# BIOMETRÍA II CLASE 4 ANALISIS DE LA VARIANZA MODELADO DE VARIANZAS

Adriana Pérez Depto de Ecología, Genética y Evolución FCEN, UBA

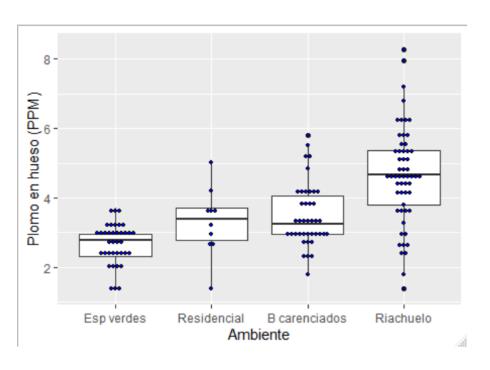
## Marcadores biológicos de contaminación ambiental

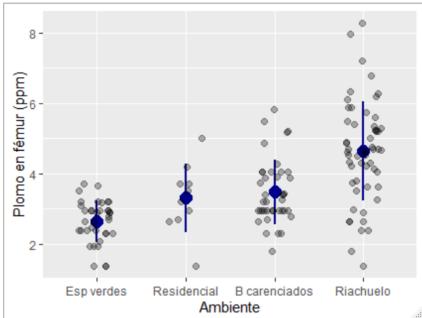


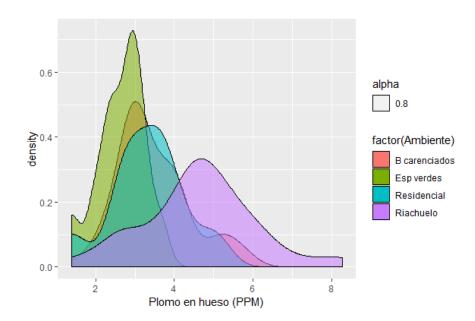
- Las ratas (genero Rattus) presentan áreas de actividad relativamente pequeñas, por lo que se ha sugerido que podrían ser usadas para la detección de contaminación ambiental por metales pesados del ambiente en el que viven
- Se desea comparar el nivel de acumulación media de plomo en ratas provenientes de distintos ambientes de CABA
- Para ello se efectuó un muestreo aleatorio de Rattus norvegicus en 4 ambientes contrastantes: Espacios verdes; Barrios residenciales; Barrios carenciados y Costa del Riachuelo.
- En cada ejemplar se registró el nivel de acumulación de plomo en fémur (ppm) (n=143)
  - Experimento o estudio observacional?
  - Unidad muestral / experimental? Independencia?
  - variable respuesta? Tipo y potencial distribución de probabilidades?
  - variable explicativa? Tipo y niveles?
  - Modelo?



Plomo.txt





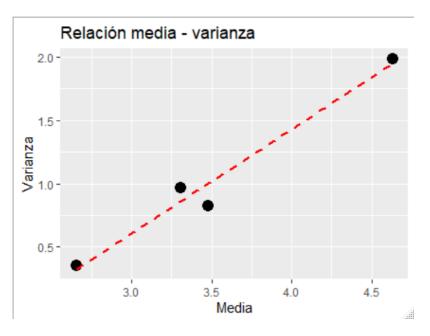


## Estadística descriptiva

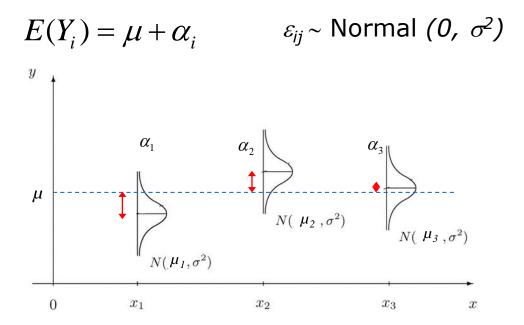
Variable respuesta: Pb

VE o factor: Ambiente con 4 niveles

	Ambiente	n	media	DE	var	min	max
	<fct></fct>	<1nt>	<db7></db7>	<db7></db7>	<db7></db7>	<db7></db7>	<db7></db7>
1	Esp verdes	37	2.65	0.593	0.351	1.39	3.71
2	Residencial	10	3.31	0.984	0.968	1.39	5.02
3	B carenciados	40	3.48	0.910	0.828	1.79	5.81
4	Riachuelo	56	4.63	1.41	1.98	1.39	8.27



## Modelo de comparación de medias



modelo1<-lm(Pb ~ Ambiente, data=bd)</pre>

## Supuestos del modelo

(mismos supuestos menos linealidad)

```
> anova(modelo1)
Analysis of Variance Tak
```

Analysis of Variance Table

Response: Pb

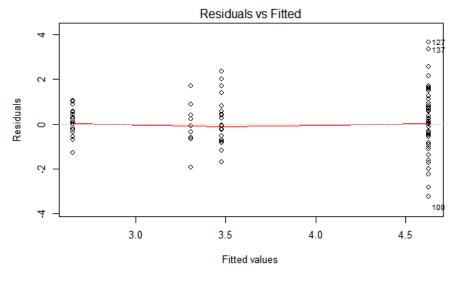
Ambiente

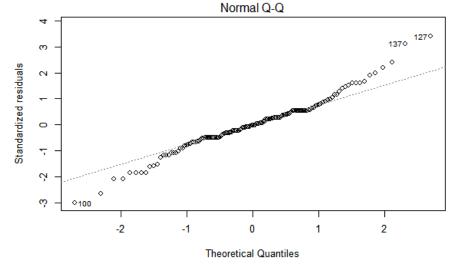
Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F) 3 92.348 30.7828 26.308 1.541e-13

Residuals 139 162.643 1.1701

6

> modelo1<-lm(Pb ~ Ambiente, data=bd)</pre>





> shapiro.test(residuals(modelo1))

Shapiro-Wilk normality test

data: residuals(modelo1)
w = 0.97456, p-value = 0.009099

El p-valor obtenido no es confiable

# La buena noticia: podemos modelar la estructura de varianzas

$$\operatorname{var}(\varepsilon_i) = \sigma^2 \cdot funci\'on \ de \ varianza$$
  
 $\operatorname{var}(\varepsilon_i) = \sigma^2 \cdot f(\mu_i, X, \delta)$ 

Se incorpora al modelo una función de varianza que puede depender de:

- $\mu_i$  = media o esperanza de la variable respuesta
- X = covariable para la varianza. Cualquier variable utilizada para modelar la estructura de varianzas de los errores
- $\delta$  = parámetro; es estimado en función de la estructura de varianzas propuesta

Las estimaciones son por mínimos cuadrados generalizados

## Funciones de varianza

Identidad (varldent): una varianza distinta para cada grupo

$$\varepsilon_i \sim N(0, \sigma^{2}_i)$$

Exponencial (varExp): la varianza como función exponencial de alguna covariable

$$\varepsilon_i \sim N(0, \sigma^2 \cdot e^{2\delta \cdot X_i})$$

Potencia (varPower): la varianza como función de potencia de alguna covariable

$$\varepsilon_i \sim N(0, \sigma^2 \cdot |X_i|^{2\delta})$$

Fija (varFixed): la varianza como función lineal de alguna covariable

$$\varepsilon_i \sim N(0, \sigma^2 \cdot X_i)$$

```
library("nlme")
gls(Y ~ X, weights="XX", data)
```

```
varIdent(form=~1|A)
varPower()
varExp()
VarFixed(~X)
```

## ¿Cuál función utilizar?

#### varldent

- Es la única que admite variables cualitativas como covariable
- Estima diferentes varianzas para cada nivel de la covariable (σ²<sub>i</sub>). Se estiman tantas varianzas como niveles -1

#### varPower

- No se puede usar cuando la covariable toma valores iguales a o
- Requiere estimar un parámetro ( $\delta$ )

#### varConstantPower

- Simil varPower pero se le suma una constante a la covariable:
- Requiere estimar dos parámetro ( $\delta$  y la cte)
- Para covariables que toman valores iguales a o

#### varExp

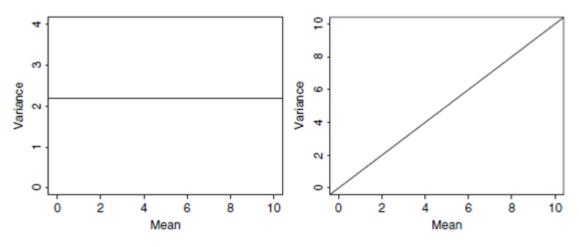
- Se puede usar cuando la covariable toma valores iguales a o
- Puede tener problemas de estimación cuando los valores de la covariable son altos (i.e. > 100); en esos casos conviene reescalar
- Requiere estimar un parámetro ( $\delta$ )

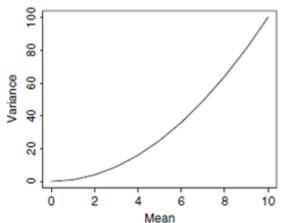
#### varFixed

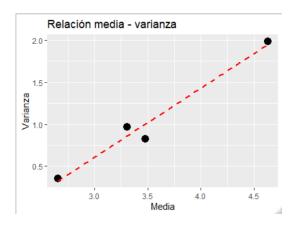
No requiere estimar ningún parámetro

Explorar la relación
Explorar la relación

## Relación entre esperanza y varianza







## Cuadrados mínimos generalizados (gls) Modelando varianzas: varldent(Ambiente)

```
11
```

```
> #modelo 3 modelado varianzas. VarIdent(ambiente)
> modelo3<-gls(Pb~Ambiente, weights=varIdent(form=~1|Ambiente), data=Plomo)
> anova(modelo3)
Denom. DF: 139
            numDF F-value p-value
(Intercept)
               1 1951.0503 <.0001
Ambiente
                3
                    30.9453 < .0001
                                                Estimación por MV
> modelo3
Generalized least squares fit by REML
                                             restringida (por default)
  Model: Pb ~ Ambiente
  Data: Plomo
  Log-restricted-likelihood: -200.2043
Coefficients:
        (Intercept) AmbienteEsp verdes AmbienteResidencial
                                                              AmbienteRiachuelo
                             -0.8221418
                                                 -0.1706125
                                                                      1.1526315
          3.4763281
Variance function:
 Structure: Different standard deviations per stratum
 Formula: ~1 | Ambiente
 Parameter estimates:
                                              Riachuelo
   Esp verdes B carenciados
                              Residencial
     1.000000
                   1.534740
                                 1.659941
                                               2.374431
Degrees of freedom: 143 total; 139 residual
Residual standard error: 0.5928515
                                          D.E. de Riachuelo/D.E. Esp verdes
```

Desvío estándar de Esp verdes

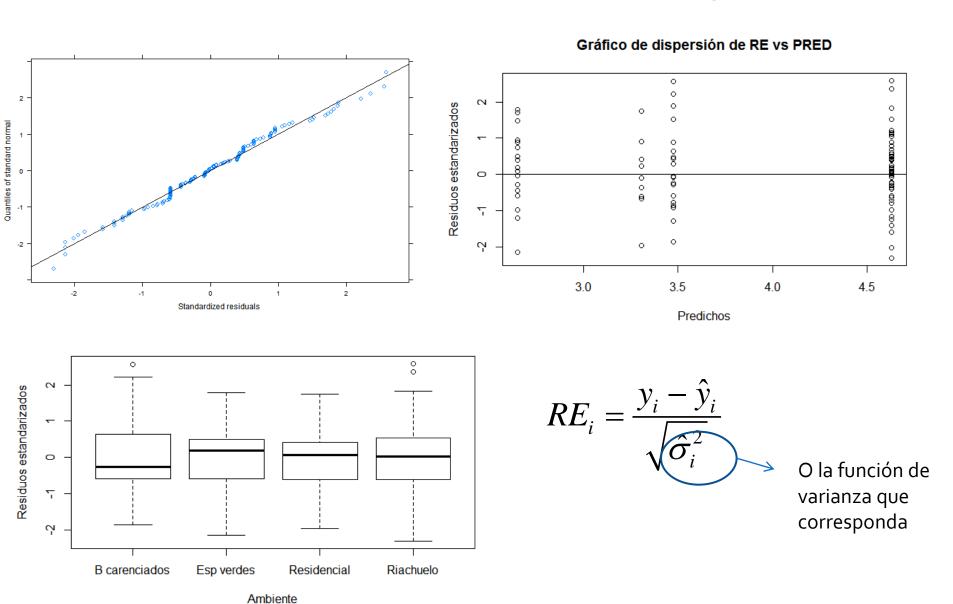
## Cuadrados mínimos generalizados (gls) Modelando varianzas: varldent(Ambiente)

12

```
modelo3<-gls(Pb~Ambiente, weights=varIdent(form=~1|Ambiente), method="ML", data=bd)</pre>
> modelo3
                                                              Estimación por MV
Generalized least squares fit by maximum likelihood
  Model: Pb ~ Ambiente
  Data: bd
 Log-likelihood: -196.7303
coefficients:
                        AmbienteResidencial AmbienteB carenciados
                                                                      AmbienteRiachuelo
          (Intercept)
            2.6541863
                                                        0.8221418
                                  0.6515293
                                                                               1.9747733
Variance function:
 Structure: Different standard deviations per stratum
 Formula: ~1 | Ambiente
                                                                         Cambian las
 Parameter estimates:
                                                                         estimaciones!
   Esp verdes B carenciados Residencial
                                              Riachuelo
     1.000000
                   1.536338
                                 1.596478
                                               2.385593
Degrees of freedom: 143 total; 139 residual
Residual standard error: 0.5847852
```

Cuando n es grande los estimadores de varianza por MV son normalmente asintóticos y consistentes. Cuando n es chico la estimación es sesgada ya que no divide por los GL sino por n. Eso se corrige empleando MV restringida (REML) que genera una función de verosimilitud sin considerar los efectos fijos

## Modelando varianzas: varldent(Ambiente) Análisis de residuos (modelo3)



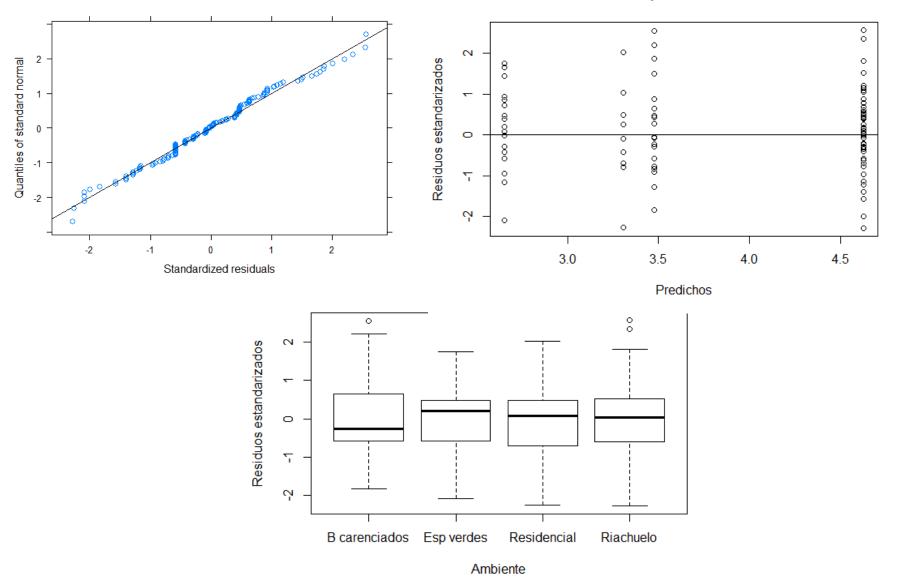
### Cuadrados mínimos generalizados (gls) Modelando varianzas: varPower

14

```
modelo4<-gls(Pb~Ambiente, weights=varPower(), data=Plomo)</pre>
> anova(modelo4)
Denom. DF: 139
             numDF F-value p-value
(Intercept) 1 1940.6731 <.0001
Ambiente
                 3 30.1536 < .0001
> modelo4
Generalized least squares fit by REML
  Model: Pb ~ Ambiente
  Data: Plomo
  Log-restricted-likelihood: -200.4478
Coefficients:
         (Intercept) AmbienteEsp verdes AmbienteResidencial AmbienteRiachuelo
           3.4763281
                                 -0.8221418
                                                       -0.1706125
                                                                               1.1526315
Combination of variance functions:
                                                             RE_{i} = \frac{y_{i} - y_{i}}{\sqrt{\hat{\sigma}^{2} * |X_{i}|^{2*\hat{\delta}}}}
 Structure: Power of variance covariate
 Formula: ~fitted(.)
 Parameter estimates:
                                                         RE_{i} = \frac{y_{i} - \hat{y}_{i}}{\sqrt{0.136^{2} \cdot |\hat{y}_{i}|^{2*1.53}}}
1.529801 \hat{\delta}
   power
Degrees of freedom: 143 total: 139 residual
Residual standard error: 0.1362282
```

## Modelando varianzas: VarPower Análisis de residuos (modelo4)

#### Gráfico de dispersión de RE vs PRED



## Varios modelos posibles

	residoos
Modelo 2: gls sin modelar varianzas. Se descarta por los residuos	X
Modelo 3: gls modelando varianzas por varldent(ambiente)	ok
Modelo 4: gls modelando varianzas por varPower	ok
Modelo 5: gls modelando varianzas por varExp	ok

Residuos

## ¿Cuál elegir?

## Selección de modelos

#### Criterios de información:

- Resumen la información de un modelo, teniendo en cuenta la función de verosimilitud  $L(\theta)$  (cuanto mayor, mejor) y el número de parámetros a estimar del modelo (p) (cuanto mayor, peor)
- Estiman la distancia relativa entre el modelo ajustado y el mecanismo verdadero pero desconocido (de tal vez infinitos parámetros) que generó los datos observados
- El valor individual no es interpretable, solo sirve con fines comparativos: cuanto menor, mejor el modelo

## Comparación de modelos

#### Criterios de información:

- Akaike (AIC)
- Bayesiano de Schwartz (BIC)

 AIC y BIC menores, implican mejor ajuste

L	Log(L)	-2xLog(L)
0		
0.1	-1	2
0.2	-0.70	1.40
0.3	-0.52	1.05
0.4	-0.40	0.80
0.5	-0.30	0.60
0.6	-0.22	0.44
0.7	-0.15	0.31
0.8	-0.10	0.19
0.9	-0.05	0.09
1	0	0

 $AIC = -2\log L(\theta) + 2p$   $BIC = -2\log L(\theta) + p\ln(n)$ 

Medida del Penalización ajuste por la complejidad del modelo

BIC penaliza más que AIC los modelos con más parámetros a estimar

#### Varios modelos

Modelo 2: gls sin modelar varianzas. Se descarta por los residuos

Modelo 3: gls modelando varianzas por varldent(ambiente)

Modelo 4: gls modelando varianzas por varPower

Modelo 5: gls modelando varianzas por varExp

```
> AIC(modelo2, modelo3, modelo4, modelo5)
df AIC
modelo3 8 416.4087
modelo4 6 412.8956
modelo5 6 413.3685
```

- 1- Seleccionamos los modelo con residuos adecuados (modelos 3 a 5)
- 2- Seleccionamos el que presente menor AIC (modelo 4)

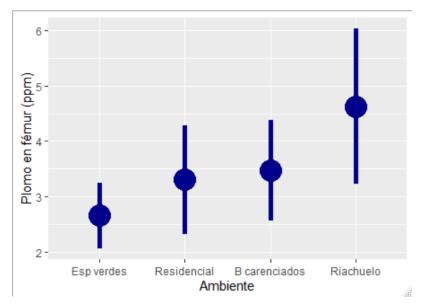
H1: Algún  $\alpha_i \neq 0$ 

## Anova

20

P-valor< 0,05

La concentración media de plomo en los fémures de las ratas de **alguno** de los ambientes difiere significativamente de la media general



Comparaciones múltiples

## Anova Comparaciones múltiples

- Sirven para detectar diferencias entre las medias de los tratamientos como complemento a la prueba global
- Controlan de alguna manera el error global, es decir la probabilidad de cometer al menos un error tipo I.
- Equivalen a hacer múltiples test t con algún tipo de ajuste
- Existen distintos métodos de comparación, según como controlen el error global

## Comparaciones múltiples

- Compara subgrupos de medias. Por ejemplo de a pares:
  - $H_o$ :  $\mu_i = \mu_j$  (o lo que es lo mismo,  $\mu_i \mu_j = o$ )
  - $H_1: \mu_i \neq \mu_j$  (o lo que es lo mismo,  $\mu_i \mu_j \neq o$ )
- La lógica es la del test de t para la comparación de dos medias. Los distintos métodos difieren en cómo se calcula el EE, en la distribución de probabilidades, en ajustes en nivel de significación, etc

$$t_{GL} = \frac{\Delta \overline{Y} - \Delta \mu}{EE_{\overline{Y_1} - \overline{Y_2}}} = \frac{\Delta \overline{Y} - \Delta \mu}{\sqrt{\frac{S^2}{n_1} + \frac{S^2}{n_2}}} = \frac{\Delta \overline{Y} - \Delta \mu}{\sqrt{\frac{CMerror}{n_1} + \frac{CMerror}{n_2}}} \text{ EE para la differencia de medias}$$
 
$$\Delta \overline{Y} \pm P_{GL,\alpha} \ EE_{\Delta \overline{Y}}$$

Se puede expresar como un IC para la diferencia de dos medias y ver si cero pertenece al IC. Además permite estimar la magnitud del efecto

## Clasificación de los métodos

#### A priori: planeados

- Las hipótesis se plantean antes del muestreo
- Se basan en información independiente del experimento
- pueden detectar diferencias aunque el anova no lo haya hecho, ya que incorporan información que ni la hipótesis global ni las comparaciones a posteriori poseen
- Mayor sensibilidad, mayor potencia
  - Contrastes ortogonales
  - Método de Bonferroni
  - Método de Dunnet

#### A posteriori: no planeados

- se aplican sólo si el Anova dio significativo
- "búsqueda de significación", exploratorios
- Más conservativos, menos potentes
  - Método de Tukey

## Comparaciones no planeadas Método de Tukey



- Compara todos los pares posibles de medias
- La cantidad total de comparaciones de a pares posibles con  $\alpha$  grupos es:

$$q_{GL \, dentro, a} = \frac{\Delta \overline{Y} - \Delta \mu}{\sqrt{\frac{CMerror}{n_i}}}$$

Distribución de TUKEY

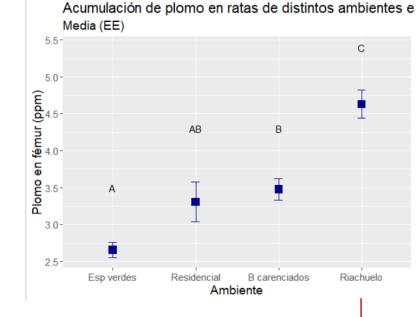
Procedimiento: Se calculan todas las diferencias entre las medias de los tratamientos y se comparan con una diferencia crítica o diferencia mínima significativa (DMS):

$$\Delta \overline{Y} \text{ vs DMS} = q_{GL \text{ dentro}, \alpha, k} \sqrt{\frac{CM dentro}{n_i}}$$

Alternativamente se calcula un IC para la diferencia de dos medias

## Usando paquete emmeans. Tukey por default emmeans(modelo4, pairwise ~ Ambiente)

#### \$emmeans Ambiente lower.CL upper.CL df SE emmean 2.65 0.0993 43.1 2.45 2.85 Esp verdes Residencial 3.31 0.2680 109.3 2.77 3.84 B carenciados 3.48 0.1448 128.7 3.19 3.76 Riachuelo 4.63 0.1904 76.8 4.25 5.01 d.f. method: satterthwaite



Confidence level used: 0.95

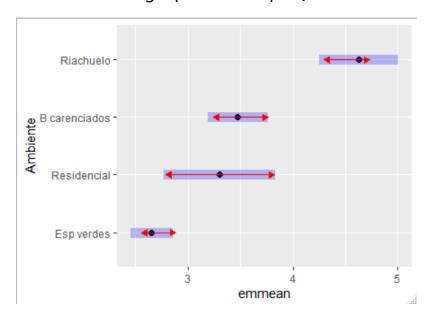
```
$contrasts
                             estimate
 contrast
                                          SE
                                                df t.ratio p.value
                                                                     ¿Las medias difieren
 Esp verdes - Residencial
                               -0.652 0.286
                                              98.5 -2.280
                                                           0.1098
                                                                     significativamente?
 Esp verdes - B carenciados
                                                           0.0001
                               -0.822/0.176
                                              94.7 -4.683
                                                                     ¿En qué magnitud?
                               -1.97 0.215 122.9 -9.196
 Esp verdes - Riachuelo
                                                           <.0001
 Residencial - B carenciados
                               -0.171 0.305 113.9 -0.560
                                                           0.9436
 Residencial - Riachuelo
                               -1.323 0.329 142.5 -4.025
                                                           0.0005
 B carenciados - Riachuelo
                                -1,153 0.239 117.5 -4.818
                                                           <.0001
P value adjustment: tukey method for comparing a family of 4 estimates
```

Graficar siempre las estimaciones que surgen del modelo

No usar los IC para la media para determinar si hay diferencias. Lo correcto es analizar IC para la diferencia de medias

<pre>\$contrasts contrast Esp verdes - Residencial</pre>	estimate -0.652			lower.CL -1.398	upper.CL	IC95% para la diferencia de
Esp verdes - B carenciados					-0.3630	medias:
Esp verdes - Riachuelo	-1.975	0.215	122.9	-2.534	-1.4155	Contiene al cero? Si
Residencial - B carenciados	-0.171	0.305	113.9	-0.965	0.6236	lo contiene, cuál es
Residencial - Riachuelo	-1.323	0.329	142.5	-2.178	-0.4686	•
B carenciados - Riachuelo	-1.153	0.239	117.5	-1.776	-0.5291	su magnitud?

Las barras azules son IC para la media. Las flechas rojas indican comparaciones entre medias. Si las flechas de dos grupos se solapan, las diferencias no son estadísticamente significativas



Con una confianza del 95% se estima que la concentración de plomo en fémur de ratas de Riachuelo es, en promedio, entre 1,43 y 2,52 ppm mayor a la de ratas de espacios verdes

## Método de Bonferroni

 Consiste en ajustar los valores p de las pruebas de hipótesis individuales de manera de controlar el error global (corrección por múltiples tests)

```
valor\ p\ corregido = valor\ p \cdot m
```

- O lo que es lo mismo,  $\alpha \ corregido = \alpha^* = \frac{\alpha}{m}$  donde m es la cantidad de comparaciones que se efectúan
- Si solo se hace una comparación, equivale a un test t. Pero la prueba va perdiendo potencia si m es muy grande
- Existen variantes no tan conservadoras Bonferroni secuencial (Holm, 1979)

```
$contrasts
 contrast
                            estimate
                                       SE df t.ratio p.value
 Esp verdes - Residencial
                              -0.652 0.286 98.5 -2.280
                                                        0.1486
 Esp verdes - B carenciados
                             -0.822 0.176 94.7 -4.683
                                                        0.0001
 Esp verdes - Riachuelo
                             -1.975 0.215 122.9 -9.196 <.0001
 Residencial - B carenciados
                             -0.171 0.305 113.9 -0.560 1.0000
 Residencial - Riachuelo
                             -1.323 0.329 142.5 -4.025
                                                        0.0006
 B carenciados - Riachuelo
                              -1.153 0.239 117.5 -4.818 <.0001
```

P value adjustment: bonferroni method for 6 tests

## Contrastes ortogonales



- Otra lógica: preguntas específicas planteadas a priori basadas en información por fuera del ensayo (pocas, bien dirigidas, máxima potencia)
- Los contrastes deben ser independientes (ortogonales) entre sí, ya que consisten en una descomposición de la SC de los tratamientos
- Como máximo #grupos-1 contrastes
- Solo para diseños balanceados
- Equivale a un test t

## Contrastes ortogonales

- Máximo 3 contrastes
- ¿Zonas con mayor cobertura vegetal (espacios verdes y residenciales) difieren de zonas con menor cobertura (barrios carenciados y Riachuelo)?
- ¿ espacios verdes y residenciales difieren entre sí?

$$Ho^{1}: \frac{\mu_{esp.verd} + \mu_{res}}{2} = \frac{\mu_{b.car} + \mu_{riach}}{2} \implies \frac{\mu_{esp.verd} + \mu_{res}}{2} - \frac{\mu_{b.car} + \mu_{riach}}{2} = 0$$

$$Ho^2: \mu_{esp.verd} = \mu_{res} \implies \mu_{esp.verd} - \mu_{res} = 0$$

Contraste	1	2	ci cj
Esp verdes			
Residenciales			
Carenciados			
Riachuelo			

$$\Sigma c_{i} = 0$$
  
 
$$\Sigma c_{i} c_{j} = 0 \quad para \ todos (i, j)$$

## Contrastes ortogonales

Creamos la matriz de coeficientes

```
c1<-c(1/2,1/2, -1/2,-1/2)
c2<-c(1,-1,0,0)
matriz_contrastes<-cbind(c1,c2)</pre>
```

2. Ajustamos el modelo

```
modelo4b <- lm(Pb ~ Ambiente, data=bd,contrasts =
list(dosis_cd_cuali=matriz_contrastes))
summary(modelo4b)</pre>
```

```
Coefficients:
```

```
Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept) 3.5643 0.1208 29.516 < 2e-16 ***
Ambientec1 -1.1687 0.2415 -4.839 3.4e-06 ***
Ambientec2 -0.3258 0.2096 -1.554 0.122
---
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

## ¿Cuál método de comparación elegir?

Tukey: todos contra todos, de a pares. "Búsqueda de significación", exploratorio. El más recomendable para ese objetivo

Bonferroni: Cuantas más comparaciones menos potente

Dunnet: todos contra el control

Ortogonal: el más potente de todos, pero con serias restricciones acerca de las comparaciones que se pueden efectuar (deben ser matemáticamente ortogonales)

⇒ Compromiso entre cantidad de preguntas que se desean responder y potencia (a fin de mantener el error global)

## Modelo4 como regresión lineal

AmbienteResidencial 3.305716
AmbienteB carenciados 3.476328
AmbienteRiachuelo 4.628960

32

```
modelo4<-gls(Pb~Ambiente, weights=varPower(), data=Plomo)</pre>
```

```
> summary(modelo4)
Generalized least squares fit by REML
Variance function:
 Structure: Power of variance covariate
 Formula: ~fitted(.)
 Parameter estimates:
                                                Magnitud del efecto
                                                                               EE para la
   power
                                               (diferencia de medias)
                                                                              diferencia de
1.529801
                                                                                medias
Coefficients:
                                  Std.Error
                                               t-value p-value
                       2.6541863 0.09970036 26.621633
(Intercept)
                                                         0.0000
AmbienteResidencial
                       0.6515293 0.28623657
                                              2.276192
                                                         0.0244
AmbienteB carenciados 0.8221418 0.17588010
                                              4.674445
                                                         0.0000
AmbienteRiachuelo
                       1.9747733 0.21436703
                                              9.212113
                                                         0.0000
```

- Salvo cuando hay solo dos niveles, no hay una prueba "global" sobre el efecto de la VE
- Los coeficientes son diferencias de medias con respecto al nivel de referencia; no se informan otras comparaciones
- No son comparaciones ortogonales
- No controlan el error global

## Resumiendo

- El análisis de la varianza puede usarse para comparar cualquier cantidad de grupos con respecto a su media
- Si la VE es cuantitativa y afecta a la VR según una función modelable, es más eficiente utilizar regresión que anova (más parsimoniosa, permite interpolar)
- Si la VE es cuali o si es cuanti pero sin una relación clara, se recomienda Anova
- Luego del ANOVA se debe aplicar algún método de comparaciones entre grupos. La elección del método depende de los objetivos
- Para leer sobre IC en comparaciones: Cumming, G., & Finch, S. (2005). Inference by eye: confidence intervals and how to read pictures of data. *American Psychologist*, 60(2), 170.