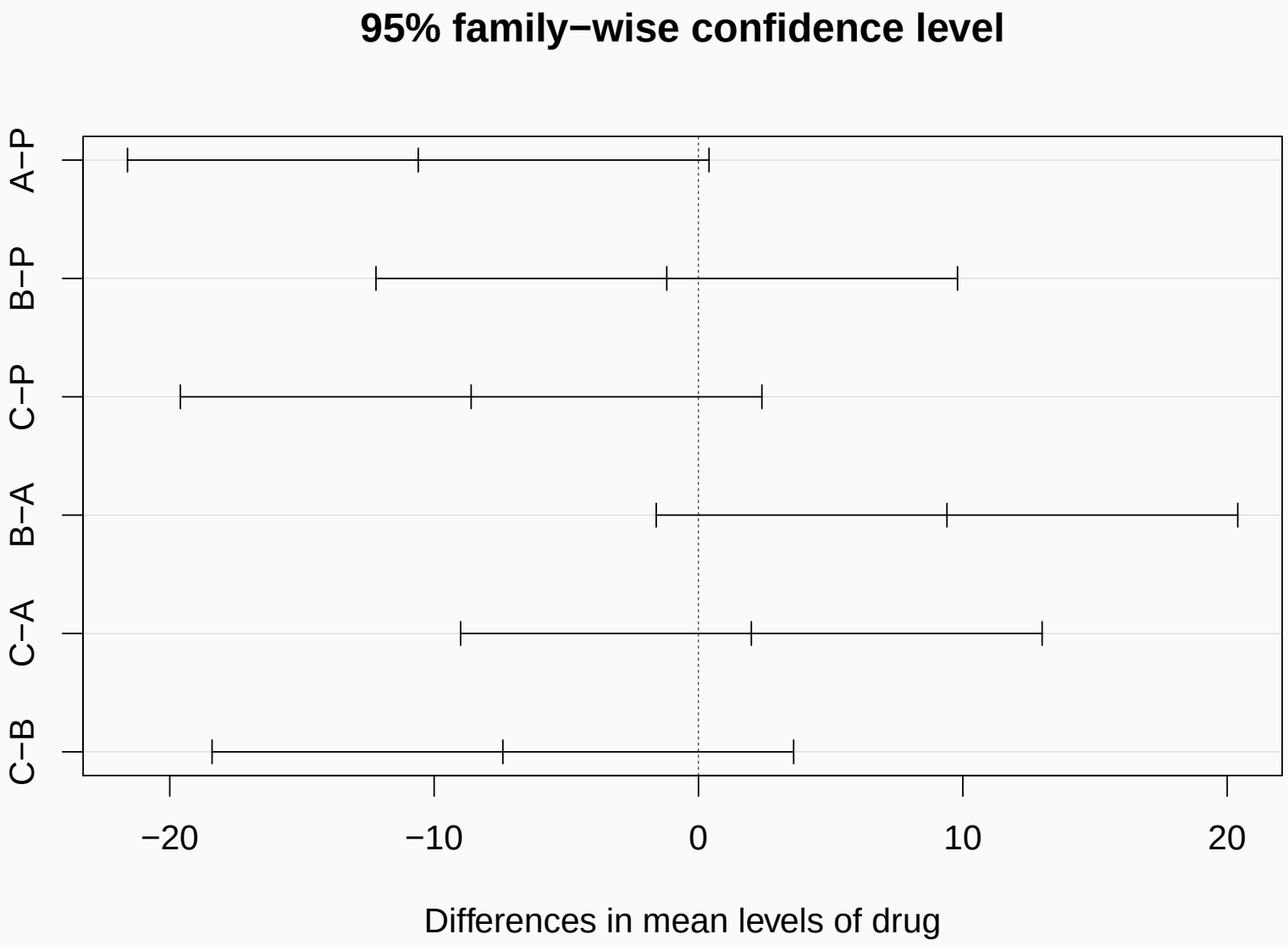
Post-hoc (Tukey's HSD)

Para **ANOVA** foi desenvolvida um teste mais preciso que utiliza a variação global no lugar de somente os pares (como seria feito).

```
> TukeyHSD(model_drug)
```

```
##   Tukey multiple comparisons of means
##     95% family-wise confidence level
##
## Fit: aov(formula = bp ~ drug)
##
## $drug
##      diff        lwr        upr     p adj
## A-P -10.6 -21.599124  0.3991236 0.0609262
## B-P  -1.2 -12.199124  9.7991236 0.9890559
## C-P  -8.6 -19.599124  2.3991236 0.1554472
## B-A   9.4  -1.599124 20.3991236 0.1082113
## C-A   2.0  -8.999124 12.9991236 0.9529943
## C-B  -7.4 -18.399124  3.5991236 0.2569956
```

```
> plot(TukeyHSD(model_drug))
```

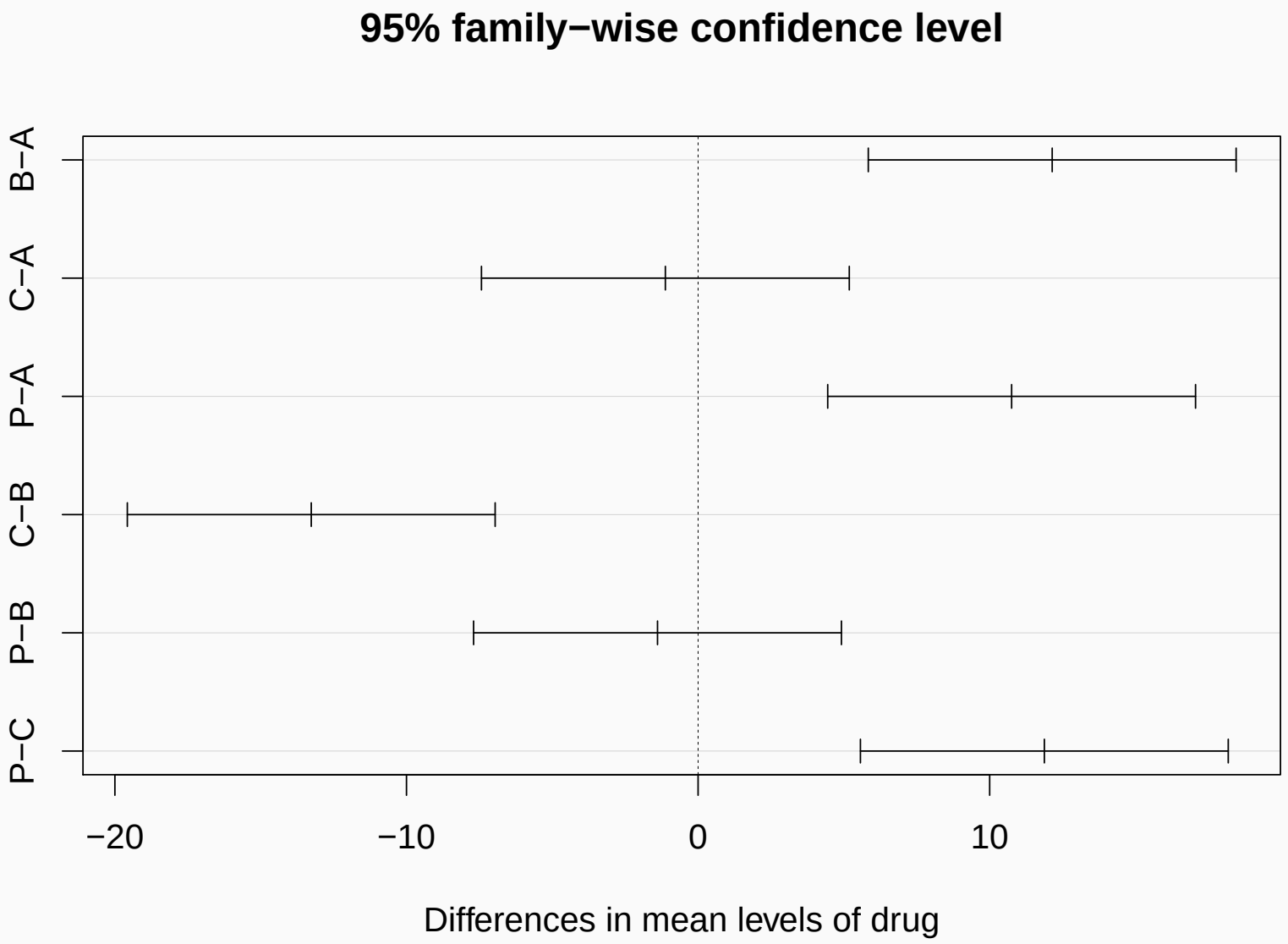


Exercícios - Post-hoc

Para os dados do exercícios anterior, avalie entre quais tratamentos houve diferenças significativas da pressão arterial. Ilustre a diferença entre os grupos.

```
> TukeyHSD(aov(bp~drug, data=hbp))


##   Tukey multiple comparisons of means
##     95% family-wise confidence level
##
## Fit: aov(formula = bp ~ drug, data = hbp)
##
## $drug
##           diff        lwr       upr     p adj
## B-A  12.144512   5.837205 18.451818 0.0000224
## C-A  -1.121894  -7.429201  5.185412 0.9653512
## P-A  10.752993   4.445686 17.060300 0.0001797
## C-B -13.266406 -19.573712 -6.959099 0.0000039
## P-B  -1.391519  -7.698825  4.915788 0.9368283
## P-C  11.874887   5.567581 18.182194 0.0000338
```

```
> plot(TukeyHSD(aov(bp~drug, data=hbp)))
```



ANOVA Two-way

Imagine...

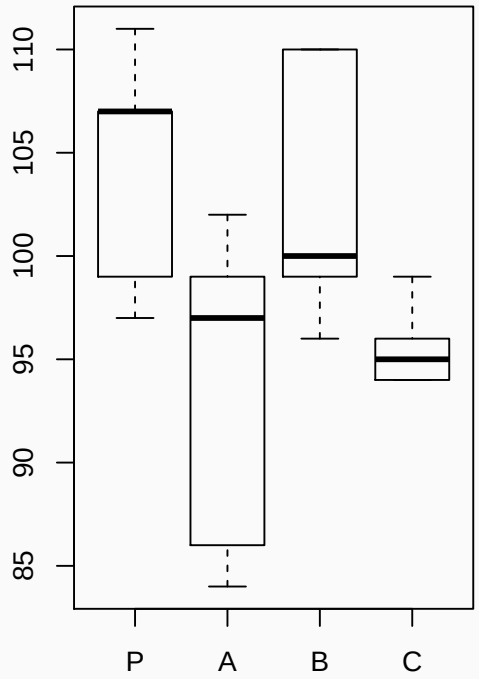
Sabendo que a pressão sanguínea varia entre os sexos (masculino e feminino).

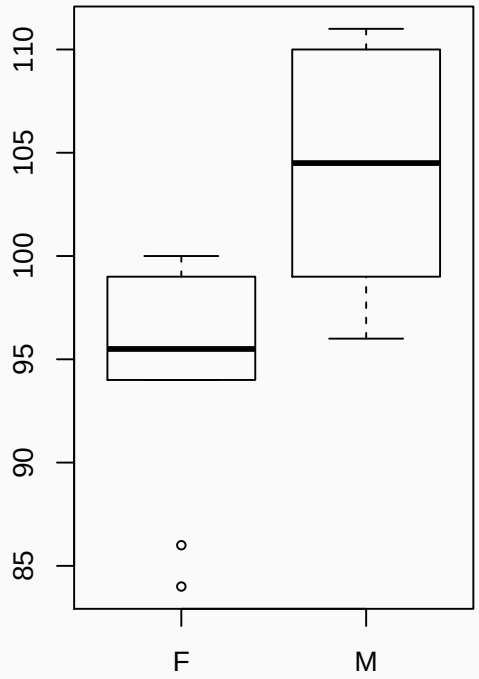
A resposta ao tratamento, varia dependendo do sexo?

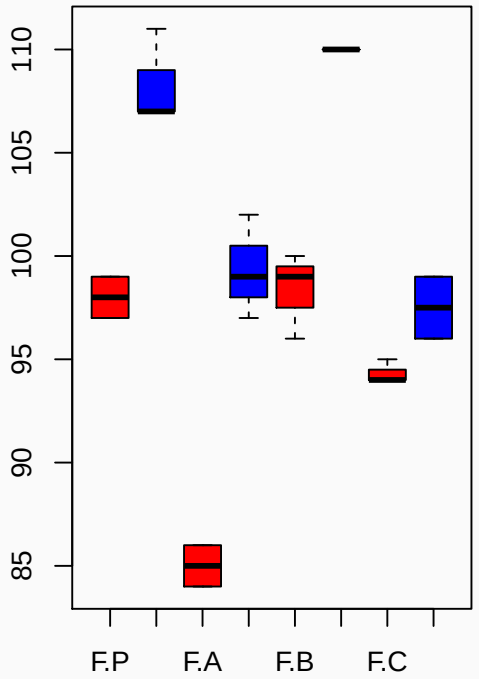
Table 3: Pressão Sanguínea por Tratamento e sexo

Pressão Sanguínea	Tratamento	Sexo	Pressão Sanguínea	Tratamento	Sexo
107	P	M	110	B	M
111	P	M	99	B	F
99	P	F	100	B	F
107	P	M	110	B	M
97	P	F	96	B	F
102	A	M	96	C	M
84	A	F	95	C	F
86	A	F	94	C	F
97	A	M	99	C	M
99	A	M	94	C	F

```
> sex <- factor(c("M","M","F","M","F","M","F","F","M","M",
+                 "M","F","F","M","F","M","F","F","M","F"))
> par(mfrow = c(1,3))
> boxplot(bp~drug)
> boxplot(bp~sex)
> boxplot(bp~sex*drug, col=c('red', 'blue'))
```







ANOVA Two-way

Fonte	DF	SSQ[3]	MS[4]	F
A	$a-1$	$SSQ(A)$	$SSQ(A)/DF(A)$	$MS(A)/MS(error)$
B	$b-k$	$SSQ(B)$	$SSQ(B)/DF(B)$	$MS(B)/MS(error)$
AB	$(a-1)(b-1)$	$SSQ(AB)$	$SSQ(AB)/DF(AB)$	$MS(AB)/MS(error)$
Resid	$n-ab$	$SSQ(err)$	$SSQ(er)/DF(err)$	
Total	$n-1$	$SSQ(total)$		

$$
\begin{aligned}
SSQ(A) &= \sum(\hat{y}_i - \hat{y})^2 \\
SSQ(B) &= \sum(\hat{y}_{ij} - \hat{y}_i)^2 \\
SSQ(AB) &= SSQ(total) - SSQ(A) - SSQ(B) - SSQ(err) \\
SSQ(err) &= \sum(y - \hat{y}_{ijk})^2 \\
SSQ(total) &= \sum(y - \hat{y})^2
\end{aligned}
$$

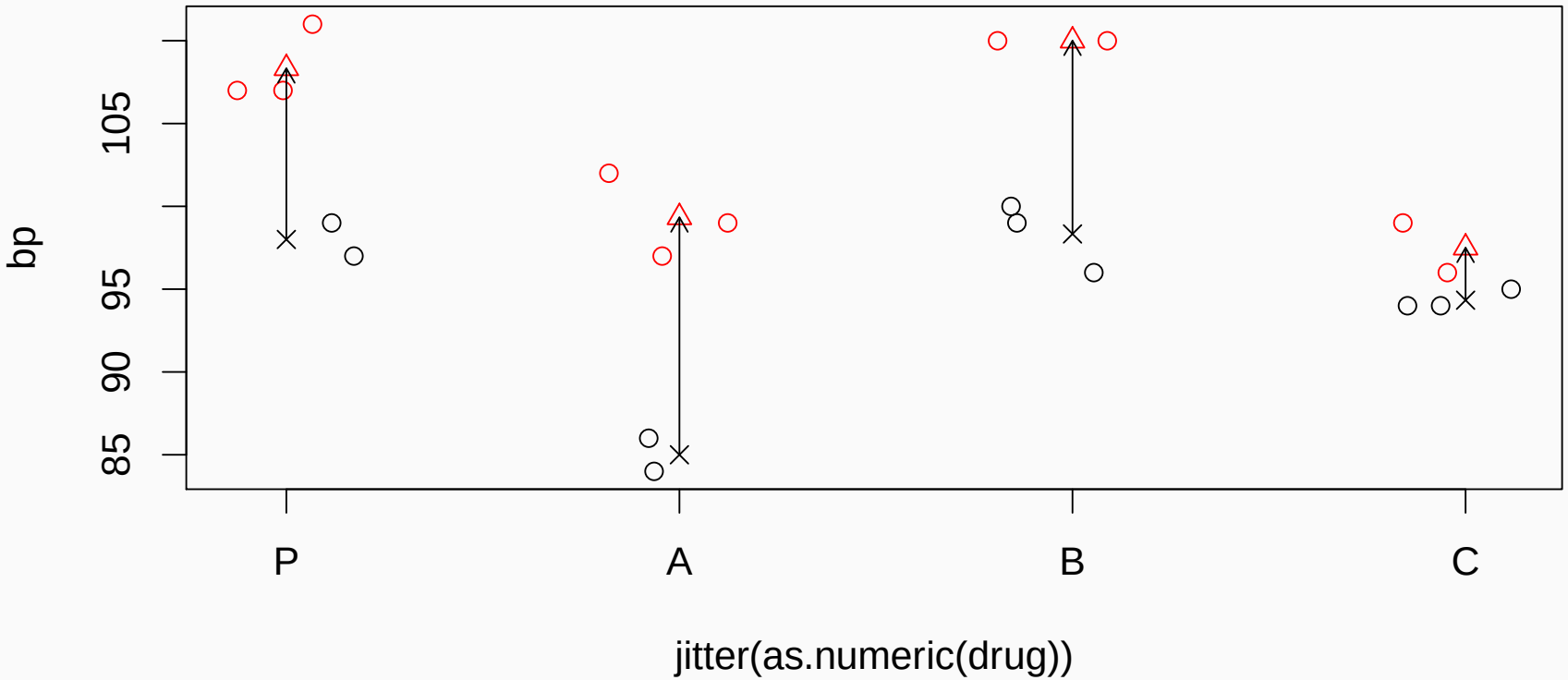
[3] Soma do erro quadrático

[4] Erro quadrático médio.

```
> summary(aov(bp ~ sex * drug))
```

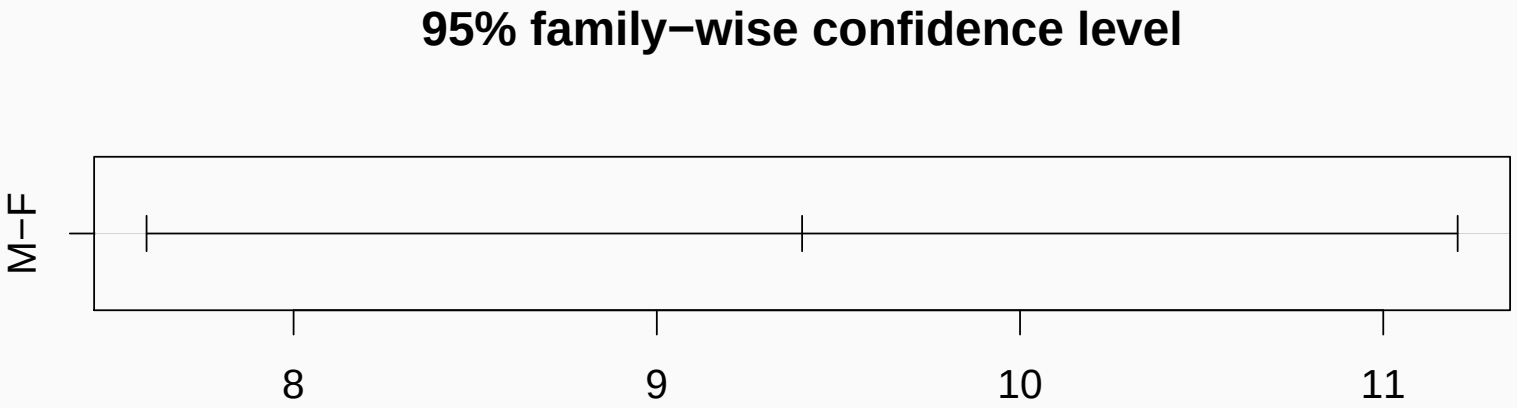
```
##              Df Sum Sq Mean Sq F value   Pr(>F)
## sex           1  441.8   441.8 128.784 8.99e-08 ***
## drug          3  444.9   148.3  43.227 1.04e-06 ***
## sex:drug      3   82.0    27.3   7.964  0.00346 **
## Residuals    12   41.2     3.4
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

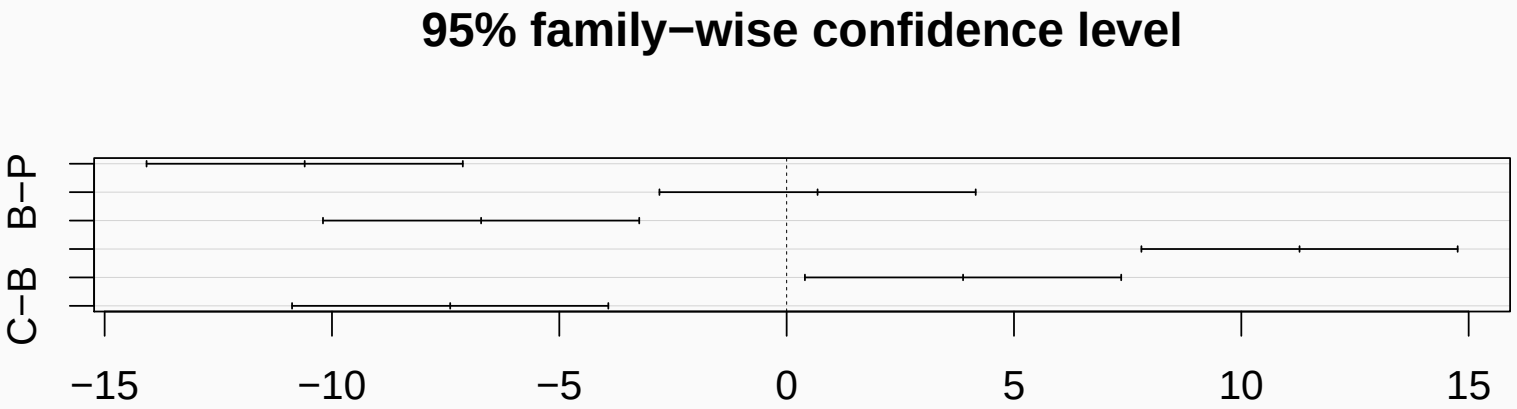
```
> cf <- coef(lm(bp~0+drug*sex))
> plot(bp~jitter(as.numeric(drug)), col=sex, xaxt="n")
> axis(side = 1, 1:4, levels(drug))
> points(1:4, cf[1:4], col=1, pch=4)
> points(1:4, cf[5] + cf[1:4] + c(0, cf[6:8]), col=2, pch=2)
> arrows(1:4, cf[1:4],
+        1:4, cf[5] + cf[1:4] + c(0, cf[6:8]), length=.1)
```



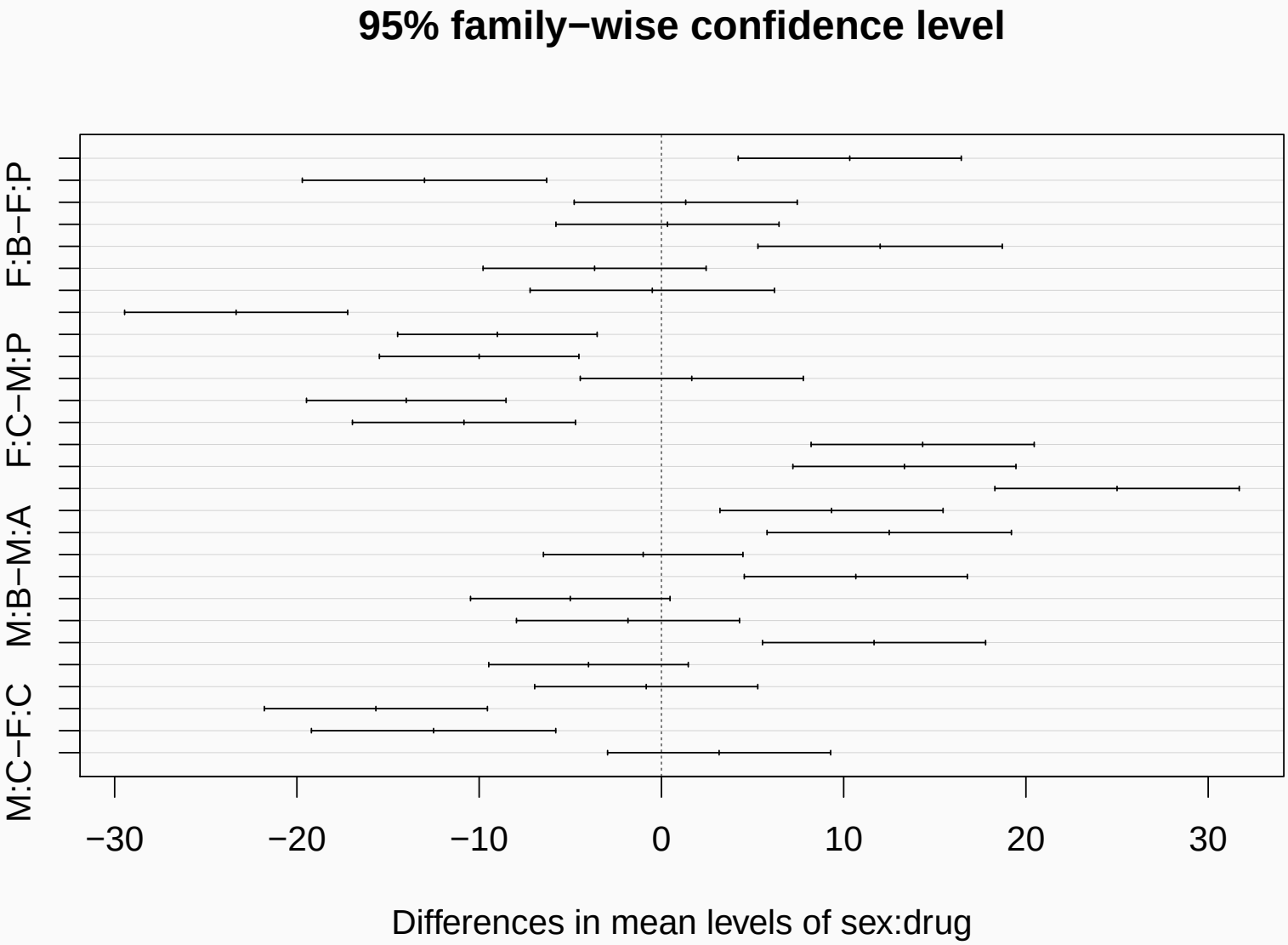
```
> sssex  <- sum((predict(lm(bp~sex)) - predict(lm(bp~1)))^2)
> ssdrug <- sum((predict(lm(bp~sex+drug)) - predict(lm(bp~sex)))^2)
> ssint  <- sum((predict(lm(bp~sex*drug)) - predict(lm(bp~sex+drug)))^2)
> sserr  <- sum(resid(lm(bp~sex*drug))^2)
> c("SS SEX"=sssex, "SS DRUG"=ssdrug, "SS SEX:DRUG"=ssint, "SS ERR"=sserr)

##      SS SEX     SS DRUG SS SEX:DRUG      SS ERR
##   441.80000   444.87500    81.95833    41.16667

> summary(aov(bp~sex*drug))[[1]]

##             Df Sum Sq Mean Sq  F value    Pr(>F)
## sex          1 441.80  441.80 128.7838 8.986e-08 ***
## drug         3 444.88  148.29  43.2267 1.043e-06 ***
## sex:drug     3  81.96   27.32   7.9636  0.003459 **
## Residuals   12  41.17    3.43
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
> par(mfrow = c(2,1))
> plot(TukeyHSD(aov(bp~sex*drug), "sex"))
> plot(TukeyHSD(aov(bp~sex*drug), "drug"))
```





```
> plot(TukeyHSD(aov(bp~sex*drug), "sex:drug"))
```



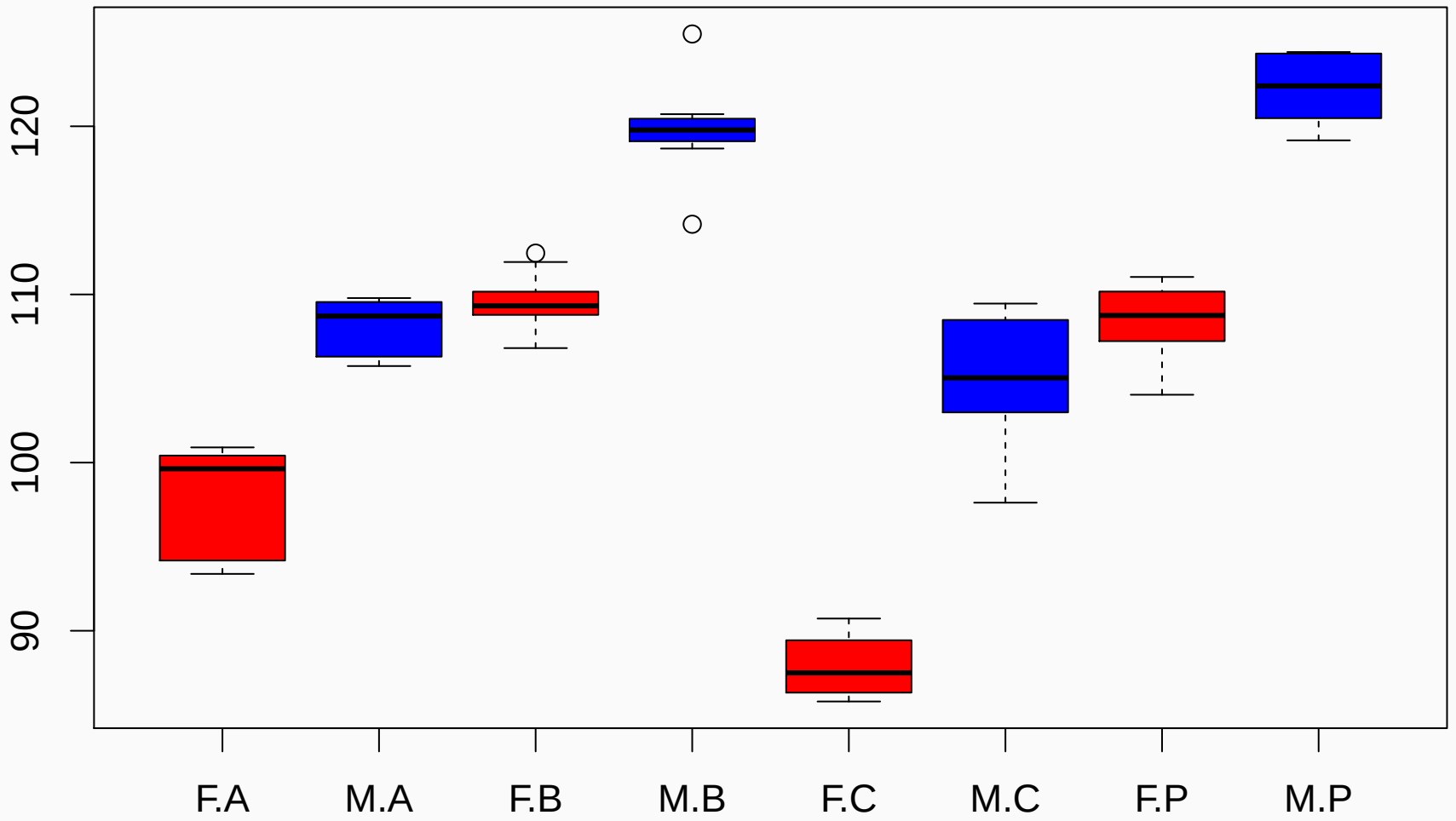
Exercícios - ANOVA Two-way

Visto que a pressão arterial média difere entre homens e mulheres, os pesquisadores decidiram avaliar se o efeito dos medicamentos também varia entre os sexos.

1. Ilustre a distribuição de pressão arterial entre os tratamentos e sexo dos pacientes.
2. Avalie se o efeito de algum dos tratamentos varia em função do sexo dos pacientes e identifique qual.

1. Ilustre a distribuição de pressão arterial entre os tratamentos e sexo dos pacientes.

```
> boxplot(bp~sex*drug, data=hbp, col = c("red", "blue"))
```



2. Avalie se o efeito de algum dos tratamentos varia em função do sexo dos pacientes e identifique qual.

```
> summary(aov(bp~sex*drug))
```

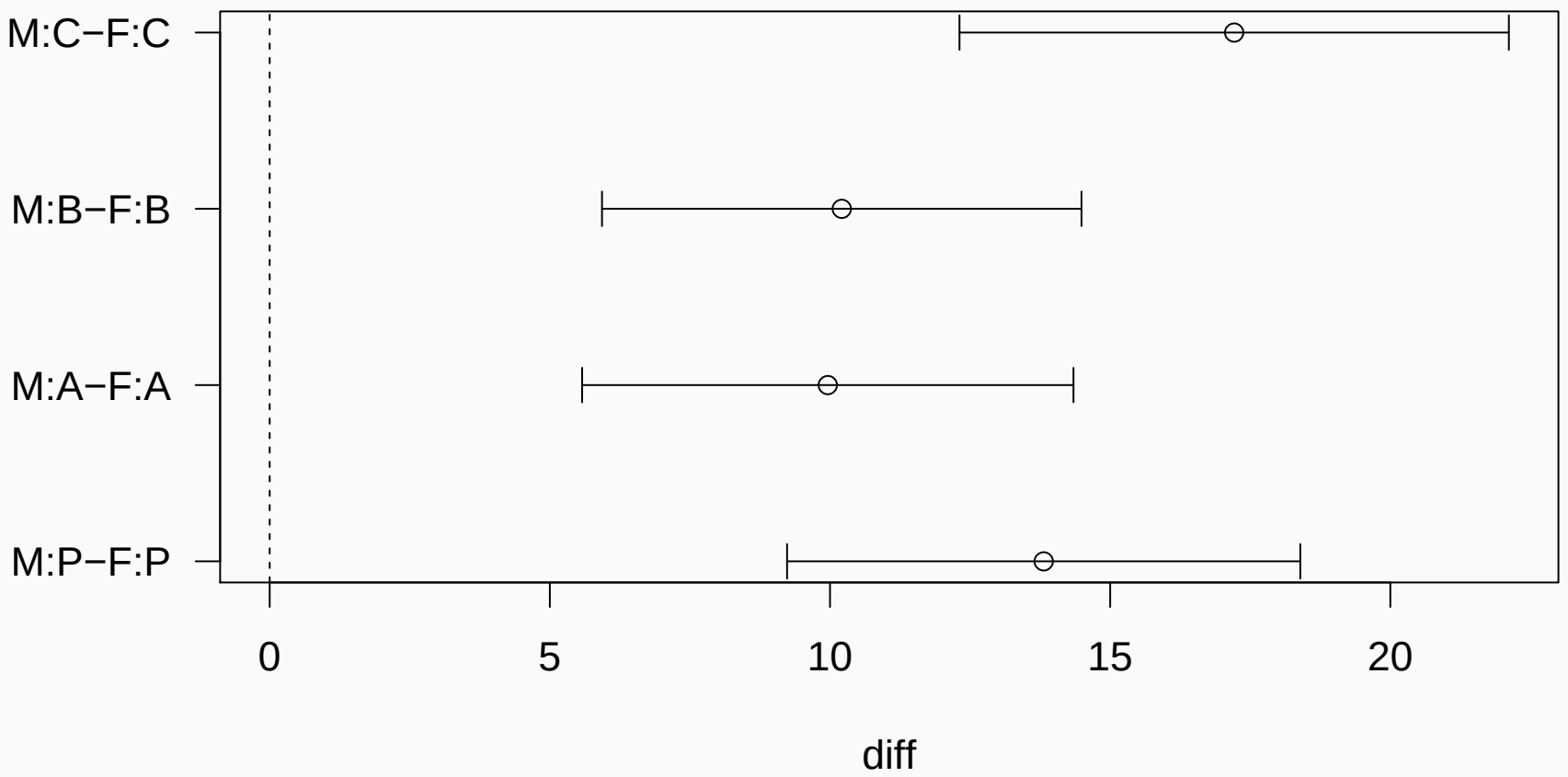
```
##              Df Sum Sq Mean Sq F value   Pr(>F)
## sex           1  441.8   441.8 128.784 8.99e-08 ***
## drug          3  444.9   148.3  43.227 1.04e-06 ***
## sex:drug      3   82.0    27.3   7.964  0.00346 **
## Residuals    12   41.2     3.4
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
> TukeyHSD(aov(bp~sex*drug))$`sex:drug`

##                  diff        lwr         upr        p adj
## M:P-F:P  10.3333333   4.213596  16.4530704 9.572931e-04
## F:A-F:P -13.0000000 -19.703836  -6.2961640 2.641204e-04
## M:A-F:P   1.3333333  -4.786404   7.4530704 9.906154e-01
## F:B-F:P   0.3333333  -5.786404   6.4530704 9.999989e-01
## M:B-F:P  12.0000000   5.296164  18.7038360 5.618192e-04
## F:C-F:P  -3.6666667  -9.786404   2.4530704 4.288268e-01
## M:C-F:P  -0.5000000  -7.203836   6.2038360 9.999907e-01
## F:A-M:P -23.3333333 -29.453070 -17.2135963 2.028280e-07
## M:A-M:P  -9.0000000 -14.473659  -3.5263408 1.213862e-03
## F:B-M:P -10.0000000 -15.473659  -4.5263408 4.646400e-04
## M:B-M:P   1.6666667  -4.453070   7.7864037 9.681530e-01
## F:C-M:P -14.0000000 -19.473659  -8.5263408 1.622261e-05
## M:C-M:P -10.8333333 -16.953070  -4.7135963 6.225770e-04
## M:A-F:A  14.3333333   8.213596  20.4530704 4.045805e-05
## F:B-F:A  13.3333333   7.213596  19.4530704 8.422393e-05
## M:B-F:A  25.0000000  18.296164  31.7038360 2.616402e-07
## F:C-F:A   9.3333333   3.213596  15.4530704 2.332514e-03
## M:C-F:A  12.5000000   5.796164  19.2038360 3.835888e-04
```

```
> table <- TukeyHSD(aov(bp~sex*drug, data=hbp))$`sex:drug`
> rows  <- c("M:P-F:P", "M:A-F:A", "M:B-F:B", "M:C-F:C")
> (set  <- as.data.frame(table[rows,]))
```

```
##              diff       lwr      upr        p adj
## M:P-F:P 13.81338  9.233623 18.39314 1.539591e-11
## M:A-F:A  9.96024  5.575453 14.34503 5.344898e-08
## M:B-F:B 10.20986  5.930747 14.48897 1.362111e-08
## M:C-F:C 17.21295 12.310610 22.11529 7.374990e-12
```

```
> par(mar=c(4, 6, 2, 2))
> plot(range(set), c(1, nrow(set)), type="n",
+      xlab = "diff", ylab = "", yaxt="n")
> abline(v = 0, lty=2)
> points(set$diff, 1:4)
> arrows(set$lwr, 1:4, set$upr, 1:4, angle=90, code = 3, length = .1)
> axis(side = 2, 1:4, rownames(set), las=2)
```



```
> coef(summary(lm(bp~sex*drug)))
```

```
##                Estimate Std. Error    t value     Pr(>|t|)
## (Intercept)  98.0000000   1.309686 74.8270881 2.160295e-17
## sexM         10.3333333   1.690798  6.1115143 5.243534e-05
## drugA       -13.0000000   1.852176 -7.0187718 1.397166e-05
## drugB         0.3333333   1.690798  0.1971456 8.470133e-01
## drugC        -3.6666667   1.690798 -2.1686019 5.092209e-02
## sexM:drugA    4.0000000   2.391149  1.6728361 1.202072e-01
## sexM:drugB    1.3333333   2.391149  0.5576120 5.873608e-01
## sexM:drugC   -7.1666667   2.391149 -2.9971647 1.112516e-02
```

Ao final

Objetivos

- Avaliar a diferença de uma variável quantitativa entre três ou mais grupos.
- Compreender o resultado de uma ANOVA.
- Quando aplica-se uma ANOVA *one-way* ou *two-way*.
- Como investigar a diferença entre os grupos.
- Ilustrar os resultados.

Até a próxima