

Parte I - Métodos em epidemiologia nutricional

14 - Análise de dados com medidas repetidas

Maria Helena Constantino Spyrides
Cláudio José Struchiner
Maria Tereza Serrano Barbosa
Gilberto Kac

SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros

SPYRIDES, MHC., *et al.* Análise de dados com medidas repetidas. In: KAC, G., SICHIERI, R., and GIGANTE, DP., orgs. *Epidemiologia nutricional* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ/Atheneu, 2007, pp. 245-260. ISBN 978-85-7541-320-3. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.



All the contents of this work, except where otherwise noted, is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Todo o conteúdo deste trabalho, exceto quando houver ressalva, é publicado sob a licença [Creative Commons Atribuição 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Todo el contenido de esta obra, excepto donde se indique lo contrario, está bajo licencia de la licencia [Creative Commons Reconocimiento 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Análise de Dados com Medidas Repetidas

Maria Helena Constantino Spyrides, Cláudio José Struchiner,
Maria Tereza Serrano Barbosa e Gilberto Kac

O interesse de pesquisadores em estudos epidemiológicos por acompanhar o comportamento de determinadas variáveis medidas em um mesmo indivíduo ou unidade experimental ao longo do tempo é muito comum. Estudos de crescimento infantil, ganho de peso gestacional, retenção de peso pós-parto, composição corporal, evolução de taxas hormonais em mulheres em período reprodutivo, acompanhamento da carga viral em pacientes com HIV são alguns exemplos da aplicação de medidas repetidas no tempo.

Os estudos que envolvem o acompanhamento repetido dessas medidas procuram, desde o seu planejamento, controlar ao máximo as diversas fontes de variação envolvidas no processo, buscando encontrar um padrão para o comportamento das medidas no tempo e identificar os fatores que influenciam este padrão.

Assim, a análise estatística que vai auxiliar nessa busca precisa levar em consideração que tais medidas apresentam dependência entre as observações de um mesmo indivíduo e não podem se encaixar na suposição estatística usual de que são independentes. Além disso, o outro pressuposto básico de alguns modelos estatísticos que se refere à igualdade das distribuições entre os indivíduos também não se aplica, considerando-se que há uma variabilidade individual decorrente de fatores não mensurados.

Os modelos de efeitos mistos são atualmente um dos mais importantes instrumentos para a análise de dados epidemiológicos longitudinais. Esses modelos incluem a estimação de efeitos comuns para indivíduos de um mesmo grupo (efeitos fixos) e efeitos específicos por indivíduo (efeitos aleatórios) que permitem controlar a variação existente entre indivíduos e podem ser provenientes de fontes de variação não controladas no estudo.

Esse tipo de modelagem tem recebido uma grande atenção nos últimos anos, já que seus pressupostos se ajustam mais ao grau de conhecimento biológico e à realidade dos experimentos, permitindo que a estimação dos efeitos capte mudanças nas respostas individuais do grupo estudado.

Este capítulo, inicialmente, introduz o conceito de medidas repetidas no tempo ou dados longitudinais, com subsequente ilustração da aplicação destes estudos com um exemplo em epidemiologia nutricional. As características dos dados longitudinais abordados na seção seguinte são importantes no acompanhamento de estudos, pois alertam para as dificuldades e cuidados a serem tomados durante a coleta da informação.

Medidas Repetidas

O que são medidas repetidas em um estudo? As observações de um desfecho ou resposta coletadas sobre uma mesma unidade experimental ou indivíduo em duas ou mais ocasiões ou condições denominam-se medidas repetidas.

As medidas podem ser repetidas:

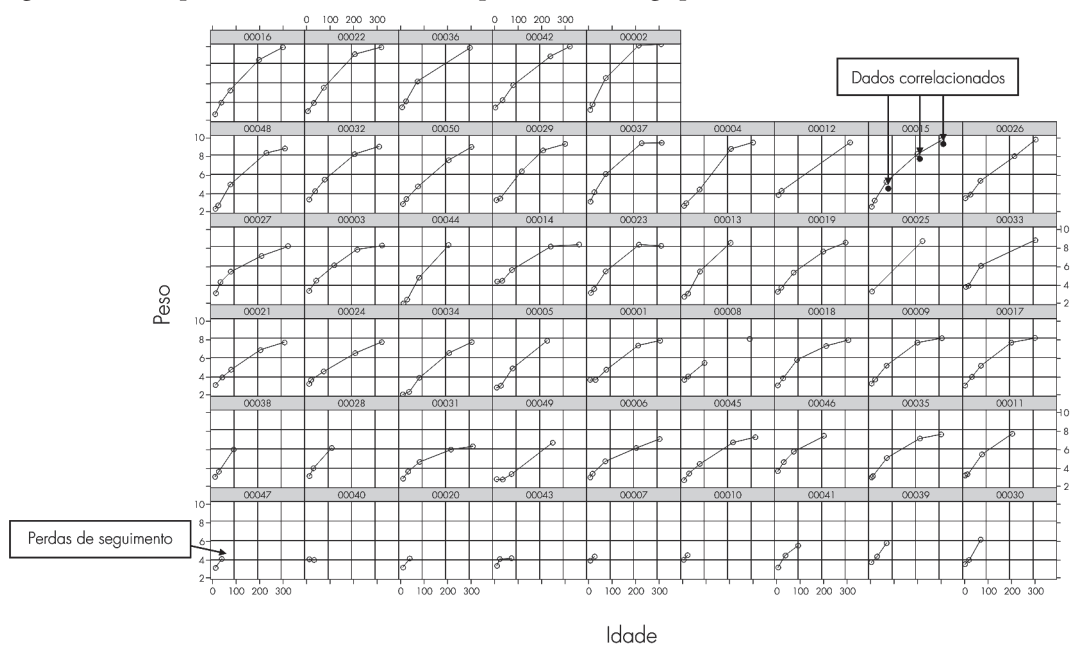
- apenas no tempo, ao se medir e pesar os recém-nascidos nos seus primeiros meses de vida;
- no tempo e no espaço, simultaneamente, ao se medir taxas de mortalidade infantil ou neonatal em diversos anos e em diversos bairros ou municípios, com o intuito de identificar padrões espaciais diferenciados de mortalidade;
- em distintas condições experimentais, quando um mesmo paciente é submetido a dois tipos de tratamento.

Em estudos longitudinais, os indivíduos ou unidades são monitorados em um determinado período, com o objetivo de identificar um padrão nos valores observados. As medidas repetidas no tempo de marcadores imunológicos e virológicos de pacientes com infecção do HIV, por exemplo, têm um papel importante na avaliação tanto da história natural da doença como da resposta ao tratamento. Estas medidas repetidas ao longo do tempo denominam-se dados longitudinais.

Aplicação em Nutrição

Foram acompanhadas 479 crianças em um centro de saúde do Rio de Janeiro, através de um estudo longitudinal envolvendo quatro ondas de seguimento: 0,5, 2, 6 e 9 meses. As variáveis dependentes foram o peso e o comprimento, coletados de acordo com procedimentos padronizados em todos os pontos do estudo. Os principais objetivos foram avaliar o efeito da duração da amamentação predominante sobre o perfil antropométrico e identificar os determinantes do crescimento infantil nessa coorte de crianças.

Figura 1 – Comportamento individual do peso infantil (kg) por idade, Rio de Janeiro, 1999-2001



A Figura 1 apresenta o comportamento do peso de cinquenta das 479 crianças acompanhadas desde o nascimento até os 9 meses de idade. Ao observá-la, pode-se identificar que: a) as medidas tomadas de uma mesma criança são positivamente correlacionadas, ou seja, o peso das crianças em cada um dos momentos depende muito do seu peso ao nascer; b) essa dependência decresce se os intervalos entre as medidas crescem, ou seja, há maior correlação entre os pesos aferidos no nascimento e aos 2 meses do que entre os pesos aferidos no nascimento e aos 9 meses; c) essa correlação não é a mesma para todas as crianças, ou seja, há padrões diferenciados de crescimento; d) nem todas as crianças apresentam o mesmo número de medidas, podendo haver perdas de seguimento ao longo do estudo. As perdas de seguimento podem ocorrer por preenchimento incompleto dos prontuários ou por desistência dos indivíduos ao longo do acompanhamento no estudo. A Figura 1 mostra que houve perda de seguimento de algumas crianças no estudo por não-comparecimento da mãe e da criança em certas consultas. Essas características de dados longitudinais podem ser acomodadas nos modelos de efeitos mistos.

Características dos Dados Longitudinais

A base de dados de um estudo de coorte ou longitudinal é formada por um conjunto de variáveis, por diferentes indivíduos e pelas medidas tomadas no tempo de um mesmo indivíduo. As dimensões da base de dados compreendem: a variável resposta, ou seja, o desfecho ou fenômeno que se pretende estudar, as variáveis explicativas, que são os potenciais determinantes desse desfecho, e as repetições dessas observações. Portanto, os dados estarão dispostos em uma matriz da forma ‘indivíduos x medidas repetidas x variáveis’. O número de registros ou linhas da matriz corresponde ao número de indivíduos vezes o número de medidas repetidas em um mesmo indivíduo, e o número de colunas corresponde ao número de variáveis explicativas.

A base de dados Crescer.txt refere-se ao exemplo da seção “Aplicação em nutrição” e consiste de 2.395 linhas ou registros (479 crianças x 5 medidas repetidas tomadas ao longo do tempo = 2.395). As colunas PesoCC, Sexo, AmPred referem-se ao peso da criança (kg) no momento da visita ao centro de saúde, sexo da criança e tempo de amamentação predominante (dias), respectivamente.

NQquest	Visita	Tempo (dias)	PesoCC (kg)	Sexo	AmPred (dias)
00001	0	0	3,77	2	0,00
00001	1	20	3,80	2	8,00
00001	2	64	4,90	2	8,00
00001	3	190	7,60	2	8,00
00001	4	280	8,20	2	8,00
00002	0	0	3,26	2	0,00
00002	1	10	3,80	2	10,00
00002	2	61	6,70	2	61,00
00002	3	193	10,40	2	180,00
00002	4	291	10,50	2	180,00
00003	0	0	3,41	1	0,00
00003	1	26	4,60	1	26,00
00003	2	100	6,30	1	39,00
00003	3	189	8,00	1	39,00

NQquest	Visita	Tempo (dias)	PesoCC (kg)	Sexo	AmPred (dias)
00003	4	293	8,50	1	39,00
00004	0	0	2,70	1	0,00
00004	1	7	3,00	1	7,00
00004	2	63	4,50	1	15,00
00004	3	185	9,00	1	15,00
00004	4	276	9,80	1	15,00
...

Essa base de dados pode ser digitada em qualquer planilha eletrônica e importada para o programa estatístico que será utilizado para a análise dos dados. Por exemplo, o R é um programa de domínio público e está disponível na Internet: <<http://www.r-project.org/>>.

Após a leitura dos dados, é necessário informar que pertencem a uma hierarquia de grupos, ou seja, fazer corresponder a cada indivíduo ou grupo suas respectivas medidas repetidas.

A repetição de medidas em uma mesma unidade de observação permite que a modelagem capte a variação específica do indivíduo de forma separada da variação atribuída ao processo de medição e da variação no tempo intra-indivíduo. Em um modelo de regressão clássico, por exemplo, que busca explicar o peso com base na estatura ou em outras co-variáveis, toda a variabilidade da variável resposta não explicada pelas co-variáveis é atribuída a um erro aleatório com uma estrutura de co-variância extremamente simplificadora. Quando se supõe que as observações sejam independentes com mesma variabilidade, não se permite captar as diferenças entre os indivíduos, nem as correlações que porventura possam existir.

Além dessas características, a análise longitudinal deve levar em consideração que as medidas de um mesmo indivíduo apresentam uma correlação no tempo e que as observações nem sempre são igualmente espaçadas. Na linguagem estatística, essas características vão exigir que se assumam pressupostos específicos sobre estruturas de co-variâncias. Na seção “Estrutura de variância” serão apresentadas várias estruturas de co-variância para contornar esse problema.

Estrutura de Variância/Co-variância

As medidas repetidas de um mesmo indivíduo são correlacionadas, ou seja, apresentam estruturas de dependência longitudinal que precisam ser consideradas na análise estatística.

Na aplicação da seção “Aplicação em nutrição”, medidas repetidas de uma mesma criança são observadas ao longo do tempo (Figura 1); verifica-se que as correlações entre as observações próximas são altas e, em geral, decrescem à medida que as distâncias entre estas aumentam. Na análise de medidas repetidas, a incorporação nos modelos das possíveis dependências entre as observações tomadas de um mesmo indivíduo melhora a precisão das estimativas, ou seja, é importante na redução da amplitude dos intervalos de confiança dos parâmetros estimados no modelo; ganha-se, com isso, poder de teste. Essa dependência é incorporada no modelo a partir da escolha adequada de estruturas de co-variância, com o objetivo de detectar um nível de mudança que pode não se dever apenas às flutuações aleatórias (Boscardin, Taylor & Law, 1998).

Medidas Não Eqüidistantes no Tempo

Outro problema freqüente com dados longitudinais é que as medidas podem não estar igualmente espaçadas no tempo, requerendo, assim, estruturas de co-variância mais específicas. Essas estruturas são semelhantes às utilizadas para dados espaciais, pois levam em consideração a distância no tempo entre as medidas. A seção “Estrutura de variância” também apresenta algumas matrizes de variância/co-variância que levam em consideração a distância de tempo ou espaço entre as medidas repetidas.

Número de Medidas Repetidas por Indivíduo

Uma das considerações que se deve fazer no planejamento de um estudo longitudinal refere-se ao número de indivíduos envolvidos na análise e ao número de medidas repetidas por indivíduo.

Dimensionamento da Amostra

A determinação do tamanho de amostra adequada para que as conclusões de um estudo sejam confiáveis é uma das preocupações dos pesquisadores em diversas áreas de conhecimento. O número de unidades experimentais, pacientes ou indivíduos, em um estudo clínico ou epidemiológico que devem ser investigadas é extremamente importante na determinação do poder do teste e, conseqüentemente, na confiança e precisão da decisão assumida pelo pesquisador.

Quando o desenho de estudo envolve medidas repetidas, o dimensionamento da amostra depende não só do número de unidades experimentais, pacientes ou indivíduos, mas também do número de observações obtidas em cada uma destas unidades experimentais. O desenho do estudo deve contemplar um tamanho de amostra adequado para detectar diferenças importantes baseadas nas hipóteses do pesquisador.

Segundo Leon (2004), um estudo conduzido sem o devido cuidado corre o risco de pecar tanto por falta quanto por excesso de unidades amostrais. Por um lado, acarretaria falha na detecção de diferenças importantes e, por outro, o estudo estaria envolvendo um número excessivo de participantes, o que contraria as normas éticas dos protocolos de pesquisa.

Em ensaios clínicos ou em estudos observacionais, o interesse do pesquisador é detectar diferenças entre grupos de participantes submetidos a tratamentos ou condições diferentes. Segundo Diggle e colaboradores (2004), na determinação do tamanho da amostra alguns aspectos devem ser considerados:

- a) Erro do Tipo I, ou seja, o nível de significância (α) que corresponde à probabilidade de detectar diferenças significativas quando de fato estas diferenças não existem na população em estudo. Dependendo das exigências do estudo, pode-se convencionar este erro em 1%, 5% ou em valores maiores.
- b) O Poder do Teste, o complemento do erro Tipo II (β), que corresponde à probabilidade de detectar diferenças significativas quando de fato estas ocorrem na população. Costuma-se trabalhar com um poder de teste em torno de 0,80.
- c) A diferença mínima significativa (Δ) entre os tratamentos ou grupos que se deseja detectar no nível de significância α .
- d) A variância residual (σ^2), ou seja, a variabilidade não explicada na resposta, e no caso de estudos longitudinais.
- e) O coeficiente de correlação entre as medidas repetidas.
- f) O número de medidas repetidas observadas por indivíduo.

Na comparação entre tipos de tratamento ou grupos, portanto, o tamanho de amostra dependerá das exigências do pesquisador com relação a cada um desses aspectos. O tamanho de amostra necessário para a realização de um estudo será maior quanto mais elevado for o poder de teste estabelecido, e será inversamente proporcional à diferença mínima significativa e à correlação existente entre as medidas repetidas.

Para maiores informações sobre o cálculo da amostra, consultar Vonesh & Chinchilli (1997), Freitas (2000), Diggle et al. (2002) e Paz et al. (2005).

Os Modelos Estatísticos para Medidas Repetidas

Ao contrário dos estudos transversais, o acompanhamento de um indivíduo com base em medidas repetidas permite a descrição da evolução no tempo do desfecho de interesse e possibilita que se busque o ajuste de funções que representem o comportamento individual.

Os modelos de efeitos mistos constituem uma ferramenta de grande utilidade no processo de busca do entendimento do comportamento do desfecho em relação aos seus determinantes. Este tipo de modelagem aproxima-se do desenho de estudo que originou as medidas repetidas, que, em um primeiro estágio, considera as unidades amostrais selecionadas aleatoriamente da população de interesse e, em um segundo estágio, que um número de medidas seja observado em cada unidade do primeiro estágio. Os modelos de efeitos mistos têm a flexibilidade de especificar alguns efeitos como fixos (os efeitos da população) e outros aleatórios (os efeitos devido ao indivíduo), levando em consideração a correlação existente entre e intra-indivíduos (Pinheiro & Bates, 2000; Verbeke & Molenberghs, 2000). Os efeitos aleatórios permitem controlar a variação existente entre indivíduos e que pode ser proveniente de fontes de variação não controladas no estudo. Dessa forma, estes modelos fornecem estimativas mais precisas dos parâmetros estimados, o que torna o teste mais sensível para captar diferenças significativas.

A relação entre uma variável resposta e as explicativas descreve um comportamento que pode ser expresso por uma função linear ou não linear nos parâmetros. No primeiro caso, os modelos são chamados modelos lineares de efeitos mistos e, no segundo caso, modelos não lineares de efeitos mistos. Ao se escolher um modelo que descreva o comportamento de uma variável resposta em relação às explicativas, sempre se tem a opção de usar modelos polinomiais, que são lineares nos parâmetros. No entanto, os coeficientes dos modelos polinomiais nem sempre permitem uma interpretação biológica ou natural do processo estudado.

Os modelos não lineares são baseados em funções que buscam reproduzir o mecanismo de geração da variável resposta, por isso seus parâmetros geralmente são objeto de uma interpretação prática. Além disso, estes modelos fornecem previsões mais confiáveis para a variável resposta fora do intervalo dos dados observados. Antes de ajustar um modelo estatístico, é importante observar se o comportamento da variável descreve uma função aproximadamente linear ou não linear. Neste caso, faz-se necessária a escolha de uma função que represente bem essa relação.

Construção dos Modelos

Suponha que N indivíduos ou unidades amostrais foram observados em uma determinada população e que tais unidades foram medidas repetidamente n_i vezes no tempo t_{ij} , $i = 1, \dots, N$ e $j = 1, \dots, n_i$. Y_i expressa o vetor resposta de interesse para o indivíduo i , de dimensão n_i . Se n_i é o mesmo para cada indivíduo ($n_i = n$), tem-se um total de $n \times N$ observações.

O modelo de efeitos mistos pode ser entendido como uma combinação de dois estágios de análise. O primeiro estágio assume que Y_i satisfaz um modelo de regressão estimando parâmetros que são específicos da população em estudo, ou seja, são os mesmos para todos os indivíduos observados, e são denominados efeitos

fixos. O segundo estágio compreende a estimação de parâmetros específicos para cada indivíduo, denominados efeitos aleatórios. Isso quer dizer que os parâmetros são decompostos em uma parte fixa, que representa o comportamento médio da população observada, e uma parte aleatória específica de cada indivíduo, que é acrescentada ou subtraída da média.

O modelo linear de efeitos mistos, portanto, é dado pela equação:

$$Y_i = X_i \beta + Z_i b_i + \varepsilon_i \quad (1)$$

onde β é um vetor p -dimensional de efeitos fixos, b_i é um vetor de efeitos aleatórios associados ao i -ésimo indivíduo (não variando com j) com $b_i \sim N(0, D)$ sendo D a matriz de variância/co-variância e $\varepsilon_i \sim N(0, \sigma^2 I)$. X_i e Z_i são matrizes de co-variáveis ou variáveis explicativas conhecidas com dimensões $(n_i \times p)$ e $(n_i \times q)$, respectivamente. Isto é, a decomposição dos efeitos em uma parte fixa e outra aleatória permite que os coeficientes variem de indivíduo para indivíduo, tornando as estimativas individuais mais precisas (Pinheiro & Bates, 2000; Verbeke & Molenberghs, 2000).

Conceito de Efeitos Fixos e Aleatórios

Para ilustrar o conceito de efeitos fixos e aleatórios, suponha que a variável resposta Y tenha uma relação linear com uma variável explicativa X . Esta relação pode ser expressa pela equação $Y_i = \phi_{0i} + \phi_{1i} X + \varepsilon_i$, onde ϕ_{0i} representa o intercepto e ϕ_{1i} corresponde à taxa de crescimento de Y em função dos valores que X assume.

Se uma única estimativa for calculada para cada um dos parâmetros ϕ_0 e ϕ_1 , esses valores estariam representando o comportamento médio do grupo observado sem levar em consideração as especificidades de cada unidade amostral. Considere, agora, que cada um desses parâmetros pode ser decomposto em uma parte fixa ($\bar{\phi}_0$ e $\bar{\phi}_1$), representando o comportamento médio, e outra parte aleatória ($\phi_{0i} - \bar{\phi}_0$) e ($\phi_{1i} - \bar{\phi}_1$), correspondente ao diferencial de cada indivíduo em relação à média da população. Então, os parâmetros poderiam ser reescritos em função de $\bar{\phi}$ (média dos parâmetros individuais), da seguinte forma:

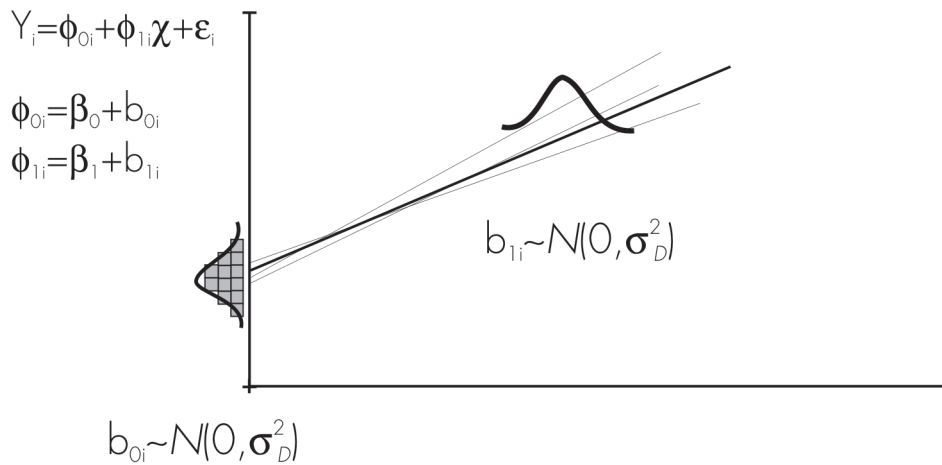
$$Y_i = \bar{\phi}_0 + (\phi_{0i} - \bar{\phi}_0) + \{ \bar{\phi}_1 + (\phi_{1i} - \bar{\phi}_1) \} X + \varepsilon_i$$

Na versão de modelo linear de efeitos mistos, tem-se:

$$Y_i = (\beta_0 + b_{0i}) + \{ (\beta_1 + b_{1i}) \} X + \varepsilon_i$$

Para cada indivíduo, portanto, é ajustado um modelo específico, o que melhora muito a qualidade do ajuste. A Figura 2 apresenta a interpretação gráfica dos efeitos aleatórios. Observa-se que é feita a suposição de que o conjunto de valores específicos por indivíduo em cada um dos parâmetros tem uma distribuição normal, com média zero e variância D .

Figura 2 – Efeitos fixos e aleatórios de um modelo linear



Onde os efeitos fixos β representam os valores médios dos parâmetros na população de indivíduos e os efeitos aleatórios b_i representam os desvios individuais.

Estrutura de Variância

Como já foi ressaltado, a análise de dados longitudinais envolvendo medidas repetidas deve levar em conta não só a variabilidade entre indivíduos, mas também a variação existente entre observações de um mesmo indivíduo. A escolha adequada de uma estrutura de variância é um passo muito importante para se fazer inferências sobre os parâmetros de um modelo de forma precisa.

No exemplo do crescimento infantil, as variações intra e entre crianças são estimadas separadamente. A variação entre grupos descreve como os coeficientes variam de criança para criança, ao passo que a intragrupo descreve a variação no ajuste de peso ou comprimento de uma mesma criança em torno de seu próprio comportamento de crescimento.

Na formulação do modelo, portanto, é necessária a especificação dos três componentes estocásticos que definem a estrutura de variância e que devem ser considerados:

- Efeitos aleatórios – parâmetros específicos por indivíduo (variações em torno dos parâmetros populacionais), representados pelo $b_i \sim N(0, D)$.
- Erro de medida – devido ao processo de medição, representado por $\varepsilon_{(1)i} \sim N(0, \sigma^2 I)$.
- Correlação serial – devido ao processo estocástico variando no tempo operando intra-indivíduo, representado por: $\varepsilon_{(2)i} \sim N(0, \tau^2 H_i)$.

Os erros ε_{ij} do modelo podem ser, portanto, decompostos em um componente devido ao processo de medição ($\varepsilon_{(1)i}$) e em um componente estocástico devido à correlação serial operando intra-indivíduo ($\varepsilon_{(2)i}$).

$$\varepsilon_i = \varepsilon_{(1)i} + \varepsilon_{(2)i} \quad \varepsilon_i \sim N(0, \Sigma)$$

As estruturas mais comumente utilizadas na literatura são: a matriz de co-variância uniforme ou Simétrica Composta (SC), a auto-regressiva de primeira ordem e a não estruturada. O Quadro 1 apresenta algumas características dos tipos de estruturas de variância/co-variância. Para mais informações, consultar Verbeke e Molenberghs (2000).

Quadro 1 – Características de algumas estruturas de variância/co-variância

Matriz de co-variância	Característica
Não estruturada	Os elementos da diagonal representam a variância calculada para cada ponto no tempo, e os demais elementos correspondem às co-variâncias entre as respostas tomadas em pontos de tempo distintos. Requer muitos parâmetros à medida que o número de observações por indivíduo aumenta e, conseqüentemente, requer um tamanho de amostra maior.
Uniforme ou Simétrica composta	Assume-se que existe uma correlação positiva ρ , entre quaisquer duas medidas de um mesmo indivíduo. São necessários apenas dois parâmetros, independentemente do número de medidas repetidas sobre o mesmo indivíduo, porém esta estrutura assume que não somente as variâncias, mas também as co-variâncias, sejam constantes.
Auto-regressiva de primeira ordem	Nesta matriz a correlação entre as observações sobre o mesmo indivíduo entre os instantes de tempo corresponde a ρ^{n_i} , ou seja, a correlação é elevada à potência equivalente ao instante n_i . As variâncias (elementos da diagonal) são consideradas constantes. Considera-se aqui que cada indivíduo foi medido em intervalos de tempo igualmente espaçados.
Poder, Exponencial e Gaussiana	No caso em que as medidas repetidas não estão igualmente espaçadas no tempo, as estruturas de co-variância têm de levar em consideração os intervalos de tempo entre observações. Nessas situações, recomenda-se o uso de estruturas de co-variância proporcionais aos intervalos de tempo.

A decisão sobre qual a estrutura de variância e co-variância mais adequada deve ser tomada com base no Critério de Informação de Akaike (*Akaike Information Criterion* – AIC) ou o Critério Bayesiano de Schwartz (*Baysean Information Criterion* – BIC). Quanto menor o valor do AIC, melhor a qualidade do ajuste.

Após a escolha da estrutura de variância e co-variância, procede-se à seleção das variáveis com base na diferença entre modelos aninhados. Um modelo com a variável que se quer testar e outro sem a variável. A diferença entre os logaritmos de máxima verossimilhança ($-2 \log ML$) dos dois modelos aninhados tem distribuição de qui-quadrado e, comparada com seus graus de liberdade, permite testar a significância do parâmetro.

Estimação dos Parâmetros

O processo de estimação e inferência torna-se diferente da resolução de sistema de equações normais desenvolvida em modelos lineares. A solução dos sistemas não lineares não é obtida de forma explícita e requer métodos numéricos para o seu desenvolvimento. Felizmente, hoje já se dispõe de programas computacionais que possibilitam a implementação de algoritmos, como o Winbugs, o S-Plus/R e o SAS.

No caso dos sistemas lineares, a estimação de mínimos quadrados dos parâmetros é baseada em valores que minimizam a soma de quadrados dos resíduos (ou, equivalentemente, maximiza a função de verossimilhança, considerando $\varepsilon \sim N(0, I\sigma^2)$). Derivando a soma de quadrados dos resíduos em função dos parâmetros, obtêm-se as equações normais, que igualadas a zero fornecem as estimativas dos parâmetros (pontos de máximo ou mínimo da função). No caso de modelos de efeitos mistos, não é possível obter as estimativas dos parâmetros de uma forma fechada. Esta dificuldade pode propiciar múltiplas soluções. Neste caso, o processo é dito não identificável, e faz-se necessário um processo iterativo para solucionar o sistema de equações de verossimilhança, que são obtidas igualando a zero as derivadas parciais das funções de verossimilhança (função score), com respeito aos parâmetros correspondentes ou à inclusão de restrições nos parâmetros.

Várias técnicas numéricas, tais como os algoritmos de Newton-Raphson ou Fisher-scoring, são utilizados. O processo começa com algumas estimativas preliminares dos parâmetros. Essas estimativas são utilizadas para calcular a Soma de Quadrado Residual (SQR) e verificar em um passo seguinte que alterações devem ser feitas nos parâmetros estimados que resultem na redução da SQR. O procedimento é repetido até que nenhuma modificação nos parâmetros reduza substancialmente a soma de quadrados residual.

Outros métodos numéricos têm sido implementados com o intuito de obter as estimativas que minimizem a soma de quadrados residual ou que maximizem a função de verossimilhança, como, dentre outros: Algoritmo de Gauss-Newton, Método do Gradiente, Método DUD (*Doesn't Use Derivatives*), Algoritmo Lindstrom & Bates, Aproximação Laplaciana, Aproximação Adaptativa Gaussiana.

Medidas de Diagnóstico

Uma etapa importante no processo de construção do modelo linear de efeitos mistos é o diagnóstico sobre o ajuste do modelo. A análise de diagnóstico envolve os seguintes aspectos:

- Seleção dos efeitos que necessitam a incorporação de componentes aleatórios.
- Verificação das suposições das distribuições feitas para o modelo por meio da análise de resíduos, isto é, a diferença entre os valores observados e os estimados pelo modelo.
- Identificação de pontos que exercem alguma influência nas estimativas dos parâmetros, como os *outliers* ou observações extremas e os pontos influentes.

Seleção dos Efeitos Aleatórios

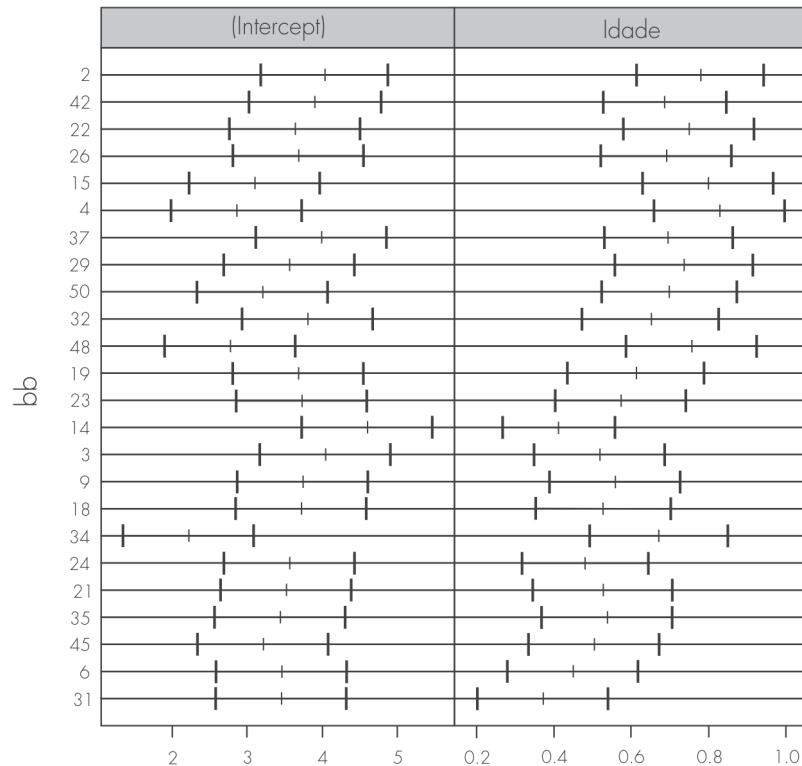
Um problema prático importante é a escolha dos parâmetros que necessitam um componente aleatório. Uma questão difícil é como decidir quais fatores têm coeficientes que variam entre indivíduos. A inclusão do efeito aleatório dependerá, principalmente, do delineamento do estudo. O exemplo da seção “Aplicação em nutrição” refere-se a um estudo planejado em blocos (grupos) no qual se busca captar os efeitos da variação aleatória em torno da média populacional.

Os efeitos aleatórios são comumente incorporados nos modelos de dados longitudinais para se considerar a heterogeneidade entre indivíduos, acomodar a dependência nas observações repetidas e estudar a estrutura de variância e co-variância que melhor acomode a dependência entre as medidas repetidas. É importante, portanto, decidir que efeitos aleatórios incluir e que estrutura de co-variância esses efeitos teriam. Suponha que para cada indivíduo fosse ajustado um modelo com coeficientes específicos.

Uma maneira de visualizar a necessidade da inclusão dos efeitos aleatórios é a construção de um gráfico com os intervalos de confiança para os coeficientes estimados para cada indivíduo (Figura 3). Veja, por exemplo, os intervalos de confiança estimados para cinquenta das 479 crianças. Esses intervalos são obtidos por meio do ajuste de parâmetros estimados com base em regressões individuais, estimando-se os coeficientes de cada criança e calculando-se o intervalo de confiança de cada um destes parâmetros.

A Figura 3 (página seguinte) é útil para verificar a necessidade da inclusão do efeito aleatório. O intercepto representa o peso ao nascer das crianças, e o parâmetro associado à idade corresponde à taxa de crescimento infantil de acordo com a idade. Percebe-se, na Figura 3, que há pouca variação da amplitude dos intervalos tanto para o intercepto quanto para a idade; no entanto, não ocorre interseção entre alguns dos intervalos de confiança calculados. Por exemplo, para o peso ao nascer entre as crianças de número 14 e 34 não existe interseção dos intervalos de confiança. Nesse caso, é necessário ajustar um componente aleatório para a variável idade da criança. O mesmo ocorre com a taxa de crescimento. Isso quer dizer que há um comportamento diferenciado entre as crianças com relação tanto ao peso ao nascer quanto às taxas de crescimento.

Figura 3 – Intervalos de confiança para os coeficientes da regressão linear (intercepto e taxa de crescimento) para cada uma das cinquenta crianças, Rio de Janeiro, 1999-2001



Análise de Resíduos

Antes de proceder a qualquer inferência com os parâmetros do modelo, é importante checar se os pressupostos básicos sobre as distribuições feitas para o modelo de efeitos mistos estão sendo cumpridos. Há duas suposições importantes que devem ser consideradas na análise:

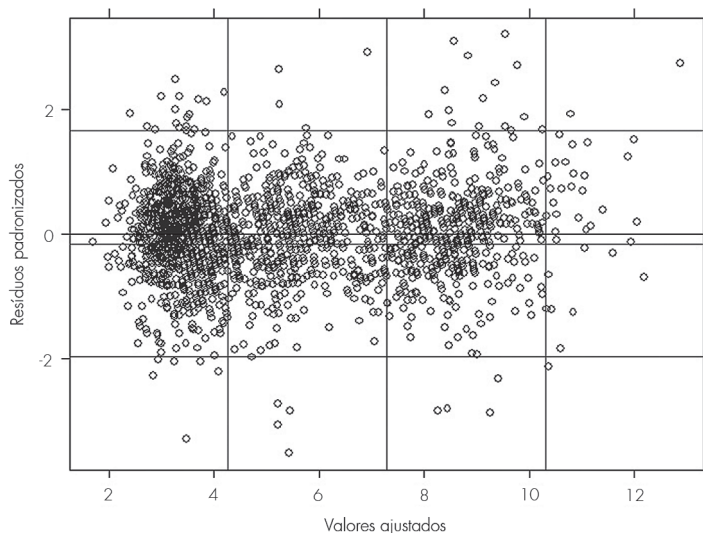
1. Os erros intra-indivíduo ou intragrupo são independentes e identicamente distribuídos pela normal, com média zero e variância σ^2 , e são independentes dos efeitos aleatórios.
2. Os efeitos aleatórios são normalmente distribuídos, com média zero e co-variância Ψ , e são independentes para diferentes grupos ou indivíduos.

Uma ferramenta bastante útil para a verificação do pressuposto da distribuição dos erros é o gráfico dos valores ajustados em relação aos resíduos padronizados (Figura 4). Este gráfico permite observar se a média está centrada em zero e se a variabilidade dos resíduos respeita os limites aceitáveis, que variam de -3 a 3. Além disso, permitem identificar pontos extremos.

A Figura 4 (página seguinte) permite visualizar dois aglomerados distintos de pontos. Estes aglomerados constituem o comportamento de acordo com o sexo das crianças. Caso a variabilidade dos resíduos demonstrasse comportamentos diferenciados em cada nível do fator sexo, seria recomendável a escolha de uma matriz de variância/co-variância adequada para contornar a heterocedasticidade.

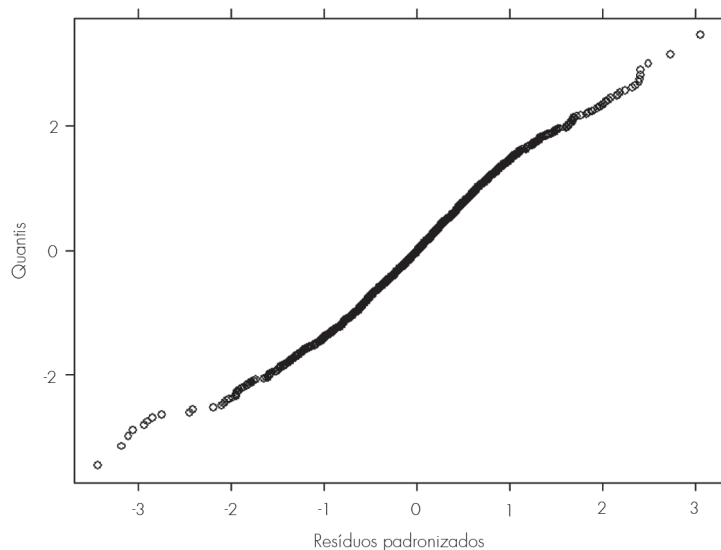
Outra maneira bastante útil de checar se o modelo está bem ajustado é construir um gráfico dos valores observados *versus* os valores ajustados pelo modelo que leva em consideração a variação intra-indivíduo. Quando os valores descrevem aproximadamente uma reta diagonal, indicam sucesso no ajuste.

Figura 4 – Análise de resíduos *versus* valores ajustados pelo modelo linear de efeitos mistos para o peso infantil, Rio de Janeiro, 1999-2001



Para se verificar o pressuposto de normalidade dos resíduos, utiliza-se o gráfico conhecido por qqnorm (Figura 5). Neste tipo de gráfico, é importante verificar se as caudas não estão demasiadamente prolongadas, quebrando o comportamento linear da reta, e se esta é simétrica em torno de zero.

Figura 5 – Teste de normalidade dos resíduos do modelo linear de efeitos mistos para o peso infantil, Rio de Janeiro, 1999-2001



Dois tipos de gráficos são utilizados para checar a suposição de normalidade dos efeitos aleatórios: o qqnorm, para constatar a normalidade e identificar *outliers*, e um gráfico de dispersão dos efeitos aleatórios estimados, para testar a suposição de homogeneidade da matriz de variância e co-variância dos efeitos aleatórios.

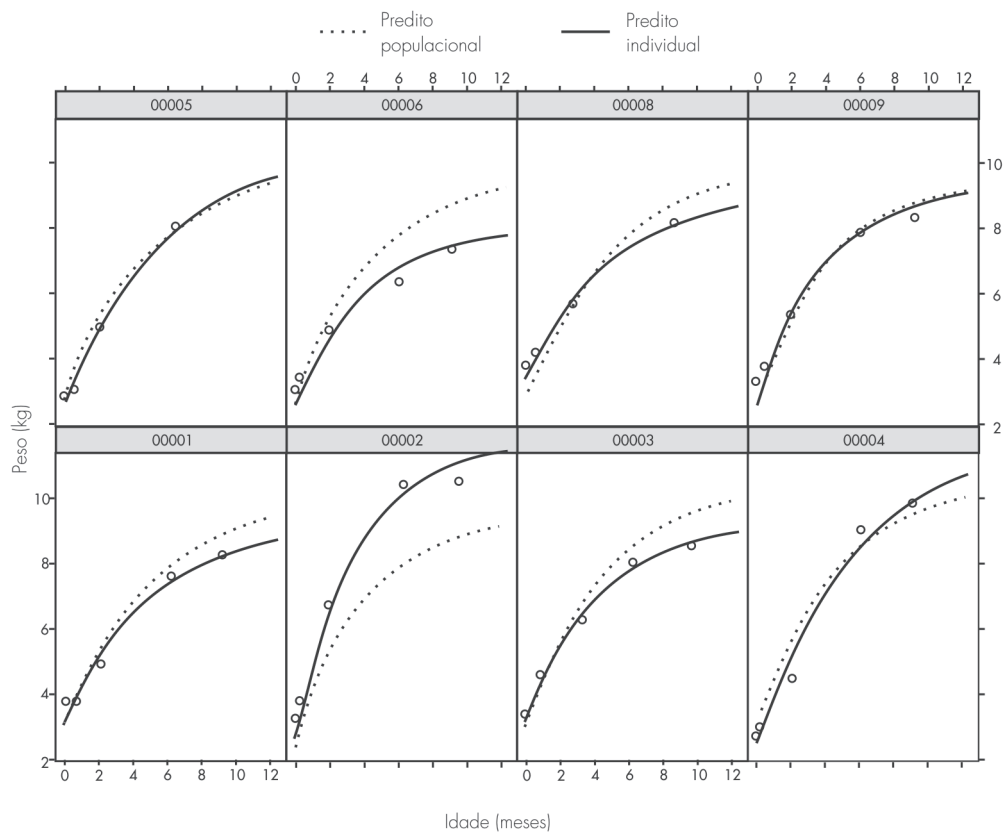
Análise de Resultados

Com o intuito de ilustrar e consolidar os conceitos expostos anteriormente, descreve-se nesta seção o processo de modelagem da situação prática apresentada na seção “Aplicação em nutrição”. Trata-se do estudo longitudinal de crianças acompanhadas em quatro ondas de seguimento com 0,5, 2, 6 e 9 meses. A modelagem estatística foi desenvolvida por meio do programa computacional R versão 5 (2007).

Situação Prática

Para melhor compreensão sobre os parâmetros aleatórios, a Figura 6 mostra o comportamento de apenas oito crianças participantes do estudo, refletindo a variação existente no padrão de crescimento entre as crianças. Pode-se observar que o comportamento do peso de cada uma das crianças poderia ser ajustado com interceptos e coeficientes de regressão diferentes, correspondendo ao peso inicial e à taxa de crescimento, respectivamente. Isto é, cada criança apresenta um ritmo de crescimento diferente do comportamento médio populacional (linha contínua), tanto no que se refere ao peso ao nascer quanto nos ganhos de peso ao longo desses primeiros meses. O modelo de efeitos aleatórios, portanto, permite estimar a variação dos desvios individuais em torno da média populacional de cada parâmetro do modelo, fazendo com que as estimativas se tornem mais precisas.

Figura 6 – Comparação dos ajustes dos modelos com e sem efeitos aleatórios com base nos valores observados do peso infantil, Rio de Janeiro, 1999-2001



No caso em estudo, de acordo com o comportamento apresentado pelos dados longitudinais observados, assumiu-se para o crescimento infantil, nos primeiros meses de vida, o modelo de regressão assintótico para a função f , dada por Pinheiro e Bates (2000) como:

$$f(\phi_{ij}, v_{ij}) = P_{assint.} + (P_0 - P_{assint.}) \exp[- \exp(\text{Ln_taxa} * \text{idade})]^{(2)}$$

A interpretação dos parâmetros ϕ_{ij} pode ser dada da seguinte forma:

$P_{assint.}$ - representa o peso assintótico, considerando-o como o peso ao final do período de estudo;

P_0 - representa o peso ao nascer;

Ln_taxa - logaritmo da taxa (λ) de ganho de peso; pressupõe-se que estas taxas de ganho de peso sejam constantes.

Nesta análise encontrou-se o modelo reduzido de regressão assintótico considerando-se apenas os parâmetros de efeitos fixos para a variável peso, o que resulta em um erro-padrão residual de 0,7689. Ao se comparar o ajuste do modelo reduzido de efeitos aleatórios com o que ignora a estrutura agrupada (modelo de efeitos fixos), verificou-se para o ajuste do peso uma redução significativa do erro-padrão residual para 0,2667, uma redução de 65% da variabilidade entre grupos. Isso ocorre porque a variabilidade entre grupos no modelo de efeitos fixos não é incorporada no modelo, sendo absorvida no erro-padrão residual. Além disso, observa-se na Tabela 1 que as estimativas, embora similares, apresentam erros-padrão menores no modelo que considera os efeitos aleatórios. Uma das vantagens, portanto, de se considerar os efeitos como aleatórios na modelagem é o aumento na precisão de suas estimativas.

Tabela 1 – Coeficientes estimados e erros-padrão dos modelos reduzidos com e sem efeitos aleatórios

Parâmetros	Modelo de efeitos fixos		Modelo de efeitos mistos	
	Estimativas	Erro-padrão	Estimativas	Erro-padrão
Peso				
$P_{assint.}$	10,29	0,1492	10,16	0,1004
P_0	3,13	0,0293	3,11	0,0226
Ln_taxa	- 1,68	0,0433	- 1,62	0,0196
Resíduo		0,7689		0,2667

$P_{assint.}$ representa o peso assintótico, considerando-o como o peso ao final do período de estudo; P_0 representa o peso ao nascer; Ln_taxa - logaritmo da taxa (λ) de ganho de peso.

A Tabela 2 mostra que a variável sexo é significativa em todos os três parâmetros, ou seja, as meninas apresentam pesos significativamente inferiores aos dos meninos tanto ao nascer (- 0,0971) quanto em seu peso assintótico (- 0,3639) e tendem a ter taxas menores de ganho de peso (- 0,0991) ao longo dos primeiros meses de vida. A idade gestacional influencia apenas no peso ao nascer (0,1338), ou seja, quanto maior a idade gestacional, maior é o peso da criança ao nascer, porém esta variável não influi significativamente nem sobre o peso assintótico nem sobre a taxa de crescimento infantil. O tipo de parto apresenta efeito significativo (0,0766) apenas sobre a taxa de crescimento, revelando que as crianças nascidas de parto cesáreo tendem a apresentar taxas de ganho de peso mais elevadas.

É interessante observar o efeito significativo da duração da amamentação sobre o peso assintótico (- 0,2813) da criança e em sua taxa de crescimento (0,0798). Percebe-se que, embora a taxa de crescimento seja mais elevada à medida que a duração da amamentação predominante aumenta, o peso assintótico de crianças amamentadas por mais tempo torna-se inferior. Isso quer dizer que as crianças com período de amamentação predominante mais elevado, embora tenham um ritmo de crescimento maior nos primeiros meses de vida, atingem um peso de equilíbrio menor ao final do período estudado.

Tabela 2 – Modelo não linear de efeitos mistos para a evolução do peso (kg) de crianças menores de 1 ano, Rio de Janeiro, 1999-2001

Efeitos fixos	Estimativa	Erro-padrão	Valor-p
$P_{assint.}$ (Intercepto)	11,2074	0,1858	< 0,0001
$P_{assint.}$ Sexo	- 0,3639	0,1887	0,0541
$P_{assint.}$ AmPred _i (mês)	- 0,2813	0,0390	< 0,0001
P_0 (Intercepto)	3,0985	0,0362	< 0,0001
P_0 Sexo	- 0,0971	0,0254	0,0431
P_0 Idade gestacional	0,1338	0,0133	< 0,0001
Ln_taxa (Intercepto)	- 1,8104	0,0385	< 0,0001
Ln_taxa Sexo	- 0,0991	0,0357	0,0056
Ln_taxa AmPred _i (mês)	0,0798	0,0110	< 0,0001
Ln_taxa Tipo de parto	0,0766	0,0289	0,0083
Efeitos aleatórios	Intervalos de confiança 95%		
	Limite inferior	Estimativa	Limite superior
$\sigma_{assint.}$ (Intercepto)	1,2512	1,4170	1,6048
σ_{P_0} (Intercepto)	0,3391	0,3766	0,4183
σ_{Ln_taxa} (Intercepto)	0,1312	0,1722	0,2260
Cor[Assint., P_0]	- 0,1148	0,0520	0,2159
Cor[Assint., Ln_taxa]	- 0,5666	- 0,3882	- 0,1750
Cor[P_0 , Ln_taxa]	0,0393	0,3376	0,5806
$\sigma_{residual}$	0,2514	0,2669	0,2834
- 2 ln-verossimilhança	2069,34		
AIC	2103,35		

Os parâmetros $\sigma_{intercepto}$ e σ_{idade} expressam os desvios em torno do peso inicial e da taxa de ganho de peso entre crianças, respectivamente.

Considerações Finais

Estudos envolvendo a análise de medidas repetidas observadas em um mesmo indivíduo são bastante comuns em epidemiologia nutricional. Nesses estudos, as características nutricionais dos indivíduos são monitoradas ao longo do tempo, o que requer o controle da dependência entre as observações de um mesmo indivíduo. Os modelos de efeitos mistos permitem acomodar essas dependências intra e entre indivíduos por meio de estruturas de variância e co-variância apropriadas, melhorando a qualidade do ajuste e fornecendo estimativas mais precisas dos parâmetros a serem estimados. Adicionalmente, importantes avanços da informática possibilitaram a implementação de algoritmos em vários programas computacionais, como o S-Plus/R, o SAS e o Winbugs.

Na área da saúde, além de dados contínuos como os discutidos no presente capítulo, é comum também o interesse dos pesquisadores em investigar desfechos com distribuição discreta. Vários autores abordam técnicas para lidar com a análise longitudinal de dados discretos. Crowder e Hand (1990), Lindsey (1993) e Molenberghs e Verbeke (2005), que apresentam várias técnicas estatísticas para lidar com medidas repetidas para dados discretos, são algumas referências importantes na literatura.

Referências

- BOSCARDIN, W. J.; TAYLOR, J. M. G. & LAW, N. Longitudinal models for Aids marker data. *Statistical Methods in Medical Research*, 7: 13-27, 1998.
- CROWDER, M. J. & HAND, D. J. *Analysis of Repeated Measures*. London: Chapman & Hall, 1990.
- DIGGLE, P. J. et al. *Analysis of Longitudinal Data*. New York: Oxford University Press, 2002.
- FREITAS, A. R. Método para estimar o tamanho amostral em análises de medidas repetidas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35(4): 697-702, 2000.
- LEON, A. C. Sample-Size requirements for comparisons of two groups on repeated observations of a binary outcome. *Evaluation and the Health Professions*, 27(1): 34-44, 2004.
- LINDSEY, J. K. *Models for Repeated Measurements*. New York: Oxford University Press, 1993.
- MOLENBERGHS, G. & VERBEKE, G. *Models for Discrete Longitudinal Data*. New York: Springer-Verlag New York, 2005.
- PAZ, C. C. et al. Sample size and power calculations for body weight in beef cattle. Biostatistics Research Archive, Berkeley, CA, 2005.
- PINHEIRO, J. C. & BATES, D. M. *Mixed-Effects Models in S and S-Plus*. New York: Spring-Verlag, 2000.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2007. ISBN 3-900051-07-0, URL. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>.
- VERBEKE, G. & MOLENBERGHS, G. *Linear Mixed for Longitudinal Data*. New York: Springer-Verlag, 2000.
- VONESH, E. F. & CHINCHILLI, V. M. *Linear and Nonlinear Models for the Analysis of Repeated Measurements*. New York: Marcel Dekker, 1997.