

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia



Métodos de Estimação de Efeitos de Mediação em Estudos Longitudinais com Aplicação na Doença de Machado-Joseph

Leticia Menegotto

Orientador: Prof^a Dr^a Vanessa Bielefeldt Leotti

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Citton Padilha dos Reis

Porto Alegre

30 de Junho de 2020

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia



**Métodos de Estimação de Efeitos de Mediação em
Estudos Longitudinais com Aplicação na Doença de
Machado-Joseph**

Leticia Menegotto

Orientador: Prof^a Dr^a Vanessa Bielefeldt Leotti

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Citton Padilha dos Reis

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-graduação em Epidemiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre

30 de Junho de 2020

Leticia Menegotto

Métodos de Estimação de Efeitos de Mediação em Estudos Longitudinais com Aplicação na Doença de Machado-Joseph/ Leticia Menegotto. – Porto Alegre, 30 de Junho de 2020-

79 p. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador: Profª Drª Vanessa Bielefeldt Leotti

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Citton Padilha dos Reis

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS
Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, 30 de Junho de 2020

1. Dados longitudinais. 2. Análise de Mediação. 3. Análise de Causalidade. I. Bielefeldt Leotti, Vanessa, Orient. II. Citton Padilha dos Reis, Rodrigo, coorient. III. Título

Leticia Menegotto

Métodos de Estimação de Efeitos de Mediação em Estudos Longitudinais com Aplicação na Doença de Machado-Joseph

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-graduação em Epidemiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Trabalho aprovado. Porto Alegre, 30 de Junho de 2020:

Prof^a Dr^a Vanessa Bielefeldt Leotti
Orientador

Prof. Dr. Rodrigo Citton Padilha dos Reis
Co-Orientador

Prof. Dr. Álvaro Vigo - Programa de Pós Graduação em Epidemiologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. José Luiz Padilha da Silva - Departamento de Estatística - Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Ricardo de Souza Kuchenbecker - Programa de Pós Graduação em Epidemiologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre, 2020

*Este trabalho é dedicado às crianças adultas que,
quando pequenas, sonharam em se tornar cientistas.*

Agradecimentos

Agradeço à minha família pelo suporte e capacidade de acreditar e investir em mim. A presença dos meus pais Clecio e Sueli e de meus irmãos Luana e Lucas me deu a segurança de que não estou e nunca estarei sozinha nesta jornada.

Aos meus orientadores, pelos ensinamentos.

Aos meus amigos e colegas pelo incentivo e apoio constantes.

*"You're going to find that many of the truths we cling to depend greatly on our own point
of view".*

(Obi-Wan Kenobi)

Resumo

Introdução: A análise de mediação é uma abordagem útil para investigar caminhos causais em estudos epidemiológicos e mede que porção do efeito de uma exposição sobre o desfecho opera através de uma variável intermediária em particular, ou seja, através de uma variável mediadora. A literatura de inferência causal que trata sobre análise de mediação para dados longitudinais se baseia principalmente no que foi desenvolvido nas ciências sociais, no entanto ainda são poucos os estudos que tratam de dados longitudinais utilizando a abordagem de desfechos potenciais. **Objetivo:** Estimar o efeito exercido pela variável mediadora no caminho causal existente entre a exposição e desfecho quando este último se apresenta na forma de dados longitudinais, através da utilização da abordagem proposta por Bind et al. (2015) e do algoritmo de Imai et al. (2010a) no *software* estatístico R, o pacote *mediation* (Tingley et al., 2014). Além disso, explorar, abordar e divulgar os métodos de análise de mediação para dados longitudinais que podem ser utilizados em diversos estudos epidemiológicos. **Métodos:** A aplicação considerada se dá no contexto da Doença de Machado-Joseph, hereditária e causada por uma mutação genética. A variável de exposição considerada é o número de repetições CAG (comprimento da mutação), o mediador é a idade de início dos sintomas e o desfecho é dado por avaliações repetidas da escala NESSCA, que representam a progressão da doença. A fim de aplicar e comparar as abordagens, foi simulado um banco de dados considerando estas variáveis provenientes de 10 000 indivíduos, e os ajustes dos modelos bem como a análise de mediação foram realizados utilizando o *software* estatístico R. **Resultados:** Ambos os métodos utilizados para avaliar os efeitos de mediação nos dados simulados apresentaram resultados muito próximos aos utilizados como parâmetros para geração dos dados simulados, sendo ambos acurados na estimativa dos efeitos direto, indireto e proporção mediada. **Conclusão:** Ambos os métodos permitem ao pesquisador, além de compreensão prática do método, a aplicabilidade em outros contextos de pesquisa que se tenha dados longitudinais a fim de avaliar mecanismos causais de mediação, que podem ser fundamentais para avaliação de alternativas de tratamentos e exposições em outros cenários. A abordagem proposta por Imai et al. (2010a), uma vez que já está implementada através do pacote *mediation* é mais prática de ser aplicada pelo pesquisador.

Palavras-chave: Análise de causalidade. Análise de mediação. Dados longitudinais. Doença de Machado-Joseph.

Abstract

Introduction: Mediation analysis is a useful approach to investigate causal pathways in epidemiological studies and measures how much of an exposure's effect on the outcome operates through a particular intermediate variable, that is, through a mediating variable. The causal inference literature that deals with mediation analysis for longitudinal data is based mainly on what has been developed in the social sciences, however there are still few studies that deal with longitudinal data using the approach of potential outcomes.

Objective: To estimate the effect of the mediating variable on the causal path between exposure and outcome when the latter is presented as longitudinal data, using the approach proposed by Bind et al. (2015) and the algorithm proposed by Imai et al. (2010a) in the R statistical software, the mediation package (Tingley et al., 2014). In addition, explore, approach and disseminate the methods of mediation analysis for longitudinal data that can be used in several epidemiological studies. **Methods:** The application considered is in the context of Machado-Joseph Disease, hereditary and caused by a genetic mutation. The exposure variable considered is the number of CAG repetitions (length of the mutation), the mediator is the age at onset of symptoms and the outcome is given by repeated assessments of the NESSCA scale, which represent the progression of the disease. In order to apply and compare the approaches, a database was simulated considering these variables from 10,000 individuals, and the adjustments of the models as well as the mediation analysis were performed using the R statistical software. **Results:** Both methods used to evaluate the mediation effects in the simulated data showed results very close to those used as parameters for generating the simulated data, both being accurate in estimating the direct, indirect and mediated proportion effects. **Conclusion:** Both methods allow the researcher, in addition to practical understanding of the method, the applicability in other research contexts that have longitudinal data in order to evaluate causal mediation mechanisms, which can be fundamental for the evaluation of alternative treatments and exposures in other scenarios. The approach proposed by Imai et al. (2010a), since it is already implemented through the mediation package, is more practical to be applied by the researcher.

Keywords: Causal analysis. Mediation analysis. Longitudinal data. Machado-Joseph disease.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Modelo de Causalidade de Rothman. Fonte: Adaptado de Rothman (1976).	27
Figura 2 – Diagrama Causal sem Confundimento	33
Figura 3 – Diagrama Causal sem Confundimento. Fonte: Adaptado de VanderWeele (2015).	34
Figura 4 – Diagrama Causal.	60
Figura 5 – Perfis da amostra e ajuste médio do modelo por replicação do CAG. Os valores da exposição apresentados foram escolhidos de acordo com os quartis da variável na amostra ($CAG = 73, 74, 76$)	61

Lista de tabelas

Tabela 1 – Características da amostra analisada - <i>baseline</i>	60
Tabela 2 – Estimativas e intervalos de 95% de confiança dos efeitos causais de mediação para cada abordagem.	64

Lista de abreviaturas e siglas

DMJ	Doença de Machado-Joseph
SCA3	Ataxia Espinocerebelar Tipo 3 (do inglês, <i>Spinocerebellar Ataxia Type 3</i>)
ICARS	<i>International Cooperative Ataxia Rating Scale</i>
SARA	<i>Scale for the Assessment and Rating of Ataxia</i>
NESSCA	<i>Neurological Examination Score for Spinocerebellar Ataxia</i>
LSEM	Modelo de Equações Estruturais (do inglês, <i>Linear Structural Equation Model</i>)
NDE	Efeito Natural Direto (do inglês, <i>Natural Direct Effect</i>)
NIE	Efeito Natural Indireto (do inglês, <i>Natural Indirect Effect</i>)
TE	Efeito Total (do inglês, <i>Total Effect</i>)
PM	Proporção Mediada (do inglês, <i>Proportion Mediated</i>)

Sumário

1	APRESENTAÇÃO	13
2	INTRODUÇÃO	14
3	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1	Doença de Machado Joseph	17
3.1.1	Escalas de Avaliação da Progressão da DMJ	18
3.2	Diferença entre Associação e Causação	19
3.2.1	Associação Estatística	20
3.2.2	Causa/Causação	21
3.3	Causalidade e Inferência Causal	23
3.3.1	Causalidade em Epidemiologia	24
3.3.2	Inferência Causal	28
3.3.3	Diagramas Causais	32
3.4	Mecanismos Causais: A Análise de Mediação	33
3.4.1	Análise de Mediação: Aproximação Estocástica	37
3.5	Associação e Causalidade em Dados Longitudinais	40
3.5.1	Associação Estatística em Dados Longitudinais	41
3.5.2	Análise de Mediação em Dados Longitudinais	42
4	OBJETIVOS	46
4.1	Objetivo Geral	46
4.2	Objetivos Específicos	46
	Referências	47
5	ARTIGO	51
6	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
	APÊNDICES	69
	APÊNDICE A – MATERIAL SUPLEMENTAR	70

1 Apresentação

Este trabalho consiste na Dissertação de Mestrado intitulada "Métodos de Estimação de Efeitos de Mediação em Estudos Longitudinais com Aplicação na Doença de Machado-Joseph", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em 30 de Junho de 2020.

O trabalho é apresentado em três partes, na ordem que segue:

1. Introdução, Revisão de Literatura e Objetivos;
2. Artigo;
3. Conclusões e Considerações Finais.

Documentos de apoio estão apresentados no apêndice.

2 Introdução

Estabelecer relações causais é algo que se busca desde o século IV a.C, como é possível verificar através dos estudos de Aristóteles (Barata, 1997). A primeira ideia do conceito de causa é baseada nas próprias observações diretas realizadas pelo indivíduo, e isso faz com que o conceito resultante seja limitado pelo escopo dessas observações (Holland, 1986). Normalmente, observam-se causas com efeitos imediatamente aparentes. Rothman e Greenland (2005) utilizam o exemplo de que, quando é acionado o interruptor de energia, a luz acende. Isso dá a impressão de que a única causa que leva a luz a acender é a ativação do interruptor, no entanto, há muitas outras variáveis envolvidas no processo e o interruptor é apenas uma parte do mecanismo necessário para acender a luz.

A causalidade muitas vezes é vista como um tipo de explicação, mesmo que nem todas as explicações sejam causais, estas podem também fazer referência a dedução lógica ou matemática ou intenção humana (VanderWeele, 2015). Desta forma, se fazem necessárias hipóteses e modelos apropriados para que uma causa específica seja vinculada aos efeitos observados. Segundo Luiz e Struchiner (2002), o conhecimento biológico sobre uma proposição epidemiológica é normalmente raro, o que faz com que essa proposição se torne apenas uma afirmação a respeito da associação entre exposição e desfecho. A existência de associação entre as variáveis estudadas é verificada através da análise estatística. No entanto, o estudo de causalidade vai além da quantificação da associação existente.

Em 1882, Koch propôs postulados para avaliar se determinado agente biológico seria causa de uma doença – também chamados de postulados de Henle-Koch. Esta abordagem considera que cada doença tem um agente causal específico e que esta causa específica resulta em uma doença. No entanto, dificilmente uma doença é resultado de apenas uma única causa e os postulados de Koch são mais direcionados para técnicas experimentais (Ross e Woodward, 2016). Sob a ótica epidemiológica, estabelecer relações causais é muito mais difícil do que verificar relações de associação quando a teoria biológica não é tão avançada (Luiz e Struchiner, 2002).

De acordo com Rothman e Greenland (2005), a causa de uma doença é um evento, condição ou característica que precedeu o evento da doença e sem o qual o evento da doença não teria ocorrido ou não teria ocorrido até mais tarde. Sob essa definição, pode ser que nenhum evento, condição ou característica específica seja suficiente por si só para produzir a doença. Esta não é uma definição, então, de um mecanismo causal completo, mas apenas um componente dele. Uma causa suficiente, que significa um mecanismo causal completo, pode ser definida como um conjunto de condições e eventos mínimos que inevitavelmente

produzem doenças. Na etiologia da doença, a conclusão de uma causa suficiente pode ser considerada equivalente ao início da doença, ou seja, ao estágio inicial do processo da doença. Para efeitos biológicos, a maioria e, às vezes, todos os componentes de uma causa suficiente são desconhecidos. Um modelo de causalidade baseado na classificação dos mecanismos que precedem a resposta tem sido conhecido como modelo de Rothman ou modelo de causas suficientes/componentes (Luiz e Struchiner, 2002).

Desta forma, busca-se entender nos estudos de causalidade o que poderia ter ocorrido se alguma ação ou estado tivesse sido diferente. Se algum aspecto tivesse diferido, se alguma exposição ou ação tivesse sido diferente, então diríamos que a exposição ou ação causa ou afeta o resultado (VanderWeele, 2015). Uma forma de explicar uma relação de causa e efeito é explicar como a causa afeta o desfecho, ou seja, descrever o mecanismo pelo qual este efeito ocorreu.

A análise de mediação é uma abordagem útil para avaliar caminhos em estudos epidemiológicos. Desta forma, é possível avaliar o efeito indireto, ou seja, a porção do efeito da causa sobre o desfecho opera através de uma variável intermediária em particular, o mediador, e o efeito direto, definido pela porção do efeito ocorre através de outros mecanismos ou caminhos. O trabalho de Baron e Kenny (1986) deu visibilidade para a análise de mediação nas ciências sociais e serve como base para os estudos de mediação. Outras abordagens, baseadas em desfechos potenciais, foram propostas por VanderWeele (2015) e Imai et al. (2010a), e possibilitam o uso da análise de mediação em diversos cenários de estudos envolvendo variáveis quantitativas e binárias, que podem ser utilizados em contextos de estudos epidemiológicos.

Em estudos epidemiológicos, Twisk (2013) afirma que a utilização de estudo longitudinal tem como principal vantagem – quando comparado a um estudo transversal – a possibilidade de estudo do desenvolvimento individual de uma determinada variável de desfecho ao longo do tempo. Além disso, o desenvolvimento individual de uma determinada variável de desfecho pode estar relacionado ao desenvolvimento individual de outras variáveis. Estudos de coorte, geralmente conduzidos para estudar aspectos biológicos de uma doença, coletam dados longitudinais de cada indivíduo participante. Devido a isso, foram desenvolvidos métodos para análise de mediação em dados longitudinais, permitindo a estimação dos efeitos diretos e indiretos presentes nos caminhos causais (Bind et al., 2015).

É possível realizar análise de mediação com dados longitudinais utilizando diferentes abordagens. No entanto, nem todas permitem interação entre exposição e mediador, além de não definir as estimativas dos efeitos utilizando comparações em desfechos potenciais ou considerar os pressupostos necessários para que as estimativas tenham interpretação causal (Bind et al., 2015). A abordagem proposta por Bind et al. (2015) é baseada nos modelos mistos generalizados para dados longitudinais e fornece as definições necessárias

para que seja possível o cálculo das estimativas dos efeitos direto e indireto utilizando a abordagem de desfechos potenciais.

A proposta deste estudo é estimar a porção do efeito da exposição no desfecho que ocorre através do caminho do mediador quando apenas o desfecho se apresenta na forma de dados longitudinais, através da utilização e implementação no *software* estatístico R da abordagem proposta por Bind et al. (2015) e utilização do algoritmo de Imai et al. (2010a) no mesmo *software* através do pacote *mediation* (Tingley et al., 2014). O método proposto por Bind et al. (2015), referido também como abordagem exata no decorrer do texto, traz uma forma fechada para estimação dos efeitos causais de mediação. Já o algoritmo Imai et al. (2010a), referido como abordagem estocástica, por não possuir uma forma fechada para estimação dos efeitos faz isso através de aproximação por simulação. Vale ressaltar que a abordagem proposta por Bind et al. (2015) não possuía nenhuma implementação em *software* livre, e por este motivo, uma importante contribuição deste trabalho é disseminar a metodologia através da disponibilização do código de implementação feito em R. Além disso, explorar, abordar e divulgar os métodos de análise de mediação para dados longitudinais que podem ser utilizados em diversas áreas de estudos epidemiológicos.

A utilização dos métodos será exemplificada no contexto da Doença de Machado-Joseph, uma doença genética que ocorre devido uma expansão de trinucleotídeos CAG no gene ATXN3, que leva à degeneração de múltiplos sistemas neurológicos. Sabe-se que a expansão do CAG tem influência significativa na progressão da doença; sabe-se que o CAG também exerce influência na idade de início dos sintomas. No entanto, o papel da idade de início dos sintomas no caminho causal entre a expansão do CAG e a progressão da doença ainda é desconhecido (De Mattos et al., 2019; Jardim et al., 2010). Desta maneira, verificar se a idade de início dos sintomas atua como variável mediadora na relação entre a replicação do CAG e a progressão da doença é a motivação do exemplo apresentado. As análises foram realizadas utilizando um banco de dados simulado a fim de possibilitar a reprodutibilidade do exemplo através da disponibilização destes dados para que se tivesse uma base com grande número de observações e que permitisse comparação entre os métodos aplicados.

3 Revisão de Literatura

Nas seções a seguir serão apresentadas considerações a respeito da Doença de Machado-Joseph, contexto motivador para o estudo de análise de causalidade com a utilização de dados longitudinais tratado neste trabalho. Além disso, serão contempladas a análise de causalidade e sua importância em estudos epidemiológicos, bem como as abordagens filosóficas e estatísticas a respeito do estudo de causalidade. Também são apresentadas considerações sobre diferentes abordagens do estudo de análise de mediação como ferramenta para avaliação de causalidade, a apresentação de abordagens como a de Baron e Kenny (1986), VanderWeele (2015), Imai et al. (2010a) e Bind et al. (2015), sendo este último totalmente voltado para a análise de mediação em dados longitudinais.

3.1 Doença de Machado Joseph

A Doença de Machado-Joseph (DMJ) ou Ataxia Espinocerebelar Tipo 3 (SCA3, do inglês *Spinocerebellar Ataxia Type 3*) é a ataxia autossômica dominante mais comum (Milanez et al., 2016). Segundo publicado pelo Sindicato Médico do Rio Grande do Sul (SIMERS, 2016), a doença acomete boa parte da população brasileira, sendo o estado do Rio Grande do Sul o que apresenta, proporcionalmente, maior número de casos da DMJ com pelo menos 1 caso em cada 16 mil habitantes.

A doença foi descrita pela primeira vez por Nakano et al. (1972), e acometia a família Machado, descendente de açorianos da Ilha de São Miguel. Woods e Schaumburg (1972) descreveram doentes descendentes de açorianos emigrantes dos Estados Unidos afetados por uma degenerescência nigro-espinodenteada com oftalmoplegia nuclear, identificados como família Thomas. Rosenberg et al. (1976) identificaram nos Estados Unidos uma nova família – a família Joseph, também com descendência açoriana, que apresentou ataxia progressiva, disartria, nistagismo, bradicinesia, entre outras características, em sete gerações. Romanul et al. (1977) descreveram uma família que apresentava características semelhantes das três famílias observadas anteriormente, o que levou à conclusão de que se tratava da mesma doença. Somente em meados de 1980 a designação de Doença de Machado-Joseph foi proposta por Coutinho e Andrade (1978), após observar quarenta pacientes de quinze famílias diferentes de origem açoriana que apresentavam fenótipos diferentes dentro da mesma família. O nome Doença de Machado-Joseph provém de duas famílias descritas neste trabalho e acredita-se que o gene se espalhou pelo mundo devido as colonizações.

A DMJ ocorre devido uma expansão de trinucleotídeos CAG no gene ATXN3, que leva à degeneração de múltiplos sistemas neurológicos. O curso da doença é progressivo,

sendo que não há tratamento específico para a doença e afeta cerca de 3:100.000 indivíduos no Sul do Brasil e Portugal. A DMJ normalmente tem o início de seus sintomas durante a vida adulta, em média, aos 32 anos de idade (Jardim et al., 2010). Depois de alguns anos, os pacientes acabam em cadeiras de rodas e, mais tarde, acamados. A sobrevivência mediana após o início da doença é de 21 anos (Kieling et al., 2007). Hauser e Josephson (2013) afirmam que a disparidade clínica da doença faz com que ela tenha três classificações em tipos clínicos principais (tipo 1, tipo 2 e tipo 3). Segundo Bettencourt e Lima (2011), a variabilidade clínica da doença depende do tamanho da repetição CAG e de uma variação que ainda não pode ser explicada.

De acordo com De Mattos et al. (2019), a expansão do CAG explica cerca de 55,2% da variabilidade da idade de início dos sintomas. Jardim et al. (2010) mostram que a inclinação da reta de progressão da doença aumenta em 0,15 em CAG adicional na repetição expandida. Além disso, Bürk et al. (1996) mostram que a doença é causada pela repetição instável do CAG. Algumas intervenções antes da idade de início dos sintomas estão sendo propostas em estudos clínicos, como a utilização de dietas de restrição calórica (Cunha-Santos et al., 2016).

Após a identificação do gene da doença, foi possível estabelecer um teste de diagnóstico. Kawaguchi et al. (1994) afirmam que, por não haver um marcador bioquímico específico, somente uma análise molecular pode estabelecer um diagnóstico laboratorial para os casos sintomáticos e assintomáticos.

3.1.1 Escalas de Avaliação da Progressão da DMJ

Escalas para avaliação da progressão da Doença de Machado-Joseph são amplamente utilizadas. Como exemplo, pode-se citar a utilização das escalas *International Cooperative Ataxia Rating Scale* (ICARS), *Scale for the Assessment and Rating of Ataxia* (SARA) e *Neurological Examination Score for Spinocerebellar Ataxia* (NESSCA).

A escala ICARS é dividida em quatro domínios, sendo estes: postura e distúrbios na marcha, funções cinéticas do tronco, alterações na fala e alterações oculomotoras. A ICARS totaliza 100 pontos, sendo que quanto maior a pontuação, pior o desempenho do paciente (Schoch et al., 2007).

A escala SARA é uma escala proposta por Schmitz-Hübsch et al. (2006) e avalia a doença de acordo com a incapacidade do indivíduo. A escala é dividida em oito domínios, a saber: marcha, postura, sentar, alterações na fala, teste índice-índice, teste índice-nariz, movimentos alternados e teste calcâneo-joelho. A escala totaliza 40 pontos e quanto maior a pontuação, pior o desempenho do paciente.

A escala NESSCA foi desenvolvida por Kieling et al. (2008) e se baseia em uma avaliação quantitativa do exame neurológico padronizado, tendo como foco as principais

características gerais das Ataxias Espinocerebelares e da DMJ em particular. O escore NESSCA é uma escala semiquantitativa de 40 pontos, que abrange várias manifestações neurológicas que ocorrem no indivíduo portador da Doença de Machado-Joseph, e assim como as demais escalas, quanto maior a pontuação do paciente, pior a sua situação em relação à progressão da doença.

De acordo com Kieling et al. (2008) as escalas na neurologia podem apresentar uma ou mais dimensões, apresentando-se de forma complexa ou não. Essa complexidade da escala que se está utilizando depende da distribuição potencial dos sintomas da doença que se quer medir a progressão. Os instrumentos construídos para medir a DMJ possuem pelo menos duas características que devem ser consideradas: combinação de variáveis e sintomas qualitativamente diferentes e manifestação variável dos sinais e sintomas ao longo do tempo.

Segundo Saute et al. (2012), ainda não existe alguma vantagem clara na utilização de alguma das três escalas. As escalas SARA e ICARS são as melhores estudadas e validadas até o momento, sendo que a SARA é mais simples e menos demorada que a ICARS; além disso, itens redundantes da ICARS podem ser um problema. No entanto, enquanto as escalas SARA e ICARS são atáxicas, a escala NESSCA é uma escala atáxica e não atáxica, sendo recomendada para utilização de maneira concomitante. Em outras palavras, Saute et al. (2012) afirmam que a SARA e a ICARS foram as melhores escalas atáxicas estudadas e validadas, e sua confiabilidade sustenta seu uso. As pontuações obtidas utilizando-se a NESSCA podem fornecer uma visão melhor da progressão geral da doença em ensaios de longo prazo e estudos de história natural.

3.2 Diferença entre Associação e Causação

Estudos epidemiológicos têm como objetivo gerar hipóteses a respeito da associação entre determinada exposição e a ocorrência do desfecho. Ou seja, avaliar se existe dependência estatística entre duas variáveis que estão sendo estudadas. No entanto, a associação entre duas variáveis estudadas, por mais forte que seja, não implica em uma relação de causa e efeito. Desta forma, busca-se verificar se a associação encontrada é causal com base nas evidências.

Estabelecer relações causais é algo que se busca desde o século IV a.C, como é possível verificar através dos estudos de Aristóteles (Barata, 1997). A concepção de causa e efeito passou por transformações e foi abordada também por Hume, Mill e Suppes. O estudo destes autores é essencial para entendimento do conceito de causa, bem como se tornaram uma grande contribuição para o desenvolvimento da inferência causal e de métodos para a análise de causalidade. Nesta seção, além da revisão de literatura, foi realizada uma revisão compreensiva de Holland (1986).

3.2.1 Associação Estatística

De acordo com Holland (1986), um modelo apropriado para verificar a existência de associação estatística entre uma exposição e um desfecho é basicamente o modelo estatístico que relaciona duas variáveis em uma população. O autor especifica que o modelo em questão inicia com uma população ou universo de indivíduos. Um indivíduo desta população pode ser denotado como i e estes indivíduos são os objetos sob estudo, tal como humanos, porções de terra, equipamentos de laboratório, espécies de plantas, entre outros.

Uma variável é uma função real que é definida em todos os indivíduos da população, desta forma o valor de uma variável para um indivíduo i é verificado através de algum mecanismo de medição. Para cada indivíduo i na população existe um valor Y_i referente à observação da variável Y na população, sendo de relevância científica entender o motivo pelo qual existe variabilidade desta variável dentro da população estudada. Neste caso, tem-se que Y é a variável desfecho do estudo, uma vez que se quer explicá-lo. Pode-se verificar a existência de associação entre as variáveis quando se entende a maneira na qual os valores de Y estão relacionados a valores de outras variáveis definidas na população. Seja A uma segunda variável observada na população e definida como uma característica dos indivíduos estudados. Segundo Holland (1986), A e Y são consideradas variáveis sob o ponto de vista matemático, ambas definidas e observadas na população e que ganham significado através dos pesquisadores interessados em estudá-las.

Os cálculos estatísticos – tais como probabilidades, distribuições e valores esperados – são realizados a respeito da população. A probabilidade será a proporção de indivíduos nessa população estudada; o valor esperado de uma variável será a média na população; os valores esperados condicionais serão valores médios de subconjuntos de indivíduos, sendo esses subconjuntos definidos condicionados aos valores das variáveis (Holland, 1986).

Através do modelo especificado é possível obter informações mais detalhadas a respeito da população em estudo. A distribuição conjunta das variáveis observadas Y e A sobre a população é especificada por $\mathbb{P}(Y = y, A = a)$, ou seja, a proporção de indivíduos i na população para a qual $Y_i = y$ e $A_i = a$. Além disso, é possível especificar a distribuição condicional de Y dado A através de

$$\mathbb{P}(Y = y|A = a) = \frac{\mathbb{P}(Y = y, A = a)}{\mathbb{P}(A = a)}$$

e a partir desta distribuição condicional, verificar como os valores de Y mudam na população conforme A varia. A análise de regressão é uma das maneiras mais comuns de se obter parâmetros de associação entre duas variáveis e nada mais é do que a esperança condicional dos valores de Y dados os valores de A , denotada por $\mathbb{E}(Y|A = a)$. No caso de um desfecho dicotômico, tem-se que o valor esperado é a própria probabilidade condicional. Além disso, pode-se também realizar estimativas e testes sobre os parâmetros de associação que relacionam as duas variáveis de acordo com os valores medidos previamente a partir

de uma amostra. Neste sentido, segundo Holland (1986), medir a associação entre duas variáveis não vai além de realizar estatísticas descritivas ou estimá-las através de uma amostra da população estudada.

3.2.2 Causa/Causação

Durante muito tempo a conceitualização de causa foi restrita a abordagem filosófica. Segundo Barata (1997), desde a origem dos tempos existe o interesse no entendimento de causalidade, isto é, entender a relação de causa e efeito entre fenômenos. Pode-se citar como início dos estudos acerca de causalidade as primeiras abordagens filosóficas a respeito do assunto. No século IV a.C, Aristóteles definiu o fenômeno causal em quatro vertentes: a causa material, a causa formal, a causa eficiente e a causa final. O conhecimento das causas é realizado através de observações, formulação de premissas e raciocínio dedutivo baseado na lógica formal (Barata, 1997). Através das quatro vertentes abordadas, Aristóteles enfatiza a causa das coisas em vez do efeito produzido, ou seja, explica a maneira como as coisas ocorrem.

Em meados do século XVIII, Hume enfatiza que a causação é a relação entre experiências muito mais do que entre fatos. A visão de Hume de que uma causa não pode ser deduzida logicamente do fato de que dois eventos estão ligados, mas que precisam ser vivenciados ou percebidos, é importante para a epidemiologia (Bhopal, 2016). A posição empírica de Hume pode ser considerada simpática à visão estatística de que o papel da estatística é extrair inferências sobre quantidades não observadas com base nos fatos observados (Holland, 1986). A análise de Hume identifica três critérios básicos para causação:

- (i) Adjacência espaço-temporal;
- (ii) Sucessão temporal;
- (iii) Conjunção constante.

Na análise da ideia de que o fenômeno *A* causa o fenômeno *B*, os critérios de Hume significam que *A* e *B* ocorrem no mesmo indivíduo e são adjacentes temporalmente (i), *A* precede temporalmente *B* (ii) e que *A* e *B* sempre ocorrem – ou não ocorrem – juntos (iii). No entanto, na análise de Hume, as causas não são delineadas em nenhum âmbito, qualquer fenômeno pode ser uma causa. Segundo Holland (1986), a análise de Hume falha em não considerar o fato de que uma causa poderia ter sido diferente do que era e de que é essa diferença que define o efeito. Além disso, Hume também não define a ideia de um experimento como relacionada ou importante para a causação, uma vez que ainda não se tinha a ideia de experimento como método científico.

Neste sentido, John Stuart Mill difere da noção de causa anteriormente apresentada. Para Mill, a observação sem experimentação pode determinar sequências e coexistências, mas não pode provar a causalidade (Holland, 1986). Mill foi responsável por codificar e elaborar vários métodos de investigação experimental, sendo quatro métodos considerados gerais: *método da variação concomitante*, *método da diferença*, *método dos resíduos* e *método da concordância*.

De acordo com o *método da variação concomitante* definido por Mill, quando um fenômeno varia de uma maneira específica sempre que outro fenômeno varia, de sua maneira específica, as variações são causa ou efeito uma da outra. Segundo Holland (1986), o *método da variação concomitante* pode ser aplicado a casos para os quais apenas a associação é apropriada.

O *método da diferença* define que se um caso em que o fenômeno acontece e um caso em que não acontece têm todas as circunstâncias em comum, com exceção de uma, ocorrendo esta somente no primeiro, a circunstância única em que os dois casos diferem é o efeito, ou a causa, ou uma parte indispensável da causa do fenômeno. Holland (1986) afirma que esse método é quase uma afirmação exata do que se quer dizer com efeito causal, mesmo que tenha sido expressa em uma linguagem mais geral e seu uso proposto seja identificar causas e efeitos.

O *método dos resíduos* consiste em eliminar determinadas circunstâncias e observar se o fenômeno persiste. Holland (1986) considera o *método de resíduos* de Mill uma afirmação precoce quase explícita da definição de efeito causal. Por fim, sobre o *método da concordância*, o autor afirma que o mesmo requer a noção de efeito nulo e mesmo que pareça um método para identificar a causa de um fenômeno, ele serve para descartar possíveis causas.

O princípio da causalidade afirma que todo fenômeno tem uma causa, ou seja, todo efeito tem uma causa. No entanto, a afirmação inversa não é válida, pois causas não têm necessariamente efeitos. O pensamento de Mill está próximo da ideia de que o efeito de uma causa é sempre relativo a outra causa, ao contrário de Hume. Como Hume, no entanto, ele não restringe a noção de causa de forma alguma. Para Hume e Mill, qualquer fenômeno pode ser uma causa, e além disso, a variabilidade não é algo que possa vir a ser um problema (Holland, 1986).

Em 1970, Patrick Suppes demonstrou consideração explícita a respeito da variação em sua teoria probabilística de causalidade (Holland, 1986). O autor ainda afirma que a ideia de Suppes era melhorar as análises de Hume, especificamente o critério de conjunção constante. Suppes não restringe as causas e efeitos, exceto pela possibilidade de ser possível expressá-los como eventos que ocorrem no tempo, e por isso, formaliza sua ideia utilizando-se da notação de processos estocásticos. Suppes adotou o critério de sucessão temporal, ou seja, todas as causas precedem temporalmente seus efeitos. Suppes primeiramente definiu

uma causa *prima facie* de um evento como sendo um evento que o precede temporariamente e que está positivamente associado a ele, para então definir causa espúria e genuína.

Ser uma causa *prima facie* é um pré-requisito para ser qualquer tipo de causa que não seja uma causa negativa, ou seja, que não seja um evento que faça com que outro evento não ocorra (Holland, 1986). Suppes assume que a direção da causa sempre segue a direção do tempo, não permite causalidade reversa. No entanto, mesmo que dois eventos sejam causalmente conectados não se pode inferir que o anterior é a causa do último: ambos podem ser efeitos de alguma causa comum (Otte, 1981). De acordo com a definição de Suppes, uma causa espúria é, portanto, uma causa *prima facie*, para a qual um evento anterior pode ser encontrado, o que explica pelo menos também a probabilidade condicional do efeito (Rosen, 1978). De acordo com Suppes, uma causa de um evento será genuína quando esta for uma causa *prima facie* e não for uma causa espúria, ou seja, uma causa *prima facie*, para ser genuína ou não espúria, não se tenha algum evento anterior que comprometa sua eficácia (Otte, 1981).

Segundo Holland (1986), Suppes também considera outros problemas, como as causas diretas e indiretas, mas o ponto principal de sua teoria são as definições acima apresentadas. O modelo proposto por Suppes descreve um comportamento médio e não o comportamento do indivíduo.

A definições de causalidade possuem amplo embasamento de literatura, tanto na sua origem filosófica quanto na teoria estatística, no entanto se faz necessária a diferenciação entre a causação e associação entre variáveis. De acordo com Holland (1986), embora a observação das variáveis bem como a medição de seus valores sejam realizadas em determinado período de tempo, nos estudos de associação ele apenas define a população de indivíduos que será estudada ou especifica o significado operacional de alguma variável, enquanto nos estudos de causalidade o tempo influenciará na interpretação dos resultados obtidos. Uma vez que o experimento não está sendo realizado em um ambiente completamente controlado, não se pode afirmar que o mesmo está totalmente livre de vieses. Os métodos e critérios trabalhados por Aristóteles, Hume, Mill e Suppes contribuíram no desenvolvimento da inferência causal e abriram portas para que ocorresse o desenvolvimento de métodos para análise de causalidade.

3.3 Causalidade e Inferência Causal

O postulado de Koch é um dos critérios para definição de causa mais conhecido quando se trata do estudo de causas de doenças, e foi proposto em 1882. De acordo com Luiz e Struchiner (2002), a satisfação do postulado de Koch fornecia razoáveis elementos para que a hipótese de que determinado agente causou a doença fosse verdadeira, enquanto o contrário não excluía esta hipótese. De forma semelhante, em 1965, Hill propôs fatores

necessários para distinguir uma associação causal de uma associação não causal. Apesar de suas limitações, os postulados propostos por Koch e os fatores de Hill permitiram que a discussão sobre etiologia de doenças tomasse uma proporção maior na Epidemiologia.

Ainda segundo Luiz e Struchiner (2002), a abordagem estatística a respeito da causalidade, diferentemente das abordagens de Hill e Koch, tem como base a formulação de um modelo, no qual são estabelecidas hipóteses que procuram viabilizar a inferência causal. No entanto, estas hipóteses são difíceis de serem verificadas e testadas quando se trata de dados observacionais. A inferência causal se consolida a partir de contribuições de estudos observacionais, na tentativa de explicação da causalidade acompanhada de métodos estatísticos adequados para este tipo de análise (VanderWeele, 2015).

Nesta seção serão definidos os critérios propostos por Koch e Hill, bem como inferência causal em epidemiologia e a utilização de diagramas causais para avaliar hipóteses de estudos.

3.3.1 Causalidade em Epidemiologia

A primeira ideia do conceito de causa é baseada nas próprias observações diretas realizadas pelo indivíduo, e isso faz com que o conceito resultante seja limitado pelo escopo dessas observações. Normalmente, observam-se causas com efeitos imediatamente aparentes. Rothman e Greenland (2005) utilizam o exemplo de que, quando é acionado o interruptor de energia, a luz acende. Isso dá a impressão de que a única causa que leva a luz a acender é a ativação do interruptor, no entanto, há muitas outras variáveis envolvidas no processo – fornecimento de energia ao circuito, boa fiação e uma lâmpada funcionando – o interruptor é apenas uma parte do mecanismo necessário para acender a luz.

A causalidade muitas vezes é vista como um tipo de explicação, embora nem todas as explicações sejam causais, estas podem também fazer referência a dedução lógica ou matemática ou intenção humana (VanderWeele, 2015). Em 1882, Koch propôs postulados para determinar se certo agente biológico seria causa de uma doença – também chamados de postulados de Henle-Koch. Esta abordagem considera que cada doença tem um agente causal específico, e que esta causa específica resulta em uma doença. Foi desta maneira que Koch identificou as bactérias causadoras da tuberculose, difteria, febre tifoide, entre outras doenças infecciosas (Fletcher et al., 1996). Os seguintes itens do postulado de Koch estão ligados às causas únicas:

- (i) O organismo precisa estar presente em todos os casos da doença;
- (ii) O organismo precisa ser isolado e cultivado em uma cultura pura;
- (iii) Quando a cultura pura é inoculada em animais ou no homem suscetível, ela deve reproduzir a doença.

No entanto, dificilmente uma doença é resultado de apenas uma única causa e os postulados de Koch são mais direcionados para técnicas experimentais (Ross e Woodward, 2016). Sob a ótica epidemiológica, estabelecer relações causais é muito mais difícil do que verificar relações de associação quando a teoria biológica não é tão avançada (Luiz e Struchiner, 2002).

De acordo com Rothman e Greenland (2005), a causa de uma doença é um evento, condição ou característica que precedeu o evento da doença e sem o qual o evento da doença não teria ocorrido ou não teria ocorrido até mais tarde. Sob essa definição, pode ser que nenhum evento, condição ou característica específica seja suficiente por si só para produzir a doença. Esta não é uma definição, então, de um mecanismo causal completo, mas apenas um componente dele.

Uma causa suficiente, que significa um mecanismo causal completo, pode ser definida como um conjunto de condições e eventos mínimos que inevitavelmente produzem doenças. Mínimo implica que todas as condições ou eventos são necessários para essa ocorrência. Na etiologia da doença, a conclusão de uma causa suficiente pode ser considerada equivalente ao início da doença, ou seja, ao estágio inicial do processo da doença. Para efeitos biológicos, a maioria e, às vezes, todos os componentes de uma causa suficiente são desconhecidos (Rothman e Greenland, 2005).

Em 1965, Hill propôs alguns fatores que poderiam auxiliar o pesquisador a entender se a associação observada poderia ser considerada causal, sendo estes:

- *Temporalidade*: A causa precede o efeito;
- *Evidência Experimental*: Relações causais são mais bem demonstradas mediante evidências experimentais de aumento do efeito;
- *Gradiente Biológico*: Exposições maiores à causa estão associadas com taxas mais elevadas da doença;
- *Plausibilidade*: Se o efeito sobre o qual se formula a hipótese é plausível diante do conhecimento biológico vigente, a interpretação causal é fortalecida;
- *Coerência*: É satisfeito quando a associação encontrada não entra em conflito com o que é conhecido sobre a história natural e a biologia da doença (Luiz e Struchiner, 2002);
- *Analogia*: Uma analogia simples pode aumentar a credibilidade para uma atribuição de causalidade;
- *Força*: Quanto mais forte a associação, maior a chance de que ela seja causal;

- *Consistência*: Generalização do achado quando o estudo é repetido em outras populações;
- *Especificidade*: Uma causa leva a um efeito.

De acordo com Holland (1986), muitas considerações poderiam ser feitas a respeito dos fatores propostos por Hill. O autor afirma que para Hill a temporalidade é um fator muito importante, uma vez que se tem uma sequência de eventos. Além disso, Holland (1986) afirma que tanto o gradiente biológico quanto a evidência experimental podem ser vistos como uma ênfase a natureza causal do agente causal proposto. Holland (1986) agrupa os fatores de plausibilidade, coerência e analogia, por entender que os mesmos se referem aos conhecimentos adquiridos até a época do estudo. A causa suspeita é biologicamente plausível? É coerente no sentido de não estar seriamente em conflito com fatos conhecidos? É análogo a relações causais conhecidas para agentes e doenças semelhantes? Estes três fatores refletem o conhecimento científico a respeito do que se está estudando. Ainda sobre os fatores de Hill, Holland (1986) pontua, a respeito do critério de força, que o mesmo pode ser visto como uma simples aceitação do *método de variação concomitante* de Mill ou da utilidade científica do efeito da causa *prima facie* de Suppes. Além disso, sobre o fator consistência, o autor afirma que o mesmo pode ser visto como uma forma enfraquecida de conjunção constante. No mínimo, uma associação que está presente em uma população e ausente em outra sugere efeitos causais variáveis. Por fim, a respeito da especificidade, Holland (1986) afirma que este fator pode estar relacionado ao pensamento do pressuposto de independência. Como a suposição de independência implica que o efeito causal *prima facie* é igual ao efeito causal médio, a especificidade combinada com a associação forte pode ser uma evidência de uma forte conexão causal. A falta de especificidade, no entanto, não refuta a suposição de independência em muitos casos e não garante que esta última seja válida.

Entre as abordagens que a epidemiologia tradicionalmente tem utilizado para discutir causalidade, a mais objetiva parece ser aquela que se baseia nos critérios estabelecidos por Hill. Além disso, um modelo determinístico muito utilizado a fim de demonstrar causalidade é o modelo de Rothman (1976). A Figura 1 ilustra esse modelo, que se refere a um esquema de causas suficientes de uma determinada doença no qual é possível observar três causas suficientes. Cada constelação de causas componentes representada é minimamente suficiente para produzir a doença, ou seja, não há causa componente redundante ou estranha. Cada um é uma parte necessária desse mecanismo causal específico. Uma causa componente específica pode desempenhar um papel em um, dois ou em todos os três mecanismos causais mostrados. Neste caso, a causa **A** destacada na figura é uma causa necessária, uma vez que está presente nos três conjuntos de causas suficientes, enquanto as demais desempenham papéis de causas componentes dentro da constelação de causas suficientes representadas. Um modelo de causalidade baseado na classificação

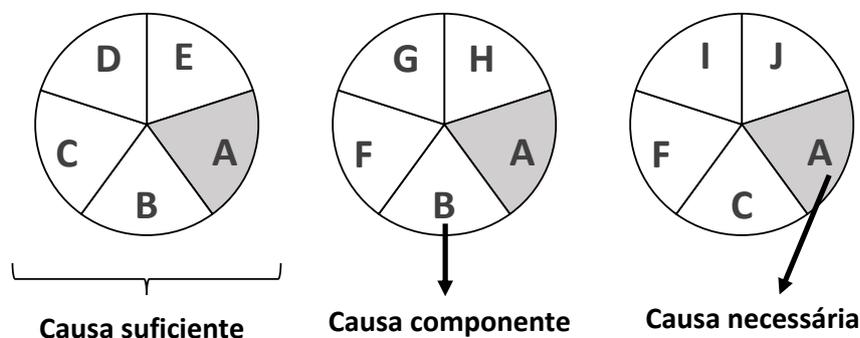


Figura 1 – Modelo de Causalidade de Rothman. Fonte: Adaptado de Rothman (1976).

dos mecanismos que precedem a resposta tem sido conhecido como modelo de Rothman ou modelo de causas suficientes/componentes (Luiz e Struchiner, 2002). No entanto, na maioria das vezes, os componentes de uma causa suficiente são desconhecidos.

Desta forma, se fazem necessárias hipóteses e modelos apropriados para que uma causa específica seja vinculada para as avaliações dos efeitos observados. Segundo Luiz e Struchiner (2002), o conhecimento biológico sobre uma proposição epidemiológica é normalmente raro, o que faz com que essa proposição se torne apenas uma afirmação a respeito da associação entre exposição e desfecho. A existência de associação entre as variáveis estudadas é verificada através da análise estatística. No entanto, o estudo de causalidade vai além da quantificação da associação existente.

Segundo Rothman e Greenland (2005), uma determinada doença pode ser causada por mais de um mecanismo causal, e todo mecanismo causal envolve a ação conjunta de uma infinidade de causas componentes. Os autores ainda trazem que quase sempre existem causas genéticas e componentes ambientais em todos os mecanismos causais que devem ser levados em conta. Quando vários fatores agem em conjunto para causar uma doença, temos o que chamamos de rede de causalidade. Segundo Fletcher et al. (1996), uma rede de causalidade é bem compreendida em doenças crônico-degenerativas – como câncer e doenças cardiovasculares – mas também é base para doenças infecciosas, nas quais temos que a presença do microorganismo é uma causa necessária para a doença ocorrer, mas não necessariamente suficiente.

A multicausalidade é importante pois a maioria das causas identificadas não é necessária nem suficiente para produzir doenças. No entanto, uma causa não precisa ser necessária ou suficiente para que sua remoção resulte na prevenção de doenças. O fato de a causa não ser necessária implica que algumas doenças ainda possam ocorrer mesmo com a prevenção desta causa, mas uma causa componente será, no entanto, uma causa necessária para alguns dos casos que ocorrem. O fato de a causa componente não ser suficiente implica que outras causas componentes devem interagir com ela para produzir a doença e que o bloqueio de qualquer uma delas resultaria na prevenção de alguns casos da doença. Portanto, não é necessário identificar todas as causas componentes para prevenir alguns casos de doença (Rothman e Greenland, 2005).

Mesmo que a assimilação de causa e efeito seja apresentada desde muito cedo no cotidiano social, a ideia de causalidade não é suficiente para servir como base de teorias científicas. Essa mesma insuficiência ocorre muitas vezes quando se trata de problemas ligados à epidemiologia e ciências sociais, uma vez que se faz necessário desenvolver um modelo conceitual mais refinado para servir de início para discussões de problemas de causalidade (Rothman, 1976). Esse modelo deve abordar problemas de causalidade multifatorial, confundimento, independência dos efeitos, efeitos diretos e indiretos, entre outros pontos que podem ser essenciais para o problema que está sendo discutido.

3.3.2 Inferência Causal

Luiz e Struchiner (2002) afirmam que a inferência causal em epidemiologia se divide entre a abordagem filosófica e estabelecimento de condições que respaldem uma interpretação causal (Seção 3.2.2). A principal contribuição da estatística se refere à verificação da existência de associação entre a exposição e o desfecho (Luiz e Struchiner, 2002). De acordo com Holland (1986), os modelos de inferência causal de Rubin, que serão abordados neste trabalho, estão de acordo com premissas que se alinham com a busca dos efeitos das causas, randomização dos indivíduos do estudo (ou seja, a alocação aleatória dos indivíduos entre tratamento e controle), comparação dos grupos tratamento e controle e a importância do tempo no estabelecimento de causalidade. Ainda de acordo com Holland (1986), inferir causalidade se refere a inferir efeitos de causas em indivíduos específicos, ou seja, tentar descrever relações através de comparações.

Na década de 80, diferentes abordagens e métodos de inferência causal começaram a se consolidar, a partir de importantes contribuições provenientes de estudos observacionais (Holland, 1986; Robins, 1986, 1987; Rubin, 1974, 1978). Até então, estabelecer causalidade entre exposições e desfechos era algo bastante evitado por estatísticos (Holland, 1986). A cautela em estabelecer a relação causal entre as variáveis estudadas era resultado do desconhecimento ao certo das origens da exposição e se de fato o desfecho seria resultado dessa variável ou se é resultado de confundimento não medido existente entre as variáveis

estudadas.

Atualmente, o foco vem sendo dado também ao como e quando as coisas aconteceram, dando mais espaço para explicação dos mecanismos pelos quais o efeito opera. A tentativa de explicação da causalidade vem acompanhada de métodos estatísticos cada vez mais adequados para este tipo de análise, no entanto, o modelo formado pela junção da teoria epidemiológica e dos métodos estatísticos dependem de pressupostos que dificilmente são satisfeitos ao utilizarmos apenas dados provenientes de estudos observacionais (VanderWeele, 2015). Neste sentido, a teoria de desfechos potenciais auxilia o pesquisador a tentar entender o que poderia acontecer caso o desfecho observado fosse diferente do que ocorreu.

R. A. Fisher, por exemplo, responsável por iniciar a teoria moderna do delineamento experimental, nunca trabalhou diretamente com causalidade multifatorial, uma vez que seus exemplos não eram facilmente generalizáveis (Holland, 1986). No entanto, Fisher se aproximou da ideia de desfechos potenciais em suas discussões sobre a relação entre a hipótese nula e a randomização. Uma das primeiras referências para o modelo de respostas múltiplas foi realizada por Neyman – em sua colocação, a ideia de desfechos potenciais se dá analisando o rendimento de um lote experimental de terra em um experimento agrícola. A discussão de Neyman também introduziu a noção de um elemento estocástico que é adicionado ao desfecho para permitir erros técnicos devido a imprecisões da técnica experimental.

Para Holland (1986), a noção de causa que opera em um experimento e em um estudo observacional é a mesma, a diferença está no grau de controle que um experimentador tem sobre os fenômenos sob investigação em comparação com a de um observador. Supondo que se tem dois níveis de tratamento, sendo $A_i = a$ a variável que indica a qual nível de tratamento cada indivíduo da população foi exposto, ou seja, $A_i = 1$ indica que o indivíduo i foi exposto ao tratamento e $A_i = 0$ indica que o indivíduo foi exposto ao controle. Em um estudo controlado, A_i é conhecido pelo pesquisador e os indivíduos são alocados em seus níveis através de um mecanismo aleatório. Em um estudo não controlado, A_i é determinado até certo ponto por fatores fora do controle do experimentador. Em qualquer um dos casos, a característica principal da noção de causa neste modelo é que o valor de A_i para cada indivíduo poderia ter sido diferente (Holland, 1986). O modelo de desfechos potenciais foi um dos primeiros a aplicar as ideias discutidas por Fisher e Neyman no estudo de causalidade.

Da mesma forma que o modelo de associação, apresentado na Seção 3.2.1, o modelo de Rubin inicia com uma população de indivíduos i . Indivíduos, nos modelos de inferência causal, referem-se aos objetos em estudo nos quais causas/tratamentos podem exercer algum tipo de influência. De acordo com Holland (1986), a noção-chave é o potencial (independentemente de ser possível ou não na prática) de expor ou não expor cada

indivíduo à ação de uma causa. Para inferência causal, é fundamental que cada indivíduo seja potencialmente exposto a qualquer uma das causas.

A variável A_i utilizada para construir a definição de Rubin é semelhante à variável A utilizada na definição de associação estatística, explicada na Seção 3.2.1. A diferença principal entre as duas variáveis é que, na definição de Rubin, A_i indica a exposição de i a um tratamento/causa específica, enquanto na definição de associação estatística A_i indica uma característica ou propriedade de i , e neste caso, não poderia ser diferente do que foi observada.

Diferentemente do que ocorre em estudos de associação estatística, o papel do tempo é fundamental na análise de inferência causal, uma vez que quando um indivíduo é exposto a uma causa, isso ocorre em um momento específico ou por um período de tempo específico. Desta forma, a divisão das variáveis se torna diferente e são definidas pré ou pós exposição, sendo que seus valores são determinados antes ou depois de serem expostas à causa que está sendo estudada (Holland, 1986).

O papel de uma variável de resposta Y é medir o efeito da causa e, portanto, as variáveis de resposta devem se enquadrar na classe pós-exposição. De acordo com Holland (1986), isso dá origem a outro elemento crítico do modelo. Os valores das variáveis pós-exposição são potencialmente afetados pela causa específica, $A_i = 1$ ou $A_i = 0$, à qual o indivíduo está exposto. Isso é a afirmação de que as causas têm efeitos, que é o cerne da noção de causalidade. Para que o modelo represente fielmente esse estado de eventos, precisa-se de uma variável que indique o desfecho potencial, Y_i^a , para representar as duas respostas em potencial. A interpretação desses dois valores, Y_i^1 e Y_i^0 para um determinado indivíduo i , é que Y_i^1 é o valor da resposta que seria observada se o indivíduo fosse exposto ao tratamento e Y_i^0 é o valor que seria observado no mesmo indivíduo, se esse fosse exposto ao controle.

O efeito do tratamento em i , medido por Y e relativo ao controle, é a diferença entre Y_i^1 e Y_i^0 , dados pela diferença algébrica $Y_i^1 - Y_i^0$. Segundo Holland (1986), essa diferença pode ser referida como o efeito causal do tratamento (relativo ao controle) em i (medido por Y), ou seja, o tratamento causa o efeito $Y_i^1 - Y_i^0$ no indivíduo i . No entanto, o autor afirma que é impossível observar o valor de Y_i^1 e Y_i^0 no mesmo indivíduo, e consequentemente, observar o efeito do tratamento em i , sendo este chamado de problema fundamental da inferência causal.

Para que este problema seja contornado, Holland (1986) cita a solução científica e a solução estatística. A solução científica é explorar suposições de homogeneidade e invariância entre as variáveis que estão sendo estudadas. A solução estatística é trabalhar com o efeito causal médio na população. Este efeito causal médio é o valor esperado da diferença $Y_i^1 - Y_i^0$ sobre os indivíduos na população, ou seja,

$$T = \mathbb{E}(Y_i^1 - Y_i^0),$$

sendo T o efeito médio causal. Para que T possa ser estimado é necessário assumir que os desfechos potenciais são comparáveis entre os grupos de exposição. No caso de um experimento aleatorizado, esta suposição é razoável devido ao fato que a atribuição dos indivíduos aos grupos de tratamento se deve ao acaso. Já em um estudo observacional, esta suposição não é realista, mas ela pode ser adaptada para que dentro de um mesmo estrato definido por um conjunto de covariáveis mensuradas C , os diferentes grupos de exposição sejam comparáveis com respeito aos seus desfechos potenciais. Esta suposição é conhecida na literatura como suposição de intercambiabilidade ou ausência de confundimento não observado na relação entre A e Y . A suposição de consistência, de maneira mais formal, afirma que se um indivíduo fosse exposto ao nível $A = a$, então o desfecho observado Y é igual ao desfecho potencial Y^a . Desta forma, estatisticamente tem-se que, dentro de um estrato definido por C , os desfechos potenciais Y_i^a são independentes do nível atribuído da variável de exposição. As suposições de consistência e intercambiabilidade condicional resultam no seguinte resultado de identificação do efeito causal médio populacional

$$\begin{aligned} T &= \mathbb{E}(Y^1 - Y^0) \\ &= \mathbb{E}(\mathbb{E}(Y^1 - Y^0|C)) \\ &= \mathbb{E}(\mathbb{E}(Y^1|C) - \mathbb{E}(Y^0|C)) \\ &= \mathbb{E}(\mathbb{E}(Y^1|A = 1, C) - \mathbb{E}(Y^0|A = 0, C)) \\ &= \mathbb{E}(\mathbb{E}(Y|A = 1, C) - \mathbb{E}(Y|A = 0, C)). \end{aligned} \tag{3.1}$$

Nota-se que a última igualdade fornece uma quantidade estimável, pois contém apenas variáveis observadas. Este resultado mostra como informações sobre diferentes indivíduos que podem ser observados podem ser usadas para obter conhecimento sobre T . A maneira pela qual os indivíduos seriam atribuídos para exposição ao tratamento ou ao controle é muito importante e envolve as considerações usuais de um bom planejamento estatístico de experimentos. A solução estatística substitui o efeito causal impossível de observar em um indivíduo específico pelo efeito causal médio do tratamento, possível de estimar sobre uma população (Holland, 1986).

Se o modelo de associação e o modelo de Rubin forem comparados, pode-se ver que ambos envolvem uma população de indivíduos e envolvem duas variáveis observáveis: no modelo de associação seriam as variáveis (A_i, Y_i) onde A_i representa um atributo da variável e Y_i representa o desfecho, enquanto para o modelo de Rubin, teremos (A_i, Y_i^A) , onde A_i representa a exposição e Y_i^a representa o desfecho potencial de acordo com o nível da exposição. Inicialmente, o modelo de associação envolve apenas variáveis observáveis pelo pesquisador, enquanto o mesmo não ocorre no modelo de Rubin, pois Y_i^a não é

conhecido para todas as exposições em todos os indivíduos da amostra. Desta maneira, duas ou mais causas (ou tratamentos) devem ser expostas a todos os indivíduos, e a resposta Y deve ser uma variável pós-exposição para que a resposta observada Y_i^a seja definida. A inferência associativa envolve distribuições conjuntas ou condicionais dos valores de Y e A , e a inferência causal diz respeito aos valores $Y_i^1 - Y_i^0$ em unidades individuais. As inferências causais procedem dos valores observados de A_i e Y_i^a e de suposições que abordam o problema fundamental da inferência causal, mas que geralmente são não testáveis. Inferências causais não envolvem necessariamente inferências estatísticas, mas inferências associativas quase sempre envolvem (Holland, 1986).

3.3.3 Diagramas Causais

Diagramas causais são figuras simples, mas que se tornaram ferramentas chave para pesquisadores que almejam avaliar efeitos causais, uma vez que é possível resumir o que já é sabido a respeito do problema em questão e comunicar as suposições do pesquisador sobre sua estrutura causal. Os grafos causais foram desenvolvidos a partir da combinação entre teoria de probabilidade gráfica e diagramas de caminhos (Cortes et al., 2016).

Segundo Rothman et al. (2016), as regras gráficas que ligam as relações causais a associações estatísticas estão baseadas na matemática. Dessa maneira, é possível visualizar os diagramas causais como uma ferramenta que permite a extração de conclusões sobre as relações estatísticas existentes no problema até mesmo para os que não são familiarizados com a parte matemática, e desta forma, auxiliar na construção de um modelo teórico.

Os diagramas causais expressam os pressupostos do pesquisador a respeito das relações existentes entre as variáveis que estão sendo estudadas – exposição, desfecho e covariáveis. Afirma-se que uma variável X afeta diretamente uma variável Y se houver uma seta de X para Y . Diz-se que X afeta Y indiretamente se houver uma sequência de setas na mesma direção de X para Y . Esse caminho é chamado de caminho dirigido ou caminho causal. Qualquer variável ao longo de um caminho causal é dita como uma variável intermediária entre X e Y Rothman et al. (2016). Na Figura 2, U e X não afetam uma à outra.

Filhas de uma variável X são variáveis afetadas diretamente por esta variável; *mães* de X são variáveis que afetam diretamente X . *Descendentes* de X são variáveis afetadas direta ou indiretamente por X , enquanto as *ancestrais* são todas as variáveis que afetam X direta ou indiretamente. Na Figura 2, Y tem *mães* U e X , e uma *filha* Z ; X tem uma *filha* (Y) e duas *descendentes* (Y e Z); e Z tem uma *mãe* Y e três *ancestrais*, Y , U e X (Rothman, 1976).

Um caminho entre as variáveis X e Y é uma sequência sem cruzamento e sem repetição, traçado ao longo de conectores começando em X e terminando em Y . Caminhos

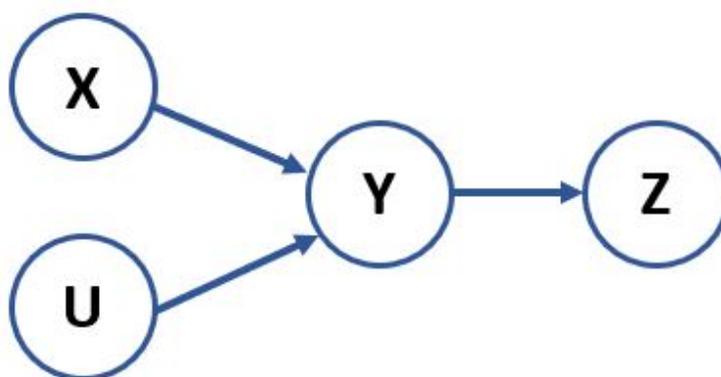


Figura 2 – Diagrama Causal sem Confundimento

dirigidos são os que os conectores existentes apontam para a mesma direção, enquanto qualquer outro caminho é dito caminho não direcionado. Se houver uma variável que está localizada no encontro das pontas de duas setas, ela é chamada de colisora (como Y no caminho entre U e X); um caminho dirigido não pode conter um colisor. Se o caminho da Figura 2 não apresentasse a variável U , Y seria uma variável intermediária na relação entre X e Z .

De acordo com Cortes et al. (2016), a utilização de diagramas causais pode gerar conclusões úteis, mesmo quando ainda não se é possível identificar todas as variáveis que devem ser utilizadas no modelo a fim de realizar o controle para confundimento. Ainda segundo Cortes et al. (2016), a análise de causalidade em estudos observacionais requer informações a respeito dos dados empíricos e pressupostos causais. Desta forma, a teoria dos diagramas causais propõe uma forma para a comunicação desses pressupostos, sendo uma importante ferramenta auxiliar na construção do modelo teórico e verificação de suas suposições.

3.4 Mecanismos Causais: A Análise de Mediação

Uma forma de explicar uma relação de causa e efeito é explicar como a causa afeta o desfecho, ou seja, descrever o mecanismo pelo qual este efeito ocorreu. A análise de mediação mede que porção do efeito da causa sobre o desfecho opera através de uma variável intermediária em particular e quanto do efeito ocorre através de outros mecanismos ou caminhos. Segundo VanderWeele (2015), o efeito da causa no desfecho que ocorre por meio de uma variável intermediária é chamado de efeito indireto ou efeito mediado, enquanto o efeito da causa no desfecho que não ocorre através desta variável é dito como efeito direto ou efeito não mediado. Já a variável intermediária é definida como variável mediadora.

Busca-se entender nos estudos de causalidade o que poderia ter ocorrido se alguma ação ou estado tivesse sido diferente do que era. Se algum aspecto tivesse diferido, se

alguma exposição ou ação tivesse sido diferente, então diríamos que a exposição ou ação causa ou afeta o resultado (VanderWeele, 2015). Na prática, sabe-se apenas o que realmente ocorreu, e o resultado no estado contrafactual em que nós tomamos uma ação diferente da que foi tomada de fato é essencialmente ausente ou desconhecido. Neste sentido, a utilização da teoria contrafactual ou de desfechos potenciais fornece uma notação formal e técnica para a conceitualização de causa (VanderWeele, 2015).

Os métodos para a mediação são aqueles que são mais naturalmente pensados como avaliação dos mecanismos. À medida que se possibilita a identificação de fatores que estão presentes no caminho causal e que podem afetar o desfecho, obtém-se resultados que podem auxiliar no refinamento de intervenções (VanderWeele, 2015).

O trabalho de Baron e Kenny (1986) deu visibilidade para a análise de mediação nas ciências sociais e serve como base para os estudos de mediação. Através do Diagrama Causal apresentado na Figura 3, é possível visualizar a forma mais simples de um modelo de mediação. Neste caso, **A** representa a exposição, **M** representa o mediador e **Y** representa o desfecho.



Figura 3 – Diagrama Causal sem Confundimento. Fonte: Adaptado de VanderWeele (2015).

O método de Baron e Kenny (1986) é por muitas vezes tratado como método do produto ou método do produto dos coeficientes, e tem como objetivo estimar os efeitos direto e indireto do modelo de mediação utilizando modelos de regressão. Para o caso de mediador e desfecho contínuos, consideramos os seguintes modelos de regressão:

$$\mathbb{E}(M|A = a, \mathbf{C} = \mathbf{c}) = \beta_0 + \beta_1 a + \beta'_2 \mathbf{c} \quad (3.2)$$

$$\mathbb{E}(Y|A = a, M = m, \mathbf{C} = \mathbf{c}) = \theta_0 + \theta_1 a + \theta_2 m + \theta'_4 \mathbf{c} \quad (3.3)$$

em que, na Equação (3.2), $\mathbb{E}(M|A = a, \mathbf{C} = \mathbf{c})$ é a esperança da variável mediadora condicionada à variável de exposição e às variáveis confundidoras \mathbf{C} , β_0 é o intercepto, β_1 é o coeficiente da variável de exposição e β'_2 é o vetor de coeficientes das variáveis confundidoras. Na Equação (3.3), $\mathbb{E}(Y|A = a, M = m, \mathbf{C} = \mathbf{c})$ representa a esperança da variável desfecho condicionada à variável de exposição, à variável mediadora e às variáveis confundidoras, θ_0 é o intercepto, θ_1 é o coeficiente da variável de exposição, θ_2 é o coeficiente da variável mediadora e θ'_4 é o vetor de coeficientes das variáveis confundidoras.

O efeito direto pode ser definido como o efeito da exposição no desfecho em um nível fixo da variável mediadora. Isso difere da estimativa do efeito total, que indica o efeito global da exposição ou tratamento no desfecho. Já o efeito indireto é o efeito que ocorre no desfecho devido a mudanças ocorridas na exposição através da variável mediadora. A estimativa do efeito direto pode ser realizada estimando θ_1 , enquanto o efeito indireto pode ser calculado estimando β_1 e θ_2 e realizando o produto das estimativas. Sendo assim, o efeito direto estimado é o coeficiente da exposição no modelo de regressão para o desfecho (Equação (3.3)) no qual a variável mediadora é considerada como uma covariável, enquanto o efeito indireto é o coeficiente da exposição no modelo de regressão para o mediador (Equação (3.2)) multiplicado pelo coeficiente do mediador no modelo de regressão para o desfecho (Equação (3.3)).

Vale ressaltar que, para que estes efeitos tenham interpretação causal, é necessário que suposições fortes a respeito de confundimento sejam feitas (VanderWeele, 2015), e essas suposições serão citadas posteriormente. Os efeitos direto e indireto baseados em teorias contrafactuais podem ser estimados a partir dos modelos de regressão, desde que certas suposições sobre confundidores sejam atendidas e os modelos estatísticos sejam especificados de maneira correta.

Uma suposição implícita nos modelos anteriores é que não existe interação entre mediador e exposição. Desta forma, supondo desfecho e mediadores contínuos, que a regressão para o mediador permanece como na Equação (3.2), e que o modelo de regressão para o desfecho permite interação entre os termos da exposição e mediador, tem-se o seguinte modelo para o desfecho:

$$\mathbb{E}(Y|A = a, M = m, \mathbf{C} = \mathbf{c}) = \theta_0 + \theta_1 a + \theta_2 m + \theta_3 am + \boldsymbol{\theta}'_4 \mathbf{c} \quad (3.4)$$

A partir dos modelos expressos na Equação (3.2) e na Equação (3.4) é possível definir os efeitos: direto controlado (CDE, do inglês *Controlled Direct Effect*, na Equação (3.5)), natural direto (NDE, do inglês *Natural Direct Effect*, na Equação (3.6)) e natural indireto (NIE, do inglês *Natural Indirect Effect*, na Equação (3.7)). Desta forma, é possível descrever uma mudança no desfecho dado que a exposição muda do nível a^* para a , estimando estes efeitos conforme Equações (3.5), (3.6) e (3.7), utilizando-se os coeficientes obtidos através dos modelos de regressão para o mediador e para o desfecho, nas Equações (3.2) e (3.4). Vale ressaltar que os termos “controlado” e “natural” presentes na nomenclatura dos efeitos se devem ao fato de que o NDE corresponde aos mecanismos causais – equivalente ao efeito direto anteriormente definido – enquanto o CDE representa o efeito causal da manipulação direta, ou seja, quando na experimentação se define um nível do qual as mudanças de exposição serão controladas (Imai et al., 2010a).

O efeito direto controlado (ou CDE) expressa o quanto o desfecho mudaria, em média, caso o mediador fosse fixo para toda a população mas a exposição alterasse. Já

$$CDE(m) = (\theta_1 + \theta_3 m)(a - a^*) \quad (3.5)$$

$$NDE = (\theta_1 + \theta_3 \beta_0 + \theta_3 \beta_1 a^* + \theta_3 \beta_2' \mathbf{c})(a - a^*) \quad (3.6)$$

$$NIE = (\theta_2 \beta_1 + \theta_3 \beta_1 a)(a - a^*) \quad (3.7)$$

o efeito natural direto (NDE) captura o efeito da exposição no desfecho caso o caminho da exposição para o mediador fosse desativado. De forma semelhante, o efeito natural indireto captura o efeito da exposição no desfecho alterando o mediador. O efeito total (T) descreve quanto o desfecho mudaria globalmente para uma mudança na exposição do nível a^* para a , e pode ser decomposto como a soma do NIE e NDE, conforme a equação abaixo:

$$T = NIE + NDE \quad (3.8)$$

De acordo com VanderWeele (2015), para que as estimativas destes efeitos tenham, de fato, interpretação causal, deve ser realizado controle para as variáveis de confusão. Para poder estimar o efeito direto controlado usando as fórmulas apresentadas, duas suposições são necessárias.

- **Suposição (A2.1):** não há confundimento não medido da relação exposição-desfecho, ou seja, se existem variáveis confundidoras no caminho entre a exposição e o desfecho, as mesmas estão sendo consideradas nas equações de regressão.
- **Suposição (A2.2):** não há confundimento não medido da relação mediador-desfecho, ou seja, se existem variáveis confundidoras no caminho entre o mediador e o desfecho, as mesmas estão sendo consideradas nas equações de regressão.

A suposição A2.1 seria atendida caso a exposição fosse randomizada. A identificação dos efeitos naturais direto e indireto usa as duas suposições anteriores, juntamente com duas adicionais.

- **Suposição (A2.3):** não deve haver confundimento não medido na relação exposição-mediador.
- **Suposição (A2.4):** não deve haver nenhum confundidor na relação mediador-desfecho que seja afetado pela exposição.

A maior crítica a respeito da experimentação em estatística é que o resultado que obtemos a respeito de causalidade é proveniente de uma caixa preta, ou seja, não se sabe

o que exatamente foi realizado e considerado para a obtenção de determinado resultado. A análise de mediação está acabando com essa limitação, uma vez que identifica variáveis intermediárias (ou mediadores) que estão presentes no caminho causal entre a exposição e o desfecho (Imai et al., 2010a).

De acordo com VanderWeele (2015), a fim de avaliar até que ponto o efeito total da exposição sobre o desfecho opera por meio do mediador, algumas vezes utiliza-se a proporção mediada (PM, do inglês *Proportion Mediated*). Quando os efeitos são usados na escala de diferenças, a proporção mediada é apenas definida como a razão do efeito indireto natural para o efeito total, ou seja,

$$PM = \frac{NIE}{T} = \frac{T - NDE}{T} \quad (3.9)$$

A proporção mediada mede o que aconteceria com o efeito da exposição no desfecho caso o caminho existente entre a exposição e o mediador fosse desativado, ou seja, o quanto reduziríamos do efeito. No entanto, a medida possui algumas limitações. Por exemplo, quando os efeitos naturais direto e indireto têm direções opostas e magnitude parecida, a proporção pode resultar em um valor muito maior do que 100% e não fornecer informações que tenham sentido para a análise. Desta forma, a medida deve ser utilizada com cautela (VanderWeele, 2015; MacKinnon, 2012). A abordagem apresentada até aqui será chamada de abordagem analítica, pois a partir dos modelos se obtém expressões fechadas para os efeitos. Para outras estruturas de modelos, às vezes essas expressões não podem ser obtidas, e para isso pode-se utilizar uma aproximação estocástica.

3.4.1 Análise de Mediação: Aproximação Estocástica

Usualmente, a análise de mediação é formulada, entendida e implementada utilizando-se modelos de equações estruturais lineares (LSEM, do inglês *Linear Structural Equation Model*) (como por exemplo, em Baron e Kenny (1986)). No entanto, de acordo com Imai et al. (2010a), essa abordagem pode ser problemática em dois sentidos: primeiro, os modelos de equações estruturais não podem oferecer uma definição geral dos efeitos causais da mediação que sejam aplicáveis além de modelos estatísticos específicos. Segundo, os métodos desenvolvidos na estrutura de LSEM não podem ser generalizados para modelos não lineares, incluindo modelos logito e probito – para mediadores e desfechos discretos – e modelos semi ou não paramétricos.

Por este motivo, Imai et al. (2010a) apresentam um modelo que supera as limitações do modelo com LSEM e que possui uma estrutura única para definição, identificação, estimação e análise de sensibilidade dos efeitos de mediação, sem que seja necessária a referência a algum modelo estatístico específico. O modelo é definido levando em consideração a teoria contrafactual da inferência causal, possibilitando que se tenha uma

definição formal dos efeitos causais de mediação. Além disso, Imai et al. (2010a) estendem resultados que mostram que os efeitos médios da análise de mediação são identificados não parametricamente, ou seja, podem ser consistentemente estimados sem qualquer forma funcional ou premissa de distribuição (Imai et al., 2010b). Com o resultado desta identificação não paramétrica, Imai et al. (2010a) desenvolveram maneiras para estimar os efeitos de mediação causal que podem acomodar relações lineares e não lineares, modelos paramétricos e não paramétricos, mediadores contínuos e discretos e vários tipos de variáveis de desfecho.

Na sequência, se utilizará da definição de desfechos potenciais descrita na Seção 3.3.2 e se tomará uma notação mais simplificada na qual Y representa o desfecho, A_i como sendo a variável binária que indica a exposição do indivíduo i ao tratamento ($A_i = 1$) ou não exposição ao tratamento ($A_i = 0$) e Y_i^a como o desfecho potencial do indivíduo i sob o tratamento a . Como se pode observar apenas um dos desfechos, tem-se que $Y_i = Y_i^a$ para todo i . Desta forma, o efeito causal médio é dado por $\mathbb{E}(Y_i^1 - Y_i^0)$ (Imai et al., 2010a).

A fim de definir os efeitos causais de mediação, supõe-se que M_i representa a variável mediadora do modelo, que pode assumir dois potenciais valores – M_i^1 e M_i^0 – mas que apenas um destes valores pode ser observado, ou seja, $M_i = M_i^A$. Anteriormente, os desfechos potenciais quando definidos eram função apenas do tratamento. Para a abordagem de Imai et al. (2010a), os desfechos potenciais devem ser visualizados em função da variável de tratamento e da variável mediadora. Sendo assim, Y_i^{a,M^a} denota o desfecho potencial que seria resultante se as variáveis de tratamento e mediadoras fossem iguais a a e M^a respectivamente.

Utilizando-se das descrições acima, Imai et al. (2010a) definem o efeito causal de mediação ou efeito indireto para cada indivíduo i como sendo

$$\delta_i(a) = Y_i^{a,M_i^1} - Y_i^{a,M_i^0} \quad (3.10)$$

para $a = 0, 1$. Segundo Imai et al. (2010a), para entender a Equação (3.10), deve-se fazer a seguinte pergunta contrafactual: que mudança ocorreria no desfecho se alguém mudasse o mediador do valor que seria realizado sob a condição de controle, M_i^0 , para o valor que seria observado sob o condição de tratamento, M_i^1 , mantendo o status do tratamento em a ? Se o tratamento não tiver efeito no mediador, ou seja, $M_i^1 = M_i^0$, o efeito indireto será zero. Embora Y_i^{a,M_i^a} seja observável para indivíduos com $A_i = a$, $Y_i^{a,M_i^{1-a}}$ nunca pode ser observado para nenhum indivíduo, ou seja, tem-se o problema fundamental da inferência causal (Seção 3.3.2).

De maneira similar, Imai et al. (2010a) definem o efeito direto do tratamento em cada indivíduo como sendo

$$\zeta_i(a) = Y_i^{1,M_i^a} - Y_i^{0,M_i^a} \quad (3.11)$$

para $a = 0, 1$. Desta maneira, o efeito total do tratamento pode ser decomposto nos efeitos diretos e indiretos, resultando em

$$\tau_i = Y_i^{1, M_i^1} - Y_i^{0, M_i^0} = \frac{1}{2} \sum_{a=0}^1 \{\delta_i(a) + \zeta_i(a)\}. \quad (3.12)$$

Além disso, assumindo que os efeitos direto e indireto não variam de acordo com o status do tratamento (ou seja, $\delta_i = \delta_i(1) = \delta_i(0)$ e $\zeta_i = \zeta_i(1) = \zeta_i(0)$), então o efeito total se dá pela soma dos efeitos direto e indireto. Imai et al. (2010a) definem os efeitos médios direto e indireto, ou seja, o efeito entre toda a população de indivíduos observada. Desta forma, teremos as seguintes estimativas para os efeitos médios direto, indireto e total:

$$\bar{\zeta}(a) = \mathbb{E}(Y_i^{1, M_i^a} - Y_i^{0, M_i^a}) \quad (3.13)$$

$$\bar{\delta}(a) = \mathbb{E}(Y_i^{a, M_i^1} - Y_i^{a, M_i^0}) \quad (3.14)$$

$$\bar{\tau} = \mathbb{E}(Y_i^{1, M_i^1} - Y_i^{0, M_i^0}) = \frac{1}{2} \sum_{a=0}^1 \{\bar{\delta}(a) + \bar{\zeta}(a)\} \quad (3.15)$$

Assumindo que os efeitos médios direto e indireto não variam de acordo com o status do tratamento (ou seja, $\bar{\delta}_i = \bar{\delta}_i(1) = \bar{\delta}_i(0)$ e $\bar{\zeta}_i = \bar{\zeta}_i(1) = \bar{\zeta}_i(0)$), então o efeito médio total se dá pela soma dos efeitos médios direto e indireto ($\bar{\tau} = \bar{\delta} + \bar{\zeta}$). Os pressupostos para identificação dos efeitos de mediação podem ser verificados em Imai et al. (2010a). Os efeitos definidos pelas Equações (3.13), (3.14) e (3.15) são equivalente aos definidos por VanderWeele (2015) e ilustrados nas Equações (3.6), (3.7) e (3.8), respectivamente. Além disso, é possível trocar os níveis da exposição expressados por $A = 0, 1$ para o contexto de uma exposição contínua assumindo os níveis de exposição como sendo $A = a, a^*$.

Para utilização em casos onde a variável mediadora é binária, a modelagem do mediador pode ser feita através de modelos probito e logito a fim de se obter as estimativas dos efeitos médios da mediação causal e sua incerteza de estimativa. De acordo com Imai et al. (2010a), é uma área de aplicação importante, porque medidas discretas e binárias são comuns, e ainda assim os métodos padrão baseados na estrutura LSEM não são diretamente aplicáveis nestes casos.

O algoritmo geral de estimação de Imai et al. (2010a), desenvolvido e implementado no pacote *mediation* do *software* R, pode ser aplicado em diversos modelos estatísticos, como por exemplo modelos lineares, modelos lineares generalizados, probito e logito ordenados, modelos de sobrevivência, entre outros. O algoritmo proposto é representado da seguinte maneira:

1. Ajustam-se os modelos e distribuição de probabilidade para as variáveis desfecho e mediadora;
2. Realiza-se a predição da variável mediadora para os valores da exposição (M^{a^*}, M^a) ;
3. Realiza-se a predição da variável desfecho especificando $A = a^*$ e $M = M^a$, e $A = a^*$ e $M = M^{a^*}$;
4. Calculam-se as diferenças entre os desfechos e estimam-se os efeitos causais de mediação;
5. Realizam-se as simulações de Monte Carlo e bootstrap para estimar a incerteza e calcular os intervalos de confiança.

Mesmo que não se tenha uma expressão de forma fechada para os estimadores dos efeitos de mediação a ser utilizada nos modelos com variável dicotômica, a abordagem de Imai et al. (2010a) permite estimativas aproximadas com os ajustes do modelo. De maneira semelhante, as estimativas dos efeitos definidos por VanderWeele (2015) na Seção 3.4 nos casos de desfechos e mediadores dicotômicos são adaptadas mudando-se a escala das estimativas, sendo tratadas na escala de razão de chances e razão de riscos. A abordagem proposta por Imai et al. (2010a) foi implementada no *software R*, resultando no pacote *mediation* (Tingley et al., 2014), enquanto a abordagem de VanderWeele (2015) é implementada em uma macro para o *software SAS* (Valeri e VanderWeele, 2013).

3.5 Associação e Causalidade em Dados Longitudinais

Estudos longitudinais são definidos como estudos onde a variável desfecho é medida repetidamente, isto é, a variável resposta é medida em cada indivíduo em diversas ocasiões (Twisk, 2013). Em estudos longitudinais, as observações de um indivíduo ao longo do tempo não são independentes entre si. Devido a isso, faz-se necessária a aplicação de técnicas estatísticas que consideram o fato de que as observações intraindivíduos são correlacionadas (Twisk, 2013).

Um dos critérios de causalidade de Hill apresentados na seção 3.3.1 se faz essencial para estudos de dados longitudinais, o critério da temporalidade. É necessário que exista um intervalo de tempo entre a variável desfecho Y (efeito) e a variável preditora X (causa), ou seja, a causa deve preceder o efeito. A questão a respeito da existência ou não de causalidade na relação entre as variáveis pode ser total ou parcialmente respondida através de estudos longitudinais específicos (por exemplo, estudos experimentais) (Twisk, 2013). Os estudos longitudinais são caros, consomem tempo e tornam a análise mais difícil, mas também permitem que o desenvolvimento individual de uma variável específica seja verificado.

Nesta seção serão tratados os conceitos de associação e causalidade em dados longitudinais, bem como a análise de mediação com medidas repetidas no tempo.

3.5.1 Associação Estatística em Dados Longitudinais

Na prática, dados longitudinais muitas vezes se apresentam de forma desbalanceada, ou seja, o número de medidas dos indivíduos estudados não é igual ou as medidas não são realizadas em pontos fixos do tempo. É possível tratar dados longitudinais com diferentes métodos de análise estatística – Teste t pareado (no caso mais simples de duas medidas por indivíduo), Modelos Lineares Generalizados Mistos (também chamados de Modelos de Curva de Crescimento ou Modelos Multiníveis), Equações de Estimação Generalizadas e Modelos de Equações Estruturais. Uma alternativa surge da observação de que os perfis longitudinais específicos de um sujeito podem ser aproximados através da regressão linear. Desta forma, é possível resumir o vetor das observações repetidas de cada sujeito por um vetor de coeficientes estimados de regressão por sujeitos. Subsequentemente, é possível aplicar técnicas de regressão multivariada para relacionar as estimativas obtidas com as covariáveis conhecidas – por exemplo, tratamento, classificações, características da linha de base, entre outras (Verbeke e Molenberghs, 2009).

Segundo Laird et al. (1982), em geral, um modelo linear de efeitos mistos será qualquer modelo que satisfizer as seguintes condições:

$$\left\{ \begin{array}{l} \mathbf{Y}_i = X_i\beta + Z_i\mathbf{b}_i + \varepsilon_i; \\ \mathbf{b}_i \sim N(\mathbf{0}, D); \\ \varepsilon_i \sim N(\mathbf{0}, \Sigma_i); \\ \mathbf{b}_1, \dots, \mathbf{b}_N, \varepsilon_1, \dots, \varepsilon_N \text{ independentes,} \end{array} \right. \quad (3.16)$$

onde \mathbf{Y}_i é o vetor n_i -dimensional de respostas do sujeito i , $1 \leq i \leq N$, N é o número de indivíduos, X_i e Z_i são matrizes $(n_i \times p)$ e $(n_i \times q)$ -dimensionais de covariáveis conhecidas, β é um vetor p -dimensional contendo os efeitos fixos, \mathbf{b}_i é um vetor q -dimensional contendo os efeitos aleatórios e ε_i é um vetor n_i -dimensional que contém os valores residuais. D é a matriz $(n_i \times n_i)$ de covariância geral simétrica e Σ_i é a matriz $(n_i \times n_i)$ de covariância que depende de i apenas através de sua dimensão n_i , ou seja, o conjunto desconhecido de parâmetros em Σ_i não depende de i . Além disso, o modelo definido por Laird et al. (1982) é mais geral devido a matriz de covariância Σ_i , permitindo que o modelo apresente erros correlacionados e heterocedasticidade, sendo este o modelo construído quando utilizada a função *lme* do pacote *nlme* no *software R* (Pinheiro et al., 2012).

3.5.2 Análise de Mediação em Dados Longitudinais

A análise de mediação é uma abordagem útil para avaliar caminhos em estudos epidemiológicos. Estudos de coorte, geralmente conduzidos para estudar aspectos biológicos de uma doença, coletam dados longitudinais de cada indivíduo participante. Isso possibilitou o desenvolvimento de fórmulas para análise de mediação em dados longitudinais, permitindo a estimação dos efeitos diretos e indiretos presentes nos caminhos causais (Bind et al., 2015).

É possível realizar análise de mediação com dados longitudinais utilizando abordagens com regressões multiníveis, utilizando as trajetórias individuais exposição-mediador com um modelo de curva de crescimento, modelos lineares de efeitos mistos, além de modelos Bayesianos. No entanto, nem todas as abordagens permitem interação entre exposição e mediador, além de não definir as estimativas dos efeitos utilizando comparações em desfechos potenciais ou considerar os pressupostos necessários para que as estimativas tenham interpretação causal (Bind et al., 2015).

A abordagem proposta por Bind et al. (2015) é baseada nos modelos mistos generalizados para dados longitudinais e fornece as definições necessárias para que seja possível o cálculo das estimativas dos efeitos direto e indireto utilizando a abordagem de desfechos potenciais. Além disso, permite a interação entre exposição e mediador, a análise de diversos tipos de mediadores e desfechos, considera múltiplos mediadores conjuntamente e fornece métodos para estimação e inferência a respeito dos dados estudados.

Para este estudo, consideram-se os modelos lineares de efeitos mistos, tanto para o mediador (M_{ij}) quanto para o desfecho (Y_{ij}), observados no indivíduo i na ocasião j ($j = 1, \dots, n_i$). Desta forma, o modelo para o mediador possui intercepto e o coeficiente da exposição variando para os indivíduos. O modelo para o desfecho tem interceptos e inclinações aleatórios para a exposição (A_{ij}), o mediador e a interação entre ambos:

$$\mathbb{E}[M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a, \mathbf{b}_i] = (\beta_0 + b_{0i}) + (\beta_1 + b_{1i})a + \boldsymbol{\beta}_c^T \mathbf{c} \quad (3.17)$$

$$\begin{aligned} \mathbb{E}[Y_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a, M_{ij} = m, \mathbf{g}_i] \\ = (\gamma_0 + g_{0i}) + (\gamma_1 + g_{1i})a + (\gamma_2 + g_{2i})m + (\gamma_3 + g_{3i})am + \boldsymbol{\gamma}_c^T \mathbf{c} \end{aligned} \quad (3.18)$$

em que \mathbf{C}_{ij} é o vetor de covariáveis conhecidas para o indivíduo i na ocasião j , A_{ij} é a exposição referente ao indivíduo i na ocasião j . Tem-se que $\mathbf{u}_i = (\mathbf{b}_i, \mathbf{g}_i)^T = (b_{0i}, b_{1i}, g_{0i}, g_{1i}, g_{2i}, g_{3i})^T$ com média zero e matriz de covariância

$$Cov(\mathbf{u}_i) = \begin{pmatrix} \sigma_{b_0}^2 & \sigma_{b_0,b_1} & \sigma_{b_0,g_0} & \sigma_{b_0,g_1} & \sigma_{b_0,g_2} & \sigma_{b_0,g_3} \\ \sigma_{b_1,b_0} & \sigma_{b_1}^2 & \sigma_{b_1,g_0} & \sigma_{b_1,g_1} & \sigma_{b_1,g_2} & \sigma_{b_1,g_3} \\ \sigma_{g_0,b_0} & \sigma_{g_0,b_1} & \sigma_{g_0}^2 & \sigma_{g_0,g_1} & \sigma_{g_0,g_2} & \sigma_{g_0,g_3} \\ \sigma_{g_1,b_0} & \sigma_{g_1,b_1} & \sigma_{g_1,g_0} & \sigma_{g_1}^2 & \sigma_{g_1,g_2} & \sigma_{g_1,g_3} \\ \sigma_{g_2,b_0} & \sigma_{g_2,b_1} & \sigma_{g_2,g_0} & \sigma_{g_2,g_1} & \sigma_{g_2}^2 & \sigma_{g_2,g_3} \\ \sigma_{g_3,b_0} & \sigma_{g_3,b_1} & \sigma_{g_3,g_0} & \sigma_{g_3,g_1} & \sigma_{g_3,g_2} & \sigma_{g_3}^2 \end{pmatrix}$$

possível de ser estimada devido ao fato de que as Equações (3.17) e (3.18) são estimadas de forma conjunta.

Os efeitos direto e indireto são identificados caso quatro suposições forem atendidas. Essas suposições são similares às que são feitas quando se trabalha com dados não correlacionados e que foram citadas na Seção 3.4. Devido ao delineamento longitudinal, as suposições envolvem independência condicional aos efeitos aleatórios $\mathbf{u}_i = (\mathbf{b}_i, \mathbf{g}_i)^T$. Para todo $j = 1, \dots, n_i$, assume-se que:

1. $Y_{ij}^{a,m} \perp\!\!\!\perp A_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, \mathbf{b}_i, \mathbf{g}_i$;
2. $Y_{ij}^{a,m} \perp\!\!\!\perp M_{ij} | A_{ij} = a, \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, \mathbf{b}_i, \mathbf{g}_i$;
3. $M_{ij}^a \perp\!\!\!\perp A_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, \mathbf{b}_i, \mathbf{g}_i$;
4. $Y_{ij}^{a,m} \perp\!\!\!\perp M_{ij}^{a*} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, \mathbf{b}_i, \mathbf{g}_i$.

Nesta notação, os índices sobrescritos indicam os níveis da exposição e/ou do mediador que estão sendo considerados enquanto os índices subscritos indicam o indivíduo e a ocasião da medição e $\perp\!\!\!\perp$ representa a independência entre as variáveis. A primeira suposição é atendida se não houver confundimento não medido entre exposição e desfecho na ocasião j dadas as covariáveis e efeitos aleatórios. A segunda suposição é atendida caso não tenha confundimento não medido na relação mediador e desfecho. A terceira suposição é atendida se não houver confundimento não medido na relação exposição e mediador. A quarta e última suposição é atendida se não houver confundimento na relação entre mediador e desfecho afetado pela exposição. As suposições de independência condicionais aos efeitos aleatórios são necessárias para que as derivações dos efeitos diretos e indiretos sejam válidas.

Devido a natureza dos dados longitudinais, também é necessário assumir que não exista confundimento com respeito às variáveis de exposição e mediadora que varie no tempo. O modelo proposto por Bind et al. (2015) supõe que, para todo $j = 1, \dots, n_i - 1$ e para todo $j' > j$, M_{ij} e Y_{ij} não afetam $A_{ij'}$, da mesma forma que A_{ij} e Y_{ij} não afetam $M_{ij'}$.

A derivação dos efeitos naturais direto e indireto pode ser verificada no material suplementar do artigo de Bind et al. (2015). As expressões finais obtidas para a estimativa dos efeitos direto e indireto condicionais às covariáveis e efeitos aleatórios são dadas por:

$$NDE_{cond} = \mathbb{E} \left(Y_{ij}^{a, M_{ij}^{a*}} - Y_{ij}^{a^*, M_{ij}^{a*}} \middle| \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, \mathbf{b}_i, \mathbf{g}_i \right) = (\gamma_1 + g_{1i})(a - a^*) + (\gamma_3 + g_{3i})(a - a^*) [(\beta_0 + b_{0i}) + (\beta_1 + b_{1i})a^* + \boldsymbol{\beta}_c^T \mathbf{c}], \quad (3.19)$$

$$NIE_{cond} = \mathbb{E} \left(Y_i^{a, M_i^a} - Y_i^{a^*, M_i^{a*}} \middle| \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, \mathbf{b}_i, \mathbf{g}_i \right) = (\gamma_2 + g_{2i})(\beta_1 + b_{1i})(a - a^*) + (\gamma_3 + g_{3i})(\beta_1 + b_{1i})a(a - a^*), \quad (3.20)$$

em que os coeficientes β_i e γ_i são estimados através dos modelos de regressão para o mediador e desfecho, respectivamente, a e a^* são os diferentes níveis de exposição no qual se quer verificar a estimativa dos efeitos. Ao integrar os efeitos direto e indireto condicionais aos efeitos aleatórios $\mathbf{u}_i = (\mathbf{b}_i, \mathbf{g}_i)^T$, são obtidas as equações para estimação dos efeitos direto e indireto condicionais apenas às covariáveis, dadas por

$$NDE = \mathbb{E} \left(Y_{ij}^{a, M_{ij}^{a*}} - Y_{ij}^{a^*, M_{ij}^{a*}} \middle| \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c} \right) = \mathbb{E}_{\mathbf{u}} \left[\mathbb{E} \left(Y_{ij}^{a, M_{ij}^{a*}} - Y_{ij}^{a^*, M_{ij}^{a*}} \middle| \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, \mathbf{b}_i, \mathbf{g}_i \right) \middle| \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij}, M_{ij} \right] = (a - a^*) \left(\gamma_1 + \gamma_3 \beta_0 + \sigma_{g_3, b_0} + a^* \gamma_3 \beta_1 + a^* \sigma_{g_3, b_1} + \gamma_3 \boldsymbol{\beta}_c^T \mathbf{c} \right), \quad (3.21)$$

$$NIE = \mathbb{E} \left(Y_i^{a, M_i^a} - Y_i^{a^*, M_i^{a*}} \middle| \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c} \right) = \mathbb{E}_{\mathbf{u}} \left[\mathbb{E} \left(Y_{ij}^{a, M_{ij}^a} - Y_{ij}^{a^*, M_{ij}^{a*}} \middle| \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, \mathbf{b}_i, \mathbf{g}_i \right) \middle| \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij}, M_{ij} \right] = (a - a^*) \{ \gamma_2 \beta_1 + \sigma_{g_2, b_1} + a(\gamma_3 \beta_1 + \sigma_{g_3, b_1}) \}, \quad (3.22)$$

em que a e a^* são os diferentes níveis de exposição no qual se quer verificar a estimativa dos efeitos, σ_{b_i, g_i} são coeficientes da matriz de variância e covariância obtida através dos modelos. O efeito total e a proporção mediada também são definidos sob o escopo longitudinal e correspondem a soma dos efeitos direto e indireto e a razão entre o efeito indireto e a soma do efeito total ($T = \left(\frac{NIE}{NDE + NIE} \right)$), respectivamente.

A covariância entre as duas inclinações aleatórias para o efeito da exposição no mediador e a do mediador no desfecho (σ_{b_1, g_2}) contribuem para a estimativa do efeito

indireto, e é uma importante quantidade a ser considerada na presença de heterogeneidade nas respostas. Em cenários nos quais o produto $\gamma_2\beta_1$ é positivo, uma covariância positiva aumenta as estimativas dos efeitos mediados, enquanto uma covariância negativa diminui os mesmos. Ou seja, efeitos aleatórios correlacionados caracterizam o grau em que os indivíduos que experimentam um efeito de exposição no mediador também exibem um efeito do mediador no desfecho (Bind et al., 2015).

4 Objetivos

4.1 Objetivo Geral

Estimar a porção do efeito da exposição no desfecho que ocorre através do caminho do mediador quando apenas o desfecho se apresenta na forma de dados longitudinais, através da implementação no *software* livre R da abordagem proposta por Bind et al. (2015) e utilização do algoritmo de Imai et al. (2010a) no mesmo *software* através do pacote *mediation* (Tingley et al., 2014).

4.2 Objetivos Específicos

- Explorar, abordar e divulgar os métodos de análise de mediação para dados longitudinais que podem ser utilizados em diversas áreas de estudos epidemiológicos;
- Disponibilizar os códigos de construção e análise do banco de dados, a fim de possibilitar a reprodutibilidade do exemplo de análise de mediação no contexto abordado.

Referências

- Barata, R. B. (1997). Causality and epidemiology. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, 4(1):31–49.
- Baron, R. M. e Kenny, D. A. (1986). The moderator–mediator variable distinction in social psychological research: Conceptual, strategic, and statistical considerations. *Journal of personality and social psychology*, 51(6):1173–1182.
- Bettencourt, C. e Lima, M. (2011). Machado-joseph disease: from first descriptions to new perspectives. *Orphanet journal of rare diseases*, 6(1):35.
- Bhopal, R. S. (2016). *Concepts of epidemiology: integrating the ideas, theories, principles, and methods of epidemiology*. Oxford University Press.
- Bind, M.-A., Vanderweele, T., Coull, B., e Schwartz, J. (2015). Causal mediation analysis for longitudinal data with exogenous exposure. *Biostatistics*, 17(1):122–134.
- Bürk, K., Abele, M., Fetter, M., Dichgans, J., Skalej, M., Laccone, F., Didierjean, O., Brice, A., e Klockgether, T. (1996). Autosomal dominant cerebellar ataxia type i clinical features and mri in families with sca1, sca2 and sca3. *Brain*, 119(5):1497–1505.
- Cortes, T. R., Faerstein, E., e Struchiner, C. J. (2016). Use of causal diagrams in epidemiology: application to a situation with confounding. *Cadernos de saude publica*, 32(8).
- Coutinho, P. e Andrade, C. (1978). Autosomal dominant system degeneration in portuguese families of the azores islands a new genetic disorder involving cerebellar, pyramidal, extrapyramidal and spinal cord motor functions. *Neurology*, 28(7):703–709.
- Cunha-Santos, J., Duarte-Neves, J., Carmona, V., Guarente, L., De Almeida, L. P., e Cavadas, C. (2016). Caloric restriction blocks neuropathology and motor deficits in machado–joseph disease mouse models through sirt1 pathway. *Nature communications*, 7:11445.
- De Mattos, E. P., Musskopf, M. K., Leotti, V. B., Saraiva-Pereira, M. L., e Jardim, L. B. (2019). Genetic risk factors for modulation of age at onset in machado-joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 90(2):203–210.
- Fletcher, R. H., Fletcher, S. W., e Wagner, E. H. (1996). *Epidemiologia clínica: elementos essenciais*. Artes Médicas Porto Alegre RS.

- Hauser, S. e Josephson, S. (2013). *Harrison's neurology in clinical medicine*. McGraw-Hill.
- Holland, P. W. (1986). Statistics and causal inference. *Journal of the American statistical Association*, 81(396):945–960.
- Imai, K., Keele, L., e Tingley, D. (2010a). A general approach to causal mediation analysis. *Psychological methods*, 15(4):309–334.
- Imai, K., Keele, L., e Yamamoto, T. (2010b). Identification, inference and sensitivity analysis for causal mediation effects. *Statistical science*, pages 51–71.
- Jardim, L. B., Hauser, L., Kieling, C., Saute, J. A. M., Xavier, R., Rieder, C. R. M., Monte, T. L., Camey, S., e Torman, V. B. L. (2010). Progression rate of neurological deficits in a 10-year cohort of sca3 patients. *The Cerebellum*, 9(3):419–428.
- Kawaguchi, Y., Okamoto, T., Taniwaki, M., Aizawa, M., Inoue, M., Katayama, S., Kawakami, H., Nakamura, S., Nishimura, M., Akiguchi, I., et al. (1994). Cag expansions in a novel gene for machado-joseph disease at chromosome 14q32. 1. *Nature genetics*, 8(3):221–228.
- Kieling, C., Prestes, P. R., Saraiva-Pereira, M., e Jardim, L. B. (2007). Survival estimates for patients with machado–joseph disease (sca3). *Clinical genetics*, 72(6):543–545.
- Kieling, C., Rieder, C., Silva, A., Saute, J., Cecchin, C., Monte, T., e Jardim, L. (2008). A neurological examination score for the assessment of spinocerebellar ataxia 3 (sca3). *European journal of neurology*, 15(4):371–376.
- Laird, N. M., Ware, J. H., et al. (1982). Random-effects models for longitudinal data. *Biometrics*, 38(4):963–974.
- Luiz, R. R. e Struchiner, C. J. (2002). *Inferência causal em epidemiologia: o modelo de respostas potenciais*. Editora Fiocruz.
- MacKinnon, D. (2012). *Introduction to statistical mediation analysis*. Routledge.
- Milanez, P. A. O., Escobar, A. N. O., Salvador, G. G., Delfraro, J. A. S., e de Oliveira, P. M. P. (2016). Doença de machado-joseph. *Biosaúde*, 11(2):75–81.
- Nakano, K. K., Dawson, D. M., e Spence, A. (1972). Machado disease a hereditary ataxia in portuguese emigrants to massachusetts. *Neurology*, 22(1):49–49.
- Otte, R. (1981). A critique of suppes' theory of probabilistic causality. *Synthese*, pages 167–189.
- Pinheiro, J., Bates, B., DebRoy, S., e Sarkar, D. (2012). nlme: Fit and compare gaussian linear and nonlinear mixed-effects models.

- Robins, J. (1986). A new approach to causal inference in mortality studies with a sustained exposure period—application to control of the healthy worker survivor effect. *Mathematical modelling*, 7(9-12):1393–1512.
- Robins, J. M. (1987). Addendum to “a new approach to causal inference in mortality studies with a sustained exposure period—application to control of the healthy worker survivor effect”. *Computers & Mathematics with Applications*, 14(9-12):923–945.
- Romanul, F. C., Fowler, H. L., Radvany, J., Feldman, R. G., e Feingold, M. (1977). Azorean disease of the nervous system. *New England Journal of Medicine*, 296(26):1505–1508.
- Rosen, D. A. (1978). In defense of a probabilistic theory of causality. *Philosophy of Science*, 45(4):604–613.
- Rosenberg, R. N., Nyhan, W. L., Bay, C., e SHORE, P. (1976). Autosomal dominant striatonigral degeneration a clinical, pathologic, and biochemical study of a new genetic disorder. *Neurology*, 26(8):703–714.
- Ross, L. N. e Woodward, J. F. (2016). Koch’s postulates: An interventionist perspective. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 59:35–46.
- Rothman, K., Greenland, S., e Lash, T. (2016). *Epidemiologia Moderna-3ª Edição*. Artmed Editora.
- Rothman, K. J. (1976). CAUSES. *American Journal of Epidemiology*, 104(6):587–592.
- Rothman, K. J. e Greenland, S. (2005). Causation and causal inference in epidemiology. *American journal of public health*, 95(S1):S144–S150.
- Rubin, D. B. (1974). Estimating causal effects of treatments in randomized and nonrandomized studies. *Journal of educational Psychology*, 66(5):688 – 701.
- Rubin, D. B. (1978). Bayesian inference for causal effects: The role of randomization. *The Annals of statistics*, pages 34–58.
- Saute, J. A. M., Donis, K. C., Serrano-Munuera, C., Genis, D., Ramirez, L. T., Mazzetti, P., Pérez, L. V., Latorre, P., Sequeiros, J., Matilla-Dueñas, A., et al. (2012). Ataxia rating scales—psychometric profiles, natural history and their application in clinical trials. *The Cerebellum*, 11(2):488–504.
- Schmitz-Hübsch, T., Du Montcel, S. T., Baliko, L., Berciano, J., Boesch, S., Depondt, C., Giunti, P., Globas, C., Infante, J., Kang, J.-S., et al. (2006). Scale for the assessment and rating of ataxia: development of a new clinical scale. *Neurology*, 66(11):1717–1720.

- Schoch, B., Regel, J. P., Frings, M., Gerwig, M., Maschke, M., Neuhäuser, M., e Timmann, D. (2007). Reliability and validity of icars in focal cerebellar lesions. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 22(15):2162–2169.
- SIMERS (2016). Rio Grande do Sul é campeão mundial no número de pessoas com a Doença de Machado-Joseph.
- Tingley, D., Yamamoto, T., Hirose, K., Keele, L., e Imai, K. (2014). Mediation: R package for causal mediation analysis.
- Twisk, J. W. (2013). *Applied longitudinal data analysis for epidemiology: a practical guide*. cambridge university press.
- Valeri, L. e VanderWeele, T. J. (2013). Mediation analysis allowing for exposure–mediator interactions and causal interpretation: theoretical assumptions and implementation with sas and spss macros. *Psychological methods*, 18(2):137–150.
- VanderWeele, T. (2015). *Explanation in causal inference: methods for mediation and interaction*. Oxford University Press.
- Verbeke, G. e Molenberghs, G. (2009). *Linear mixed models for longitudinal data*. Springer Science & Business Media.
- Woods, B. T. e Schaumburg, H. H. (1972). Nigro-spino-dentatal degeneration with nuclear ophthalmoplegia: a unique and partially treatable clinico-pathological entity. *Journal of the neurological sciences*, 17(2):149–166.

5 Artigo

Análise de Mediação em Epidemiologia: Métodos de Estimação de Efeitos em Estudos Longitudinais

Leticia Menegotto¹

Vanessa Bielefeldt Leotti¹

Rodrigo Citton Padilha dos Reis¹

Laura Bannach Jardim²

¹ Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

² Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Correspondência

Leticia Menegotto

Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos, 2400, 2º andar

CEP 90035-003, Porto Alegre, Rio Grande do Sul

leticia.menegotto@gmail.com

Este artigo será submetido ao *International Journal of Epidemiology*.

Resumo

Em epidemiologia, a utilização de estudos longitudinais tem como principal vantagem a possibilidade de estudo do comportamento individual de um determinado desfecho ao longo do tempo. Este comportamento individual do desfecho pode estar relacionado ao desenvolvimento individual de outras variáveis, tornando natural a existência de caminhos causais em dados longitudinais. Isso permite o desenvolvimento de métodos para análise de mediação neste tipo de estudo, sendo possível realizar a estimação dos efeitos diretos e indiretos presentes nos caminhos causais. Neste artigo são estudadas abordagens exata e estocástica, ambas no contexto de análise de mediação para dados longitudinais considerando o desfecho medido repetidamente no tempo, enquanto as variáveis de exposição e mediadora são medidas uma única vez, no contexto de uma doença neuropatológica genética. Além disso, foi revisada a definição de desfechos potenciais para o cálculo dos efeitos causais de mediação. Por fim, como forma de ilustrar a aplicação das abordagens, é apresentado um exemplo de progressão de manifestações neurológicas em pacientes de Ataxia Espinocerebelar tipo 3. Os resultados obtidos são muito similares, sendo a abordagem estocástica considerada mais prática por já estar implementada em *software*.

Palavras-chave: Análise de Mediação, Dados Longitudinais, Abordagem Exata, Abordagem Estocástica.

Abstract

In epidemiology, the use of longitudinal designs has as its main advantage the possibility of studying the individual behavior of a given outcome over time. This individual behavior of the outcome may be related to the individual development of other variables, making natural the existence of causal paths in longitudinal data. This allows the development of methods for mediation analysis in this type of study, making it possible to estimate the direct and indirect effects present in the causal paths. In this article, exact and stochastic approaches are studied, both in the context of mediation analysis for longitudinal data considering the outcome measured repeatedly over time, while the exposure and mediator variables are measured only once, in the context of a genetic neuropathological disease. In addition, the definition of potential outcomes for the calculation of causal mediation effects was revised. Finally, to illustrate the application of the approaches, an example of progression of neurological manifestations in patients with type 3 spinocerebellar ataxia is presented. The results obtained are remarkably similar, the stochastic approach being considered more practical because it is already implemented in software.

Keywords: Mediation Analysis, Longitudinal Data, Exact Approach, Stochastic Approach.

Introdução

A análise de mediação é uma abordagem útil para investigar caminhos causais em estudos epidemiológicos e mede que porção do efeito de uma exposição sobre o desfecho opera através de uma variável intermediária em particular (1,2). Ou seja, a análise de mediação particiona o efeito de uma variável de exposição no desfecho em um efeito indireto via uma variável mediadora (intermediária, ou simplesmente mediador) e um efeito direto via outros mecanismos (3). Mesmo fora do contexto de análise de mediação, a utilização de estudo longitudinal tem como principal vantagem – quando comparado a um estudo transversal – a possibilidade de estudo do desenvolvimento individual de um determinado desfecho ao longo do tempo (4) que pode estar relacionado ao desenvolvimento individual de outras variáveis, tornando natural a existência de caminhos em estudos longitudinais. Isso permite a elaboração de métodos para análise de mediação em dados longitudinais, sendo possível realizar a estimação dos efeitos diretos e indiretos presentes nos caminhos causais (2).

É possível realizar análise de mediação com dados longitudinais utilizando diferentes abordagens (5–7). A abordagem proposta por Bind et al. (2) é baseada nos modelos mistos generalizados para dados longitudinais e fornece as definições necessárias para que seja possível o cálculo dos efeitos direto e indireto utilizando a abordagem de desfechos potenciais. Essa abordagem permite que exista interação entre exposição e mediador, além de definir os efeitos utilizando comparações em desfechos potenciais e considerar os pressupostos necessários para que as estimativas tenham interpretação causal (2). A macro em SAS para utilização da abordagem é disponibilizada para os usuários deste *software*.

Imai et al. (8) apresentam um modelo que possui uma estrutura única para definição, identificação, estimativa e análise de sensibilidade dos efeitos de mediação, sem que seja necessária a especificação a alguma forma paramétrica. O modelo é definido levando em consideração a teoria de desfechos potenciais da inferência causal, possibilitando que se tenha uma definição formal dos efeitos causais de mediação. O algoritmo geral de estimação foi desenvolvido e implementado no pacote *mediation* do *software* R e pode ser aplicado em qualquer modelo estatístico.

Existe uma lacuna na literatura no que diz respeito a disponibilização de materiais que ilustrem a aplicação dos métodos de análise de mediação disponíveis em *softwares* livres, evidenciando as interpretações de resultados e comparação dos mesmos. Neste contexto, o objetivo do estudo é revisar a abordagem de desfechos potenciais para a definição de efeitos causais de mediação, descrever as duas abordagens de análise de mediação para dados longitudinais detalhando os recursos computacionais utilizando o *software* livre R e ilustrar a aplicação dos métodos no contexto de uma doença neuropatológica genética.

Desfechos Potenciais e Análise de Mediação

A notação de desfechos potenciais, ou abordagem contrafactual na literatura estatística, foi empregada na definição de efeitos causais pela primeira vez por Neyman (9) no contexto de experimentos completamente casualizados. Posteriormente a abordagem foi estendida por Rubin (10) para estudos observacionais. A noção de causa que opera em um estudo observacional e em um experimento é a mesma, o que difere é o grau de controle que o experimentador tem sobre os fenômenos que estão sendo estudados.

Considere que o interesse seja em avaliar o efeito de uma variável de exposição A em uma variável desfecho Y . Na abordagem de desfechos potenciais, Y^a denota o desfecho que teria ocorrido se A tivesse sido especificado como a . No caso em que a exposição é uma variável binária, existem dois desfechos potenciais para cada indivíduo, Y^0 e Y^1 . Se o indivíduo fosse exposto ao nível $A = 0$ (grupo controle, ausência de tratamento ou não-exposto), então Y^0 seria observado e não se saberia o valor de Y^1 . De forma análoga, se o indivíduo fosse exposto ao nível $A = 1$ (grupo tratamento, presença de tratamento ou exposto), então Y^1 seria observado e não se saberia o valor de Y^0 . Em verdade, as duas últimas afirmações são resultantes da suposição de consistência (11), que, de maneira mais formal, afirma que se um indivíduo fosse exposto ao nível $A = a$, então o desfecho observado Y é igual ao desfecho potencial Y^a . Anterior a qualquer exposição (ou alocação a um grupo de tratamento) ambos os desfechos são possíveis (potenciais) de serem observados. Pode-se definir o efeito causal individual como a diferença do par de desfechos potenciais $Y^1 - Y^0$. Pode-se dizer que a exposição teve um efeito no desfecho para este indivíduo se $Y^1 - Y^0$ é diferente de zero. É impossível observar o par de desfechos potenciais Y^1 e Y^0 simultaneamente no mesmo indivíduo e conseqüentemente, observar o efeito causal individual, sendo este chamado de problema fundamental da inferência causal (12).

A solução estatística para este problema substitui o efeito causal impossível de observar em um indivíduo específico pelo efeito causal médio na população, possível de ser estimado, $T = \mathbb{E}(Y^1 - Y^0)$ (12). Para que o efeito causal médio possa ser estimado é necessário assumir que os desfechos potenciais são comparáveis entre os grupos de exposição. No caso de um experimento aleatorizado, esta suposição é razoável devido ao fato que a atribuição dos indivíduos aos grupos de tratamento se deve ao acaso. Já em um estudo observacional, esta suposição não é realista, mas ela pode ser adaptada para que dentro de um mesmo estrato definido por um conjunto de covariáveis mensuradas C , os diferentes grupos de exposição sejam comparáveis com respeito aos seus desfechos potenciais. Esta suposição é conhecida na literatura como suposição de intercambiabilidade ou ausência de confundimento não observado na relação entre A e Y .

Estatisticamente tem-se que, dentro de um estrato definido por C , os desfechos potenciais Y^a são independentes do nível atribuído da variável de exposição. As suposições de consistência e intercambiabilidade condicional resultam no seguinte resultado do efeito

causal médio populacional:

$$T = \mathbb{E}(Y^1 - Y^0) = \mathbb{E}(\mathbb{E}(Y|A = 1, C = c) - \mathbb{E}(Y|A = 0, C = c)).$$

Tal resultado é interpretado como sendo de identificação, onde, a partir da definição de desfechos potenciais que não são todos observáveis, obtém-se uma quantidade que depende apenas de dados observados. Assim, esse resultado mostra como informações sobre diferentes indivíduos que podem ser observados podem ser usadas para obter conhecimento sobre T . Uma alternativa à estratificação da população é controlar em covariáveis observadas C através de um modelo de regressão, tal como $\mathbb{E}(Y|A = a, C = c) = \alpha_0 + \alpha_1 a + \alpha'_2 c$. Sob a suposição de intercambiabilidade condicional em c , o efeito causal médio é dado por $T = \mathbb{E}(\mathbb{E}(Y|A = 1, C = c) - \mathbb{E}(Y|A = 0, C = c)) = \mathbb{E}((\alpha_0 + \alpha_1 1 + \alpha'_2 c) - (\alpha_0 + \alpha_1 0 + \alpha'_2 c)) = \alpha_1$ (1). Ou seja, se o modelo de regressão estiver corretamente especificado e a suposição de intercambiabilidade condicional for válida, então o coeficiente de regressão da variável de exposição, α_1 , pode ser interpretado como o efeito causal médio.

Como anteriormente, denota-se Y^a como o desfecho potencial de um indivíduo se a exposição A fosse especificada em a . Da mesma forma, M^a representa o valor potencial de uma variável intermediária (mediadora) M se a exposição A fosse especificada em a . Ainda, denota-se por $Y^{a,m}$ o valor potencial para Y se A fosse especificada em a e M fosse especificado em m (1). Considere a^* um outro nível da exposição A que se deseja comparar com a . O efeito natural direto (NDE) individual da exposição A no desfecho Y é formalmente definido como $Y^{a,M^{a^*}} - Y^{a^*,M^{a^*}}$ e expressa quanto do efeito da exposição no desfecho permaneceria caso o caminho que passa pelo mediador fosse desativado. Analogamente, tem-se que o efeito natural indireto (NIE) individual da exposição A em Y é definido como $Y^{a,M^a} - Y^{a,M^{a^*}}$ e expressa o efeito da exposição no desfecho quando se altera o nível atribuído ao mediador (1). Também pode-se considerar os valores médios dos efeitos natural direto e indireto, na população, $\mathbb{E}(Y^{a,M^{a^*}} - Y^{a^*,M^{a^*}})$ e $\mathbb{E}(Y^{a,M^a} - Y^{a,M^{a^*}})$, ou em um estrato c , $\mathbb{E}(Y^{a,M^{a^*}} - Y^{a^*,M^{a^*}}|C = c)$ e $\mathbb{E}(Y^{a,M^a} - Y^{a,M^{a^*}}|C = c)$.

De forma análoga ao efeito causal médio, para a identificação dos efeitos causais de mediação (natural direto e indireto), deve-se realizar suposições de ausência de confundimento não medido:

- Suposição A1: Não há confundimento não medido na relação A - Y .
- Suposição A2: Não há confundimento não medido na relação M - Y .
- Suposição A3: Não deve haver confundimento não medido na relação A - M .
- Suposição A4: Não deve haver nenhum confundidor na relação M - Y que seja afetado por A .

Se as suposições (A1) a (A4) valem, então o efeito natural direto médio condicional em C é identificável e dado por

$$\mathbb{E} \left(Y^{a, M^{a^*}} - Y^{a^*, M^{a^*}} \middle| C = c \right) = \sum_m \{ \mathbb{E}(Y|a, m, C = c) - \mathbb{E}(Y|a^*, m, C = c) \} \mathbb{P}(m|a^*, C = c),$$

enquanto o efeito natural indireto médio condicional em C é identificável e dado por

$$\mathbb{E} \left(Y^{a, M^a} - Y^{a, M^{a^*}} \middle| C = c \right) = \sum_m \mathbb{E}(Y|a, m, C = c) \{ \mathbb{P}(m|a, C = c) - \mathbb{P}(m|a^*, C = c) \}.$$

Deste resultado, os efeitos naturais direto e indireto para a população são obtidos tomando-se o valor esperado com respeito a distribuição das covariáveis C . Uma abordagem muito comum é especificar um modelo de regressão para $\mathbb{E}(Y|A = a, M = m, C = c)$. A distribuição do mediador $\mathbb{P}(M|A = a, C = c)$ é também especificada por uma estrutura de regressão para a média e uma distribuição para a variável mediadora.

Por fim, o Efeito Total (T) é dado pela soma dos efeitos NIE e NDE. Para que as estimativas dos efeitos tenham interpretação causal, é necessário que haja controle para as variáveis de confusão, além de serem necessárias as suposições apresentadas anteriormente (1). A fim de avaliar quanto do efeito total opera através do mediador, por vezes utiliza-se a proporção mediada, definida como $PM = \frac{NIE}{T}$. No entanto, a medida possui algumas limitações. Por exemplo, quando os efeitos naturais direto e indireto têm direções opostas e magnitude parecida, a proporção pode resultar em um valor muito maior do que 100% e não fornecer informações que tenham sentido para a análise. Desta forma, a medida deve ser utilizada com cautela (1,4).

Análise de Mediação Longitudinal: Abordagem Exata

Estudos longitudinais são definidos como estudos onde a variável desfecho é medida repetidamente, isto é, a variável resposta é medida em cada indivíduo em diversas ocasiões (13). Em estudos longitudinais, as observações de um indivíduo ao longo do tempo não são independentes entre si. Devido a isso, faz-se necessária a aplicação de técnicas estatísticas que consideram o fato de que as observações intraindivíduos são correlacionadas (13).

De acordo com Verbeke e Molenberghs (14), o modelo linear de efeito mistos é dado por $Y_i = X_i\beta + Z_ib_i + \varepsilon_i$, onde Y_i é o vetor de todas as medidas repetidas do i -ésimo indivíduo, $i = 1, \dots, N$, agrupando todas as medidas Y_{ij} em cada ocasião j ,

$j = 1, \dots, n_i$, sendo N o número de indivíduos, n_i o número de ocasiões em que o i -ésimo indivíduo foi avaliado, X_i é uma matriz ($n_i \times p$) de covariáveis conhecidas correspondentes aos efeitos fixos, β é um vetor p -dimensional de efeitos fixos do modelo, Z_i é a matriz ($n_i \times q$) de covariáveis correspondente à parte aleatória do modelo, b_i é o vetor de efeitos aleatórios específicos de cada indivíduo e ε_i são os componentes residuais, independentes e normalmente distribuídos com média zero e matriz de covariâncias dada por $\sigma^2 I_{n_i}$, onde I_{n_i} é a matriz identidade n_i -dimensional. O modelo pode ser estendido ao se definir a matriz de covariância Σ_i , de dimensões ($n_i \times n_i$) que depende de i apenas através de sua dimensão, ou seja, o conjunto desconhecido de parâmetros da matriz não depende de i e permite que o modelo apresente erros correlacionados e heterocedasticidade (14,15).

Bind et al. (2) propuseram uma abordagem para análise de mediação em dados longitudinais, permitindo a estimação dos efeitos diretos e indiretos presentes nos caminhos causais. A abordagem proposta é baseada nos modelos mistos generalizados para dados longitudinais e fornece as definições necessárias para que seja possível o cálculo das estimativas dos efeitos direto e indireto utilizando a abordagem de desfechos potenciais. Neste trabalho será utilizado apenas o caso de mediadores e desfechos contínuos e com distribuição normal, podendo-se assim, utilizar os modelos mistos lineares.

Através do método proposto (2), são utilizadas diferenças em desfechos potenciais bivariados e consideram-se os modelos lineares mistos tanto para o mediador (M_{ij}) quanto para o desfecho (Y_{ij}) observados no indivíduo i na ocasião j quando se tem mediador e desfecho longitudinais. Desta forma, o modelo para o mediador possui intercepto e o coeficiente da exposição variando para os indivíduos, ou seja, aleatórios, e é dado por $\mathbb{E}[M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a, \mathbf{b}_i] = (\beta_0 + b_{0i}) + (\beta_1 + b_{1i}) a + \beta_c^T \mathbf{c}$. O modelo para o desfecho tem intercepto e coeficiente de exposição aleatórios, o mediador e a interação entre ambos, e é dado por $\mathbb{E}[Y_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a, M_{ij} = m, \mathbf{g}_i] = (\gamma_0 + g_{0i}) + (\gamma_1 + g_{1i}) a + (\gamma_2 + g_{2i}) m + (\gamma_3 + g_{3i}) am + \gamma_c^T \mathbf{c}$ (2).

Os efeitos diretos e indiretos são identificados caso algumas suposições sejam atendidas – essas suposições são semelhantes às citadas anteriormente, mas para o caso longitudinal são consideradas as ocasiões de medição, bem como a condicionalidade aos efeitos aleatórios (2). O NDE é dado pela equação

$$\begin{aligned} NDE &= \mathbb{E} \left(Y_{ij}^{a, M_{ij}^{a^*}} - Y_{ij}^{a^*, M_{ij}^{a^*}} \middle| \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c} \right) = \\ &= \mathbb{E}_u \left[\mathbb{E} \left(Y_{ij}^{a, M_{ij}^{a^*}} - Y_{ij}^{a^*, M_{ij}^{a^*}} \middle| \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, \mathbf{b}_i, \mathbf{g}_i \right) \middle| \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij}, M_{ij} \right] = \\ &= (a - a^*) \left(\gamma_1 + \gamma_3 \beta_0 + \sigma_{g_3, b_0} + a^* \gamma_3 \beta_1 + a^* \sigma_{g_3, b_1} + \gamma_3 \beta_c^T \mathbf{c} \right). \end{aligned}$$

O NIE é dado pela equação

$$\begin{aligned} NIE &= \mathbb{E} \left(Y_i^{a, M_i^a} - Y_i^{a, M_i^{a^*}} \mid \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c} \right) = \\ &= \mathbb{E}_{\mathbf{u}} \left[\mathbb{E} \left(Y_{ij}^{a, M_{ij}^a} - Y_{ij}^{a, M_{ij}^{a^*}} \mid \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, \mathbf{b}_i, \mathbf{g}_i \right) \mid \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij}, M_{ij} \right] = \\ &= (a - a^*) \{ \gamma_2 \beta_1 + \sigma_{g_2, b_1} + a (\gamma_3 \beta_1 + \sigma_{g_3, b_1}) \}. \end{aligned}$$

Os coeficientes β_i e γ_i são obtidos através dos modelos de regressão para o mediador e desfecho, respectivamente, a e a^* são os diferentes níveis de exposição nos quais se quer verificar a estimativa dos efeitos. \mathbf{C}_{ij} é o vetor de covariáveis conhecidas para o indivíduo i na ocasião j , A_{ij} é a exposição referente ao indivíduo i na ocasião j . Tem-se que $\mathbf{u}_i = (\mathbf{b}_i, \mathbf{g}_i)^T = (b_{0i}, b_{1i}, g_{0i}, g_{1i}, g_{2i}, g_{3i})^T$ é o vetor de efeitos aleatórios com média zero e matriz de covariância dada por

$$Cov(\mathbf{u}_i) = \begin{pmatrix} \sigma_{b_0}^2 & \sigma_{b_0, b_1} & \sigma_{b_0, g_0} & \sigma_{b_0, g_1} & \sigma_{b_0, g_2} & \sigma_{b_0, g_3} \\ \sigma_{b_1, b_0} & \sigma_{b_1}^2 & \sigma_{b_1, g_0} & \sigma_{b_1, g_1} & \sigma_{b_1, g_2} & \sigma_{b_1, g_3} \\ \sigma_{g_0, b_0} & \sigma_{g_0, b_1} & \sigma_{g_0}^2 & \sigma_{g_0, g_1} & \sigma_{g_0, g_2} & \sigma_{g_0, g_3} \\ \sigma_{g_1, b_0} & \sigma_{g_1, b_1} & \sigma_{g_1, g_0} & \sigma_{g_1}^2 & \sigma_{g_1, g_2} & \sigma_{g_1, g_3} \\ \sigma_{g_2, b_0} & \sigma_{g_2, b_1} & \sigma_{g_2, g_0} & \sigma_{g_2, g_1} & \sigma_{g_2}^2 & \sigma_{g_2, g_3} \\ \sigma_{g_3, b_0} & \sigma_{g_3, b_1} & \sigma_{g_3, g_0} & \sigma_{g_3, g_1} & \sigma_{g_3, g_2} & \sigma_{g_3}^2 \end{pmatrix}$$

possível de ser estimada dado o fato de que os coeficientes das equações são estimados conjuntamente.

O efeito total e a proporção mediada também são definidos sob o escopo longitudinal e correspondem a soma dos efeitos direto e indireto e a razão entre o efeito indireto e a soma do efeito total ($PM = \left(\frac{NIE}{NDE + NIE} \right)$), respectivamente. A fim de determinar o grau de incerteza das estimativas obtidas, calculam-se os intervalos de confiança. Estes podem ser obtidos através do método delta ou a partir de simulações *bootstrap* (2).

Análise de Mediação Longitudinal: Aproximação Estocástica

O modelo de Imai et al. (8) é definido levando em consideração a teoria de desfechos potenciais da inferência causal, possibilitando que se tenha uma definição formal dos efeitos causais de mediação. Deve-se considerar que nos casos em que não se tem desfecho ou mediador contínuos, não se tem garantia de uma forma analiticamente fechada, mas os efeitos de mediação podem ser aproximados por simulações de Monte Carlo (8).

O algoritmo geral de estimação de Imai et al. (8), desenvolvido e implementado no pacote *mediation* do *software* R, pode ser aplicado em diversos modelos estatísticos, como por exemplo modelos lineares, modelos lineares generalizados, probito e logito ordenados, modelos de sobrevivência, entre outros. O algoritmo proposto é representado da seguinte maneira:

1. Ajustam-se os modelos e distribuição de probabilidade para as variáveis desfecho e mediadora;
2. Realiza-se a predição da variável mediadora para os valores da exposição (M^{a^*}, M^a) ;
3. Realiza-se a predição da variável desfecho especificando $A = a^*$ e $M = M^a$, e $A = a^*$ e $M = M^{a^*}$;
4. Calculam-se as diferenças entre os desfechos e estimam-se os efeitos causais de mediação;
5. Realizam-se as simulações de Monte Carlo e bootstrap para estimar a incerteza e calcular os intervalos de confiança.

Para o caso longitudinal, os modelos ajustados para as variáveis desfecho e mediadora (passo 1 do algoritmo) devem considerar a natureza dos dados, levando em conta a ocasião em que ocorreu a medição juntamente com o indivíduo que faz parte da amostra estudada. Desta forma, se faz necessário o uso de modelos que melhor se adequem aos dados estudados, sendo o modelo definido por Verbeke e Molenberghs (14) uma das opções para ajuste dos dados. No *software* R, isso é possível através da utilização da função *lmer* do pacote *lme4* (15).

Exemplo

O exemplo considerará o contexto da Doença de Machado-Joseph (DMJ), uma doença genética que ocorre devido uma expansão de trinucleotídeos CAG no gene ATXN3, que leva à degeneração de múltiplos sistemas neurológicos. A doença é hereditária e dominante, e em determinado momento da vida iniciam os sintomas seguidos da progressão da doença. Sabe-se que a idade de início dos sintomas (AO, do inglês *age at onset*) está associada com o tamanho da expansão CAG (16), sendo que quanto maior o CAG mais cedo o indivíduo começa a apresentar os sintomas. O comprometimento da doença é avaliado através de escalas como a NESSCA (do inglês, *Neurological Examination Score for Spinocerebellar Ataxia*), que avalia várias manifestações neurológicas que ocorrem no indivíduo portador da MJD, e quanto maior a pontuação do paciente, pior a sua situação em relação à progressão da doença (17). Sabe-se também que quanto maior a replicação do CAG, mais rápida é a progressão da doença (18). A escolha deste contexto clínico para exemplificação da aplicabilidade dos métodos vem ao encontro com o fato da DMJ – assim como outras doenças neurodegenerativas – não ter cura, mas apenas tratamento para suavização dos sintomas que ocorrem nos pacientes acometidos pela doença. Neste caso, a análise de mediação pode ser uma alternativa para avaliação dos caminhos existentes entre a exposição e o desfecho da doença, quantificando o efeito direto, que é inevitável dada a

herdabilidade do CAG, e mensurando o máximo impacto que intervenções poderiam ter com o efeito indireto.

A fim de aplicar e verificar os resultados obtidos a partir das abordagens anteriormente apresentadas (1,2,8), foi realizada a simulação de um banco de dados com 10000 indivíduos portadores da DMJ, considerando o tamanho da replicação do CAG como exposição, AO como mediadora e NESSCA como desfecho longitudinal apresentando três medidas no tempo para cada indivíduo da amostra, além de considerar a duração da doença em cada avaliação do desfecho como covariável na análise (representada pela variável DURATION). No diagrama causal da Figura 4 pode-se observar as relações das variáveis envolvidas na análise. Utilizou-se um conjunto de dados simulado a fim de possibilitar a reprodutibilidade do exemplo através da disponibilização destes dados e para que se tivesse um grande número de observações que permitisse uma comparação empírica entre os métodos aplicados menos sensível a flutuações amostrais.

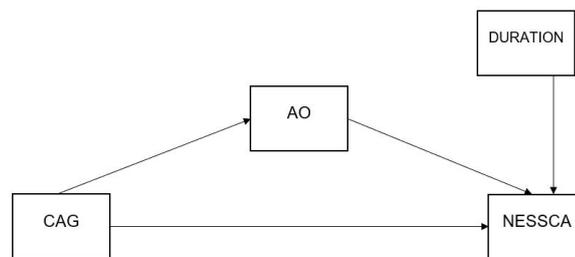


Figura 4 – Diagrama Causal.

Na Tabela 1 pode-se verificar as características das variáveis envolvidas na análise. A média da idade de início dos sintomas é de cerca de 34 anos, enquanto a duração média da doença é de 5 anos. O tamanho médio da repetição CAG é 74 e a progressão média registrada com a escala NESSCA é de cerca de 11 pontos.

Tabela 1 – Características da amostra analisada - *baseline*

	Média (dp)
Idade de Início dos Sintomas (anos)	33,87 (9,83)
Duração da doença (anos)	5 (1)
CAG (repetições)	74,44 (2,59)
NESSCA	11,37 (6,17)

O passo a passo da simulação do banco de dados e aplicação dos métodos utilizando o *software* estatístico R (versão 3.6.0) está apresentado no material suplementar. Os valores utilizados como parâmetros para simulação dos dados foram obtidos através dos ajustes dos modelos aos dados de uma coorte de indivíduos acompanhada por um hospital da região sul do Brasil (19).

Através da Figura 5 é possível verificar o comportamento do desfecho de acordo com o valor da variável de exposição – CAG – e o modelo real simulado. As linhas pontilhadas representam a progressão da doença nos indivíduos da amostra, enquanto a linha sólida representa as progressões para o modelo real simulado. Pode-se notar que o valor da escala de progressão aumenta com o passar do tempo e que valores maiores de NESSCA são observados nos indivíduos que possuem replicação do CAG maior.

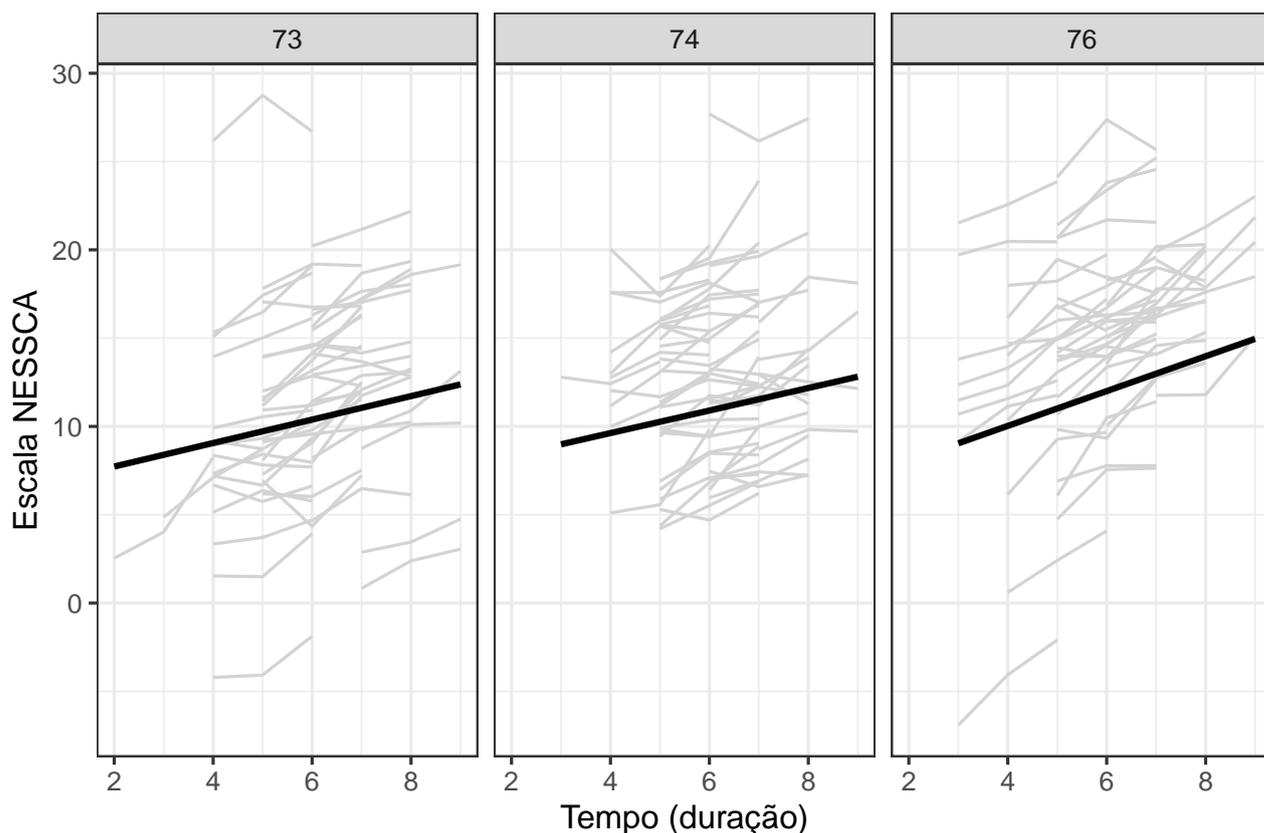


Figura 5 – Perfis da amostra e ajuste médio do modelo por replicação do CAG. Os valores da exposição apresentados foram escolhidos de acordo com os quartis da variável na amostra ($CAG = 73, 74, 76$)

Para aplicação do método proposto por Bind et al. (2), algumas adaptações no formato do banco de dados são necessárias. Uma descrição geral dos passos está na sequência, e detalhes computacionais adicionais estão no material suplementar.

1. Deve-se fazer um banco onde todas as medidas do mesmo sujeito para o desfecho fiquem na mesma coluna, e o mesmo para covariáveis que variam com as ocasiões de medição, mas repetindo-se os valores da exposição e mediadora – no caso do exemplo, totalizando 30000 observações;

2. Deve-se agregar ao final do banco obtido no passo 1 mais uma linha para cada indivíduo, onde na mesma coluna que antes havia sido colocado o desfecho, agora será colocada a variável mediadora; na coluna da exposição, deve-se repetir o valor dela para cada indivíduo - totalizando 40000 observações no banco;
3. Neste trabalho, nomeou-se a coluna que recebeu o desfecho e a mediadora de z_var ; a coluna com apenas a variável mediadora de m_var ; a coluna com apenas a variável exposição de a_var ;
4. Também foram criadas as variáveis indicadoras sy , sm e dv . Quando o valor de z_var se referir ao desfecho, sy receberá valor 1, sm receberá valor 0 e dv categorizado como y ; da mesma forma, quando z_var se referir ao mediador, sy receberá valor 0, sm receberá valor 1 e dv será categorizado como m .

No Quadro 1 é possível visualizar como foi realizado o ajuste do modelo necessário para aplicação desta abordagem no *software* R. Para ajuste do modelo linear misto na abordagem exata, é utilizada a função *lme* do pacote *nlme* (20) por ser mais generalizado e permitir que o modelo apresente erros correlacionados e heterocedasticidade (14). Após o ajuste, a fim de calcular os efeitos causais de mediação através da abordagem exata, os coeficientes ajustados são extraídos do modelo e substituídos nas equações de cálculo dos efeitos apresentadas anteriormente (ver material suplementar). Para o cálculo dos intervalos de confiança das estimativas, foi utilizado o método de *bootstrap*, diferentemente do método delta utilizado no artigo de Bind et al (2). Maiores detalhes estão disponíveis no material suplementar.

A abordagem estocástica é realizada através do pacote *mediation* (8). Para aplicação deste método, se faz necessária a utilização do banco do passo 1 explicado anteriormente formado pelas observações das variáveis desfecho (agora denotada por y_i), mediadora, exposição e covariável (denotada por c_i), bem como a variável de identificação do sujeito. Para utilizar a função *mediate* na estimação dos efeitos de mediação, criam-se dois modelos de regressão, um para o desfecho e outro para o mediador, conforme Tabela 1. Importante salientar que, para a construção do modelo de regressão para o mediador, é utilizado um terceiro banco de dados que possui uma linha de informação por indivíduo com os valores do mediador e da exposição. Para o modelo do desfecho, foi utilizada a função *lmer* do pacote *lme4* (15) a fim de construir um modelo linear misto para ajustar a progressão da NESSCA e a função *lm* para ajuste de uma regressão linear simples entre mediador e exposição. Após a criação dos dois modelos, utiliza-se a função *mediate*, especificando os modelos criados separadamente nos argumentos da função.

Os resultados obtidos em ambos os métodos podem ser verificados na Tabela 2. Através do método proposto por Bind (2), tem-se que o efeito do CAG na progressão da DMJ caso o caminho existente entre CAG e a idade de início dos sintomas mediador fosse

Quadro 1 – Ajuste dos modelos lineares mistos no *software R*.

Abordagem	Código
Estocástica	<pre> model.Y<-lmer(yi ~ a_var*ci*m_var + (ci id) , data=db.long, control = lmerControl(optimizer="Nelder_Mead")) model.M <- lm(m_var ~ a_var, data = db.long2) med <- mediate(model.m = model.M, model.y = model.Y, treat = "a_var", mediator = "m_var", control.value = a.star, treat.value = a, sims = 1000,robustSE = TRUE) </pre>
Exata	<pre> mod1 <- lme(z_var ~ -1 + sm + sm:a_var + sy + sy:ci + sy:a_var + sy:m_var + sy:m_var:a_var + sy:ci:a_var + sy:ci:m_var + sy:ci:a_var:m_var , random = list(id = ~ -1 + sy + sy:ci), weights = varIdent(form = ~ 1 dv), control = lmeControl(opt = "optim"), data = db.long3) fixedcoef <- mod1\$coefficients\$fixed gamma1 <- fixedcoef["a_var:sy"] gamma2 <- fixedcoef["sy:m_var"] gamma5 <- fixedcoef["a_var:sy:m_var"] gamma6 <- fixedcoef["a_var:sy:ci"] gamma7 <- fixedcoef["sy:ci:m_var"] gamma8 <- fixedcoef["a_var:sy:ci:m_var"] beta0 <- fixedcoef["sm"] beta1 <- fixedcoef["sm:a_var"] NDE <- mean(gamma1 + gamma5 * (beta0 + a.star*beta1) + gamma6 * db.long\$ci + gamma8 * (beta0 + a.star*beta1) * db.long\$ci) NIE <- mean(gamma2*beta1 + a*gamma5*beta1 + gamma7*beta1*db.long\$ci + a*gamma8*beta1*db.long\$ci) TE <- NDE + NIE PM <- NIE / TE </pre>

desativado (NDE), é de 0,1959. Já o efeito do indireto do CAG na progressão da doença quando se altera o nível da idade de início dos sintomas (NIE), é de 0,4791 (IC 95% 0,4455 - 0,5192). Desta forma, o efeito total — que representa a soma dos efeitos direto e indireto — é de 0,6750 (IC 95%: 0,6553 - 0,7420). Com estas informações, tem-se que a proporção mediada – a porção do efeito total do CAG na progressão da DMJ que passa pela idade

de início dos sintomas – é de 0,7097 (IC 95%: 0,6331 - 0,7612), ou seja, quase 71% do efeito da exposição no desfecho passa pelo mediador. A diferença dos efeitos calculados pelas abordagens é muito pequena, diferenciando-se na segunda casa decimal.

Tabela 2 – Estimativas e intervalos de 95% de confiança dos efeitos causais de mediação para cada abordagem.

Efeito	Abordagem	
	Exata	Estocástica
NDE	0,1959 (0,1579 ; 0,2636)	0,2138 (0,1667 ; 0,2669)
NIE	0,4791 (0,4455 ; 0,5192)	0,4811 (0,4451 ; 0,5157)
TE	0,6750 (0,6553 ; 0,7420)	0,6950 (0,6528 ; 0,7415)
PM	0,7097 (0,6331 ; 0,7612)	0,6927 (0,6304 ; 0,7501)

Discussão

Por várias razões, medidas repetidas aprimoram a interpretação dos processos de mediação, uma vez que é possível examinar as mudanças nos indivíduos, além das diferenças entre os indivíduos (4). Os efeitos e estimativas obtidos das abordagens propostas por Imai et al. (8) e Bind et al. (2) foram muito próximas, o que mostra a equivalência de ambas as abordagens no cenário proposto, onde apenas o desfecho se apresenta na forma de medidas repetidas. Esta equivalência era esperada em uma aplicação realizada em um contexto linear, uma vez que a abordagem exata se apresenta como uma alternativa ao método estocástico (2), os dois métodos se baseiam no conceito de desfechos potenciais e nas mesmas suposições de identificação necessárias para interpretação causal, além de ambos os métodos terem utilizado modelos mistos para modelagem das variáveis desfecho e mediadora. No contexto em que foi aplicado, a relevância da idade de início dos sintomas no caminho causal pode ser explorada em outros estudos através de propostas de intervenções que visem postergar o início da manifestação da doença ou então atenuar a progressão da mesma (21,22).

Para a escolha do método, deve-se considerar também o tempo computacional para execução dos códigos de simulação. Por se tratar de um banco de dados com muitas observações, ao realizar a técnica de *bootstrap* para obtenção dos intervalos de confiança das estimativas obtidas através da abordagem exata (2), o tempo de execução é maior do que o tempo para execução do método já implementado no pacote *mediation* (8).

É importante ressaltar que as suposições feitas por ambas as abordagens devem estar sendo atendidas para aplicação correta delas. Neste trabalho utilizou-se dados simulados para realização das análises, considerando-se que as suposições para identificação fossem atendidas. Em situações de análises de dados primários deve ser realizada uma análise de sensibilidade, tema não abordado aqui mas que o leitor interessado pode consultar em VanderWeele (11). Uma limitação é de que a simulação não foi repetida, o que permitiria a

melhor avaliação de viés e variância das estimativas produzidas pelas duas abordagens. Por fim, espera-se que este trabalho tenha fornecido recursos suficientes para que tais métodos sejam aplicados por pesquisadores interessados em inferências causais em delineamentos longitudinais das mais diversas áreas.

Referências

1. Vanderweele TJ. *Explanation in Causal Inference: Methods for Mediation and Interaction*. Oxford University Press; 2015.
2. Bind MAC, Vanderweele TJ, Coull BA, Schwartz JD. Causal mediation analysis for longitudinal data with exogenous exposure. *Biostatistics*. 2015;17(1):122–34.
3. Baron RM, Kenny DA. The Moderator-Mediator Variable Distinction in Social Psychological Research: Conceptual, Strategic, and Statistical Considerations. *J Pers Soc Psychol*. 1986;51(6):1173–82.
4. MacKinnon DP. Introduction statistical mediation analysis. *APA Handb Res methods Psychol Vol 2 Res Des Quant Qual Neuropsychol Biol* [Internet]. 2008;478. Available from: <http://content.apa.org/books/13620-018>
5. Kenny DA, Korchmaros JD, Bolger N. Lower Level Mediation in Multilevel Models. *Psychol Methods*. 2003;8(2):115–28.
6. Tofighi D, West SG, Mackinnon DP. Multilevel mediation analysis: The effects of omitted variables in the 1-1-1 model. *Br J Math Stat Psychol*. 2013;66(2):290–307.
7. Cheong J, MacKinnon DP, Khoo ST. Structural equation modeling: A confirmatory analysis of computer self-efficacy. *Struct Equ Model*. 2003;10(2):263–75.
8. Imai K, Keele L, Tingley D. A General Approach to Causal Mediation Analysis. *Psychol Methods*. 2010;15(4):309–34.
9. Splawa-Neyman J. On the application of probability theory to agricultural experiments. *Essay on principles*. Section 9. *Ann Agric Sci*. 1923;10:1–51.
10. Rubin DB. Estimating causal effects of treatments in randomized and nonrandomized studies. *J Educ Psychol*. 1974;66(5):688–701.
11. VanderWeele T. *Mediation Analysis: A Practitioner’s Guide*. Ssrn. 2016;
12. Holland PW. Statistics and causal inference. *J Am Stat Assoc*. 1986;81(396):945–60.

13. Twisk JWR. Applied Longitudinal Data Analysis for Epidemiology—A Practical Guide. Jos W R Twisk, Cambridge: Cambridge University Press, 2003, pp. 318 24.95 (PB) ISBN: 0-521-52580-2, 65.00 (HB) ISBN: 0-521-81976-8. Cambridge University Press. 2003. 318 p.
14. Verbeke G, Molenberghs G. Linear Mixed Models for Longitudinal Data. 2nd ed. Springer; 2001.
15. Bates D, Mächler M, Bolker BM, Walker SC. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J Stat Softw.* 2015;67(1): 1-48.
16. De Mattos EP, Kolbe Musskopf M, Bielefeldt Leotti V, Saraiva-Pereira ML, Jardim LB. Genetic risk factors for modulation of age at onset in Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3: A systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2019;90(2):203–10.
17. Kieling C, Rieder CRM, Silva ACF, Saute JAM, Cecchin CR, Monte TL, et al. A neurological examination score for the assessment of spinocerebellar ataxia 3 (SCA3). *Eur J Neurol.* 2008;15(4):371–6. JARDIM, Laura Bannach et al. Progression rate of neurological deficits in a 10-year cohort of SCA3 patients. *The Cerebellum*, v. 9, n. 3, p. 419-428, 2010.
18. Kieling C, Prestes PR, Saraiva-Pereira ML, Jardim LB. Survival estimates for patients with Machado-Joseph disease (SCA3). *Clin Genet.* 2007;72(6):543–5.
19. Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, Team RC. nlme: Linear and nonlinear mixed effects models. R Packag nlme version. 2007;3(1):1–83.
20. Kuiper EFE, de Mattos EP, Jardim LB, Kampinga HH, Bergink S. Chaperones in polyglutamine aggregation: Beyond the Q-stretch. *Front Neurosci.* 2017;11(MAR):1–11.
21. Cunha-Santos J, Duarte-Neves J, Carmona V, Guarente L, De Almeida LP, Cavadas C. Caloric restriction blocks neuropathology and motor deficits in Machado-Joseph disease mouse models through SIRT1 pathway. *Nat Commun.* 2016;7(May):1–14.

6 Conclusões e Considerações Finais

Nos estudos de causalidade, busca-se entender a maneira como os eventos ocorrem em determinada relação causal a fim de buscar alternativas que podem ser, por exemplo, intervenções em determinado momento desta relação. A análise de mediação é uma abordagem útil para avaliar caminhos em estudos epidemiológicos e pode permitir ao pesquisador uma nova perspectiva a respeito das hipóteses já firmadas. No caso da Doença de Machado-Joseph, é importante conhecer as variáveis que podem influenciar na sua progressão. Como se trata de uma doença hereditária, não se tem como trabalhar com políticas de prevenção. Pelo fato de a doença não ter cura, somente tratamento para os sintomas à medida que eles vão ocorrendo, a análise da influência exercida por todos os fatores existentes no caminho entre exposição e desfecho permite uma ideia melhor sobre como e quando ocorrem as relações no caminho causal.

Neste estudo foram apresentados métodos que permitem estimar a porção do efeito da exposição no desfecho que ocorre através do caminho do mediador quando apenas o desfecho se apresenta na forma de dados longitudinais. Também foi apresentada a aplicação destas abordagens utilizando o contexto da Doença de Machado-Joseph. Os efeitos e estimativas obtidos foram muito próximas, o que mostra a equivalência – já esperada – de ambos os métodos no cenário utilizado como exemplo. É importante ressaltar que as suposições feitas para a utilização das abordagens devem estar sendo atendidas para sua correta aplicação e interpretação dos resultados.

Entretanto, uma das limitações deste trabalho é que não foi realizado um estudo aprofundado a respeito da utilização de análise de sensibilidade no contexto de análise de mediação. Outra limitação é de que a simulação não foi repetida, o que permitiria a melhor avaliação de viés e variância das estimativas produzidas pelas duas abordagens.

Os resultados obtidos através dos métodos avaliados mostram que cerca de 71% do efeito da replicação do CAG na progressão da doença se dá através do caminho mediado pela idade de início dos sintomas. Se esta relação permanecer verdadeira ao se utilizar um banco não simulado com informações dos pacientes portadores de Doença de Machado-Joseph, é possível avaliar a contribuição que as intervenções que estão sendo propostas em estudos clínicos – como a utilização de dietas de restrição calórica, por exemplo – terão no tratamento da doença. Se o método proposto for bem-sucedido, o mesmo pode ser utilizado em outros estudos que envolvem ataxias que são resultantes da expansão do CAG, como a doença de Huntington, bem como em outras áreas de estudo da epidemiologia que lidam com dados longitudinais.

A realização deste estudo possibilitou a implementação da abordagem exata em

software livre, permitindo a disseminação da metodologia através da disponibilização do código feito em R e facilitando a aplicação e replicação das análises nos mais diversos contextos epidemiológicos. Futuramente, novos trabalhos no contexto de análise de mediação podem explorar a ocorrência de múltiplos mediadores no contexto longitudinal, bem como o estudo mais aprofundado a respeito de análise de sensibilidade em análise de mediação.

Apêndices

APÊNDICE A – Material Suplementar

Neste material é possível visualizar o passo a passo para criação dos bancos de dados e análises realizadas de acordo com as abordagens tratadas no artigo, bem como a demonstração dos cálculos dos efeitos direto e indireto de acordo com a abordagem exata no contexto do exemplo apresentado. Cada passo é seguido pelo código rodado no *software* estatístico R (versão 3.6.0).

Antes de iniciar a construção do banco e realização das análises, é necessário carregar os pacotes que serão utilizados no decorrer do código e definir as variáveis que serão utilizadas na análise.

```
#### Required Packages:
library(lme4)
library(mediation)
library(MASS)
library(nlme)
library(dplyr)
####Variables:
#n = number of subjects
#a_var = exposure (A)
#m_var = mediator (M)
#ci = covariable. In this example it represents the duration time of the
      disease for each subject in each opportunity (C)
#id = identification variable
#yi = outcome variable in each opportunity (i=1,2,3) (Y)
#z_var = this variable contains the outcome and mediator values
#sm = binary variable that indicates if the value in z_var referes to the
      mediator (0 = no, 1 = yes)
#sy = binary variable that indicates if the value in z_var referes to the
      outcome (0 = no, 1 = yes)
#dv = string variable that indicates if the value in z_var referes to the
      mediator (dv=m) or the outcome (dv=y)
```

Passo 1: A primeira variável gerada no banco de dados é a variável de exposição, ou seja, *A*. Essa variável é proveniente de uma distribuição normal, e foi gerada a partir da função *rnorm*, utilizando-se como argumento o número de indivíduos definido ($N = 10000$), média igual a 74.4 e desvio padrão de 2.58.

```
#### Step 1: Simulating the exposure
```

```
#We defined the seed to let this example reproducible
set.seed(123456)
n = 10000
a_var = round(rnorm(n, 74.4, 2.58), 0)
```

Passo 2: A geração da variável mediadora, M , foi realizada para os N indivíduos através da equação $ao = 208.9333 - 2.3517 \times cag + \varepsilon$, onde ε é normalmente distribuído, com média 0 e desvio padrão igual a 7.718.

```
#### Step 2: Simulating the mediator
m_var = 208.9333-2.3517*a_var + rnorm(n, 0, 7.718)
```

Passo 3: A covariável que representa a duração da doença, C , foi gerada para os N indivíduos a partir da função $rnorm$, utilizando-se como argumento o número de indivíduos definido ($N = 10000$), média igual a 5 e desvio padrão de 1. Por se tratar de uma variável representada por um número inteiro, ela foi arredondada no momento da geração.

```
#### Step 3: Simulating the covariable
c_var = round(rnorm(n, 5, 1), 0)
```

Passo 4: Para verificar a aplicabilidade dos métodos em um cenário onde se tem uma variável desfecho de característica longitudinal, é necessário que se gere também os efeitos aleatórios que estarão presentes nos modelos de ajuste. Desta forma, são gerados dois efeitos aleatórios, provenientes de uma distribuição normal multivariada com vetor de médias $\mu = (0, 0)$ e matriz de covariâncias dada por

$$\Sigma = \begin{bmatrix} 54.5924 & -0.717 \times \sqrt{(54.5924)} \times \sqrt{(0.4311)} \\ -0.717 \times \sqrt{(54.5924)} \times \sqrt{(0.4311)} & 0.4311 \end{bmatrix}.$$

Os efeitos aleatórios gerados são identificados como interceptos (ints) e inclinações (slopes).

```
#### Step 4: Simulating the random effects
randeff = mvrnorm(n, mu=c(0,0), Sigma=rbind(c(54.5924,
-0.717*sqrt(54.5924)*sqrt(0.4311)),
c(-0.717*sqrt(54.5924)*sqrt(0.4311), 0.4311) ))
colnames(randeff) = c("ints","slopes")
```

Passo 5: Após a criação de cada uma das variáveis, um banco único é criado, juntando uma variável de identificação do sujeito (id), a variável de exposição (A), a variável mediadora (M), a covariável (C) e os efeitos aleatórios (ints e slopes).

```
#### Step 5: Generating a single data base
db = data.frame(id = 1:n, a_var, m_var, c_var, ints = randeff[, "ints"],
slopes = randeff[, "slopes"])
```

Passo 6: A fim de que se tenha uma variável desfecho no formato longitudinal, serão gerados valores para a progressão da doença que representarão as medidas repetidas ao longo do tempo. Primeiramente é criada a variável *indexok1*, que recebe o valor da variável duração. Então, são criadas as variáveis *indexok2* e *indexok3*, as quais recebem o valor da variável duração somado a 1 e 2 unidades, respectivamente. As variáveis *indexok* representam o momento de cada medida obtida do indivíduo, sendo a covariável do modelo (*C*). As variáveis *NESSCA1*, *NESSCA2* e *NESSCA3* são as variáveis desfecho (Y_{ij}) que representam a progressão da doença em cada um dos momentos de coleta de dados, e são obtidas através da seguinte equação: $Y_{ij} = 40.217493 - 0.417186 \times A_i - 18.688468 \times C_{ij} - 0.024757 \times M_i + 0.272199 \times A_i \times C_{ij} - 0.001330 \times A_i \times M_i + 0.326349 \times M_i \times C_{ij} - 0.004527 \times A_i \times M_i \times C_{ij} + ints_i + slopes_i \times C_{ij} + \varepsilon_i$, onde $i = (1, \dots, N)$ é o número de indivíduos da amostra, $j = (1, 2, 3)$ é o número de medidas obtidas de cada indivíduo, e ε_i é normalmente distribuído, com média 0 e desvio padrão 0.9044.

```
#### Step 6: Generating outcome variable for each subject assuming that each
      one had three annual observations after baseline
db$c1 = db$c_var
db$c2 = db$c_var + 1
db$c3 = db$c_var + 2
db$y1 = 40.217493 -0.417186*db$a_var -18.688468*db$c1 -0.024757*db$m_var +
        0.272199*db$a_var*db$c1-0.001330*db$a_var*db$m_var +
        0.326349*db$m_var*db$c1 -0.004527*db$a_var*db$m_var*db$c1 +
        db$ints + db$slopes*db$c1 + rnorm(n, 0, sqrt(0.8181))
db$y2 = 40.217493 -0.417186*db$a_var -18.688468*db$c2 -0.024757*db$m_var +
        0.272199*db$a_var*db$c2-0.001330*db$a_var*db$m_var + 0.326349*db$m_var*db$c2
        -0.004527*db$a_var*db$m_var*db$c2 +
        db$ints + db$slopes*db$c2+ rnorm(n, 0, sqrt(0.8181))
db$y3 = 40.217493 -0.417186*db$a_var -18.688468*db$c3 -0.024757*db$m_var +
        0.272199*db$a_var*db$c3-0.001330*db$a_var*db$m_var + 0.326349*db$m_var*db$c3
        -0.004527*db$a_var*db$m_var*db$c3 +
        db$ints + db$slopes*db$c3 + rnorm(n, 0, sqrt(0.8181))
```

Passo 7: Após criado um segundo banco de dados com todas as variáveis e covariáveis que serão trabalhadas e com as medidas repetidas do desfecho, é necessário deixá-lo no formato longitudinal, ou seja, as medidas repetidas que estão em colunas separadas devem ser colocadas em apenas uma coluna. Para isso, é utilizada a função *reshape*, identificando que as variáveis *C* e *Y* devem ser empilhadas.

```
#### Step 7: Transposing the data base
db.long = reshape(db, varying = list(c(7:9), c(10:12)), v.names = c("ci",
```

```

"yi"), idvar = "id", direction = "long")
db.long2 <- aggregate(cbind(m_var, a_var) ~ id, FUN = mean, data = db.long)
write.csv(db, "db.csv")
write.csv(db.long, "dblong.csv")
write.csv(db.long2, "dblong2.csv")

```

Especificamente para a abordagem proposta por Bind et al.(1), utiliza-se o banco em formato longo, acrescentando as seguintes informações: Passo 8: A partir do segundo banco criado, cria-se um terceiro banco. Deve-se concatenar as das variáveis *id*, *A*, *ints*, *slopes* e *Y* do segundo banco com as variáveis *id*, *A*, *ints*, *slopes* e *Y* do primeiro banco. No caso do exemplo, teremos 10000 linhas a mais neste terceiro banco, totalizando em 40000 linhas. As variáveis *M* e *C* terão valores iguais a zero da linha 30001 até a linha 40000. Como o valor da escala de progressão utilizada nesta segunda parte é a da primeira medida, a variável *time* recebe valor igual a 1 em todas as linhas.

```

#### Step 8: Creating a third data base for Bind's approach
db.long3<-db.long
db.long3<-db.long3[order(db.long3$id),]
db.long3[30001:40000,]<-0
db.long3[30001:40000, 1:2]<-db[,1:2]
db.long3[30001:40000, 5:6]<-db[,5:6]
db.long3[30001:40000, 9]<-db[,10]
db.long3[30001:40000, 7]<-1

```

Passo 9: Deve-se criar a variável *z_{var}*, que receberá os valores da variável *Y* da linha 1 à linha 30000, e que receberá os valores da variável *M*, que estão no primeiro banco criado, da linha 30001 à linha 40000.

```

#### Step 9: Creating the z_var variable
db.long3$z_var<-0
db.long3[1:30000,10]<-db.long3[1:30000,9]
db.long3[30001:40000,10]<-db$m_var

```

Passo 10: Deve-se criar as variáveis indicadoras *sy*, *sm* e *dv*. Quando o valor de *z_{var}* se referir ao desfecho, *sy* receberá valor 1, *sm* receberá valor 0 e *dv* categorizado como *y*; da mesma forma, quando *z_{var}* se referir ao mediador, *sy* receberá valor 0, *sm* receberá valor 1 e *dv* será categorizado como *m*.

```

#### Step 10: Creating sm, sy and dv variables
db.long3$sy<-1
db.long3[30001:40000,11]<-0
db.long3$sm<-0

```

```

db.long3[30001:40000,12]<-1
db.long3$dv<-"cat"
for(i in 1:nrow(db.long3)){
  if(db.long3$sm[i]==0){
    db.long3$dv[i]<-'y'
  }else{
    db.long3$dv[i]<-'m'
  }}

```

Após a construção do banco de dados, é possível ajustar os modelos de mediação utilizando o pacote *mediation* (2) e implementando as equações propostas por Bind *et al.* (1).

Passo 11: A abordagem estocástica é realizada através do pacote *mediation* (2). Para utilizar a função *mediate* na estimação dos efeitos de mediação, cria-se dois modelos de regressão, um para o desfecho e outro para o mediador. Neste caso, para o modelo do desfecho, foi utilizada a função *lmer* do pacote *lme4* (3) a fim de construir um modelo linear misto para ajustar a variável desfecho (4).

```

#Outcome model
model.Y<-lmer(yi ~ a_var*ci*m_var + (ci|id) , data=db.long, control =
  lmerControl(optimizer="Nelder_Mead"))
summary(model.Y)
fixef(model.Y)
#Mediator model
model.M <- lm(m_var ~ a_var, data = db.long2)
summary(model.M)

```

Passo 12: Após a criação dos dois modelos, utiliza-se a função *mediate*, especificando os modelos criados separadamente nos argumentos da função.

```

# Combining models
med <- mediate(model.m = model.M, model.y = model.Y,
  treat = "a_var",
  mediator = "m_var",
  control.value = 74,
  treat.value = (74 + 1),
  sims = 1000,
  robustSE = TRUE
)
summary(med)

```

Passo 13: Para a abordagem de Bind *et al.* (1), os dados são ajustados em apenas

um modelo, e os coeficientes obtidos são substituídos na equação de estimação dos efeitos apresentadas anteriormente. Para ajuste do modelo linear misto na abordagem exata, é utilizada a função *lme* do pacote *nlme* (5) por ser mais generalizado e permitir que o modelo apresente erros correlacionados e heterocedasticidade (4).

```
# Model for outcome and mediator
## Bind's approach
mod1 <- lme(z_var ~ -1 + sm + sm:a_var + sy + sy:ci + sy:a_var + sy:m_var +
  sy:m_var:a_var + sy:ci:a_var + sy:ci:m_var + sy:ci:a_var:m_var ,
  random = list(id = ~ -1 + sy + sy:ci),
  weights = varIdent(form = ~ 1 | dv),
  control = lmeControl(opt = "optim"),
  data = db.long3)
summary(mod1)
```

Passo 14: A fim de calcular os efeitos causais de mediação através da abordagem exata, os coeficientes ajustados são extraídos do modelo e substituídos nas equações de cálculo dos efeitos.

```
#Fixed effects to calculate NDE and NIE
fixedcoef <- mod1$coefficients$fixed
gamma1 <- fixedcoef["a_var:sy"]
gamma2 <- fixedcoef["sy:m_var"]
gamma5 <- fixedcoef["a_var:sy:m_var"]
gamma6 <- fixedcoef["a_var:sy:ci"]
gamma7 <- fixedcoef["sy:ci:m_var"]
gamma8 <- fixedcoef["a_var:sy:ci:m_var"]
beta0 <- fixedcoef["sm"]
beta1 <- fixedcoef["sm:a_var"]
#Causal mediation effects: NDE (Natural Direct Effect), NIE (Natural Indirect
  Effect), TE (Total Effect), PM (Proportion Mediated)
NDE <- mean(gamma1 + gamma5 * (beta0 + 74*beta1) + gamma6 * db.long$ci +
  gamma8 * (beta0 + 74*beta1) * db.long$ci)
NIE <- mean(gamma2*beta1 + 75*gamma5*beta1 + gamma7*beta1*db.long$ci +
  75*gamma8*beta1*db.long$ci)
TE <- NDE + NIE
PM <- NIE / TE
c("NDE" = NDE, "NIE" = NIE, "TE" = TE, "PM" = PM)
```

Passo 15: Para obter intervalos de confiança para as estimativas obtidas (1), foi realizado *bootstrap* com 1000 reamostras.

```

#Obtaining the bootstrap confidence interval for Bind's results
##Bootstrap for the causal mediation effects
results<-matrix(nrow=1000, ncol=4)
colnames(results)<-c("NDE", "NIE", "TE", "PM")
ids = replicate(1000, sample(db$id, 10000, replace = T))
#Looping for bootstrap sample estimates
for (i in 1:1000){
  #Selecting the bootstrap sample
  b1 = db[ ids[ ,i], ]
  #Adjusting ids due to repetition of individuals
  b1$id = rownames(b1)
  #Creating data base to calculate the effects with the selected bootstrap
  sample
  b2 = subset(b1, select=c("id", "a_var", "m_var"))
  #b1 and b2 are created separately due to the need to stack the data bases to
  adjust the Bind model
  b1$sm = 0
  b1$sy = 1
  b1$dv = 'y'
  b2$sm = 1
  b2$sy = 0
  b2$dv = 'm'
  b2$ci = 0
  #Stacking the bank
  b1.long = reshape(b1, varying = list(c(7:9), c(10:12)), v.names = c("ci",
    "z_var"), idvar = "id", direction = "long")
  b2$z_var = b1$m_var
  b3 = bind_rows(b1.long, b2)
  #Bind Model
  library(nlme)
  mod1 <- lme(z_var ~ -1 + sm + sm:a_var + sy + sy:ci + sy:a_var + sy:m_var +
    sy:m_var:a_var + sy:ci:a_var + sy:ci:m_var + sy:ci:m_var:a_var,
    random = list(id = ~ -1 + sy + sy:ci),
    weights = varIdent(form = ~ 1 | dv),
    control=lmeControl(maxIter = 1e8, msMaxIter = 1e8),
    data = b3)
  fixedcoef <- mod1$coefficients$fixed
  gamma1 <- fixedcoef["a_var:sy"]
  gamma2 <- fixedcoef["sy:m_var"]
  gamma5 <- fixedcoef["a_var:sy:m_var"]
  gamma6 <- fixedcoef["a_var:sy:ci"]
  gamma7 <- fixedcoef["sy:ci:m_var"]

```

```

gamma8 <- fixedcoef["a_var:sy:ci:m_var"]
beta0 <- fixedcoef["sm"]
beta1 <- fixedcoef["sm:a_var"]
# Causal Mediation Effects
NDE <- mean(gamma1 + gamma5 * (beta0 + 74*beta1) + gamma6 * b1.long$ci +
  gamma8 * (beta0 + 74*beta1) * b1.long$ci)
NIE <- mean(gamma2*beta1 + 75*gamma5*beta1 + gamma7*beta1*b1.long$ci +
  75*gamma8*beta1*b1.long$ci)
TE <- NDE + NIE
PM <- NIE / TE
results[i,1]<-NDE
results[i,2]<-NIE
results[i,3]<-TE
results[i,4]<-PM
}
write.csv(results, "results.csv")
#CI
conf<-matrix(nrow = 4, ncol=2, dimnames = list(c("NDE", "NIE", "TE",
  "PM"),c("LB", "UB"))) )
for (i in 1:4){
  conf[i,1]<-quantile(results[,i],0.025)
  conf[i,2]<-quantile(results[,i],0.975)
}
}
Conf

```

As demonstrações das equações dos efeitos direto e indireto de acordo com a abordagem exata podem ser verificadas nas seguintes equações e seguem as mesmas etapas apresentadas por Bind *et al.* (1):

1. Valor esperado do resultado contrafactual;
2. Derivação dos efeitos diretos e indiretos condicionais a covariáveis e efeitos aleatórios;
3. Integração dos efeitos aleatórios para obter os efeitos diretos e indiretos naturais efeitos (condicionais apenas nas covariáveis).

$$\mathbb{E}[M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a, \mathbf{b}_i] = (\beta_0 + b_{0i}) + (\beta_1 + b_{1i})a + \beta_c^T \mathbf{c}$$

$$\mathbb{E}[Y_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a, M_{ij} = m, g_{0i}, g_{1i}] =$$

$$(\gamma_0 + g_{0i}) + \gamma_1 a + \gamma_2 m + \gamma_3 am + (\gamma_4 + g_{1i})c + \gamma_5 ca + \gamma_6 cm + \gamma_7 cam$$

$$\begin{aligned}
 & \mathbb{E}[Y_{ij}^{a, M_{ij}^a} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, g_{0i}, g_{1i}] \\
 &= \int_m \mathbb{E}(\mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a, M_{ij} = m, g_{0i}, g_{1i}) \\
 & d\mathbb{P}(M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, g_{0i}, g_{1i}, A_{ij} = a^*) = \\
 &= \int_m [(\gamma_0 + g_{0i}) + \gamma_1 a + \gamma_2 m \gamma_3 a m + (\gamma_4 + g_{1i})c + \gamma_5 c a + \gamma_6 c m + \gamma_7 c a m] \\
 & d\mathbb{P}(M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, g_{0i}, g_{1i}, A_{ij} = a^*) = \\
 &= (\gamma_0 + g_{0i}) + \gamma_1 a + (\gamma_4 + g_{1i})c + \gamma_5 c a + \int_m \gamma_2 m + \gamma_3 a m + \gamma_6 c m + \gamma_7 c a m \\
 & d\mathbb{P}(M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, g_{0i}, g_{1i}, A_{ij} = a^*) \\
 &= (\gamma_0 + g_{0i}) + \gamma_1 a + (\gamma_4 + g_{1i})c + \gamma_5 c a + \gamma_2 \mathbb{E}(M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a^*) + \\
 & \gamma_3 a \mathbb{E}(M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a^*) + \gamma_6 c \mathbb{E}(M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a^*) + \\
 & \gamma_7 c a \mathbb{E}(M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a^*)
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 NDE &= \mathbb{E}(Y_{ij}^{a, M_{ij}^a} - Y_{ij}^{a^*, M_{ij}^{a^*}} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, g_{0i}, g_{1i}) = \\
 & \gamma_1 a + \gamma_5 c a + \gamma_3 a \mathbb{E}(M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a^*) + \gamma_7 c a \mathbb{E}(M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a^*) \\
 & - \gamma_1 a^* - \gamma_5 c a^* - \gamma_3 a^* \mathbb{E}(M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a^*) - \gamma_7 c a^* \mathbb{E}(M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a^*) \\
 &= \gamma_1 (a - a^*) + \gamma_5 c (a - a^*) + \gamma_3 \mathbb{E}(M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a^*) \\
 & + \gamma_7 c \mathbb{E}(M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a^*) (a - a^*) \\
 &= (a - a^*) [\gamma_1 + \gamma_5 c + (\gamma_3 + \gamma_7 c) \mathbb{E}(M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a^*)] \\
 &= (a - a^*) [\gamma_1 + \gamma_5 c + (\gamma_3 + \gamma_7 c) (\beta_0 + \beta_1 a^*)]
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 & \mathbb{E}(Y_{ij}^{a, M_{ij}^a} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, g_{0i}, g_{1i}) = \\
 & \int_m \mathbb{E}[Y_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a, M_{ij} = m, g_{0i}, g_{1i}] d\mathbb{P}(M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, g_{0i}, g_{1i}, A_{ij} = a) \\
 &= \int_m [(\gamma_0 + g_{0i}) + \gamma_1 a + \gamma_2 m + \gamma_3 a m + (\gamma_4 + g_{1i})c + \gamma_5 c a + \gamma_6 c m + \gamma_7 c a m] \\
 & d\mathbb{P}(M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, g_{0i}, g_{1i}, A_{ij} = a) \\
 &= (\gamma_0 + g_{0i}) + \gamma_1 a + (\gamma_4 + g_{1i})c + \gamma_5 c a + \int_m \gamma_2 m + \gamma_3 a m + \gamma_6 c m + \gamma_7 c a m \\
 & d\mathbb{P}(M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a) \\
 &= (\gamma_0 + g_{0i}) + \gamma_1 a + (\gamma_4 + g_{1i})c + \gamma_5 c a + \gamma_2 \mathbb{E}(M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a) + \\
 & \gamma_3 a \mathbb{E}(M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a) + \gamma_6 c \mathbb{E}(M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a) \\
 & + \gamma_7 c a \mathbb{E}(M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a)
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
NIE &= \mathbb{E}(Y_{ij}^{a, M_{ij}^a} - Y_{ij}^{a, M_{ij}^{a^*}} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, g_{0i}, g_{1i}) = \\
&\gamma_2 \mathbb{E}(M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a) + \gamma_3 \mathbb{E}(M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a) \\
&+ \gamma_6 c \mathbb{E}(M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a) + \gamma_7 ca \mathbb{E}(M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a) \\
&- \gamma_2 \mathbb{E}(M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a^*) - \gamma_3 a \mathbb{E}(M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a^*) \\
&- \gamma_6 c \mathbb{E}(M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a^*) - \gamma_7 ca \mathbb{E}(M_{ij} | \mathbf{C}_{ij} = \mathbf{c}, A_{ij} = a^*) \\
&= \gamma_2(\beta_0 + \beta_1 a) + \gamma_3(\beta_0 + \beta_1 a) + \gamma_6(\beta_0 + \beta_1 a)c + \gamma_7(\beta_0 + \beta_1 a)ac \\
&- \gamma_2(\beta_0 + \beta_1 a^*) - \gamma_3(\beta_0 + \beta_1 a^*) - \gamma_6(\beta_0 + \beta_1 a^*)c - \gamma_7(\beta_0 + \beta_1 a^*)ac \\
&= (\beta_0 + \beta_1 a)(\gamma_2 + \gamma_3 + \gamma_6 c + \gamma_7 ac) - (\beta_0 + \beta_1 a^*)(\gamma_2 + \gamma_3 + \gamma_6 c + \gamma_7 ac) \\
&= (a - a^*)(\gamma_2 \beta_1 + \gamma_3 \beta_1 + \gamma_6 \beta_1 c + \gamma_7 \beta_1 ac) \\
&= (a - a^*)\beta_1(\gamma_2 + \gamma_3 + \gamma_6 c + \gamma_7 ac)
\end{aligned}$$

Referências

1. Bind MAC, Vanderweele TJ, Coull BA, Schwartz JD. Causal mediation analysis for longitudinal data with exogenous exposure. *Biostatistics*. 2015;17(1):122–34.
2. Imai K, Keele L, Tingley D. A General Approach to Causal Mediation Analysis. *Psychol Methods*. 2010;15(4):309–34.
3. Bates D, Mächler M, Bolker BM, Walker SC. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J Stat Softw*. 2015;67(1).
4. Verbeke G, Molenberghs G. *Linear Mixed Models for Longitudinal Data*. 2nd ed. Springer; 2001.
5. Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, Team RC. nlme: Linear and nonlinear mixed effects models. R Packag nlme version. 2007;3(1):1–83.