

ALAN CARVALHO DIAS

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROLACTINA E A
HOMEOSTASE METABÓLICA UTILIZANDO FERRAMENTAS DE APRENDIZADO
DE MÁQUINA**

BRASÍLIA, 2023

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ALAN CARVALHO DIAS

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROLACTINA E A
HOMEOSTASE METABÓLICA UTILIZANDO FERRAMENTAS DE APRENDIZADO
DE MÁQUINA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Orientadora: Prof. Dra. Luciana Ansaneli Naves

**BRASÍLIA
2023**

ALAN CARVALHO DIAS

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROLACTINA E A
HOMEOSTASE METABÓLICA UTILIZANDO FERRAMENTAS DE APRENDIZADO
DE MÁQUINA**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde pelo programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília

Aprovado em 06 de julho de 2023

BANCA EXAMINADORA

Profa Dra Luciana Ansaneli Naves (presidente)

Universidade de Brasília

Angélica Amorim Amato

Universidade de Brasília

Rafael Henriques Jácomo

Sabin Medicina Diagnóstica e

Ex-Professor da Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

À minha querida e amada esposa, **Dalvani Machado Amaral**, com quem tenho o prazer de compartilhar o caminho desta vida e aos meus pais **Maria Luciene Carvalho Dias** e **Dilson Carvalho Dias** pelo apoio e amor incondicional.

À minha orientadora Prof^a Dra. **Luciana Ansaneli Naves** por sua orientação e apoio durante todo o processo de minha dissertação de mestrado. Sem dúvida, seu envolvimento e suas valiosas sugestões foram determinantes para que eu alcançasse meus objetivos. Sua vasta expertise, disponibilidade e paciência foram essenciais para superar as dificuldades e, com sua orientação, chegar a um resultado satisfatório.

Ao Sabin Medicina Diagnóstica e o seu Núcleo de Apoio à Pesquisa e Setor de Privacidade e Proteção de Dados, obrigado pelas oportunidades e investir na ciência.

Meus sinceros agradecimentos.

“All models are wrong but are some useful.”

(George Edward Pelham Box)

RESUMO

Introdução: Recentemente uma nova “classificação metabólica” foi proposta para a prolactina e com base nela, a hipoprolactinemia e hiperprolactinemia foram definidas como resultados aproximadamente < 7 e > 100 ng/mL, respectivamente, e várias doenças metabólicas foram associadas a essa faixa de resultados, todavia a determinação dos pontos de corte que influenciam no metabolismo parecem incertos.

Objetivos: Investigar a possível correlação entre a concentração de prolactina e os testes de metabolismo de glicose e lipídios. Estabelecer uma “zona cinzenta” que representa os pontos de inflexão, associando os resultados dos exames do metabolismo glicídico e lipídico com a prolactina. Como parte do estudo, uma ferramenta de aprendizados de máquina foi criada usando a linguagem R para realizar essas análises de forma automatizada. **Métodos:** Foi realizado um estudo transversal com 65.795 resultados laboratoriais de pacientes adultos de ambos os sexos, coletados no primeiro semestre de 2018 no Laboratório Sabin. Os dados, extraídos e anonimizados do Sistema Informatizado Laboratorial, incluíam parâmetros lipídicos (colesterol total, HDL-c, LDL-c, triglicerídeos) e bioquímicos/hormonais (glicose, prolactina, insulina, HOMA-IR). Os dados individuais foram estratificados em 106 partições, baseando-se nas concentrações de médias de prolactina e analitos do metabolismo lipídico e glicídico de cada indivíduo. Essas médias foram empregadas em três análises distintas: inicialmente, foram usadas para comparar os resultados dos testes de metabolismo glicídico e lipídico dentro de cada faixa da nova classificação metabólica da prolactina; em seguida, serviram na estimativa do ponto de inflexão e seu respectivo intervalo de confiança, associando os resultados dos exames de metabolismo glicídico e lipídico com as concentrações de prolactina, e na determinação das correspondentes “zonas cinzentas”; por fim, foram utilizadas na previsão dos resultados médios desses testes de metabolismo glicídico e lipídico com base no ponto de inflexão estimado. Além disso, os resultados individuais de prolactina foram utilizados para comparar as concentrações de prolactina entre os sexos. **Resultados:** A população analisada apresentava idades entre 21 e 75 anos, sendo composta por 51.366 mulheres e 14.429 homens. A hiperprolactinemia (concentrações de prolactina superiores a 25 ng/mL) foi identificada em 4.004 das 51.366 mulheres (7,79%) e em 208 dos 14.429 homens (1,41%). Os resultados de prolactina foram equivalentes entre os sexos. Os resultados médios dos exames do

metabolismo glicídico e lipídico foram significativamente mais altos na faixa de resultados médios de prolactina < 7 ng/mL, com exceção da insulina. Na faixa HomeoFIT-PRL, a mediana e a distribuição dos resultados médios dos exames metabolismo glicídico e lipídico são predominantemente inferiores em comparação com as demais faixas de resultados médios de prolactina. Abaixo da “zona cinza” representada pelos resultados médios de prolactina entre 9,58 e 12,87 ng/mL, pode haver prejuízos no metabolismo glicídico, enquanto para o metabolismo lipídico, a “zona cinza” estimada foi de 13,81 a 18,73 ng/mL. **Conclusão:** Nossa pesquisa confirma a forte correlação entre as variações nas concentrações médias de prolactina e dos exames do metabolismo glicídico e lipídico em humanos, sugerindo um papel mediador da prolactina na patogênese do metabolismo prejudicado da glicose e lipídios. A média histórica das concentrações de prolactina pode oferecer insights mais precisos para a compreensão da homeostase metabólica.

Palavras chaves: hipoprolactinemia; resistência à insulina; síndrome metabólica; hiperprolactinemia, aprendizados de máquina.

ABSTRACT

Introduction: Recently, a new "metabolic classification" was proposed for prolactin and based on it, hypoprolactinemia and hyperprolactinemia were defined as results approximately < 7 and > 100 ng/mL, respectively, and several metabolic diseases were associated with this range of results, however, the determination of the cutoff points that influence metabolism seem uncertain. **Objectives:** To investigate the possible correlation between prolactin concentration and glucose and lipid metabolism tests. To establish a "gray zone" representing the inflection points, associating the results of the glycemic and lipid metabolism tests with prolactin. As part of the study, a machine learning tool was created using R language to perform these analyses in an automated manner. **Methods:** A cross-sectional study was conducted with 65,795 laboratory results from adult patients of both sexes, collected in the first half of 2018 at the Sabin Laboratory. The data, extracted and anonymized from the Laboratory Information System, included lipid parameters (total cholesterol, HDL-c, LDL-c, triglycerides) and biochemical/hormonal (glucose, prolactin, insulin, HOMA-IR). The individual data were stratified into 106 partitions, based on the average concentrations of prolactin and metabolites of lipid and glycemic metabolism for each individual. These averages were used in three separate analyses: initially, they were used to compare the results of the glycemic and lipid metabolism tests within each range of the new metabolic classification of prolactin; then, they served in estimating the inflection point and its respective confidence interval, associating the results of the glycemic and lipid metabolism tests with prolactin concentrations, and in determining the corresponding "gray zones"; finally, they were used in predicting the average results of these glycemic and lipid metabolism tests based on the estimated inflection point. In addition, the individual prolactin results were used to compare prolactin concentrations between the sexes. **Results:** The analyzed population was aged between 21 and 75 years, composed of 51,366 women and 14,429 men. Hyperprolactinemia (prolactin concentrations greater than 25 ng/mL) was identified in 4,004 of the 51,366 women (7.79%) and in 208 of the 14,429 men (1.41%). Prolactin results were equivalent between sexes. The average results of the glycemic and lipid metabolism tests were significantly higher in the average prolactin result range < 7 ng/mL, with the exception of insulin. In the HomeoFIT-PRL range, the median and distribution of the average

results of the glycemic and lipid metabolism tests are predominantly lower compared to the other average prolactin result ranges. Below the "gray zone" represented by the average prolactin results between 9.58 and 12.87 ng/mL, there may be impairments in glycemic metabolism, while for lipid metabolism, the estimated "gray zone" was 13.81 to 18.73 ng/mL. **Conclusion:** Our research confirms the strong correlation between variations in average prolactin concentrations and tests of glycemic and lipid metabolism in humans, suggesting a mediating role of prolactin in the pathogenesis of impaired glucose and lipid metabolism. The historical average of prolactin concentrations may offer more precise insights for understanding metabolic homeostasis.

Keywords: hypoprolactinemia; insulin resistance; metabolic syndrome; hyperprolactinemia, machine learning.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Síntese e estrutura da prolactina livre (monomérica), big- prolactina e big-big-prolactina.....	26
Figura 2 – Representação esquemática do efeito gancho.....	27
Figura 3 – Diagramação do estudo de macroprolactina por meio da precipitação utilizando polietileno glicol (PEG).....	32
Figura 4 – As três principais vias de transdução de sinalização do PRLR: Jak2-Stat5, PI3K/Akt e Ras-Raf-MEK-ERK que são ativadas pela prolactina de maneira seletiva nas células.....	35
Figura 5 – Mecanismo de regulação inibitória por via dopaminérgica.....	38
Figura 6 – Regulação neuroendócrina do apetite e da saciedade.....	42
Figura 7 – Mecanismo do efeito da prolactina no metabolismo lipídico.....	45
Figura 8 – Ações gerais da prolactina no metabolismo lipídico.....	46
Figura 9 – Exemplo de um ciclo de validação de um modelo de <i>machine learning</i>	65
Figura 10 – <i>Trade-off</i> entre viés e variância no <i>machine learning</i>	67
Figura 11 – Fluxo do "Quarteto de Critérios de Significância".....	81
Figura 12 – Diretriz utilizada para avaliar a equivalências estatística e clínica dos resultados médios preditos pelo modelo de <i>machine learning</i>	87
Figura 13 – Relação entre p e a probabilidade de intervalos de confiança não sobrepostos sob a hipótese nula (erro tipo 1).....	90
Figura 14 – Diretriz utilizada para avaliar a equivalências estatística e clínica dos pontos de inflexão estimados pelo modelo de <i>machine learning</i> para prolactina.....	91
Figura 15 – Histograma dos resultados de prolactina.....	97
Figura 16 – Histograma dos resultados médios dos exames do perfil glicídico.....	99

Figura 17 – Gráfico violino de comparação múltipla dos resultados médios do exame de HOMA-IR nas diferentes faixas de concentração média de prolactina.....	103
Figura 18 – Gráficos de dispersão dos resultados médios de HOMA-IR e prolactina com as curvas de regressão.....	104
Figura 19 – Gráfico violino de comparação múltipla dos resultados médios do exame de glicose nas diferentes faixas de concentração média de prolactina.....	106
Figura 20 – Gráficos de dispersão dos resultados médios de glicose e prolactina com as curvas de regressão.....	107
Figura 21 – Gráfico violino de comparação múltipla dos resultados médios do exame de insulina nas diferentes faixas de concentração média de prolactina.....	109
Figura 22 – Gráficos de dispersão dos resultados médios de insulina e prolactina com as curvas de regressão.....	110
Figura 23 – Histograma dos resultados médios dos exames do metabolismo lipídico (colesterol total, LDL-c, HDL-c e triglicérideos).....	112
Figura 24 – Gráfico violino de comparação múltipla dos resultados médios do exame de colesterol total nas diferentes faixas de concentração média de prolactina.....	115
Figura 25 – Gráficos de dispersão dos resultados médios de colesterol total e prolactina com as curvas de regressão.....	116
Figura 26 – Gráfico violino de comparação múltipla dos resultados médios do exame de LDL-c nas diferentes faixas de concentração médias de prolactina.....	118
Figura 27 – Gráficos de dispersão dos resultados médios de HDL-c e prolactina com as curvas de regressão.....	119
Figura 28 – Gráfico violino de comparação múltipla dos resultados médios do exame de LDL-c nas diferentes faixas de concentração médias de prolactina.....	121
Figura 29 – Gráficos de dispersão dos resultados médios de LDL-c e prolactina com as curvas de regressão.....	122

Figura 30 – Gráfico violino de comparação múltipla dos resultados médios do exame de triglicérides nas diferentes faixas de concentração médias de prolactina.....	124
Figura 31 – Gráficos de dispersão dos resultados médios de triglicérides e prolactina com as curvas de regressão.....	125
Figura 32 – Pontos de inflexão e intervalos de confiança de 95% dos exames do metabolismo glicídico (cor preta) e lipídico (cor vermelha).....	133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Causas de hiperprolactinemia patológica.....	29
Tabela 2 – Classes de medicamentos que podem causar hiperprolactinemia.....	30
Tabela 3 – Principais causas de hipoprolactinemia.....	33
Tabela 4 – Critérios diagnóstico de síndrome metabólica baseado nas recomendações da NCEP-ATPIII.....	54
Tabela 5 – Diretrizes para interpretação dos resultados do coeficiente de assimetria.....	74
Tabela 6 – Diretrizes para interpretação dos resultados do coeficiente de curtose.....	74
Tabela 7 – Diretrizes para a interpretação do coeficiente de correlação de Pearson (r_{Pearson}).....	77
Tabela 8 – Diretrizes para a interpretação dos resultados do p-valor, r , ϵ^2 , VDA e bias analítico.....	80
Tabela 9 – Critérios de inclusão estabelecidos para que o exame seja incluído no estudo de comparação entre os pontos de inflexão da prolactina.....	88
Tabela 10 – Análise da significância estatística e clínica das diferenças dos resultados de prolactina entre os sexos nas diferentes faixas de concentração.....	95
Tabela 11 – Tamanho amostral em 106 partições para cálculo da Média dos resultados de prolactina e exames do metabolismo glicídico e lipídico.....	96
Tabela 12 – Avaliação das medidas de posição e dispersão para os exames da prolactina e do metabolismo da glicose, para as 106 partições da amostra.....	98
Tabela 13 – Parâmetros do metabolismos glicídico quantificados por faixa de prolactina.....	101

Tabela 14 – Análise da significância estatística e clínica das diferenças dos resultados médios de HOMA-IR nas diferentes faixas de concentração média de prolactina.....	103
Tabela 15 – Análise da significância estatística e clínica das diferenças dos resultados médios de glicose nas diferentes faixas de concentração média de prolactina.....	106
Tabela 16 – Análise da significância estatística e clínica das diferenças dos resultados médios de insulina nas diferentes faixas de concentração média de prolactina.....	109
Tabela 17 – Resultados médios com as principais medidas de posição e dispersão para os exames da prolactina e do metabolismo lipídico.....	111
Tabela 18 – Parâmetros do metabolismos glicídico quantificados por faixa de prolactina.....	113
Tabela 19 – Análise da significância estatística e clínica das diferenças dos resultados médios de colesterol total nas diferentes faixas de concentração média de prolactina.....	115
Tabela 20 – Análise da significância estatística e clínica das diferenças dos resultados médios de HDL-c nas diferentes faixas de concentração média de prolactina.....	118
Tabela 21 – Análise da significância estatística e clínica das diferenças dos resultados médios de LDL-c nas diferentes faixas de concentração média de prolactina.....	121
Tabela 22 – Análise da significância estatística e clínica das diferenças dos resultados médios de triglicérides nas diferentes faixas de concentração média de prolactina.....	124
Tabela 23 – Critérios utilizados para avaliar a relevância prática das diferenças nos resultados dos exames utilizados como resposta nas diferentes faixas de resultados de prolactina.....	126

Tabela 24 – Critérios utilizados para avaliar a relevância prática das diferenças nos resultados dos exames utilizados como resposta nas diferentes faixas de resultados de prolactina.....128

Tabela 25 – Verificação da equivalência clínica entre os resultados médios previstos pelo modelo de *machine learning* usando os métodos da Regressão Segmentada e o método MARS.....131

Tabela 26 – Verificação da equivalência clínica entre os pontos de inflexão da prolactina associados aos exames do metabolismo glicídico e lipídico.....134

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acetil-CoA carboxilase
AgRP	peptídios relacionados ao agouti
AMR	<i>Analytical Measurement Range</i>
ANOVA	Análise de Variância
APA	<i>American Psychological Association</i>
ARC	zona arqueada do hipotálamo
ASA	<i>American Statistical Association</i>
CAP	Colégio Americano de Patologistas
CCR	<i>Clinically Reportable Range</i>
CLIA	<i>Clinical Laboratory Improvement Amendments</i>
CVg	coeficiente de variação do grupo
CVi	coeficiente de variação individual
D2R	receptores D2 de dopamina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GH	hormônio do crescimento
H₀	hipótese nula
H₁	hipótese alternativa
HAMA	anticorpo monoclonal humano anti-camundongo
HDL-c	<i>High-Density Lipoprotein cholesterol</i>
HOMA-IR	<i>Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance</i>
HomeoFIT-PRL	<i>Homeostatic Functionally Increased Transient Prolactinemia</i>
IC	Intervalo de Confiança
I-DBSM	I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IGF1	fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IMC	índice de massa corporal
JAK2	<i>Janus family of tyrosine kinase</i> tipo 2
LDL-c	<i>Low-Density Lipoprotein cholesterol</i>
LPL	Lipase Lipoproteica
MAE	<i>mean absolute error</i>

MARS	Splines de Regressão Adaptativa Multivariada
NCEP-ATP III	<i>National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III</i>
NYP	Neuropeptídeo Y
OR	<i>Odds Ratio</i>
OT	ocitocina
PEG	polietilenoglicol
PIT-1	Fator de Transcrição Pituitário Específico
POMC	Pro-Opiomelanocortina
PRLR	receptores de prolactina
R²	Coeficiente de Determinação
RBP4	proteína de ligação ao retinol 4
RMSE	<i>root mean squared error</i>
r_{MW}	tamanho do efeito "r" do Teste Mann-Whitney
r_{Pearson}	Coeficiente de Correlação de Pearson
RR	<i>Reportable range</i>
RR	Risco Relativo
SOCS	<i>suppressors of cytokine-signaling</i>
STATs	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TDE	Tamanho do Efeito
TDE-LC	tamanho do efeito linguagem comum
TGFβ1	fator de crescimento transformador beta 1
TIDA	via tubero-infundibular da dopamina
TI-GABA	sistema tuberoinfundibular-GABA
TRH	hormônio liberador de tireotrofina
TSH	hormônio tireoestimulante
VDA	Tamanho do efeito linguagem pelo método Vargha e Delaney's A
VIP	peptídeo intestinal vasoativo
VLDL-c	<i>Very-Low-Density Lipoprotein cholesterol</i>
β-hCG	fração beta da gonadotrofina coriônica humana
ε²	Tamanho do Efeito Epsilon-quadrado
η²	Tamanho do Efeito Eta-quadrado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DA PROLACTINA	25
2.2. MÉTODOS DE DOSAGEM E ARMADILHAS LABORATORIAIS	26
2.3. LIMITES DE DECISÃO PARA PROLACTINA	34
2.4. RECEPTORES DA PROLACTINA	35
2.5. MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA PROLACTINA	37
2.5.1. Regulação Inibitória por via Dopaminérgica	37
2.5.2. Mecanismos Estimulatórios	39
2.6. EFEITOS METABÓLICOS DA PROLACTINA	41
2.6.1. Controle do Apetite e Adipogênese	41
2.6.2. Metabolismo Lipídico	46
2.6.3. Metabolismo da Glicose	51
2.6.4. Síndrome Metabólica	53
2.7. INTERFACE ENTRE BIOESTATÍSTICA E APRENDIZAGEM DE MÁQUINA APLICADA	55
2.7.1. Significância estatística e tamanho amostral	55
2.7.2. Intervalo de Confiança	58
2.7.3. Significância estatística <i>versus</i> Significância clínica	58
2.7.4. Tamanho do efeito linguagem comum	61
2.7.5. Modelo de regressão preditivo de aprendizado de máquina	61
2.7.6. Validação cruzada na avaliação de modelos	64
2.7.7. Métricas de avaliação dos modelos de regressão	65
2.7.8. Identificação dos modelos com sub-ajuste e sobre-ajuste	66
2.7.9. Modelos de aprendizado de máquina aplicado ao laboratório clínico	68
3. OBJETIVOS	71
4. MÉTODOS	72
4.1. SUJETOS E DESENHO DO ESTUDO	72
4.2. ANÁLISE LABORATORIAL	72
4.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS E MODELAGEM	73
4.3.1. Estatísticas descritiva	73
4.3.2. Avaliando os pressupostos de normalidade e homoscedasticidade	73
4.3.3. Estudo de comparação entre sexos e faixas de resultados de prolactina	75
4.3.3.1. Análise da significância estatística	75

4.3.3.2.	Análise da significância clínica	77
4.3.4.	Modelagem	81
4.3.4.1.	Regressão segmentada.....	83
4.3.4.2.	Wrapper de ensacamento para Splines de Regressão Adaptativa Multivariada.....	84
4.3.4.3.	Métricas de avaliação dos modelos.....	86
4.3.4.4.	Critérios adotados para a comparação entre os resultados médios previstos	87
4.3.4.5.	Critérios adotados para a comparação entre os pontos de inflexão estimados para a prolactina	88
4.3.5.	Softwares R, Rstudio e pacotes R.....	91
4.4.	ASPECTOS ÉTICOS.....	93
4.4.1.	Lei geral de proteção de dados.....	93
4.4.2.	Parecer de comitê de ética	93
5.	RESULTADOS	94
5.1.	AMOSTRAS DE PACIENTES.....	94
5.2.	CATEGORIZAÇÃO DAS FAIXAS DE CONCENTRAÇÃO DE PROLACTINA	94
5.3.	AVALIAÇÃO DO METABOLISMO GLICÍDICO.....	98
5.3.1.	Correlação e Comparação entre Prolactina e o índice HOMA-IR.....	102
5.3.2.	Correlação e Comparação entre Prolactina e a Glicose.....	105
5.3.3.	Correlação e Comparação entre Prolactina e a Insulina	108
5.4.	AVALIAÇÃO DO METABOLISMO LIPÍDICO	111
5.4.1.	Correlação e Comparação entre Prolactina e o Colesterol Total	114
5.4.2.	Correlação e Comparação entre Prolactina e o HDL-c.....	117
5.4.3.	Correlação e Comparação entre Prolactina e o LDL-c	120
5.4.4.	Correlação e Comparação entre Prolactina e o Triglicérides	123
5.5.	RESULTADOS PREDITIVOS DO MODELO DE <i>MACHINE LEARNING</i> E PONTOS DE INFLEXÃO ESTIMADOS PARA A PROLACTINA.....	126
5.5.1.	Desempenho do modelo e capacidade de generalização.....	126
5.5.2.	Comparação entre os resultados médios previstos pelo modelo de <i>machine leaning</i>	130
5.5.3.	Comparação entre os pontos de inflexão estimados para a prolactina e seus quartis com base no intervalo de confiança.....	132
6.	DISCUSSÃO	135
7.	CONCLUSÃO	144
	REFERÊNCIAS	145

APÊNDICE A – SCRIPT DE ANÁLISE COMPARATIVA E PREDIÇÃO PARA EXAMES DO METABÓLISMO GLICÍDICO E LIPÍDICO EM FUNÇÃO DO PONTO DE INFLEXÃO DA PROLACTINA	157
APÊNDICE B – <i>SCRIPTS</i> QUE EXECUTAM A ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS DE PROLACTINA ENTRE OS SEXOS E A COMPARAÇÃO ENTRE OS PONTOS DE INFLEXÃO DA PROLACTINA	158

1. INTRODUÇÃO

A prolactina é um hormônio proteico produzido pelos lactotrofos da hipófise anterior, cuja nomenclatura decorre de sua relevância no processo de lactação (1). A ação da prolactina é necessária para manter a homeostase metabólica, pois a ausência ou redução da sinalização hormonal, relacionada à falta de expressão de receptores de prolactina (PRLR), defeitos pós-receptor ou baixas concentrações de prolactina, associam-se a alterações metabólicas (2). A prolactina possui muitos alvos diferentes e funções pleiotrópicas na saúde e doença. O seu principal papel é estimular a proliferação e diferenciação das células mamárias necessárias para a lactação, mas estudos em modelos animais atribuíram mais de 300 ações distintas a esse hormônio em várias espécies (3), reclassificando-a como um hormônio circulante único com efeitos autócrinos, parácrinos e endócrinos (1).

A prolactina manifesta impactos biológicos multifacetados, que envolvem a osmorregulação, crescimento e desenvolvimento, imunidade, neurobiologia e comportamento, angiogênese e metabolismo. Em consonância com a diversidade funcional da prolactina, seus receptores apresentam distribuição ubíqua entre os tecidos e tipos celulares, e o hormônio circula ao longo da vida humana em concentração sérica semelhante entre os sexos (um pouco maior nas mulheres), embora exiba elevação acentuada na gravidez e lactação (3,4).

O diagnóstico laboratorial envolve grande complexidade e resulta da interação entre os procedimentos, equipamentos, tecnologia e conhecimento humano. Cabe ao laboratório assegurar resultados confiáveis, com perfeita validação das fases pré-analítica, analítica e pos-analítica. Dentre os estudos necessários para a validação e verificação de métodos na fase analítica, tanto os regulamentos das emendas de melhoria de laboratórios clínicos de 1988 (CLIA, do inglês *Clinical Laboratory Improvement Amendments*) quanto as listas de verificação do Programa de Credenciamento de Laboratórios do Colégio Americano de Patologistas (CAP) exigem que os laboratórios clínicos verifiquem a veracidade, precisão, o intervalo de referência, calibração, linearidade, intervalo de medição analítica (AMR, do inglês *Analytical Measurement Range*) e os limites de decisão médica. O AMR é definido como a faixa de valores do mensurando que um método pode medir diretamente na amostra sem qualquer diluição, concentração ou outros pré-tratamentos que não

façam parte do processo de ensaio usual. O conceito de “Intervalo Reportável” (RR, do inglês *Reportable range*) proposta pela CLIA é semelhante ao conceito de “Intervalo Clinicamente Reportável” (CCR, do inglês *Clinically Reportable Range*) proposto pelo CAP. A CLIA define o RR como “o intervalo de valores de resultado de teste sobre o qual o laboratório pode estabelecer ou verificar a exatidão da resposta de medição do instrumento ou sistema de teste”. O CCR se refere a uma ampla gama de resultados de mensurandos, incluindo aqueles obtidos através da diluição ou concentração de uma amostra do paciente, e deve ser aplicado quando as concentrações dos mensurandos ultrapassam a AMR, cabendo a cada laboratório verificar a diluição máxima permitida, de modo a cobrir essa faixa sem comprometer a exatidão do ensaio e respeitando os protocolos de diluição do fabricante. A definição do CCR depende da decisão clínica com impacto na saúde do paciente (5,6).

O método mais utilizado para determinação da concentração de prolactina é o imunoensaio por quimioluminescência e as concentrações séricas normais variam entre 15 e 20 ng/mL em homens e 20 e 25 ng/mL em mulheres, com valores médios de aproximadamente 9,9 ng/mL em mulheres e $\pm 8,4$ ng/mL em homens (2). Valores entre 1 e 25 ng/mL são considerados normais e > 25 ng/mL classificados como hiperprolactinemia (2,4).

Recentemente uma nova classificação foi proposta, com base nos achados obtidos de estudos que associaram resultados de prolactina com doenças metabólicas e foi denominada de “classificação metabólica” (4). Com base nessa nova classificação, a hipoprolactinemia e hiperprolactinemia foram redefinidas como resultados <7 ng/mL e maiores do que ≈ 100 ng/mL, respectivamente, e foram associadas a várias doenças metabólicas, porém não se sabe ao certo se existe uma relação causa-efeito entre esses desfechos e os resultados de prolactina sérica. Esses estudos associam hipoprolactinemia e hiperprolactinemia com resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólica, obesidade, intolerância à glicose e doença hepática gordurosa não alcoólica (4,7). Nessa nova classificação, considera-se normoprolactinemia resultados de prolactina ≥ 7 e < 25 ng/mL e uma nova faixa denominada como “Prolactinemia Transitória com Aumento Funcional Homeostático” (HomeoFIT-PRL, do inglês *Homeostatic Functionally Increased*

Transient Prolactinemia) para resultados entre 25 e \approx 100 ng/mL, correspondendo a um aumento transitório de prolactina sem condição patológica associada (4).

Os artigos recentes de Macotela *et al.* (2,4) compilam os achados de diferentes estudos que sugerem melhora no índice de massa corporal (IMC), colesterol total, colesterol lipoproteína de baixa densidade (LDL-c, do inglês *Low-Density Lipoprotein cholesterol*), colesterol lipoproteína de alta densidade (HDL-c, do inglês *High-Density Lipoprotein cholesterol*) e do índice baseado no modelo homeostático de avaliação da resistência à insulina (HOMA-IR, do inglês *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*) após o tratamento de normalização da prolactina, na faixa denominada HomeoFIT-PRL, contudo os resultados ainda são inconsistentes. As concentrações moderadamente elevadas de prolactina (16 a 35 ng/mL) associam-se com menor prevalência e redução da incidência de diabetes mellitus tipo 2 em 10 anos. Pacientes com sobrepeso e obesidade com concentrações elevadas de prolactina apresentam melhores perfis metabólicos do que pacientes com IMC compatível e valores mais baixos de prolactina (2). Contudo, na faixa de resultados classificados como hiperprolactinemia, foi relatado comprometimento da biossíntese de apolipoproteínas, aumento do colesterol total, LDL-c e triglicérides e diminuição da HDL-c juntamente com porcentagens de gordura corporal mais altas (7).

Um estudo de revisão sistemática e metanálise conduzido por Faria de Castro *et al.* (8) investigou a possível associação entre as concentrações séricas de prolactina e o risco de diabetes mellitus tipo 2 em homens e mulheres. A análise dos dados mostrou que os indivíduos com concentrações elevadas de prolactina no quarto quartil da faixa fisiológica tiveram um risco reduzido de diabetes mellitus tipo 2 prevalente quando comparados com aqueles no primeiro quartil. No entanto, é importante ressaltar que não foi estabelecida uma relação causal entre as concentrações de prolactina e o diabetes mellitus tipo 2, sendo necessário conduzir mais estudos para entender se as concentrações de prolactina estão relacionadas à doença metabólica ou se são apenas um marcador da doença. A compreensão desses mecanismos é importante para orientar a discussão sobre o controle de pacientes com hiperprolactinemia que estão sendo tratados com agonistas dopaminérgicos e para o desenvolvimento de possíveis terapias baseadas na sinalização de prolactina para tratar o diabetes mellitus tipo 2 a longo prazo.

Levando em conta a aplicação clínica e a correlação entre a concentração de prolactina e o estado metabólico dos pacientes, seria de grande relevância clínica dispor de laudos laboratoriais que informem os quartis de prolactina com base em dados históricos. Esta prática poderia superar as limitações associadas à interpretação dos resultados, que são frequentemente afetadas por variações interlaboratoriais decorrentes de métodos distintos, procedimentos de medição e calibração. Nessa nova proposta, o primeiro quartil seria indicativo de risco metabólico, enquanto o quarto quartil e a faixa HomeoFIT-PRL seriam considerados como protetores, ou seja, metabolicamente benéficos. Essa abordagem seria uma forma de utilizar limites de decisão médica associados à manutenção da homeostase metabólica em detrimento do intervalo de referência para a prolactina (4).

Atualmente, as técnicas de aprendizado de máquina ou *machine learning* e análise de dados estão sendo utilizados para diversas aplicações, como detecção de anomalias, classificação de texto, segmentação de imagens e previsão de séries temporais. Um dos campos em que o *machine learning* se tornou extremamente popular recentemente é a medicina (9). O *machine learning* é capaz de alavancar grandes quantidades de dados para inferir padrões complexos que estão além das capacidades de sistemas baseados em regras e especialistas humanos. (10).

Dessa forma, o emprego de abordagens de *machine learning* na medicina laboratorial apresenta-se como uma perspectiva empolgante, e a utilização dessas técnicas para determinar o limite de decisão (ou valor de corte) de prolactina sérica relacionados a desequilíbrios na homeostase metabólica pode oferecer informações valiosas para a tomada de decisão médica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DA PROLACTINA

A prolactina é hormônio polipeptídico sintetizado e secretado pelos lactotrofos presentes na hipófise anterior (adeno-hipófise). Os lactotrofos correspondem a cerca de 15 a 25% da população celular da adeno-hipófise. Essas células originadas da família mamó-somatotrófica, sofrem diferenciação sob efeito de fatores de transcrição como o Fator de Transcrição Pituitário Específico (PIT-1). A produção extra-hipofisária pode ocorrer em tecidos como gônadas, endométrio, próstata, tecido adiposo, timo, células hematopoéticas, com funções endócrina e parácrina que despertam curiosidade e ainda não são totalmente conhecidas (4,11,12).

A síntese e secreção de prolactina é codificada por um gene localizado em seres humanos no cromossomo 6. A prolactina contém 199 aminoácidos e tem três pontes dissulfeto intramoleculares (13-15).

A prolactina circula no sangue sob diferentes isoformas (Figura 1): prolactina monomérica (23 kDa): referida como prolactina pequena; prolactina dimérica (40 a 60 kDa): referida como *big* prolactina; Formas poliméricas de prolactina (> 100 kDa): referida como *big-big* prolactina ou macroprolactina. A forma monomérica é considerada a predominante e a mais bioativa das diferentes formas encontradas na circulação. As demais isoformas, são decorrentes de *splicing* alternativo do transcrito primário, de clivagem proteolítica ou de modificações pós-translacionais da cadeia de aminoácidos da prolactina como dimerização e polimerização, fosforilação, glicosilação, sulfatação e deaminação (10,15). As isoformas de alto peso molecular resultam da dimerização e polimerização ou ainda da agregação com proteínas de ligação como imunoglobulinas. A forma agregada de prolactina com seu auto-anticorpo (IgG) promove a formação de uma isoforma de mais de 100 kDa, mais conhecida como macroprolactina, sendo uma forma biologicamente pouco ativa. As variantes têm diferentes ligações ao receptor e bioatividade distinta (Figura 1) (15,16).

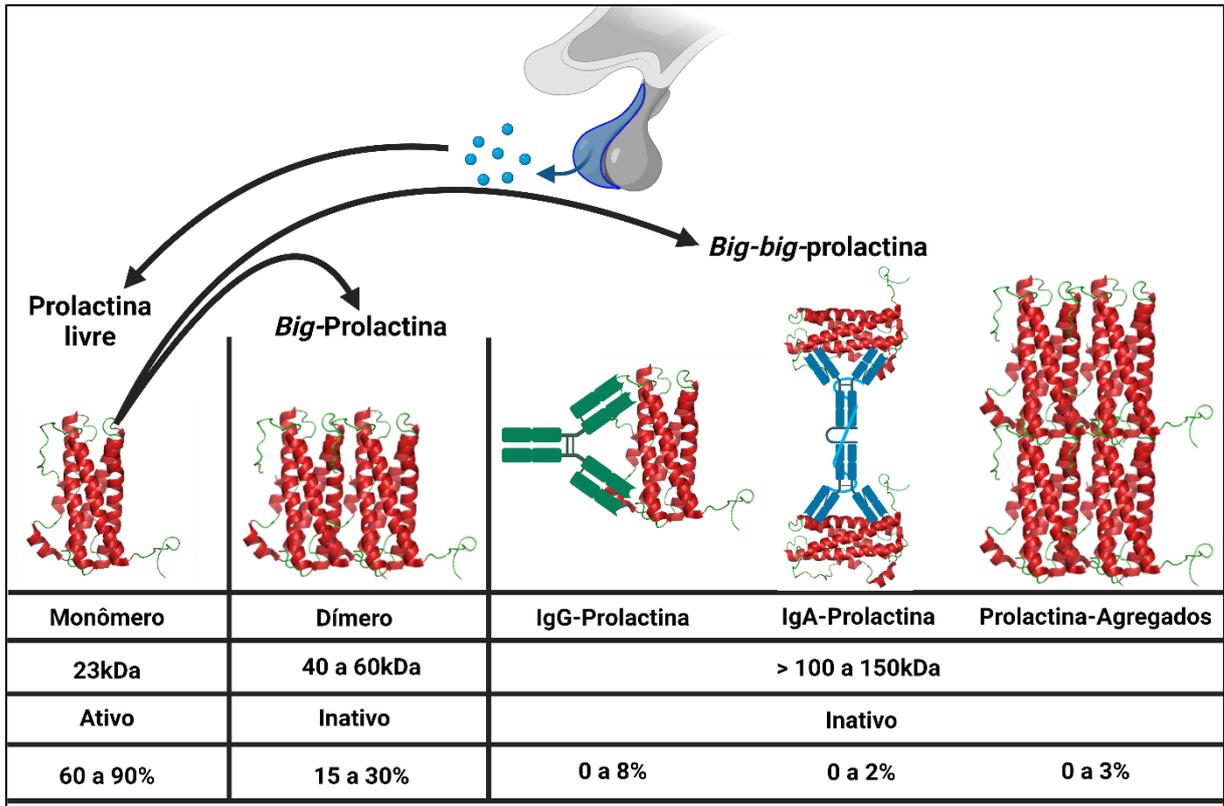


Figura 1 – Síntese e estrutura da prolactina livre (monomérica), big- prolactina e big-big- prolactina. Fonte: Adaptada da referência (17).

2.2.MÉTODOS DE DOSAGEM E ARMADILHAS LABORATORIAIS

As concentrações de prolactina sérica são comumente medidas em laboratórios clínicos por meio de métodos automatizados de imunoensaio. Os imunoensaios atuais tipicamente empregam um princípio imunométrico ou de sanduíche de dois sítios, pelo qual a prolactina pode reagir tanto com um anticorpo de captura, que é frequentemente imobilizado em uma fase sólida, quanto com um anticorpo marcado que é usado para detecção. Após a captura do sanduíche analito-anticorpo e a remoção dos reagentes não reagidos por uma etapa de lavagem, o sinal gerado está diretamente relacionado à quantidade de prolactina presente. Embora os ensaios para concentrações séricas de prolactina apresentem boa reprodutibilidade e exatidão intra-método em uma ampla faixa de concentração, é importante ressaltar que existem limitações quanto à harmonização dos resultados entre métodos. Essas diferenças analíticas podem ser observadas em programas externos de garantia de qualidade, e há variação na reatividade dos anticorpos do ensaio em relação às diferentes

isoformas da prolactina. Dessa forma, é fundamental lembrar que os intervalos de referência dependem do método utilizado e variam consideravelmente (15,18).

A detecção de hormônios usando ensaios de imunoenensaio monoclonal "sanduíche" de dois sítios pode apresentar uma armadilha chamada "efeito gancho" (Figura 2). Isso ocorre quando a concentração do hormônio é muito alta ou a quantidade de anticorpos no kit é baixa. O excesso de hormônio satura os anticorpos de captura e de sinalização, impedindo a formação de "sanduíches". O resultado é uma concentração baixa ou levemente elevada do hormônio detectado. Essa limitação ocorre quando a curva de ligação excede a capacidade dos componentes do ensaio. Em casos de prolactinoma com altas concentrações de prolactina, um falso relato de concentração levemente elevada pode levar a um diagnóstico errôneo de tumor hipofisário não funcionante e à indicação de cirurgia desnecessária, em vez de prescrição de agonistas de dopamina (18-20).

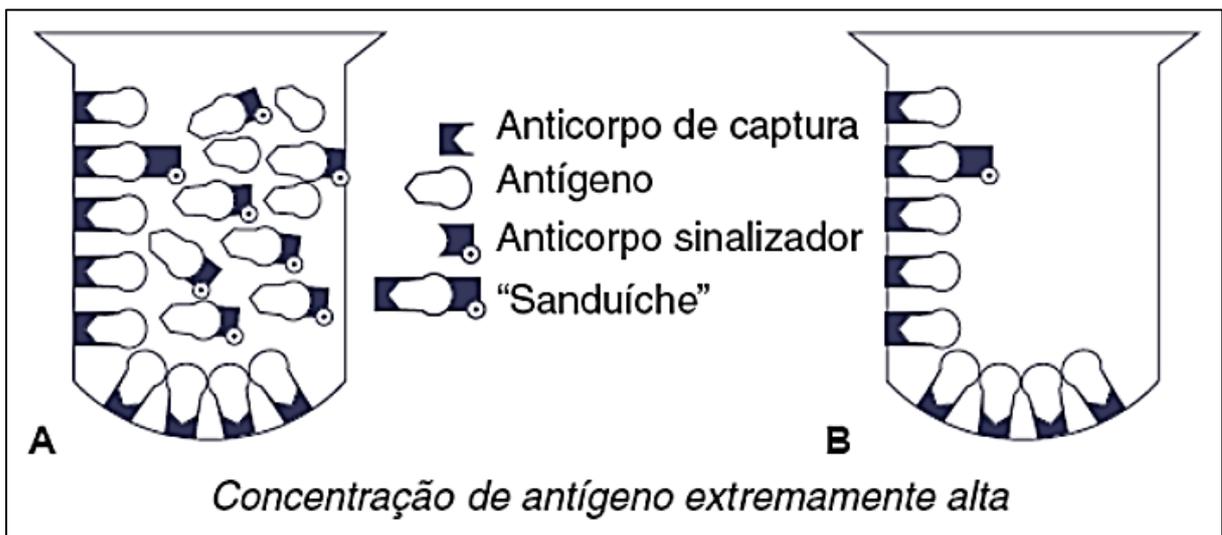


Figura 2 – Representação esquemática do efeito gancho. (A) A concentração extremamente alta de antígeno satura ambos os anticorpos de captura e sinalizadores, impedindo a formação do "sanduíche". (B) Quando a fase líquida é liberada, a maior parte do antígeno é perdida com o anticorpo sinalizador; por isso, a concentração do antígeno (no caso, a prolactina) é medida como baixa. Fonte: Adaptada da referência (20).

Um outro ponto de atenção relevante nas armadilhas clínico-laboratoriais são as hiperprolactinemias patológica, fisiológica e analítica (15).

Para a correta identificação da etiologia da hiperprolactinemia, alguns parâmetros devem ser levados em consideração: história médica, exame físico,

características clínicas, achados laboratoriais (especialmente concentrações séricas de prolactina) e estudos de imagem da hipófise e sela túrcica (19).

Considerando a diversas causas de hiperprolactinemia patológica (Tabela 1), frente a uma hiperprolactinemia é importante que sejam solicitados outros exames laboratoriais além da prolactina. A dosagem das concentrações séricas do hormônio tireoestimulante (TSH), T4 livre e creatinina são úteis para descartar causas secundárias de hiperprolactinemia. Elevação da prolactina é encontrada em cerca de um terço dos casos de acromegalia, seja por compressão da haste ou co-secreção de hormônio do crescimento (GH) e prolactina. Portanto, dosagem de fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1) está indicada em todos os pacientes com adenoma hipofisário, mesmo na ausência de manifestações típicas da acromegalia. Por fim, a dosagem da fração beta da gonadotrofina coriônica humana (β -hCG) é obrigatória em qualquer mulher em idade reprodutiva com amenorréia (19,20).

A hiperprolactinemia fisiológica é caracterizada pelo aumento acentuado de prolactina, que ocorre durante a gravidez e a lactação, bem como em situações como dietas ricas em proteínas, estresse, sono, exercícios físicos, hipoglicemia ou relação sexual. Geralmente, as concentrações de prolactina nessas circunstâncias não excedem 47,1 ng/mL. (4,15).

A prolactina é secretada de forma pulsátil e as concentrações séricas diurnas podem variar muito, com concentrações mais elevadas durante o sono, pico matinal e declínio gradual após o despertar, porém sem um ritmo circadiano típico. Em condições normais, aproximadamente 50% da produção diária total de prolactina ocorre durante o período de sono. Assim, as amostras devem ser coletadas até 3 horas após o despertar, preferencialmente em jejum (19).

A causa mais comum de hiperprolactinemia não fisiológica é a hiperprolactinemia secundária ao uso de drogas, que atuam por diferentes mecanismos: aumento da transcrição do gene prolactina (por exemplo, estrogênios), antagonismo do receptor de dopamina (por exemplo, risperidona, haloperidol, metoclopramida, domperidona, sulpirida, etc.) , depleção de dopamina (reserpina, metildopa), inibição da produção hipotalâmica de dopamina (por exemplo, verapamil,

heroína, morfina, análogos de encefalina, etc.), inibição da recaptação de dopamina (por exemplo, antidepressivos tricíclicos, cocaína, anfetamina, inibidores da monoamina oxidase), inibição da recaptação de serotonina (por exemplo, opiáceos, fenfluramina, fluoxetina, sibutramina), etc (19). Esse tipo de hiperprolactinemia pode resultar em aumentos de até dez vezes em relação às concentrações basais (Tabela 2) (15).

Tabela 1 – Causas de hiperprolactinemia patológica.

Grupo	Exemplos de patologias
Doenças sistêmicas	Hipotireoidismo primário, insuficiência adrenal, insuficiência renal, cirrose, pseudocirose, convulsões epiléticas.
Doenças hipotalâmicas	Tumores (craniofaringiomas, disgerminomas, meningiomas, etc.), distúrbios infiltrativos (histiocitose, sarcoidose, etc.), metástase, radiação craniana, cistos de fenda de Rathke, etc.
Doenças da hipófise	Prolactinomas; acromegalia, tireotropinomas, doença de Cushing, distúrbios infiltrativos, metástase, hipofisite linfocítica, síndrome da sela vazia, etc.
Distúrbios da haste	Hastite, secção cirúrgica, traumatismo craniano.
Neurogênica	Lesões da parede torácica (queimaduras, cirurgia de mama, toracotomia, anéis mamilares, herpes zoster, etc.), lesão medular (ependimoma cervical, tabes dorsalis, tumores extrínsecos, etc.), estimulação mamária, etc.
Idiopática	Metoclopramida, domperidona, bromoprida.
Produção ectópica de prolactina	Carcinoma de células renais, teratomas ovarianos, gonadoblastoma, linfoma não-Hodgkin, carcinoma cervical uterino, adenocarcinoma colorretal, etc.).

Fonte: Adaptada das referências (15,19,20).

Tabela 2 – Classes de medicamentos que podem causar hiperprolactinemia.

Classes	Fármacos/drogas
Antipsicóticos de 1ª Geração	Clorpromazina, flufenazina, haloperidol.
Antipsicóticos de 2ª Geração	Paliperidona, risperidona, quetiapina, amisulprida.
Antidepressivos	Tricíclicos: amoxapina, amitriptilina, desipramina, clomipramina.
	Inibidores da recaptção de serotonina e norepinefrina: venlafaxina, duloxetina, reboxetina.
	Inibidores seletivos de recaptção de serotonina: fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina, citalopram, escitalopram, sertralina.
	Inibidores da Monoaminoxidase: Pargilina, Clorgilina.
Anticonvulsivantes	Fenitoína.
antihipertensivos	Verapamil, ametildopa, reserpina, labetalol (intravenoso).
Antieméticos/Procinéticos	Metoclopramida, domperidona, cisaprida, alizaprida, metopimazina.
Bloqueadores dos receptores H2	Cimetidina, ranitidina
Outros	Estrógenos, anestésicos, quimioterápicos, opiáceos (p. ex., tramadol, metadona, morfina, heroína, etc.), alprazolam, cocaína, maconha, uso abusivo de álcool, etc.

Fonte: Adaptada das referências (15,19).

O estresse de várias origens - seja psicológico, induzido por exercício ou decorrente de outra doença aguda - provoca um aumento fisiológico na concentração de prolactina. No entanto, ao contrário do que se acreditava anteriormente, o repouso em decúbito dorsal antes da coleta não é essencial. Embora o estresse proveniente da punção venosa possa causar uma ligeira elevação da concentração de prolactina, geralmente abaixo de 40-60 ng/mL, e a estimulação mamária possa ter efeito similar, é importante destacar que a prolactina é secretada de forma episódica. Por isso, suas concentrações medidas ao longo do dia podem exceder o limite superior de “normalidade” para um dado laboratório em indivíduos saudáveis. Conforme uma revisão recente de Vilar *et al.* (19), que se baseia em dados literários publicados e na experiência dos autores do Departamento de Neuroendocrinologia da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia, é sugerido que um aumento na concentração de prolactina seja confirmado pelo menos uma vez. Isso é

especialmente verdadeiro, exceto quando as concentrações de prolactina estiverem notavelmente elevados (> 80-100 ng/mL). Também é recomendado que se evitem exercícios vigorosos e estimulação do mamilo por pelo menos 30 minutos antes da verificação das concentrações de prolactina, já que essas atividades podem causar um aumento desse hormônio.

As causas da hiperprolactinemia analítica, que são resultados falsamente elevados da prolactina, incluem macroprolactinemia e interferência analítica por anticorpo monoclonal humano anti-camundongo (HAMA) ou anticorpos heterofilos (reações cruzadas) (15).

Além disso, a triagem para macroprolactinemia deve ser frequentemente considerada, particularmente em casos de hiperprolactinemia assintomática (19). A macroprolactinemia está presente em 3,7% da população geral e em 10-25% em pacientes com resultados elevados de prolactina. Conforme discutido acima, a macroprolactinemia é caracterizada pela presença de uma massa molecular de prolactina superior a 100 kDa como a forma molecular predominante da prolactina circulante. A macroprolactina é principalmente um complexo de prolactina com IgG, especialmente autoanticorpos antiprolactina. Os autoanticorpos antiprolactina ligam-se à prolactina monomérica formando um grande complexo imune de prolactina com IgG. A depuração retardada deste complexo aumenta as concentrações séricas de prolactina medidas. Pacientes com macroprolactinemia geralmente não apresentam sintomas clínicos típicos de hiperprolactinemia, pois essa forma é biologicamente inativa. A macroprolactinemia pode levar a dilemas clínicos devido a interpretações errôneas de testes bioquímicos, levando a investigações e intervenções que não são apenas desnecessárias, mas caras e podem causar danos. As diretrizes atuais de melhores práticas aconselham que, no caso de soros com prolactina elevada, seja efetuado o subfracionamento utilizando precipitação de polietilenoglicol (PEG). Isso permite indicar a possível presença ou ausência de macroprolactina (15,17,20,21).

O método “padrão-ouro” para diagnosticar a macroprolactinemia é a cromatografia em gel de filtração. Entretanto, essa técnica é complexa, demorada e onerosa, sendo limitada a laboratórios especializados e casos específicos. A técnica de triagem mais utilizada, devido à sua simplicidade, reprodutibilidade e correlação com o método padrão, é a precipitação com PEG. O PEG consegue precipitar

moléculas grandes, como a macroprolactina, deixando a prolactina monomérica no sobrenadante. Valores de recuperação inferiores a 40% indicam prevalência de macroprolactina, enquanto valores superiores a 60% sugerem o diagnóstico de hiperprolactinemia monomérica (Figura 3). A precipitação com PEG possibilita determinar a condição em 85% dos casos. É crucial considerar a possibilidade de coexistência de macroprolactinemia e hiperprolactinemia monomérica. Esta última situação deve ser levantada quando as concentrações de prolactina continuam elevadas, mesmo após recuperação de prolactina inferior a 40% com a precipitação utilizando PEG (20).

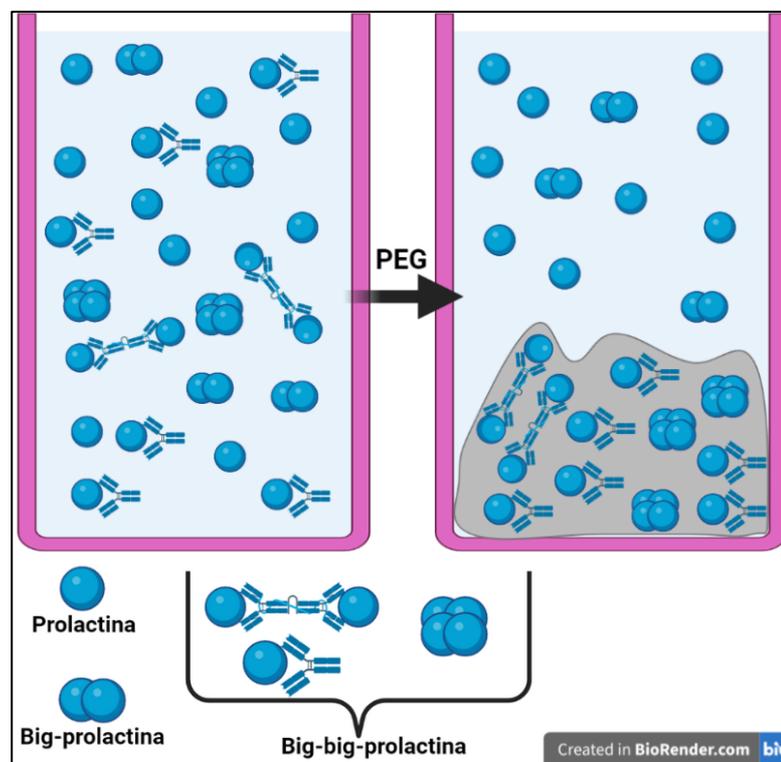


Figura 3 – Diagramação do estudo de macroprolactina por meio da precipitação utilizando polietileno glicol (PEG). Fonte: Elaborada pelo autor.

A reação cruzada é uma das armadilhas laboratoriais que podem ocorrer nos ensaios de prolactina, que utilizam anticorpos direcionados a dois epítomos diferentes na molécula de prolactina para minimizar a reatividade cruzada com outras moléculas estruturalmente relacionadas, como GH e lactogênio placentário. Entretanto, todos os ensaios imunométricos são suscetíveis à interferência de anticorpos heterofílicos, o que pode levar a resultados falsamente elevados e, conseqüentemente, a investigações e intervenções desnecessárias e à ansiedade do paciente. Embora os fabricantes adicionem "agentes bloqueadores" para minimizar essa interferência, a

interferência de anticorpos heterófilos é incomum e os problemas de ensaio com macroprolactina são mais prevalentes. É importante notar que, como em qualquer ensaio imunométrico, a prolactina pode ser suscetível ao efeito gancho de alta dose, o que pode causar subestimação grosseira da prolactina e levar a uma possível falta de diagnóstico de prolactinomas (15).

A deficiência de prolactina pode ser atribuída a diversas causas (Tabela 3), todas relacionadas a distúrbios nas células lactotróficas da hipófise, que dificultam a secreção fisiológica desse hormônio, especialmente durante a gravidez e a lactação, ou ao uso de medicamentos como agonistas dopaminérgicos, que inibem sua liberação. Além disso, algumas deficiências de prolactina decorrem de anormalidades genéticas, como mutações de perda de função em POU1F1, PROP1, LHX3, LHX4, HESX1, OTX2 e IGSF1, que interferem no desenvolvimento normal da linhagem de células lactotróficas da hipófise e de outras linhagens da hipófise anterior, como células somatotróficas e tireotróficas. Essa interferência justifica a ocorrência de deficiências de outros hormônios hipofisários, que frequentemente acompanham a deficiência de prolactina (3).

Tabela 3 – Principais causas de hipoprolactinemia.

Medicamentos (Agonistas da dopamina)	Cabergolina, bromocriptina, quinagolida e pergolida.
Destrução do tecido hipofisário	Necrose hipofisária isquêmica (Síndrome de Sheehan); Inflamação ou hipofisite (ou dano lactotrófico autoimune); Tumor ou cirurgia; Infecção (tuberculose).
Desenvolvimento anormal de células lactotróficas (Causas genéticas)	Mutações de perda de função POU1F1, PROP1, LHX3, LHX4, HESX1, OTX2 e IGSF1.
Pseudohipoparatiroidismo	
Deficiência idiopática de prolactina	

Fonte: Adaptada da referência (3).

Drogas que agem como agonistas de dopamina, ativando os receptores D2 de dopamina (D2R), são frequentemente empregadas na prática clínica para tratar

hiperprolactinemia induzida por tumor (prolactinomas). Em alguns pacientes, o uso prolongado desses medicamentos - que incluem a cabergolina, bromocriptina, quinagolida e pergolida - pode resultar em uma redução significativa na concentração de prolactina (3).

2.3. LIMITES DE DECISÃO PARA PROLACTINA

Tradicionalmente, as concentrações séricas de prolactina entre 1 e 25 ng/mL são categorizadas como 'normais', enquanto as concentrações superiores a 25 ng/mL são consideradas indicativas de hiperprolactinemia. No entanto, uma nova proposta de "classificação metabólica" introduziu o conceito de quatro faixas distintas: hipoprolactinemia (menos de 7 ng/mL), normoprolactinemia (entre 7 e 25 ng/mL), a zona 'HomeoFIT-PRL' (entre 25 e \approx 100 ng/mL) e hiperprolactinemia (mais de \approx 100 ng/mL) (2-4).

Em vista da nova abordagem da "classificação metabólica", percebe-se que a faixa de hipoprolactinemia está associada a um comprometimento metabólico, com estudos indicando uma conexão com diabetes mellitus tipo 2, obesidade, síndrome metabólica e resistência à insulina. Por outro lado, na faixa de normoprolactinemia, valores que oscilam entre 7 e 15 ng/mL estão vinculados à manutenção da homeostase metabólica, enquanto valores entre 15 e 25 ng/mL parecem conferir benefícios metabólicos (2-4).

A faixa denominada de HomeoFIT-PRL, fora da gravidez e lactação, pode ocorrer em resposta a estímulos transitórios, como hipoglicemia induzida por insulina, estresse, excitação sexual, exercícios intensivos, picos circadianos. Acredita-se que nessas concentrações existem benefícios para a homeostase metabólica e, na ausência de causas patológicas, pode representar uma resposta fisiológica a um aumento da demanda metabólica (2-4).

A faixa de hiperprolactinemia nessa nova abordagem contempla os casos associados a patologias como prolactinoma, hipotireoidismo, disfunção hepática, entre outras, e ao uso de medicamentos como antipsicóticos, antidepressivos, procinéticos e estrogênios. Há estudos que correlacionam a hiperprolactinemia, seja

patológica ou medicamentosa, com condições como obesidade, intolerância à glicose, síndrome metabólica e resistência à insulina. Vale ressaltar que a hiperprolactinemia fisiológica, que ocorre durante a gravidez e lactação, é uma resposta não prejudicial e, portanto, não se enquadra nessa classificação metabólica (2,4,7).

2.4. RECEPTORES DA PROLACTINA

A prolactina atua por meio do receptor PRLR, pertencente ao grupo da superfamília dos receptores de citocina tipo I, um grupo de proteínas transmembrana com uma porção extracelular e intracelular cuja principal via de sinalização é o sistema JAK2-STAT5, embora também seja capaz de iniciar outras cascatas de sinalização, como por exemplo, as vias Ras-Raf-MEK-ERK e PI3K/Akt (Figura 4). O gene responsável por codificar o PRLR é localizado em seres humanos no cromossomo 5 (22-29).

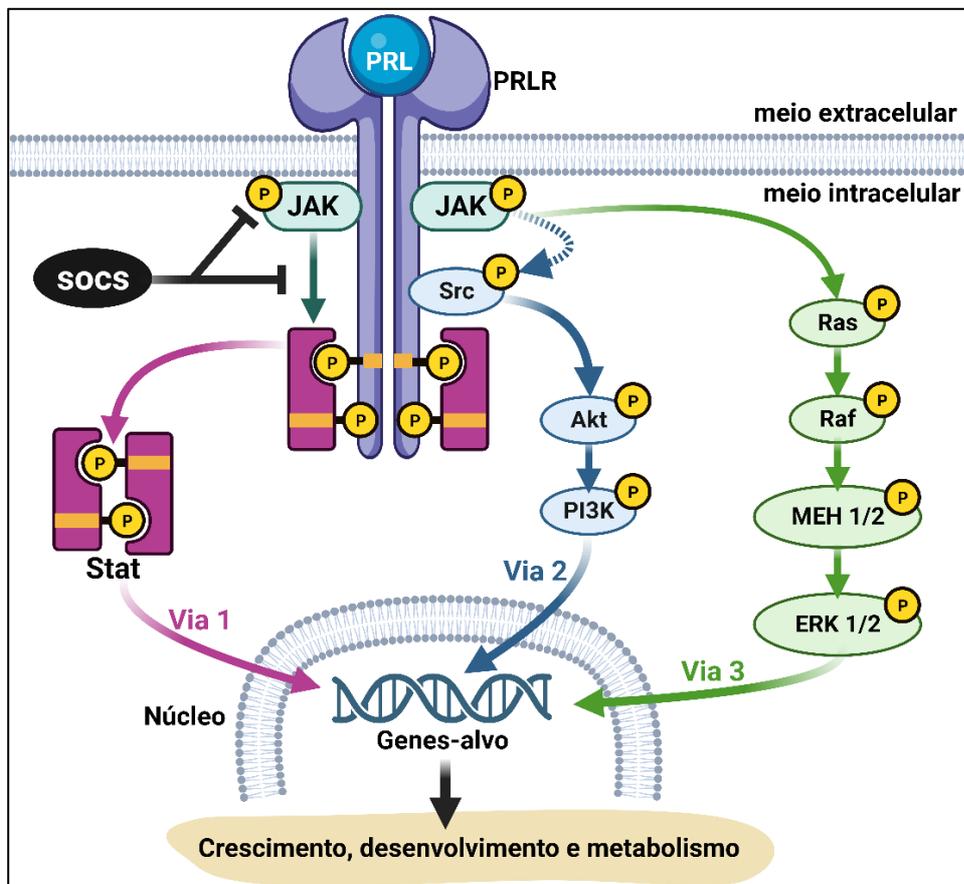


Figura 4 – As três principais vias de transdução de sinalização do PRLR são: Jak2-Stat5, PI3K/Akt e Ras-Raf-MEK-ERK que são ativadas pela prolactina de maneira seletiva nas células. PRL: prolactina; PRLR: receptor de prolactina. Adaptada das referências (28,29).

Quando uma molécula de prolactina se liga a duas moléculas do receptor, ocorre a dimerização deste. Isso ativa uma proteína da família *Janus kinase*, especificamente, a *Janus family of tyrosine kinase* tipo 2 (JAK2), que então fosforila tanto o próprio receptor quanto diversas tirosinas presentes nele. A fosforilação das tirosinas no complexo receptor-JAK2 gera sítios de ligação para proteínas sinalizadoras, dentre as quais as pertencentes à família de proteínas transdutoras de sinal e ativadoras da transcrição (STATs, do inglês *signal transducers and activators of transcription*), especificamente, as STATs tipos 1 a 5. Após essa fosforilação, as STATs se dissociam do complexo receptor-JAK2 e podem formar homodímeros ou heterodímeros com outras STATs. Em seguida, elas se deslocam para o núcleo da célula, onde ativam a transcrição gênica (23,26).

A ativação da cascata de sinalização da prolactina via JAK-STAT resulta na expressão de genes que regulam uma ampla variedade de processos celulares, incluindo a proliferação celular, a sobrevivência celular e a diferenciação celular. A desativação precisa do sistema JAK-STAT é crucial, uma vez que a ativação contínua desse sistema tem sido associada à transformação celular (23,26).

A via Ras-Raf-MEK-ERK é ativada pela prolactina em muitas células. A fosforilação de Jak2 pode recrutar proteínas adaptadoras como Shc, Grb2 e SOS para o PRLR, resultando na ligação e ativação de Ras e Raf. Isso leva à ativação da via MAP quinase, que é frequentemente associada ao aumento da proliferação celular. A ativação do PRLR também facilita o encaixe das quinases da família Src, que por sua vez ativa a via PI3K/Akt que medeia algumas das ações antiapoptóticas e metabólicas do prolactina (28).

Tanto a força quanto a duração da sinalização induzida por prolactina são reguladas por membros das proteínas supressoras de sinalização de citocinas (SOCS, do inglês *suppressors of cytokine-signaling*), cuja expressão é rapidamente induzida após a ativação do receptor. Portanto, para garantir essa desativação, ocorre a degradação dos receptores, a defosforilação das tirosinas presentes nos complexos receptor-JAK2 e a síntese de proteínas SOCS (20-25). As proteínas SOCS interagem com o PRLR ou com Jak2 e inibem a ativação de sinal adicional. Em suma, a transdução de sinal ativada pelo PRLR não representa uma progressão linear, mas

envolve várias vias de interação que diferem em predominância entre as várias células que expressam PRLR (28).

A ampla distribuição de receptores pelo organismo está relacionada ao fato de que mais de 300 ações de prolactina foram relatadas em vários vertebrados. As ações metabólicas benéficas do prolactina, que favorecem o metabolismo, resultam de sua ação pleiotrópica (efeitos autócrinos, parácrinos e endócrinos), que é refletida pela presença do PRLR em quase todos os tecidos do corpo, incluindo os principais órgãos metabólicos, como o pâncreas, o fígado, o tecido adiposo, o músculo, o intestino e o hipotálamo. Vários estudos descreveram os mecanismos de ação do prolactina nessas áreas, evidenciando seus efeitos positivos sobre o metabolismo (1,2,25).

2.5. MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA PROLACTINA

2.5.1. Regulação Inibitória por via Dopaminérgica

A prolactina atua de maneira auto-reguladora, isto é, regula sua própria secreção, por meio de um mecanismo de *feedback* negativo de alça curta (regulação autócrina), por sua ligação aos PRLR localizados nos neurônios dopaminérgicos hipotalâmicos. Essa ligação determina um aumento na síntese de dopamina pelo hipotálamo. Quando a concentração de dopamina aumenta no sangue porta hipotalâmico-hipofisário, a liberação de prolactina dos lactotopos é suprimida. A liberação de prolactina encontra-se predominantemente sob inibição tônica (*feedback* negativo) pela dopamina derivada de neurônios dopaminérgicos hipotalâmicos (1,10,30).

A dopamina, secretada na zona periventricular hipotalâmica (núcleo periventricular e núcleo arqueado) e liberada a partir de projeções neuronais na eminência média, chega à hipófise anterior através dos vasos portais (sistema conhecido como via “tubero-infundibular da dopamina” ou “TIDA”). (30)

A dopamina atua nos D2R na hipófise anterior (adeno-hipófise) para inibir a síntese e secreção de prolactina. Os D2R são acoplados à proteína G, resultando em inibição do metabolismo da adenilato-ciclase e do fosfato inositol. Além disso, a

ativação do D2R modifica pelo menos cinco canais iônicos diferentes. Em particular a dopamina ativa uma corrente de potássio que induz a hiperpolarização da membrana plasmática, enquanto diminui as correntes de cálcio ativadas por voltagem. Por conseguinte, a inibição da secreção de prolactina induzida pela dopamina é uma função da inibição da atividade da adenilato-ciclase, da ativação dos canais de potássio sensíveis à voltagem e da inibição dos canais de cálcio sensíveis à voltagem (1,4,12).

Portanto, como pode ser observado na Figura 5, a prolactina é regulada por *feedback* negativo da dopamina e também atua de maneira auto-reguladora, promovendo a liberação de dopamina. Além disso, a liberação de prolactina também está sobre controle inibitório por outros fatores derivados do sistema nervoso central como a somatostatina, ácido γ -aminobutírico, acetilcolina e norepinefrina. O GH, o fator de crescimento transformador beta 1 (TGF β 1) e endotelina têm um papel regulador parácrino em nível hipofisário (1, 12, 30).

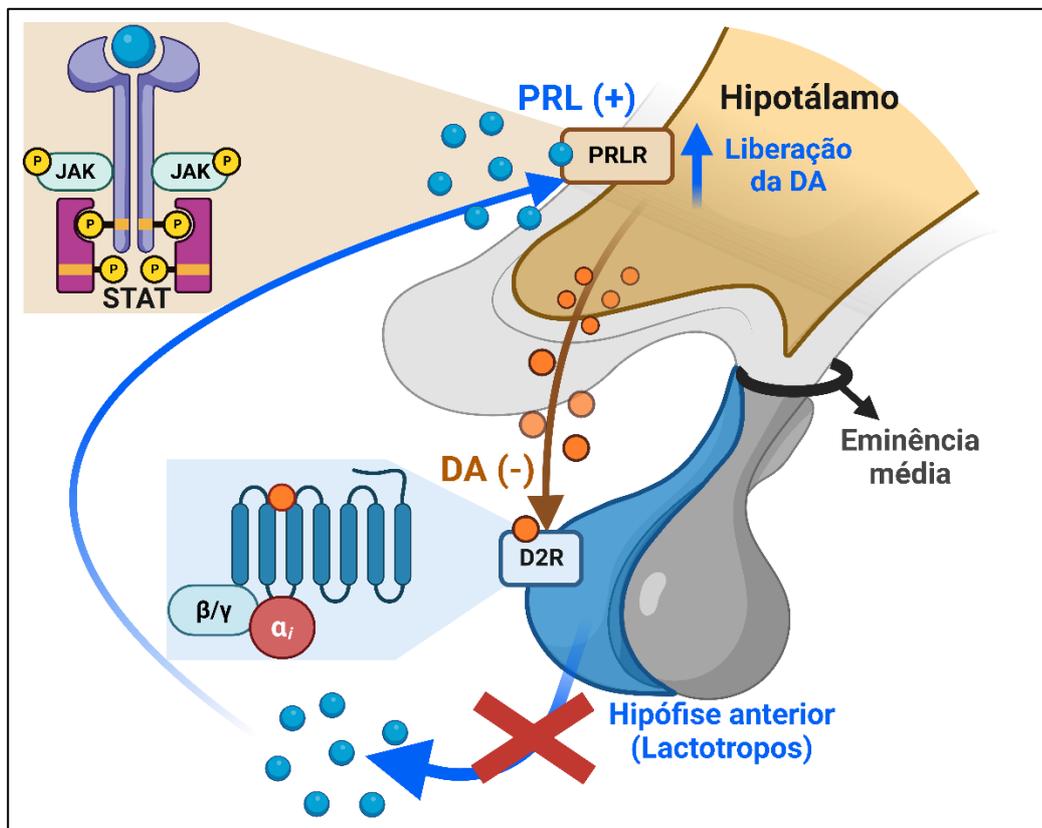


Figura 5 – Mecanismo de regulação inibitória por via dopaminérgica. PRL: prolactina; PRLR: receptor transmembrana da prolactina que ativam cascatas de sinalização intracelular com transdutor JAK2 e ativador STAT5; DA: dopamina; D2R: receptores D2 de dopamina acoplado à proteína G. Fonte: Elaborada pelo autor.

2.5.2. Mecanismos Estimulatórios

A manutenção da homeostase da prolactina é uma manifestação do delicado equilíbrio que resulta da interação de estímulos positivos e negativos, provenientes tanto do ambiente externo quanto do organismo em si. Muitos mediadores, originados do sistema nervoso central, da hipófise e de tecidos periféricos, desempenham um papel fundamental na regulação da secreção de prolactina, por meio de efeitos diretos ou indiretos sobre as células lactotróficas (30).

A secreção de prolactina resulta principalmente da supressão da via de inibição da dopamina. Assim, a maioria dos hormônios e neurotransmissores hipotalâmicos agem indiretamente através da desativação do sistema TIDA, embora efeitos diretos sobre os lactotrofos e outros mecanismos de ação, não completamente esclarecidos, provavelmente estejam presentes (30).

A liberação de prolactina é afetada por uma grande variedade de estímulos provenientes do ambiente e do meio interno. A liberação de prolactina em resposta à sucção, mecanismo estimulatório de natureza mecânica, é um reflexo neuroendócrino clássico, também conhecido como reflexo de estimulação-secreção, que é mediado pela diminuição na quantidade de dopamina liberada na eminência média, removendo a inibição tônica do lactotropos (10). Fisiologicamente, a serotonina é responsável por regular os picos noturnos e os aumentos de prolactina induzidos pela sucção, sendo um modulador potente, ainda que indireto, da secreção de prolactina. Os neurônios serotoninérgicos projetam-se do núcleo dorsal da rafe para o hipotálamo basal medial, exercendo sua ação por meio de mecanismos dos receptores 5HT1A e 5HT2. O Núcleo Paraventricular, um dos núcleos proeminentes do Hipotálamo Medial, é comprovadamente um importante local regulador da liberação de prolactina induzida por serotonina, contendo diferentes populações de células neurosecretoras que produzem ocitocina (OT), vasopressina, peptídeo intestinal vasoativo (VIP), hormônio liberador de tireotrofina (TRH) e outros neuropeptídeos (30).

O TRH é um neuropeptídeo ativo na presença do tônus inibitório fisiológico da dopamina e atua como potente estímulo para a liberação de prolactina pela estimulação dos receptores de TRH na membrana celular do lactotrofo. Contudo, o

papel fisiológico da liberação de prolactina induzida pelo TRH não foi esclarecido. Embora a administração exógena de TRH possa elevar as concentrações de prolactina, é importante assinalar que a liberação de TSH e a de prolactina nem sempre ocorrem juntas em condições fisiológicas (12).

O VIP, juntamente com seu fragmento precursor peptídeo his-isoleucina, atua por meio de aferentes hipotalâmicos, bem como por mecanismos parácrinos e autócrinos diretos, ligando-se aos receptores das células lactotróficas. Isso resulta no aumento da atividade da adenilato ciclase e da transcrição do gene da prolactina. A ocitocina também parece desempenhar um papel na liberação de prolactina induzida pelo VIP, possivelmente através da inibição do TIDA. No entanto, as fibras de serotonina têm pouco contato sináptico com as células de dopamina, o que sugere que a inibição direta das células dopaminérgicas ocorre mais por meio da transmissão do volume de serotonina. Além disso, evidências apontam para a estimulação direta de neurônios GABAérgicos nas proximidades de células dopaminérgicas, uma via conhecida como "sistema tuberoinfundibular-GABA" (TI-GABA), que modula a secreção de prolactina (30).

Os derivados estrogênicos exercem influência sobre a secreção de prolactina em resposta a eventos reprodutivos, utilizando diferentes mecanismos. Estes incluem a amplificação da atividade mitótica dos lactotróficos, o aumento da transcrição e tradução do gene da prolactina por meio da ligação do receptor $ER\beta$, a estimulação indireta da síntese de prolactina por meio do aumento da expressão gênica de VIP e OT. Ademais, os estrogênios também possuem uma ação estimulante indireta na liberação de prolactina, inibindo a síntese hipotalâmica de dopamina e reduzindo o número de D2R hipofisários. O resultado líquido é um aumento das concentrações de prolactina por meio do aumento da amplitude dos surtos, liberação e armazenamento da mesma (30).

A histamina apresenta efeito predominantemente estimulatório que é mediado através da inibição do sistema dopaminérgico. Esse efeito é mediado por receptores H2 após administração central e por receptores H1 após infusão sistêmica da dopamina. A produção de prolactina induzida por histamina é mediada por neurônios dopaminérgicos e serotoninérgicos, podendo também envolver outros compostos liberadores, como beta-endorfina, VIP, vasopressina ou TRH (30).

Os mecanismos pelos quais os opioides regulam a secreção de prolactina permanecem pouco compreendidos, mas é possível que eles atuem na sincronização dos pulsos de prolactina, bem como no aumento da secreção de prolactina em resposta ao estresse (30).

Diversos outros neuropeptídeos e neurotransmissores possuem capacidade de modular a secreção de prolactina, incluindo a galanina, endotelina, TGF β 1, angiotensina, somatostatina, substância P, neurotensina, calcitonina, Fator de Crescimento Epidermal (EGF), peptídeo atrial natriurético, bombesina, colecistoquinina, acetilcolina e vasopressina (30).

2.6. EFEITOS METABÓLICOS DA PROLACTINA

No artigo de revisão de Kirsch *et al.* (1) os autores relatam estudos que indicam que a relação entre as concentrações de prolactina e a saúde metabólica é complexa. Embora altas concentrações de prolactina sejam desfavoráveis metabolicamente, baixas concentrações também estão associadas ao aumento de doenças metabólicas. Os artigos recentes de Macotela *et al.* (2,4) compilam os achados de diferentes estudos que suportam um papel ativo da prolactina favorecendo a homeostase metabólica e protegendo da disfunção metabólica associada à obesidade em homens e mulheres. As concentrações circulantes de prolactina são reduzidas em modelos animais de obesidade, resistência à insulina e diabetes mellitus.

Em doenças metabólicas, a presença de concentrações abaixo do 1º quartil (≈ 7 ng/mL) da faixa fisiológica e acima de ≈ 100 ng/mL de prolactina pode contribuir para o desenvolvimento de fígado gorduroso, tecido adiposo disfuncional e redução do tônus hipotalâmico dopaminérgico (4).

2.6.1. Controle do Apetite e Adipogênese

A prolactina desempenha papel importante no metabolismo, principalmente por sua influência sobre a adiponectina, hormônio liberado pelo tecido adiposo e responsável por modular positivamente o sistema endócrino, aumentando a sensibilidade à insulina. Baixas concentrações de adiponectina estão associados a

condições como resistência à insulina, obesidade e aterosclerose. Durante a gravidez, a prolactina é provavelmente responsável por suprimir a produção de adiponectina materna, contribuindo assim para o novo ponto de equilíbrio homeostático característico desse período. Embora não haja estudos conclusivos que demonstrem o mesmo papel da adiponectina fora da gestação, pesquisas com animais indicaram que a secreção de adiponectina é significativamente inibida pela prolactina, tanto *in vivo* em camundongos quanto *in vitro* no tecido adiposo humano (1,37).

A prolactina exerce papel crucial na regulação neuroendócrina do apetite e da saciedade, como ilustrado na Figura 6.

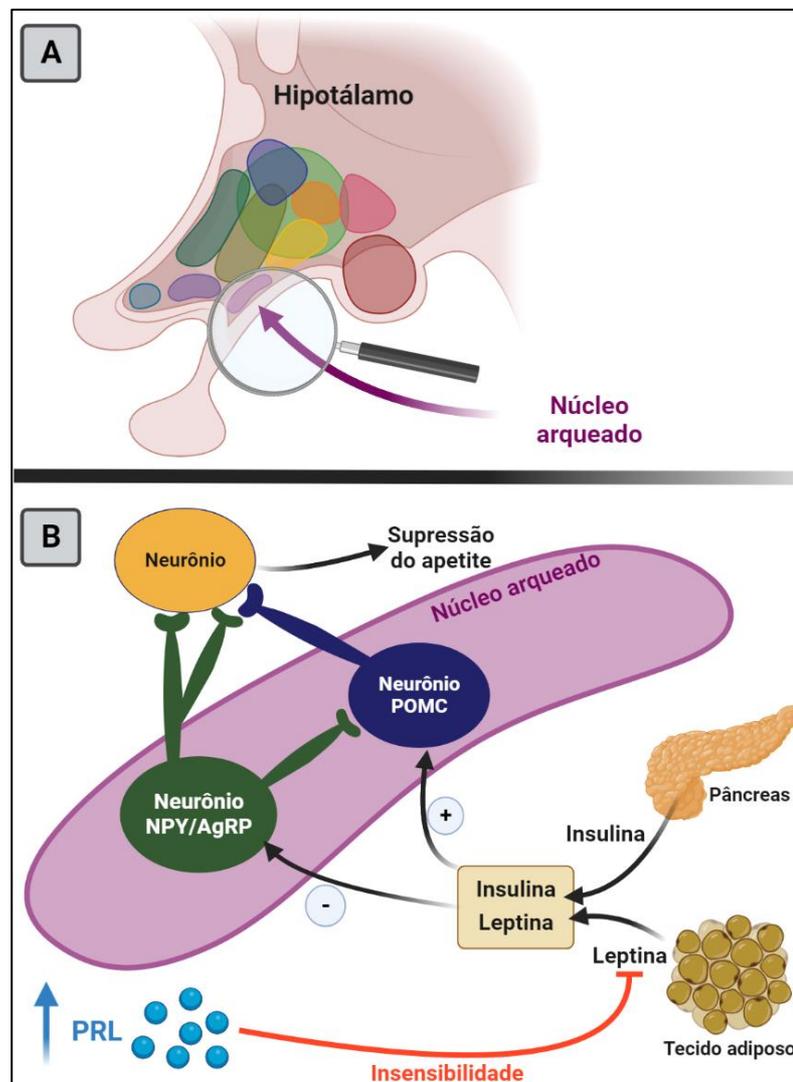


Figura 6 – Regulação neuroendócrina do apetite e da saciedade. (A) Região do ARC e (B) Mecanismo proposto de regulação neuro-hormonal do apetite no ARC e inibição pela prolactina. PRL: prolactina. Fonte: Adaptada das referências (1,37).

Essa concepção é reforçada pela observação de que a hiperprolactinemia fisiológica durante a gestação promove resistência à leptina, hiperfagia, adiposidade e resistência à insulina, para assegurar a disponibilidade de nutrientes para o desenvolvimento fetal. De forma semelhante, a hiperprolactinemia patológica associada ao prolactinoma tem sido relacionada à obesidade em ambos os sexos (1,4).

Existem pelo menos dois tipos de neurônios considerados atores-chave na regulação do apetite, localizados na zona arqueada do hipotálamo (ARC): os neurônios anorexígenos POMC e os neurônios orexígenos NYP/AgRP. Os neurônios anorexígenos POMC sintetizam a Pro-Opiomelanocortina (POMC), uma proteína precursora, que é processada enzimaticamente em vários peptídeos bioativos importantes para o controle do eixo corticotrófico, produzida principalmente pelas células neuroendócrinas no hipotálamo e pela glândula pituitária anterior. Os neurônios orexígenos NYP/AgRP secretam tanto o Neuropeptídeo Y (NYP) quanto o peptídeos relacionados ao agouti (AgRP) (1,33-37).

O ARC integra sinais de nutrientes e hormônios circulantes, como leptina e insulina, para manter a homeostase metabólica. A diminuição da sensibilidade tecidual à leptina leva ao desenvolvimento de obesidade e distúrbios metabólicos, como resistência à insulina e dislipidemia. A leptina é uma adipocina secretada em proporção direta com o tamanho e a quantidade de adipócitos no corpo. A leptina entra no cérebro através do mecanismo de transporte de saturação, possivelmente mediado por receptores de transcitose através da barreira hemato-encefálica (BHE). A leptina é muito grande para atravessar a BHE por difusão e, portanto, precisa ser transportada por meio de um sistema de transporte ajustável e saturável (1,33,34).

A leptina e seus receptores (LepRa, LepRb, LepRc, LepRd, LepRe e LepRf) são alguns dos principais reguladores do peso corporal e da homeostase energética. O LepRb é um típico receptor de citocina de classe I sem a atividade de uma quinase interna. A ligação da leptina ao LepRb permite o recrutamento e ativação de JAK2, que sofre autofosforilação, bem como a fosforilação de três resíduos de tirosina em LepRb (Y985, Y1077 e Y1138). Esses resíduos fosforilados interagem com moléculas de sinalização contendo domínio SH2, que se ligam ao complexo LepRb-JAK2 para promover a fosforilação JAK2 das proteínas sinalizadoras e subsequente transmissão

de sinais específicos da leptina para neurônios de segunda ordem localizados no núcleo do hipotálamo. Cada um desses locais de fosforilação induz uma via de sinalização específica da leptina com diferentes funções fisiológicas (1,33,34).

Os neurônios anorexígenos POMC e o orexígenos NYP/AgRP abrigam receptores LepRb. A síntese de POMC é estimulada nos neurônios produtores de POMC pela ligação da leptina, que subsequentemente estimula a síntese de neuropeptídeos anorexígenos (supressores de apetite) (34,37).

A leptina suprime os neurônios NYP/AgRP no ARC, influenciando na redução do apetite. A prolactina pode influenciar a via hipotalâmica do apetite de diferentes maneiras. Embora o mecanismo molecular permaneça indefinido, a prolactina pode exercer influência sobre o ARC indiretamente, causando insensibilidade à leptina (1,33,37).

Além disso, a interrupção do tônus dopaminérgico do sistema nervoso central com deficiência relativa de dopamina pode levar à hiperfagia. Conforme descrito acima, a prolactina se autorregula aumentando a liberação de dopamina. Em estados de alta prolactina, os neurônios dopaminérgicos centrais tornam-se refratários à prolactina, contribuindo para o ganho de peso e resistência à insulina. Portanto, além da influência potencial da prolactina nos comportamentos alimentares por meio da insensibilidade à leptina, a prolactina pode estimular ainda mais a hiperfagia por diminuir o tônus dopaminérgico. Pacientes com síndrome dos ovários policísticos apresentam baixo tônus dopaminérgico hipotalâmico levando a secreção inapropriada de prolactina (1).

A regulação do metabolismo lipídico e a promoção da adipogênese e expansão saudável do tecido adiposo são algumas das funções atribuídas à prolactina. A inibição da captação de lipídios é um efeito desse hormônio, alcançado pela redução da atividade da lipase lipoprotéica (LPL) na gordura humana e pela inibição da lipólise em ratos e humanos. A diferenciação dos adipócitos também é impulsionada pela prolactina, como visto na ativação de STAT5 e fatores de transcrição adipogênicos C/EBP β (proteína de ligação ao elemento regulador do promotor do gene CCAAT/elemento potenciador) e PPAR γ (receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama) em linhagens celulares de adipócitos NIH-3T3 e 3T3-L1 (1,2,31)

Estudos em camundongos recém-nascidos demonstraram que a prolactina é crucial para a formação e atividade da gordura marrom e para a diferenciação de pré-adipócitos marrons. Embora a obesidade diminua a liberação de prolactina da gordura humana, o PRLR ainda está presente no tecido adiposo de roedores e humanos e a prolactina é secretada pelo tecido adiposo humano. Em camundongos PRLR nulos, a massa de gordura pode diminuir ou permanecer inalterada, dependendo da idade, depósito de gordura e antecedentes genéticos. No entanto, em camundongos nulos C57BL/6 PRLR alimentados com dieta rica em gordura, há um aumento da adiposidade e hipertrofia exacerbada dos adipócitos no tecido adiposo. O tratamento com prolactina em ratos obesos também demonstrou estimular a expansão saudável do tecido adiposo, promovendo a hiperplasia dos adipócitos e reduzindo a hipertrofia dos adipócitos viscerais. Esse efeito é atribuído ao aumento da expressão dos fatores de transcrição PPAR γ e Xbp1s (proteína 1 de ligação ao elemento regulador do promotor X-box, forma ativa), que favorecem a adipogênese e a sensibilidade à insulina (Figura 7) (1,2,31).

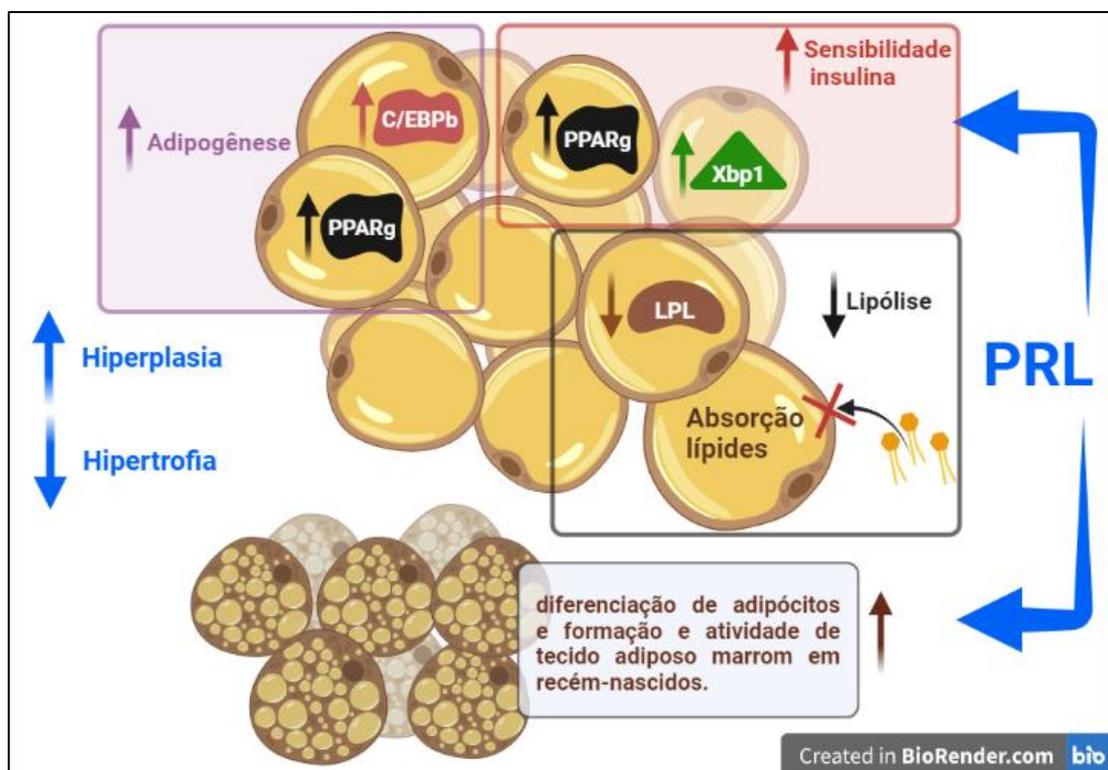


Figura 7 – Mecanismo do efeito da prolactina no metabolismo lipídico. PRL: prolactina; LPL: lipoproteína lipase; C/EBPb: proteína de ligação ao elemento regulador do promotor do gene CCAAT/elemento potenciador; PPAR γ : receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama; Xbp1s: fator de transcrição ativo proteína 1 de ligação ao elemento regulador do promotor X-box. Fonte: Adaptada da referência (1).

2.6.2. Metabolismo Lipídico

No momento, os dados disponíveis sobre o impacto da hipoprolactinemia no perfil lipídico são escassos. Estudos experimentais exploraram mecanismos intracelulares do metabolismo lipídico e, conforme ilustrado na Figura 8, mostraram que a prolactina suprime a lipogênese por meio da inibição da atividade LPL, redução da expressão de GLUT4 e diminuição das concentrações de malonil-CoA. Além disso, em adipócitos 3T3-L1 completamente diferenciados, a prolactina foi vista regulando negativamente a expressão da enzima Ácido Graxo Sintase (FAS) (27,38-48).

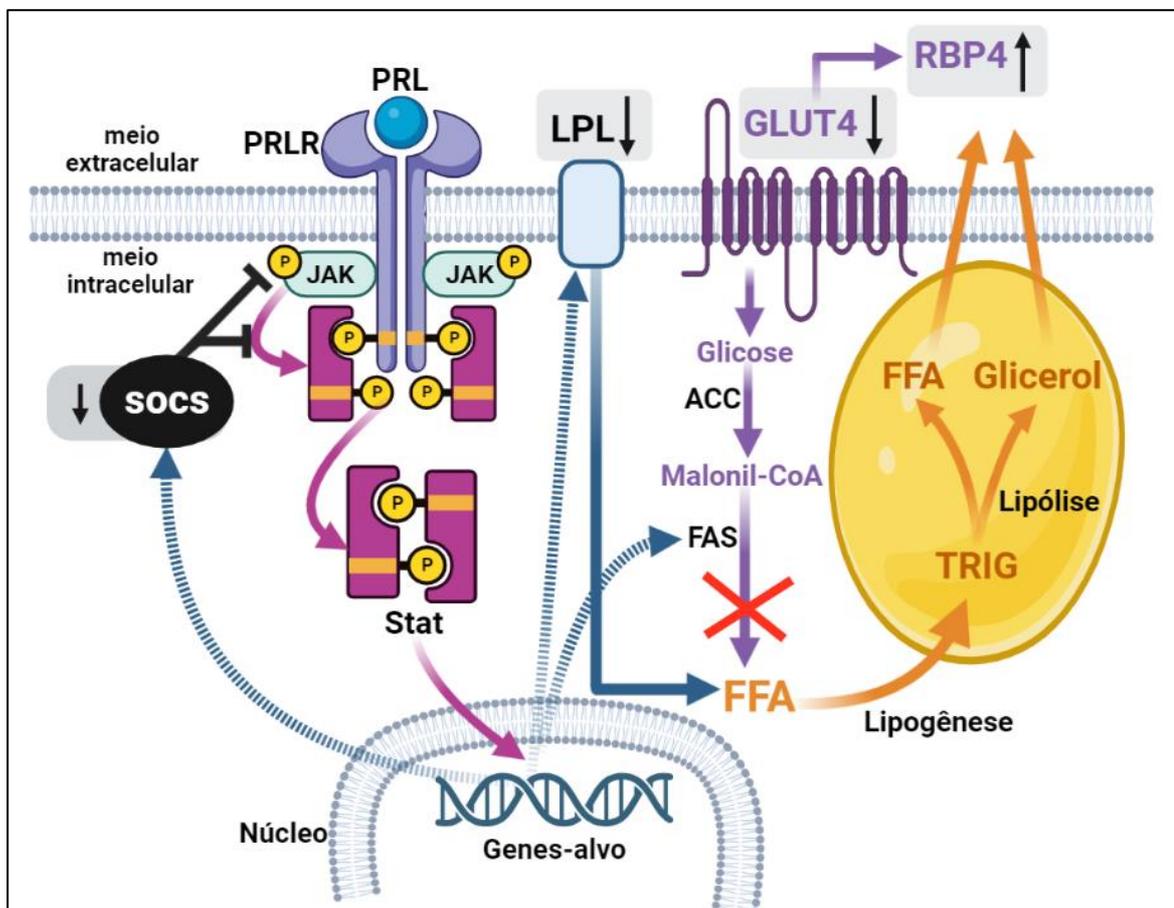


Figura 8 - Ações gerais da prolactina no metabolismo lipídico. A prolactina inibe a síntese lipídica suprimindo GLUT4, lipase lipoprotéica e ácido graxo sintase, mas também inibe a lipólise e a liberação de ácidos graxos livres. PRL: prolactina; PRLR: receptor de prolactina; LPL: lipase lipoprotéica; FAS: ácido graxo sintase; FFA: ácidos graxos livres; ACC: enzima acetil-CoA carboxilase; RBP4: proteína de ligação ao retinol 4; SOCS: proteínas supressoras de sinalização de citocinas. Fonte: Adaptada das referências (28,38,41,42).

A supressão da concentração de malonil-CoA pela prolactina no tecido adiposo humano sugere que concentrações elevadas de prolactina inibem as etapas da via da

lipogênese. Assim, a redução na lipogênese em indivíduos hiperprolactinêmicos pode indicar um estado de resistência à insulina (28,38-40).

A captação de glicose pelo tecido adiposo ocorre através da translocação do transportador de glicose GLUT4, um processo que é potencializado pela presença de insulina. Quando há um decréscimo na expressão de GLUT4, evidenciado pela redução do GLUT4 mRNA, pode haver uma consequente diminuição na captação de glicose devido à menor disponibilidade deste transportador essencial (28,38-40).

Neste contexto, a glicose é quebrada em acetil-CoA, que por sua vez, sob a ação da Acetil-CoA carboxilase (ACC), converte-se em malonil-CoA, constituindo o primeiro passo decisivo da lipogênese. O malonil-CoA é alongado enzimaticamente formando ácidos graxos, que posteriormente são processados em triglicerídeos para armazenamento. Em cenários de resistência à insulina, nota-se um aumento na secreção adiposa da proteína de ligação ao retinol 4 (RBP4). Este incremento de RBP4 está correlacionado com a diminuição da expressão e funcionalidade de GLUT4 no tecido adiposo, o que pode resultar na redução da captação de glicose e, conseqüentemente, conduzir ao estado de resistência à insulina (28,38-40).

Embora exista controvérsia, a hiperprolactinemia tem sido associada ao ganho de peso. Em um estudo realizado com mulheres com prolactinomas, por exemplo, observou-se uma correlação positiva entre a gordura corporal total, o percentual de gordura localizada e as concentrações de prolactina. Os antipsicóticos clássicos, por suprimirem a dopamina e inibirem dopaminergicamente a hipófise, podem estimular a secreção de prolactina, resultando em hiperprolactinemia como efeito colateral. Durante o tratamento com esses medicamentos, frequentemente ocorrem alterações metabólicas como ganho de peso, obesidade, hiperglicemia e dislipidemia. O acúmulo excessivo de tecido adiposo pode levar a uma diminuição da função dos adipócitos e resistência à insulina, com conseqüências negativas para a saúde metabólica (28,38-40).

Outros efeitos no metabolismo lipídico exercidos pela prolactina, incluem o controle do colesterol total, HDL-c, LDL-c e dos triglicérides. Estudos mostraram que pacientes com prolactinoma têm concentrações plasmáticas de colesterol total e LDL-c modestamente elevados. Em alguns estudos, as concentrações plasmáticas de

triglicérides também estão elevados e as concentrações de HDL-c foram relatados como reduzidos. A maioria dos estudos incluiu principalmente pacientes do sexo feminino com prolactinomas, mas a dislipidemia também é observada em homens com hiperprolactinemia (2,28,43-46).

Estudos sugerem que concentrações baixas de prolactina estão associados a concentrações mais elevadas de triglicérides e menores concentrações de HDL-c em mulheres jovens com hiperprolactinemia em tratamento com cabergolina, em comparação com controles saudáveis. Por outro lado, não houve diferença significativa no perfil lipídico quando mulheres jovens em tratamento com cabergolina atingiram concentrações normais de prolactina e controles saudáveis foram comparados. É importante notar que, no primeiro grupo, a redução da dose de cabergolina foi capaz de melhorar as frações lipídicas (1).

Os mecanismos pelos quais a prolactina fisiológica exerce esse controle são complexos e ainda não completamente elucidados. No entanto, sabe-se que a prolactina tem efeitos diretos e indiretos sobre o metabolismo lipídico. Dentre os efeitos diretos no metabolismo lipídico podemos citar a inibição da atividade da LPL e o comprometimento da biossíntese das apolipoproteína. Dentre os efeitos indiretos no metabolismo lipídico podemos citar a modulação do metabolismo da glicose e a interação com outros hormônios (2,7,28,43-47).

A LPL desempenha um papel importante na homeostase lipídica, principalmente por mediar a lipólise intravascular de lipoproteínas ricas em triglicérides. A atividade prejudicada da LPL leva ao acúmulo de quilomícrons e colesterol lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL-c, do inglês *Very-Low-Density Lipoprotein cholesterol*) no plasma, resultando em hipertrigliceridemia (45). O triglicérides é o principal lipídeo dos quilomícrons e do VLDL-c (46). A prolactina inibe a captação de lipídios por meio da redução da atividade da LPL no tecido adiposo humano e a atividade plasmática em pacientes com prolactinomas. A prolactina também inibe a atividade da LPL induzida pelo cortisol. Achados demonstram que a prolactina afeta a atividade da LPL no tecido adiposo humano de forma direta via PRLRs funcionais e de maneira indireta quando o PRLR não pôde ser demonstrado (2,28,43-46).

As apolipoproteínas têm quatro funções principais, incluindo o papel estrutural, o de ligantes para receptores de lipoproteínas, orientando a formação de lipoproteínas e ativadores ou inibidores de enzimas envolvidas no metabolismo de lipoproteínas. Assim, as apolipoproteínas desempenham um papel crucial no metabolismo das lipoproteínas (47). Foi observado que as concentrações elevadas de prolactina resultam em comprometimento da biossíntese de apolipoproteínas, o que leva ao aumento do colesterol total, LDL-c e triglicérides e à diminuição do HDL-c, juntamente com percentuais mais elevados de gordura corporal em pacientes hiperprolactinêmicos em comparação com os controles (1). Particularmente o aumento do colesterol total, LDL-c e triglicérides, e diminuição do HDL-c foram observados com mais frequência em pacientes com prolactinomas em comparação com indivíduos de controle saudáveis. Portanto, foi levantada a hipótese de uma correlação direta entre as concentrações de prolactina e as frações lipídicas. Além disso, uma diminuição significativa na apolipoproteína AI e A-II foi encontrada em mulheres hiperprolactinêmicas em comparação com mulheres saudáveis de controle. Entre essas mulheres com hiperprolactinemia, uma diminuição significativa na apolipoproteína B também foi observada naquelas com altas concentrações de estradiol em comparação com aquelas com baixas concentrações de estradiol. O comprometimento na biossíntese de apolipoproteínas induzido pelo excesso de prolactina tem sido proposto como potencial mecanismo responsável por concentrações mais baixas de apolipoproteínas nesses pacientes (7).

A restauração das concentrações de prolactina dentro dos limites normais pode melhorar o metabolismo lipídico, sendo que a cabergolina melhora o perfil lipídico independentemente das alterações no peso corporal e na porcentagem de alteração na prolactina (1). Digno de nota, uma diminuição significativa no LDL-c e nos triglicérides foi revelada após a terapia cabergolina em pacientes hiperprolactinêmicos do sexo masculino com hipogonadismo concomitante, sem melhora adicional no perfil lipídico após 12 meses de terapia de reposição de testosterona. Com base nesses achados, a melhora no perfil lipídico pode ser não apenas devido à normalização da prolactina e subsequente diminuição do IMC, mas principalmente atribuível ao efeito direto do agonistas dopaminérgicos (7).

A prolactina pode interagir com outros hormônios, que também têm efeitos sobre o metabolismo lipídico. Concentrações elevadas de prolactina estão associados a

concentrações reduzidas de estrogênio em mulheres, uma alteração que se sabe estar associada a concentrações elevadas de LDL-c e reduzidas de HDL-c. A prolactina e GH se originam da duplicação de um gene ancestral comum e, portanto, compartilham muitas funções. Um estudo, verificou-se que o GH diminui tanto a concentração de malonil-CoA quanto o mRNA de ACC. De fato, é relatado que o GH afeta a lipogênese. Em um estudo em ratos lactantes concluiu-se que a prolactina, em comparação com a GH, tem um papel importante na regulação da atividade ACC (2,28,38-46,49).

Estudos identificaram também que na presença de grandes prolactinomas, a secreção do GH pode ser prejudicada, o que pode resultar em concentrações anormais de lipídios plasmáticos. O hipotireoidismo e a hiperprolactinemia têm papéis eficazes na estimulação da alopecia androgênica. Outro estudo relatou que hiperprolactinemia e hipotireoidismo subclínico coexistem comumente e uma concentração de TSH superior a 8 mIU/L tem uma especificidade muito alta de aproximadamente 90% na detecção de hiperprolactinemia. Por isso, avaliação rotineira da prolactina é necessária em pacientes com hipotireoidismo subclínico, especialmente naqueles com TSH 7,5 mIU/L, e concentrações elevadas de prolactina podem ser uma das indicações para o tratamento do hipotireoidismo subclínico assintomático. Estudos relatam que a produção de prolactina é estimulada pelo TRH, fator de crescimento epidérmico, antagonistas dos receptores de dopamina e peptídeo intestinal vasoativo, onde concluíram que o hipotireoidismo primário com altas concentrações de TRH pode levar à hiperprolactinemia (2,28,38-46,49).

De acordo com Albu *et al.* (50), em um estudo realizado com 332 mulheres com síndrome do ovário policístico, a baixa concentração de prolactina foi associada com um perfil metabólico desfavorável caracterizado pela síndrome metabólica e glicemia elevada, mas a relação parece ser devido à complexa interação entre prolactina, resistência à insulina e adiposidade ao invés de ser um efeito direto da prolactina.

A prolactina pode afetar o metabolismo da glicose por meio da regulação da secreção e ação da insulina. Isso pode ter um impacto indireto no controle de colesterol e triglicerídeos, uma vez que a glicose e a insulina estão envolvidas na regulação da síntese e degradação de lipídios. Em estudo feito por Chirico *et al.* (51) com 162 crianças, sendo 122 crianças obesas, a regulação neuroendócrina da

liberação de prolactina foi prejudicada em crianças obesas hiperinsulinêmicas. A hiperinsulinemia e resistência à insulina desempenharam um papel fundamental na obesidade e pode representar uma explicação para as baixas concentrações de prolactina nestas crianças. A secreção de prolactina foi regulada pela insulina em estudo realizado em cultura de células primitivas de ratos machos. Foi demonstrado uma forte correlação inversa entre prolactina e IMC, hipotetizando uma autolimitação periférica se a obesidade tiver presente e uma regulação negativa da síntese pituitária. Outro estudo identificou uma diminuição da secreção de prolactina pelo tecido adiposo subcutâneo em comparação com o tecido adiposo visceral em paciente obesos e revelou que a liberação de prolactina pela adiposidade subcutânea foi inversamente correlacionada com o IMC. O mecanismo que regula a produção reduzida de prolactina pelo tecido adiposo subcutâneo de obesos ainda não foi claramente estabelecida, mas a proposta envolve a hiperinsulinemia como um dos fatores inibitórios (52).

2.6.3. Metabolismo da Glicose

A prolactina apresenta efeitos diretos sobre o pâncreas, aumentando a proliferação de células beta, promovendo a secreção de insulina dependente de glicose e prevenindo a apoptose das ilhotas pancreáticas. Como resultado, concentrações séricas de prolactina dentro da faixa fisiológica podem reduzir o risco de desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2. Entretanto, em concentrações acima do normal (hiperprolactinemia), a prolactina pode levar à resistência à insulina e intolerância à glicose. Esse estado de excesso de prolactina, desenvolvido através de distúrbios do eixo hipotálamo-hipofisário ou administração de certas drogas - denominado hiperprolactinemia patológica - tem sido associado ao aumento da resistência à insulina pós-prandial. Esse processo resulta em aumento da gliconeogênese e lipólise, além de comprometimento da captação periférica de glicose (4,53,54).

A prolactina promove a sensibilidade à insulina, pelo menos em parte, por ações centrais no hipotálamo. O aumento da expressão de PRLR no hipotálamo estimula a sensibilidade à insulina em todo o corpo, enquanto a expressão reduzida de PRLR resulta em resistência à insulina e intolerância à glicose. Os efeitos da prolactina no

hipotálamo levam a sinais vagais que promovem aumento da sensibilidade à insulina no fígado. Além disso, em 90% dos ratos pancreatectomizados, a infusão intracerebroventricular de prolactina aumenta a sensibilidade hepática à insulina, inibe a apoptose das células β e reduz o peso corporal e a adiposidade por aumentar as concentrações hipotalâmicas de dopamina e a sinalização da leptina (2).

No estudo de Manshaei *et al.* (52), as concentrações médias de prolactina em pacientes diabéticos foram de $5,32 \pm 0,36$ ng/mL, enquanto os controles saudáveis apresentaram concentrações médias de $18,38 \pm 2,3$ ng/mL. Li *et al.* (56) relataram que concentrações normais a altas de prolactina (mediana de 24 ng/mL e faixa de 16 a 35 ng/mL) foram associadas a um menor risco de diabetes mellitus tipo 2 em comparação com mulheres com concentrações mais baixas de prolactina (mediana de 6 ng/mL e faixa de 5 a 8 ng/mL) em um acompanhamento de 20 anos. Em outro estudo caso-controle de 134 pacientes, a concentração média de prolactina nos controles (18,38 μ g/L) foi significativamente maior do que nos pacientes diabéticos (5,39 μ g/L). Kirsch *et al.* (1) relata um estudo que demonstraram que uma faixa normal alta de prolactina (11,61 a 26,29 ng/mL) foi mais protetora contra a resistência à insulina e diabetes mellitus em uma grande coorte de pacientes com hiperprolactinemia.

A prolactina estimula a proliferação e a sobrevivência das células β , promove a secreção de insulina induzida por glicose, estimula o desenvolvimento do pâncreas durante a fase perinatal e é essencial para a expansão das células β durante a gravidez. Os mecanismos que regulam os efeitos da prolactina nas células β envolvem o aumento da síntese de osteoprotegerina, levando à inibição do receptor ativador da via do ligante NF- κ B, um inibidor da proliferação de células β ; aumento da concentração de survivina, expressão elevada dos fatores de transcrição Foxm1 e MafB, aumento da atividade de ciclina e maior produção de serotonina nas ilhotas por meio da síntese de Tph1, todos promovendo a proliferação de células β . Além disso, a prolactina leva à inibição das vias de apoptose extrínseca e intrínseca e melhora a sensibilidade à glicose por meio do aumento da expressão da glucoquinase e do transportador de glicose 2 (2,57).

2.6.4. Síndrome Metabólica

A síndrome metabólica é uma condição clínica complexa que envolve várias anormalidades fisiológicas, incluindo resistência à insulina, dislipidemia, hipertensão arterial e obesidade central. Ela é um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes mellitus tipo 2. A resistência à insulina é uma das principais características da síndrome metabólica e é definida como uma resposta insuficiente do tecido adiposo, músculo e fígado à ação da insulina. Portanto, a síndrome metabólica e a resistência à insulina estão relacionadas, mas não são exatamente a mesma coisa. A resistência à insulina pode ser uma das causas subjacentes da síndrome metabólica (58-61,62).

O clamp hiperinsulinêmico-euglicêmico é amplamente considerado como o padrão-ouro para medir a resistência à insulina, porém sua aplicação em ambientes clínicos é limitada devido a questões relacionadas a custo, acessibilidade e reprodutibilidade. Neste contexto, surgem potenciais índices alternativos de resistência à insulina, como HOMA-IR (62).

O modelo matemático utilizado para avaliar a resistência à insulina, chamado HOMA-IR, baseia-se na relação de retroalimentação existente entre a produção hepática de glicose e a secreção de insulina pelas células beta, para manter a homeostase glicêmica no estado de jejum. Concentrações elevadas de glicose ou insulina sugerem a presença de resistência à insulina. Neste contexto, o índice HOMA-IR é utilizado para expressar a resistência à insulina hepática, presumindo que a resistência à insulina hepática e periférica são equivalentes. Consequentemente, o HOMA-IR é amplamente utilizado como uma ferramenta clínica para avaliar a resistência à insulina em diversas populações, por ser de fácil aplicação e acessibilidade (61).

Considerando que a resistência à insulina se manifesta de forma distinta entre diferentes grupos étnicos, existem diversos estudos publicados que estimaram valores de corte para o HOMA-IR para as diferentes populações. Em 2009, foi publicado o Estudo Brasileiro de Síndrome Metabólica (BRAMS), que utilizou 1203 indivíduos para estimar os valores de corte para o índice HOMA-IR em relação à resistência à insulina e à síndrome metabólica. Os pontos de corte determinados

foram de 2,7 e 2,3, respectivamente. As Diretrizes da Sociedade Brasileira de diabetes mellitus 2019-2020 utilizaram o valor de corte de 2,7 para o HOMA-IR para adultos e idosos se baseando nos resultados do estudo BRAMS (61,63-65).

O estudo da síndrome metabólica era dificultado pela ausência de consenso na sua definição e nos valores de corte dos seus componentes, com repercussões na prática clínica e nas políticas de saúde. Considerando esse cenário houve um movimento internacional para a definição dos critérios para diagnóstico da síndrome metabólica (66-71).

Segundo o *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III), a síndrome metabólica representa a combinação de pelo menos três componentes dos apresentados na Tabela 4 (70,71).

Tabela 4 – Critérios diagnóstico de síndrome metabólica baseado nas recomendações da NCEP-ATPIII.

Critérios	Definição
Obesidade abdominal (circunferência da cintura)	
Homens	≥ 102 cm
Mulheres	≥ 88 cm
HDL	
Homens	< 40 mg/dL ou presença de tratamento medicamentoso para HDL reduzido
Mulheres	< 50 mg/dL ou presença de tratamento medicamentoso para HDL reduzido
Pressão arterial	
Sistólica	≥ 130 mmHg ou presença de tratamento medicamentoso com anti-hipertensivo
Diastólica	≥ 85 mmHg ou presença de tratamento medicamentoso com anti-hipertensivo
Triglicérides	
≥ 150 mg/dL ou presença de tratamento medicamentoso para triglicérides elevados	
Glicemia	
≥ 100 mg/dL ou presença de tratamento medicamentoso com hipoglicemiante	

Fonte: Adaptada das referências (70, 71).

A *International Diabetes Federation* (IDF) considera que a pessoa deve atender ao critério de obesidade central acima do valor de corte e dois dos 4 fatores restantes. A Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica (I-DBSM) adota os critérios da NCEP-ATP III com ressalvas em relação aos valores de corte usados para obesidade central (66-71).

A presença de LDL-c aumentado não faz parte dos critérios diagnósticos da síndrome metabólica, porém, frequentemente, os pacientes portadores de resistência à insulina e síndrome metabólica apresentam aumento da fração pequena e densa do LDL-c que tem um potencial aterosclerótico maior (71).

O primeiro relato dos efeitos metabólicos prejudiciais da hipoprolactinemia surgiu em 2009, com um estudo que identificou um risco ampliado de síndrome metabólica em pacientes masculinos com disfunção sexual e concentrações de prolactina < 5 ng/mL, particularmente homens de meia-idade e idosos. A partir desta descoberta, uma série de estudos subsequentes buscou esclarecer o impacto metabólico da hipoprolactinemia e, inesperadamente, descobriu-se uma associação entre baixas concentrações de prolactina e condições como resistência à insulina, diabetes mellitus e síndrome metabólica, sugerindo a necessidade de manter a concentração de prolactina dentro da faixa normal para garantir a homeostase metabólica (7).

2.7. INTERFACE ENTRE BIOESTATÍSTICA E APRENDIZAGEM DE MÁQUINA APLICADA

2.7.1. Significância estatística e tamanho amostral

O p -valor é calculado no contexto do teste de significância de hipótese nula (H_0). A H_0 geralmente afirma que não há efeito (por exemplo, a diferença nas médias entre os grupos é 0), enquanto a hipótese alternativa (H_1) afirma que há algum efeito ou diferença. O p -valor é a probabilidade de observar um resultado pelo menos tão extremo quanto o observado, sob a suposição de que H_0 era realmente verdadeira. Os pesquisadores geralmente rejeitam H_0 em favor da H_1 quando o p -valor está abaixo de algum limite chamado de nível de significância (alfa) (72).

Antes do estudo, além de declarar a hipótese, o pesquisador também deve selecionar o nível de significância no qual a hipótese será testada. O nível de significância representa o risco que o pesquisador está disposto a assumir de concluir erroneamente que H_1 está correta quando, na verdade, H_0 é a verdadeira na população total. Em outras palavras, o nível de significância representa a probabilidade de rejeitar H_0 quando ela realmente é verdadeira (73).

Atualmente, o nível de significância mais comum escolhido é 0,05, o que significa que o pesquisador está disposto a ter 5% de chance de que um resultado que suporte a hipótese seja falso na população total. No entanto, outros valores para nível de significância também podem ser apropriados em algumas circunstâncias. Para estudos-piloto, o nível de significância geralmente é definido em 0,10 ou 0,20. Em estudos em que é especialmente importante evitar concluir que um tratamento é eficaz quando na verdade não é, o nível de significância pode ser definido em um valor muito mais baixo; pode ser definido em 0,001 ou até mais baixo. Os estudos de medicamentos, por exemplo, costumam estabelecer o nível de significância em 0,001 ou menos. A razão para tal rigor se deve ao fato de que as implicações da aprovação de um medicamento ineficaz podem representar extremos riscos à saúde dos pacientes (73).

Quando o p -valor é menor ou igual ao nível de significância, considera-se o resultado como "estatisticamente significativo". Contudo, é crucial enfatizar que essa demarcação é arbitrária e não existe uma divisão precisa entre um resultado provável e um improvável. Assim, é desaconselhado interpretar os resultados de forma exclusivamente dicotômica - isto é, "estatisticamente significativo versus "estatisticamente não significativo" - baseando-se num limite arbitrário que representa o nível de significância. Em vez disso, é recomendado utilizar o p -valor como um indicador da robustez da evidência contra H_0 (72).

No verão de 2017, um grupo dos principais estatísticos matemáticos publicou um pequeno manifesto pré-impresso no site PsyArXiv.com e em janeiro de 2018 este artigo-manifesto foi reimpresso pela *Nature Human Behaviour*. Esse artigo propôs uma redefinição da significância estatística, isto é, propôs substituir o nível de significância comumente utilizado de 0,05 por 0,005. Essa proposta não é nova, mas uma massa crítica de pesquisadores agora endossa essa mudança. Os argumentos

que fundamentaram essa recomendação se baseiam no fato de existir uma falta de reprodutibilidade dos estudos científicos, causando crescente preocupação com a credibilidade das alegações de novas descobertas baseadas em achados “estatisticamente significativos” e resultando em uma alta taxa de falsos positivos. Segundo os autores, atualmente, a taxa de falsos positivos é superior a 33% com um nível de significância de 0,05, independentemente do nível de poder estatístico. Reduzir o nível de significância para 0,005 reduziria essa taxa mínima de falsos positivos para 5%. Reduções semelhantes nas taxas de falsos positivos ocorreriam em uma ampla gama de poderes estatísticos. Assim, resultados de $0,005 < p\text{-valor} < 0,05$, poderiam ser classificados como “evidência sugestiva” (74-80).

A recomendação de utilizar um nível de significância de 0,005 em detrimento de 0,05 visa minimizar a superestimação artificial da “significância estatística” dos resultados dos estudos científicos e contornar o problema do tamanho amostral, pois um tamanho de amostra maior fornece mais informações e reduz a incerteza na estimativa dos parâmetros populacionais, o que resulta em p -valor menores, aumentando a evidência contra a hipótese nula (75,76).

Conclusões científicas e decisões de negócios ou políticas não devem se basear apenas em se um p -valor ultrapassa um nível de significância definido. Os pesquisadores devem colocar em jogo muitos fatores contextuais para derivar inferências científicas, incluindo o desenho de um estudo, a qualidade das medições, a evidência externa para o fenômeno em estudo e a validade das suposições que fundamentam a análise de dados. Considerações pragmáticas geralmente requerem decisões binárias, “sim-não”, mas isso não significa que p -valores por si só podem garantir que uma decisão seja correta ou incorreta. O uso generalizado de “significância estatística” como uma licença para fazer uma afirmação de uma descoberta científica (ou verdade implícita) leva a uma distorção considerável do processo científico (77).

Diante do cenário apresentado, para avaliar o efeito de um estudo e indicar sua significância, é fundamental adotar uma abordagem integrada. Isso significa utilizar o p -valor (que representa a significância estatística) em combinação com o Tamanho do Efeito (TDE) - também conhecido como significância clínica ou relevância prática -

e o Intervalo de Confiança (IC). Essa combinação fornece uma análise mais precisa e informativa dos resultados do estudo (73,76-78).

2.7.2. Intervalo de Confiança

Os ICs são usados para estimar o grau de incerteza associado a uma amostra estatística. Eles fornecem um intervalo de valores, em vez de um único valor de ponto, dentro do qual o verdadeiro parâmetro populacional é provável que resida. Comumente, usamos um IC de 95%, que indica que, se repetíssemos o estudo muitas vezes, esperaríamos que o IC incluísse o verdadeiro parâmetro populacional em 95% das vezes. Portanto, um IC de 95% não implica que existe uma probabilidade de 95% de que o valor verdadeiro esteja dentro do intervalo. Na verdade, se o nível de confiança for aumentado para 99% ou 99,5%, o IC se alargará, refletindo uma maior certeza de que o valor real foi capturado dentro do intervalo. Vários fatores influenciam a largura do IC, incluindo o tamanho da amostra (um tamanho de amostra maior geralmente produz um intervalo mais estreito), o desvio padrão (um desvio padrão maior resulta em um intervalo mais amplo) e o próprio nível de confiança (um nível de confiança maior produz um intervalo mais amplo). Os ICs são amplamente utilizados para avaliar a incerteza das estimativas estatísticas. Além disso, há uma relação inversa entre o nível de confiança e o valor-p: um nível de confiança mais alto requer um valor-p menor para rejeitar H_0 em testes de hipóteses (72,73,75).

2.7.3. Significância estatística *versus* Significância clínica

Como dito anteriormente, se o p -valor for maior do que o nível de significância escolhido pelo pesquisador, não há evidências suficientes para rejeitar a H_0 . Nesse caso, qualquer diferença observada é atribuída à variabilidade natural (ou aleatória) da amostragem, em vez de um efeito real causado pela variável. Com uma amostra suficientemente grande, um teste estatístico quase sempre demonstrará uma diferença significativa, a menos que não haja efeito algum, ou seja, quando o tamanho do efeito for exatamente zero; no entanto, diferenças muito pequenas, mesmo que significativas, muitas vezes não têm sentido. Portanto, relatar apenas o p -

valor significativo para uma análise não é adequado para que os leitores entendam completamente os resultados (78-80).

Um p -valor, ou significância estatística, não mede o TDE ou a importância de um resultado. A significância estatística não é equivalente à significância científica, humana ou econômica. Um p -valor menor não implica necessariamente na presença de efeitos maiores ou mais importantes, e um p -valor maior não implica falta de importância ou mesmo falta de efeito. Qualquer efeito, por menor que seja, pode produzir um pequeno p -valor se o tamanho da amostra ou a precisão da medição for alta o suficiente, e grandes efeitos podem produzir p -valores inexpressivos se o tamanho da amostra for pequeno ou as medições forem imprecisas. Da mesma forma, efeitos estimados idênticos terão p -valores diferentes se a precisão das estimativas for diferente (77-80).

O TDE tenta responder à pergunta: “Essas diferenças são grandes o suficiente para serem significativas, apesar de serem estatisticamente significativas?”. O tamanho do efeito aborda o conceito de “diferença mínima importante”, que afirma que em um determinado ponto uma diferença estatística significativa é tão pequena que não traria nenhum benefício no mundo real. A significância estatística explora a probabilidade de nossos resultados serem devidos ao acaso e o TDE explica a importância de nossos resultados (77-80).

Ao contrário dos testes de significância, o TDE é independente do tamanho da amostra. A significância estatística, por outro lado, depende do tamanho da amostra e do TDE. Por esse motivo, p -valor é considerado confuso devido à sua dependência do tamanho da amostra. Às vezes, um resultado estatisticamente significativo significa apenas que um grande tamanho de amostra foi usado. O TDE ajuda os leitores a entender a magnitude das diferenças encontradas, enquanto a significância estatística examina se as descobertas provavelmente se devem ao acaso. Ambos são essenciais para que os leitores entendam todo o impacto do seu trabalho (77-80).

Por mais de duas décadas, a literatura científica vem insistindo continuamente na necessidade de comunicar o TDE. Em 1999, a Força-Tarefa da *American Psychological Association* (APA) sobre inferência estatística já havia publicado diretrizes para pesquisas em psicologia. Nessas diretrizes, destacava-se a premissa

de que se deve "sempre apresentar os tamanhos dos efeitos para os principais resultados". Além disso, a ênfase era dada à importância de "relatar e interpretar os TDEs no contexto de efeitos previamente relatados, pois isso é essencial para uma pesquisa de qualidade". Posteriormente, a sexta edição do Manual de Publicação da APA, em 2010, reforçou essa necessidade ao ressaltar a relevância de incluir os TDEs e os IC ao aplicar estatísticas inferenciais (81).

Em 2016, a *American Statistical Association* (ASA) emitiu uma declaração abordando a significância estatística e os p -valores, posicionando-se a favor do uso do TDE, do IC e do p -valor. Entre as estatísticas convencionais utilizadas para avaliar o TDE, podemos mencionar diversas (73,81-85):

- O "d" de Cohen, aplicado no teste t para médias;
- O eta-quadrado (η^2) e o epsilon-quadrado (ϵ^2), utilizados na Análise de Variância (ANOVA);
- A Razão de Chances (*Odds Ratio* - OR), empregada em estudos de caso-controle;
- O coeficiente de correlação de Pearson (r_{Pearson});
- O tamanho do efeito "r" do Teste Mann-Whitney (r_{MW});
- O coeficiente de determinação (R^2), utilizado em estudos de regressão;
- O Risco Relativo (RR), usado em estudos de coorte;
- O η^2 ordinal e ϵ^2 ordinal, aplicados no teste Kruskal-Wallis;
- O método Vargha e Delaney's A (VDA), etc.

Outros critérios podem ser utilizados para definição do TDE. Em laboratório clínico, um critério muito utilizado para avaliar a relevância prática (clínica) das diferenças (erros sistemáticos) são os critérios baseados nos estudos da variação biológica. Baseado nos estudos dos componentes da variação biológica (CV_i, coeficiente de variação individual; CV_g, coeficiente de variação do grupo) pode ser estimado o erro sistemático (ou *bias*) mínimo, desejável e ótimo. Dentre esses, o *bias* desejável baseado nos componentes da variação biológica é o mais utilizados para avaliar o TDE (81-83).

2.7.4. Tamanho do efeito linguagem comum

Os TDE tradicionais não são projetados para promover uma comunicação eficaz para os profissionais e podem ser mal compreendidos por pesquisadores e leigos. Para preencher essa lacuna, os pesquisadores desenvolveram medidas de TDE mais alinhadas com a compreensão natural das pessoas, chamadas coletivamente de tamanho do efeito linguagem comum (TDE-LC) ou Probabilidade de Superioridade (81-84).

Um exemplo de TDE-LC é aquele estimado pelo método VDA, que pode ser utilizado em comparações pareadas de todos os grupos. Para exemplificar, considere a avaliação de dois conjuntos de resultados do índice HOMA-IR, com médias denominadas A e B: A média A é derivada de amostras com concentrações de prolactina inferiores a 7 ng/mL, enquanto a média B provém de amostras onde as concentrações de prolactina variam entre 25 e 100 ng/mL. A análise gráfica sugere que a média dos resultados de HOMA-IR em A supera a média em B. Ao aplicar o método VDA a esses resultados, encontramos um valor de 99,51%. Esta percentagem sugere que um indivíduo aleatoriamente selecionado do grupo A tem 99,51% de probabilidade de exibir um valor de HOMA-IR superior ao de um indivíduo também selecionado aleatoriamente do grupo B. Em contrapartida, a probabilidade de um indivíduo do grupo B apresentar um valor de HOMA-IR maior que um indivíduo do grupo A é de apenas 0,49%. Essa interpretação intuitiva das diferenças entre os dois conjuntos de resultados permite compreender a magnitude da diferença entre os grupos e o impacto potencial dessa diferença na prática (82-85).

2.7.5. Modelo de regressão preditivo de aprendizado de máquina

Tradicionalmente, os computadores eram programados com regras lógicas e interpretáveis para processar conjuntos de dados e tomar decisões. No entanto, no campo da medicina, capturar as informações relevantes apenas com base nessas regras torna-se difícil, senão impossível, devido à sua vastidão e complexidade (84).

A principal diferença entre as abordagens tradicionais e o *machine learning* é que, no *machine learning*, um modelo aprende a partir de exemplos em vez de ser programado com regras. Para uma tarefa específica, exemplos são fornecidos na forma de entradas (chamadas de *features*) e saídas (chamadas de *labels*). Com isso, o modelo é capaz de aprender e fazer previsões precisas, tornando-se uma ferramenta valiosa no campo da medicina e em outras áreas (86).

Os padrões estatísticos detectados pelo modelo de *machine learning* podem ser utilizados para ajudar os médicos a identificar condições que eles não diagnosticam rotineiramente (86). Muitos algoritmos de *machine learning* são aplicados no campo da tomada de decisão computacional para a saúde como previsão e detecção de doenças (87,88).

O *machine learning* supervisionado é um tipo de aprendizado em que o algoritmo aprende uma função que mapeia as entradas para as saídas desejadas. Durante o treinamento, o algoritmo ajusta seus parâmetros para minimizar o erro entre a saída prevista e a saída real. Uma vez que o algoritmo é treinado, ele pode ser usado para prever a saída para novas entradas. O *machine learning* supervisionado é comumente utilizado em problemas de classificação e regressão para encontrar relações que não são facilmente visíveis para os seres humanos (87,89-91).

Um fluxo de trabalho simples para criar um modelo de regressão preditivo, também conhecido como ciclo de validação, envolve a preparação para a construção do modelo, o treinamento do modelo e a avaliação do modelo (85). Durante a etapa de preparação, tarefas como coleta de dados, pré-processamento e divisão dos dados em conjuntos de treinamento e teste são realizadas. O conjunto de treinamento é usado para construir o modelo de *machine learning*, enquanto o conjunto de teste é usado para avaliar o desempenho do modelo treinado. A amostragem para a obtenção dos conjuntos de treino e teste é executada de forma aleatória, mas essa tarefa é realizada pelo cientista de dados ou pelo engenheiro de *machine learning* durante a fase de pré-processamento, e não pelo algoritmo de *machine learning*. Geralmente, 70 a 80% do conjunto de dados globais são separados aleatoriamente para a criação do conjunto de treinamento, e os restantes 20 a 30% são usados para criar o conjunto de teste. Portanto, a amostragem e a aleatoriedade são controladas durante a fase de pré-processamento, antes do treinamento do algoritmo de *machine learning* (86,92).

O ato de capturar o padrão dos dados é chamado de “treinamento do modelo” ou *fitting*. Nessa etapa o algoritmo determina os parâmetros do modelo (86,92).

Na etapa de avaliação do modelo de *machine learning*, o conjunto de dados de teste é utilizado no modelo final, derivado dos dados de treinamento. O objetivo dessa etapa é confirmar se o modelo pode fazer previsões acuradas a partir de dados “não vistos” (não utilizados durante o treinamento), avaliando assim a capacidade de generalização do modelo (92).

No contexto da modelagem estatística, a natureza estocástica (ou aleatória) dos elementos é um fator crucial. Os dados, provenientes de uma distribuição aleatória, são intrinsecamente variáveis e incertos. Da mesma forma, o modelo, aprendido a partir desses dados aleatórios, também é considerado aleatório (92).

Ao avaliar o modelo, utilizamos conjuntos de dados observados, que são aleatórios, fazendo com que os resultados do teste também sejam aleatórios. Para manter a imparcialidade na avaliação, os testes devem ser conduzidos em uma amostra de dados estatisticamente independente dos dados usados durante o treinamento. Ou seja, o modelo deve ser validado em dados que não foram usados em sua fase de aprendizado. Isso nos fornece uma estimativa do erro de generalização, uma medida de quão bem o modelo pode generalizar para novos dados. Essa avaliação é crucial para entender a utilidade e a eficácia do modelo em cenários do mundo real, além das condições do conjunto de dados de treinamento (92).

Durante as etapas de treinamento e avaliação do modelo, é possível realizar o ajuste de valores especificados externamente ao procedimento de treinamento, o que é conhecido como “ajuste de hiperparâmetros” ou *tuning* de hiperparâmetros. Um hiperparâmetro de regularização, por exemplo, controla a capacidade do modelo, isto é, o quão flexível é o modelo. Um controle adequado da capacidade do modelo pode prevenir o *overfitting*. O ajuste dos hiperparâmetros é uma tarefa de meta-otimização. Assim, o resultado do ajuste dos hiperparâmetros é a melhor configuração desses hiperparâmetros, enquanto o resultado do treinamento do modelo é a melhor configuração dos parâmetros do próprio modelo (93).

2.7.6. Validação cruzada na avaliação de modelos

A validação cruzada, uma técnica que foi útil na era de conjuntos de dados pequenos e continua sendo relevante hoje, envolve a divisão do conjunto de dados em subconjuntos, sendo que um subconjunto é usado como conjunto de teste e os demais como conjuntos de treinamento. A maneira como essa divisão é realizada pode variar dependendo da técnica de validação cruzada utilizada. A validação cruzada *k-fold* é uma dessas técnicas (93).

Na validação cruzada *k-fold*, o conjunto de dados de treinamento será dividido em k subconjuntos de dados diferentes. O valor k refere-se ao número de grupos (*fold*) pelos quais o conjunto de treinamento deve ser dividido (91). Neste procedimento, primeiro dividimos o conjunto de dados de treinamento em k grupos. Para uma determinada configuração de hiperparâmetro, cada uma das k dobras se revezam sendo o conjunto de validação de espera; um modelo é treinado no restante das dobras $k - 1$ e medido na dobra mantida. O desempenho geral é considerado a média do desempenho em todos os k subgrupos. Este processo é realizado k vezes alternando de forma circular o subconjunto de validação. O procedimento é repetido para todas as configurações de hiperparâmetros que precisam ser avaliadas e, em seguida, os hiperparâmetros escolhidos são aqueles que resultaram na maior média de k grupos (93). A Figura 9 mostra o esquema realizado pelo *k-fold*.

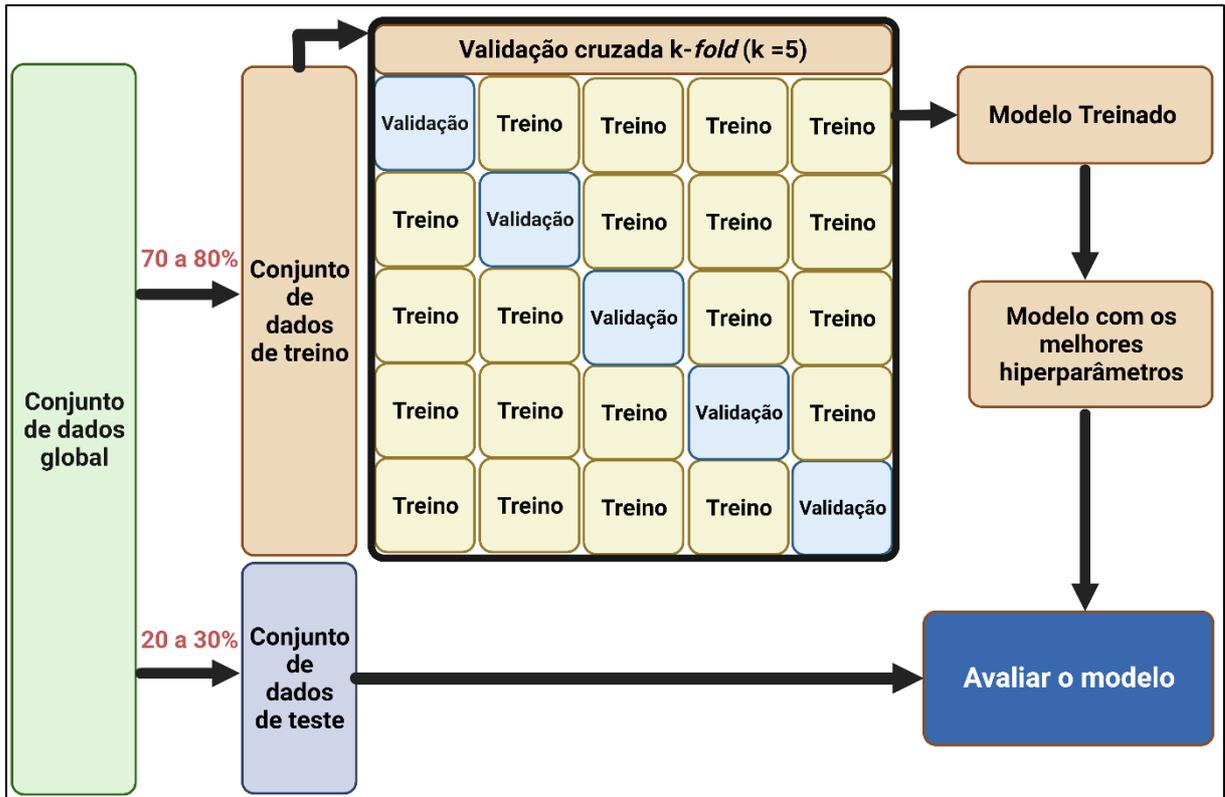


Figura 9 – Exemplo de um ciclo de validação de um modelo de *machine learning*. Separação do conjunto de dados usado para treinar e testar o modelo de *machine learning*, validação cruzada 5-fold, retreinamento após ajuste dos hiperparâmetros e avaliação final do modelo *machine learning* com os dados de treino e teste. Fonte: Elaborada pelo autor.

2.7.7. Métricas de avaliação dos modelos de regressão

No ciclo de validação de um modelo de *machine learning*, é preciso avaliar o desempenho do modelo em prever corretamente o resultado de novos dados de teste que não foram usados para construir o modelo. Dentro do pipeline da modelagem, as métricas mais conhecidas para avaliar o desempenho do modelo de regressão preditivo são o coeficiente de determinação” (R^2), raiz quadrada média dos erros (RMSE, *root mean squared error*) e erro médio absoluto (MAE, *mean absolute error*) (94-96).

A métrica R^2 é a medida estatística utilizada para avaliar o grau de ajuste dos resultados a uma linha ou curva de regressão. Ele varia de 0 a 1 e indica a proporção da variação total da variável resposta que é explicada pela variação da variável preditora. Quanto maior o R^2 , melhor o modelo de *machine learning* (93).

A métrica RMSE calcula "raiz quadrática média dos erros" entre valores observados (reais) e previsões feitas pelo modelo de *machine learning*. Quanto menor o RMSE, melhor o modelo ML (93, 95-96). A métrica MAE calcula "erro médio absoluto" entre valores observados (reais) e previsões feitas pelo modelo de *machine learning*. Quanto menor o MAE, melhor o modelo *machine learning* (95-96).

Uma característica notável do RMSE é a sua sensibilidade a grandes erros nas previsões, que podem ser causados por *outliers* no conjunto de dados; se o modelo erra significativamente em uma única previsão, o valor do RMSE pode ser consideravelmente afetado e aumentar, o que revela a falta de robustez do RMSE. A robustez, neste contexto, refere-se à resistência de uma métrica a flutuações significativas devido a ruídos ou *outliers* nos dados. Ao contrário do RMSE, o MAE pode ser considerado mais robusto, pois ele não amplifica o impacto de grandes erros ao elevá-los ao quadrado, tratando assim todos os erros com igual importância. Essa diferença entre o RMSE e o MAE é útil para diagnosticar o comportamento das previsões do modelo. Por exemplo, um valor do RMSE significativamente maior do que o MAE pode indicar a existência de erros significativos nas previsões, sugerindo que o modelo pode não estar se ajustando adequadamente a certas partes do conjunto de dados (93,95).

2.7.8. Identificação dos modelos com sub-ajuste e sobre-ajuste

Algumas métricas de avaliação do desempenho são úteis também para avaliar possíveis presenças de sub-ajuste (*underfitting*) e sobre-ajuste (*overfitting*), que são dois problemas comuns que podem ocorrer ao criar modelos de aprendizado de máquina (93-97) (Figura 10).

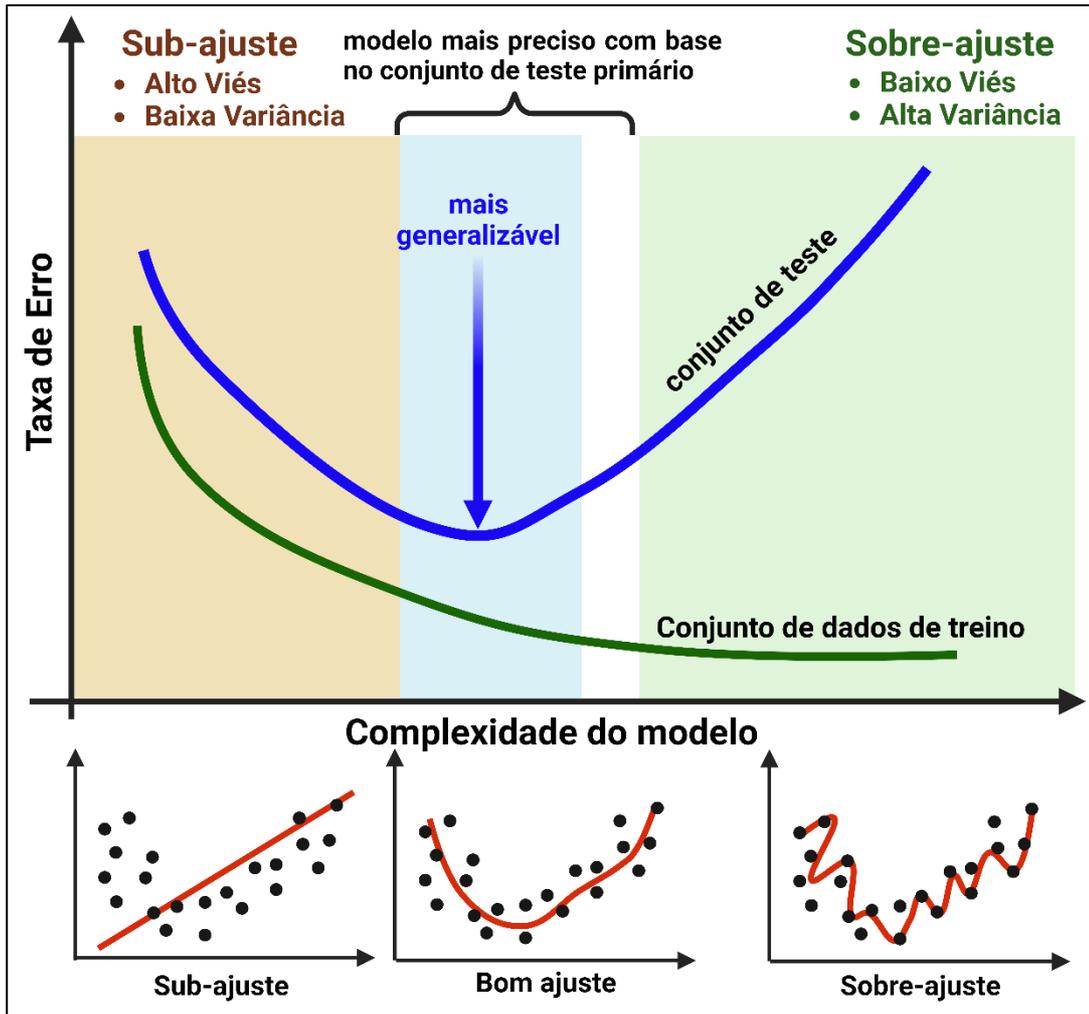


Figura 10 – *Trade-off* entre viés e variância no *machine learning*. Os dados de treinamento (linha verde) geralmente não representam completamente os resultados da fase de teste. Os dados de subajuste são menos variáveis, mas exibem uma alta taxa de erro e alto viés (caixa marrom). Em contraste, os dados de sobre-ajuste resultam em baixo viés e alta variância (caixa verde). A zona ideal (mais generalizável) fica entre o sobre-ajuste e o sub-ajuste dos dados e pode não ser ideal até que várias tentativas de teste tenham sido feitas (caixa azul). Fonte: Adaptada da referência (97).

O sub-ajuste ocorre quando o modelo não é capaz de se ajustar adequadamente aos dados de treinamento, ou seja, é muito simples para capturar a complexidade dos dados. Nesse caso, o modelo não consegue capturar todas as informações relevantes nos dados e não é capaz de generalizar bem para novos dados de teste. Um *bias* alto causa sub-ajuste, pois os resultados preditos pelo modelo perdem relação com os resultados observados (reais). Isso geralmente leva a resultados ruins das métricas R^2 , RMSE e MAE tanto para o conjunto de dados de treino quanto nos dados de teste (93,97).

Por outro lado, o sobre-ajuste ocorre quando o modelo se ajusta excessivamente aos dados de treinamento, capturando até mesmo o ruído presente nesses dados. Isso se dá quando o modelo é muito complexo e especificamente ajustado aos dados de treinamento, o que aumenta a sua variância e prejudica sua capacidade de generalização para novos dados de teste. Com o sobre-ajuste, as previsões do modelo podem ficar muito influenciadas pelo ruído nos dados de treinamento, prejudicando a relação com os resultados observados (reais). Portanto, o sobre-ajuste geralmente leva a resultados muito bons das métricas R^2 , RMSE e MAE para o conjunto de dados de treino e resultados ruins para o conjunto de dados de teste (93,97). A busca pelo equilíbrio entre ajuste e sobre-ajuste é fundamental para encontrar o modelo mais generalizável (2).

2.7.9. Modelos de aprendizado de máquina aplicado ao laboratório clínico

Atualmente, o diagnóstico laboratorial tem um papel fundamental na prestação de cuidados de saúde no campo da medicina. Especialistas e técnicos de laboratório desempenharam um papel significativo nas últimas décadas no aprimoramento do portfólio analítico, na melhoria da qualidade e no tempo de resposta intralaboratorial. A automação de muitos processos laboratoriais permitiu uma maior eficiência no tempo de execução, concedendo aos especialistas de laboratório mais recursos para aplicar seus conhecimentos na seleção e interpretação dos testes. Isso, por sua vez, diminuiu a carga de trabalho dos médicos, que anteriormente eram responsáveis por essas tarefas (10).

Entretanto, a melhoria dos processos laboratoriais, devido à automação e ao aumento da disponibilidade de testes, também levou ao uso indevido (sobre e subutilização) de testes laboratoriais, bem como à interpretação incorreta dos resultados. Essa situação pode levar a possíveis danos ao paciente e impactos financeiros. Portanto, é necessário enfatizar a importância da seleção apropriada de testes e da interpretação adequada de seus resultados para garantir uma prestação de cuidados de saúde eficaz e segura (10).

Nesse cenário, os modelos de *machine learning* se tornam peça fundamental. O uso de *machine learning* em medicina laboratorial também ganhou força e é uma área

cada vez mais importante da qual os profissionais devem se manter atualizados. O campo da inteligência artificial cresceu nos últimos 10 anos e, conseqüentemente, a utilização de modelos de *machine learning*, pois é uma das formas de aplicar a inteligência artificial. Apesar do papel crucial do diagnóstico laboratorial na tomada de decisões clínicas, a maioria dos estudos de inteligência artificial se concentra em cirurgia, radiologia e oncologia, e pouca atenção é dada à integração da inteligência artificial na medicina laboratorial (97,98).

Contudo, em um artigo de revisão publicado por Rabbani *et al.* (10) sobre o estado atual do *machine learning* na medicina laboratorial, foram reveladas diversas aplicações interessantes. Estas incluem previsão de valores de testes laboratoriais, melhoria da utilização do laboratório, automatização de processos laboratoriais, promoção da interpretação precisa de testes laboratoriais e, finalmente, aprimoramento dos sistemas de informações de medicina laboratorial. Em tais estudos, entre os algoritmos de *machine learning* utilizados, os algoritmos baseados em árvore e redes neurais geralmente obtiveram melhor desempenho.

Alguns exemplos notáveis de modelos de machine learning aplicados à medicina laboratorial incluem (8):

- Previsão de anemia por deficiência de ferro e concentrações séricas de ferro a partir de índices de hemograma completo usando modelo baseado em rede neural;
- Projeção de resultados do teste de função hepática a partir de outros testes no painel, destacando a redundância no painel de função hepática usando modelo baseado em árvore de decisão;
- Classificação dos perfis de esteróides na urina como normais ou anormais e interpretação adicional dos processos de doenças específicas usando modelo baseado em árvore de decisão para possibilitar a interpretação automatizada dos resultados;

Do ponto de vista clínico, como um campo relativamente jovem, o *machine learning* na medicina laboratorial requer padronização e regulamentação. Atualmente, não existem diretrizes sobre as melhores práticas para a validação clínica de algoritmos de *machine learning*. Mesmo em campos da patologia onde as ferramentas

clínicas de *machine learning* estão se desenvolvendo rapidamente, como a patologia digital, não existem diretrizes bem estabelecidas para aplicativos desenvolvidos em laboratório ou para a verificação de software desenvolvido por fornecedores. De fato, recentemente, o CAP formou um comitê para começar a abordar essa lacuna, incluindo a criação de padrões de laboratório para aplicações de inteligência artificial (10).

Da mesma forma, entidades reguladoras, como a *Food and Drug Administration* (FDA), ainda não definiram completamente qual será seu papel na regulamentação de aplicativos de aprendizado de máquina desenvolvidos em laboratório. Em 2021, o FDA publicou um plano de ação para atualizar a estrutura regulatória proposta para software baseado em inteligência artificial/aprendizado de máquina como um dispositivo médico. Este é um passo importante para regulamentar o mercado desse tipo de software na medicina. No entanto, ainda não está claro qual será a posição dos reguladores federais e estaduais em relação às ferramentas de aprendizado de máquina desenvolvidas em laboratório. Finalmente, serão necessários mais estudos que avaliem a implementação real dessas aplicações em laboratórios clínicos e que demonstrem sua segurança e confiabilidade para que os profissionais de medicina laboratorial adotem totalmente essa tecnologia (10).

3. OBJETIVOS

Objetivo Principal

- Investigar se a concentração sérica de prolactina tem influência sobre o metabolismo glicídico e lipídico.

Objetivos Secundários

- Estabelecer uma “zona cinza” que represente os pontos de inflexão, associando os resultados dos exames do metabolismo glicídico e lipídico à prolactina;
- Desenvolver uma ferramenta baseada em um algoritmo personalizado de *machine learning* capaz de detectar qualquer correlação relevante existente entre os valores médios da prolactina e os exames do metabolismo glicídico e lipídico, estimar o ponto de inflexão e o respectivo IC, e prever os resultados médios dos exames do metabolismo glicídico e lipídico com base nesses pontos de inflexão estimados.

4. MÉTODOS

4.1. SUJETOS E DESENHO DO ESTUDO

Estudo transversal com 65.795 resultados laboratoriais de pacientes adultos, de ambos os sexos, no 1º semestre de 2018, obtidos por meio da técnica de amostragem indireta de extração e anonimização do conjunto de dados do banco de dados do Sistema Informatizado Laboratorial no Laboratório Sabin, Matriz, Brasília-Distrito Federal.

4.2. ANÁLISE LABORATORIAL

Os parâmetros lipídicos incluíram colesterol total, HDL-c, LDL-c e triglicérides. Os parâmetros bioquímicos e hormonais incluíram glicose, prolactina, insulina e HOMA-IR eq. [1]. Os resultados de prolactina e insulina foram quantificados por quimioluminescência no procedimento de medição Advia Centaur XP da fabricante Siemens. Os resultados de glicose, colesterol total, HDL-c, LDL-c e triglicérides foram quantificados pelo procedimento de medição ADVIA 2400 *Chemistry* da fabricante Siemens, cujos princípios dos ensaios são hexoquinase, enzimático, eliminação/catalase, eliminação/catalase e GPO-Trinder sem branco do soro, respectivamente.

O HOMA-IR foi calculado pela seguinte fórmula:

$$HOMA - IR = \frac{GLI \times INS}{405} \quad [1]$$

onde, GLI: glicose em mg/dL; INS: insulina em mU/L.

A bula do kit reagente informa que o intervalo de referência da prolactina para mulheres não grávidas, mulheres pós-menopausa e homens são 2,8 a 29,2 ng/mL, 9,7 a 208,5 ng/mL, 1,8 a 20,3 ng/mL e 2,1 a 17,7 ng/mL, respectivamente. Esses intervalos de referência representam 95% dos 661 resultados obtidos de indivíduos aparentemente saudáveis.

4.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS E MODELAGEM

4.3.1. Estatísticas descritiva

As medidas de posição estimadas para os exames prolactina, glicose, insulina, colesterol total, HDL-c, LDL-c e triglicérides foram o maior valor, média, mediana, moda e menor valor. As medidas de dispersão estimadas foram desvio padrão, variância, intervalo interquartilico e amplitude.

4.3.2. Avaliando os pressupostos de normalidade e homoscedasticidade

Os resultados analíticos obtidos em grupos populacionais saudáveis costumam apresentar distribuição gaussiana ou assimétrica. Distribuições com assimetria negativa são raras na Medicina Laboratorial, enquanto as distribuições com assimetria positiva, assemelhando-se a perfis lognormais, gama ou outros tipos similares de distribuição, são comumente encontradas (99).

A eficiência dos testes de normalidade é influenciada pelo tamanho da amostra. Um aumento no tamanho amostral resulta no inflacionamento do erro tipo II (ou falso negativo) e na diminuição da sensibilidade do teste de normalidade. Ou seja, o teste estatístico pode "rejeitar a normalidade" quando, na verdade, os dados possuem uma distribuição normal (73,100). Portanto, em tais casos, o uso de histogramas e valores absolutos de assimetria e curtose é útil para identificar distribuições não normais (100, 101).

Logo, serão empregados histograma, gráfico de densidade - com detalhes sobre média, mediana e moda - e box-plot, a fim de extrair informações visuais a respeito do perfil de distribuição dos resultados. Serão ainda avaliados os coeficientes de curtose e assimetria, que representam características associadas à forma do histograma. As diretrizes para a interpretação dos resultados desses coeficientes podem ser consultadas nas Tabelas 5 e 6, respectivamente. A distribuição dos resultados será classificada como normal ou gaussiana se o coeficiente de curtose (k) estiver situado no intervalo de 2,7 a 3,3, e o coeficiente de assimetria (Sk) estiver no

intervalo de -0,15 a +0,15. (102, 103).

Tabela 5 – Diretrizes para interpretação dos resultados do coeficiente de assimetria.

Sk	Tipo de distribuição
Entre -0,15 e 0,15	A distribuição é aproximadamente normal/simétrica (ou não distorcida).
Entre -0,5 e -0,15 ou entre 0,15 e 0,5	A distribuição é levemente distorcida.
Entre -1 e -0,5 ou entre 0,5 e 1	A distribuição é moderadamente distorcida.
Menor que -1 ou maior que 1	A distribuição é altamente distorcida.

Nota: Sk, coeficiente de assimetria. A assimetria destaca a predominância de valores em uma cauda em comparação com a outra. Fonte: Adaptado das referências (102, 103).

Tabela 6 – Diretrizes para interpretação dos resultados do coeficiente de curtose.

k	Tipo de distribuição
Entre 2,7 e 3,3	Distribuição mesocúrtica, caracterizada por apresentar um pico e caudas com características similares à distribuição normal, sinaliza uma concentração de dados ao redor da média típica de uma distribuição gaussiana.
Menor que 2,7	Distribuição platicúrtica, caracterizada por apresentar um pico mais achatado e caudas mais leves em relação à distribuição normal, sinaliza uma menor concentração de dados ao redor da média.
Maior que 3,3	Distribuição leptocúrtica, caracterizada por apresentar um pico mais elevado e caudas mais densas em relação à distribuição normal, sinaliza uma maior concentração de dados ao redor da média.

Nota: k, coeficiente de curtose. Enquanto a assimetria destaca a predominância de valores em uma cauda em comparação com a outra, a curtose avalia a presença de valores mais distantes da média em ambas as caudas. A curtose é uma medida do peso conjunto das caudas de uma distribuição em relação à sua parte central. Fonte: Adaptado das referências (102, 103).

O Teste de Levene, um método não paramétrico, é empregado para verificar a homogeneidade das variâncias - isto é, a igualdade das variâncias - entre dois ou mais grupos. No software R, a função `leveneTest()` é parte do pacote "car". Esse teste foi utilizado para comparar os resultados da prolactina entre os gêneros masculino e feminino em cada intervalo de resultados, de acordo com a nova proposta de "classificação metabólica": hipoprolactinemia (< 7 ng/mL), normoprolactinemia (7 a 25 ng/mL), zona "HomeoFIT-PRL" (25 a 100 ng/mL) e hiperprolactinemia (>100 ng/mL). Também foi aplicado para comparar os resultados individuais e as médias dos resultados previamente estratificados de HOMA-IR, glicose, insulina, colesterol total, HDL-c e LDL-c.

4.3.3. Estudo de comparação entre sexos e faixas de resultados de prolactina

4.3.3.1. Análise da significância estatística

Os dados individuais foram estratificados em 106 partições, baseando-se nas concentrações de prolactina de cada indivíduo. Para cada partição, calculamos a média das concentrações de prolactina e dos resultados dos exames do metabolismo glicídico e lipídico. Essas médias foram empregadas em três aspectos principais do estudo: (1) na comparação dos resultados dos exames do metabolismo glicídico e lipídico em cada faixa da nova classificação metabólica da prolactina, (2) na estimação do ponto de inflexão por meio do modelo de *machine learning*, e (3) na predição dos resultados médios desses exames do metabolismo glicídico e lipídico a partir do ponto de inflexão estimado. Além disso, os resultados individuais de prolactina foram utilizados para comparar as concentrações de prolactina entre os sexos.

Existem várias técnicas estatísticas projetadas para analisar amostras independentemente do formato de sua distribuição, denominadas estatísticas não paramétricas. Entre elas, podemos citar os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Essas técnicas substituem os dados originais por postos ordenados (*ranks*) de acordo com a escala de dados (101).

O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi empregado para comparar a distribuição das concentrações de prolactina entre os sexos masculino e feminino em cada intervalo de resultados, conforme a nova proposta de "classificação metabólica": hipoprolactinemia (< 7 ng/mL), normoprolactinemia (7 a 25 ng/mL), zona "HomeoFIT-PRL" (25 a 100 ng/mL) e hiperprolactinemia (>100 ng/mL) (2-4).

O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar as distribuições dos resultados individuais e das médias dos resultados previamente estratificados de HOMA-IR, glicose, insulina, colesterol total, HDL-c, LDL-c e triglicérides em cada intervalo de resultados de prolactina. Diante de um resultado estatisticamente significativo no teste de Kruskal-Wallis, o teste *post-hoc* de Dunn foi aplicado, com ajuste do *p*-valor pelo método de Bonferroni para múltiplas comparações.

O r_{Pearson} eq. [2] foi usado para estimar a correlação entre a média dos resultados de prolactina frente a média dos resultados da variável resposta (HOMA-IR, glicose, insulina, colesterol total, HDL-c, LDL-c ou triglicerídeos) acima e abaixo do ponto de inflexão que foi estimado pelo modelo de *machine learning*. Para a estimativa do r_{Pearson} , adotamos a função `cor.test()`, incorporada ao pacote básico do software R. Esta função não apenas calcula a correlação, mas também fornece o IC de 95% e o respectivo *p*-valor associado à r_{Pearson} .

$$r_{\text{Pearson}} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \times (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\left[\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2\right] \times \left[\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2\right]}} \quad \text{eq. [2]}$$

onde, x_i : resultados médios de prolactina ; y_i : resultados médios da variável resposta (HOMA-IR, glicose, insulina, colesterol total, HDL-c, LDL-c ou triglicerídeos); \bar{x} : é a média global dos resultados médios da prolactina;

Os resultados dos testes de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis seguido pelo *post-hoc* de Dunn e coeficiente de correlação de Pearson, foram considerados estatisticamente significativos quando o valor-p foi inferior a 0,005.

4.3.3.2. Análise da significância clínica

Após a estimação da correlação pelo r_{Pearson} entre a média dos resultados de prolactina frente a média dos resultados da variável resposta (HOMA-IR, glicose, insulina, colesterol total, HDL-c, LDL-c ou triglicérides) acima e abaixo do ponto de inflexão estimado pelo modelo de *machine learning*, frente a uma correlação estatisticamente significativa, foi selecionado o subconjunto que apresente o melhor ajuste à regressão, isto é, o subconjunto com maior r_{Pearson} .

Considerando que o resultado da r_{Pearson} é um forma de avaliar o TDE, a interpretação dos resultados foi delineada na Tabela 7. Adotaremos uma abordagem conservadora para a interpretação da correlação, utilizando o limite inferior do IC de 95% do r_{Pearson} como referência para tal interpretação.

Tabela 7 – Diretrizes para a interpretação do coeficiente de correlação de Pearson (r_{Pearson}).

Coeficiente de correlação de Pearson (r_{Pearson})		Interpretação
1,00	- 1,00	Correlação perfeita
0,80 a 0,99	- 0,80 a - 0,99	Correlação muito forte
0,60 a 0,79	- 0,60 a - 0,79	Correlação moderada
0,30 a 0,59	- 0,30 a - 0,59	Correlação razoável
0,01 a 0,29	- 0,01 a - 0,29	Correlação pobre
0,00	0,00	nenhuma correlação

. Fonte: Adaptado das referências (121,122).

Ao trabalhar com amostras grandes, a sensibilidade dos testes de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e *pos-hoc* de Dunn aumenta, o que permite a detecção de diferenças pequenas e, possivelmente, clinicamente insignificantes entre as amostras ou grupos. Nesse contexto, é essencial levar em conta o TDE.

O TDE “r” do teste de Mann-Whitney (r_{MW}) eq. [3] foi empregado na comparação pareada quando houve um resultado estatisticamente significativo no teste de Mann-Whitney. Se $r_{MW} > 0,50$ (104,105), o método VDA eq. [4] foi aplicado, e se o resultado foi $> 71\%$, o *bias* analítico (diferença entre as médias das faixas de prolactina comparadas) foi confrontado com o *bias* máximo. Um *bias* analítico maior do que o *bias* máximo indicou que as diferenças foram relevantes do ponto de vista prático, ou seja, clinicamente significativas (73,81-83).

$$r_{MW} = \frac{z}{\sqrt{N}} \quad [3]$$

onde, r_{MW} : tamanho do efeito r do teste de Mann-Whitney; Z: valor padronizado para o valor U; N: o número total de amostras dos dois grupos avaliados.

$$VDA = \frac{U}{n_1 \times n_2} \quad [4]$$

onde, U: valor da estatística U do teste de Mann-Whitney; n_1 : tamanho amostral do grupo 1; n_2 : tamanho amostral do grupo 2.

A estimativa do r_{MW} se mantém independente do tamanho da amostra, mesmo com a presença de N na fórmula. Isso acontece porque z é sensível ao tamanho da amostra; ao dividir por uma função de N, o impacto do tamanho da amostra na estimativa resultante do tamanho do efeito é neutralizado (105).

O Epsilon-quadrado ordinal (ε^2) eq. [5] foi empregado para avaliar o TDE no grupo quando houve um resultado estatisticamente significativo nos testes de Kruskal-Wallis e pós-hoc de Dunn. Se $\varepsilon^2 > 0,26$ (83), o método VDA foi aplicado, e se o resultado foi $> 71\%$, o *bias* analítico (diferença entre as médias das faixas de prolactina comparadas) foi confrontado com o *bias* máximo. Um *bias* analítico maior do que o *bias* máximo indicou que as diferenças foram relevantes do ponto de vista prático, ou seja, clinicamente significativas (73,81-83).

$$\varepsilon^2 = \frac{H}{N - 1} \quad [5]$$

onde, H: o valor da estatística H do teste de Kruskal-Wallis; n: o número total de observações.

Os intervalos de confiança de 95% foram estimados para os TDE r_{MW} e ϵ^2 e o fluxo para interpretação do estudo de comparação dos resultados médios dos exames que avaliam o metabolismo glicídico e lipídico entre as faixas de prolactina, conforme a nova proposta de "classificação metabólica", está ilustrado na Figura 11 e foi denominado de "Quarteto de Critérios de Significância". Esse método tenta contornar o problema comum de superestimação artificial da "significância estatística" em estudos com grandes amostras e reduz a taxa de falsos positivos nas análises comparativas. Assim, permite identificar diferenças clinicamente significativas, além de estatisticamente significativas. Será utilizado uma abordagem conservadora e, portanto, os resultados de r_{MW} e ϵ^2 utilizados no processo de interpretação do atendimento ou não ao "Quarteto de Critérios de Significância", será o limite inferior do IC de 95%.

As diretrizes gerais para a interpretação dos resultados do p -valor, r , ϵ^2 , VDA e bias analítico estão apresentadas nas Tabelas 8. O *bias* máximo do HOMA-IR foi estimado com base no estado da arte (Modelo 3 do consenso de Milão), conforme as publicações de Haeckel *et al.* (106-110). O *bias* máximo desejável percentual para glicose, insulina, colesterol total, HDL-c, LDL-c e triglicérides foi obtido no site "[EFLM Biological Variation Database](https://biologicalvariation.eu/)" (<https://biologicalvariation.eu/>) e baseia-se na compilação de estudos sobre a variação biológica (Modelo 2 do consenso de Milão) (111,112). O *bias* máximo desejável absoluto eq. [6] foi obtido pela multiplicação do *bias* máximo desejável percentual e o nível de decisão médica (NDM) para o exame (61,63,65,70,71).

$$bias\ desejav\grave{e}l_{absoluto} = bias\ desejav\grave{e}l_{percentual} \times NDM \quad [6]$$

onde, NDM: nível de decisão médica.

Tabela 8 – Diretrizes para a interpretação dos resultados do p -valor, r , ϵ^2 , VDA e bias analítico.

Avaliação da significância estatística:		
Estatisticamente não significativo	$p\text{-valor} \geq 0,05$	
Estatisticamente sugestivo	$0,05 > p\text{-valor} \geq 0,005$	
Estatisticamente significativo	$p\text{-valor} < 0,005$	
Avaliação do Tamanho do efeito comparações pareadas – r :		
TDE irrisório	$ r < 0,10$	
TDE pequeno	$0,10 \leq r < 0,30$	
TDE médio	$0,30 \leq r < 0,50$	
TDE grande	$ r \geq 0,50$	
Avaliação do TDE no grupo – Epsilon ao quadrado ordinal (ϵ^2):		
TDE irrisório	$\epsilon^2 < 0,01$	
TDE pequeno	$0,01 \leq \epsilon^2 < 0,08$	
TDE médio	$0,08 \leq \epsilon^2 < 0,26$	
TDE grande	$\epsilon^2 \geq 0,26$	
Avaliação do TDE-LC nas comparações pareadas – VDA:		
TDE irrisório	$VDA < 0,56$	
TDE pequeno	$0,56 \leq VDA < 0,64$	
TDE moderado	$0,64 \leq VDA < 0,71$	
TDE grande	$VDA \geq 0,71$	
<i>Bias</i> Máximo	Modelo	Nível de decisão médica
Prolactina: 13,00%;	Modelo 2	MRE
Glicose: 2,40%	Modelo 2	100 mg/dL ou MRE
Insulina: 10,50%	Modelo 2	25 mcUI/mL ou MRE
Colesterol total = 4,38%;	Modelo 2	190 mg/dL ou MRE
LDL-c = 7,00%;	Modelo 2	110 mg/dL ou MRE
HDL-c = 6,20%;	Modelo 2	40 mg/dL ou MRE
Triglicérides = 10,50%	Modelo 2	150 mg/dL ou MRE
HOMA-IR = 5,22%	Modelo 3	2,7 ou MRE

Nota: TDE: Tamanho do efeito; TDE-LC: Tamanho do efeito linguagem comum; VDA: método Vargha e Delaney's A; r_{MW} : tamanho do efeito r do Teste Mann-Whitney; Modelo 2: Fonte da especificação para bias máximo baseado no Modelo 2 (estudos da variação biológica) do consenso de Milão; Modelo 3: Fonte da especificação para bias máximo baseado no Modelo 3 (estado da arte) do consenso de Milão;

MRE: média dos resultados do exame; HOMA-IR: *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*. Fonte: Adaptado das referências (63,65,70,71,83,104-109).

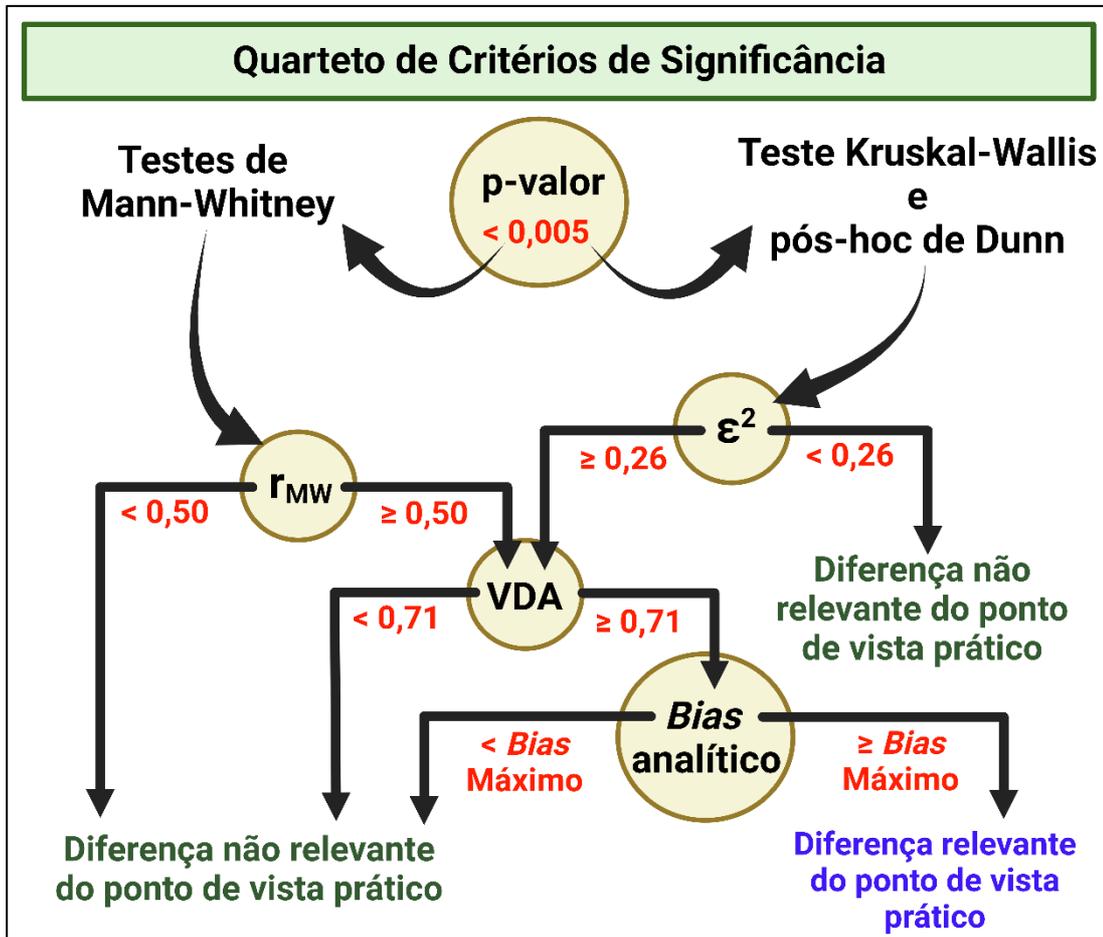


Figura 11 – Fluxo do "Quarteto de Critérios de Significância". r_{MW} : tamanho de efeito r para o teste de Mann-Whitney. A abordagem conservadora considera o limite inferior do IC de 95% do r_{MW} ; ϵ^2 , limite inferior do IC de 95% do tamanho do efeito Epsilon-quadrado ordinal; VDA, tamanho do efeito pelo método Vargha e Delaney's A. Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.4. Modelagem

Após a análise estatística inferencial, adotamos técnicas de modelagem comumente usadas em *machine learning* para determinar o ponto de inflexão entre os resultados da variável resposta (glicose, insulina, HOMA-IR, colesterol total, HDL-c, LDL-c e triglicérides) e a variável preditora (prolactina). O objetivo era prever os resultados das variáveis resposta com base no valor estimado da prolactina no ponto de inflexão identificado entre as variáveis resposta e preditora.

O pipeline do processo de modelagem e predição está detalhado a seguir:

1. Extração do conjunto de dados do banco de dados do Sistema Informatizado Laboratorial contendo os exames laboratoriais de prolactina, glicose, insulina, HOMA-IR, colesterol total, HDL-c, LDL-c e triglicérides;
2. Anonimização dos resultados laboratoriais;
3. Definição da prolactina sérica como a variável preditora e análise individualizada da associação entre os resultados médios de prolactina e os resultados médios da variável resposta (glicose, insulina, HOMA-IR, colesterol total, HDL-c, LDL-c e triglicérides);
4. Separação aleatória de 70% do conjunto de dados globais para a criação do conjunto de dados de treino e 30% para a criação do conjunto de dados de teste;
5. Utilização do conjunto de dados de treino para treinamento do modelo usando o método de “Regressão Segmentada” (pacote “segmented”) para estimação do ponto de inflexão (ou *changepoint* ou *breakpoint*) da relação entre as variáveis preditora e resposta (113-117);
 - 5.1. Avaliação da capacidade preditiva do modelo treinado utilizando o conjunto de dados de treino;
 - 5.2. Avaliação da capacidade de generalização do modelo treinado utilizando o conjunto de dados de teste;
 - 5.3. Estimação do ponto de inflexão e do seu respectivo IC de 95%. O ponto de inflexão será usado como critério para particionar o conjunto de dados em dois subconjuntos. A estimação de apenas um ponto de inflexão foi pré-definida no hiperparâmetros “npsi” que controla o número de ponto de inflexão passíveis de serem estimados;
 - 5.4. Cálculo do R^2 do subconjunto de resultados com valores menores ou iguais ao ponto de inflexão e para valores maiores do ponto de inflexão estimado para prolactina;
6. Seleção automática do subconjunto com maior grau de ajuste à regressão dos resultados médios da prolactina e da variável resposta. Foi utilizado como critério de seleção o maior valor absoluto do coeficiente de correlação de Pearson (r_{Pearson});

7. Separação aleatória de 70% do subconjunto selecionado automaticamente para a criação do subconjunto de dados de treino e 30% para a criação do subconjunto de dados de teste;
8. Utilização do subconjunto de dados de treino para treinamento do modelo usando o método *bagEarth* e validação cruzada *k-fold* ($k = 5$), ambos são hiperparâmetros da função `train()` do pacote "caret". O método *bagEarth* consiste em um wrapper de ensacamento para "splines de regressão adaptativa multivariada" (MARS). Além disso, o hiperparâmetro *nprune* é ajustado com base no valor otimizado da métrica R^2 (95);
 - 8.1. Avaliação da capacidade preditiva do modelo treinado utilizando o conjunto de dados de treino;
 - 8.2. Avaliação da capacidade de generalização do modelo treinado utilizando o conjunto de dados de teste;
9. Utilização dos dois modelos treinados, pelo método "Regressão Segmentada" método MARS, para prever o resultado variável resposta (glicose, insulina, HOMA-IR, colesterol total, HDL-c, LDL-c e triglicérides) com base no resultado da variável preditora prolactina. Comparar os dois resultados preditos e verificar se eles convergem (95,113-117).

4.3.4.1. Regressão segmentada

O pacote "segmented", aplicado no contexto de análise de regressão no R, é particularmente útil ao lidar com dados que apresentam relações não lineares. Esta ferramenta permite a modelagem de relações que variam em diferentes "segmentos" dentro do domínio da variável preditora, neste caso, a prolactina. O termo "segmentado" é aplicado a este tipo de modelo, onde a relação entre as variáveis é determinada pelo valor da variável explicativa (113-117).

O pacote "segmented" é baseado na Regressão Segmentada ou por partes. O objetivo é ajustar uma linha ou curva diferente a distintos "segmentos" ou intervalos de valores da prolactina. Isso facilita a representação de relações não lineares que podem variar em pontos diversos ao longo do intervalo da prolactina (113-117).

Utilizando o pacote "segmented", é possível estabelecer um ou mais "pontos de

inflexão". Esses pontos, também conhecidos como "pontos de quebra", marcam as transições entre diferentes segmentos nos dados (113-117).

Para cada segmento singular, delimitado por esses pontos de inflexão, o pacote "segmented" ajusta um modelo de regressão autônomo, concedendo intercepções (coeficiente linear) e inclinações (coeficiente angular) únicas para cada um. Quando os pontos de inflexão não são explicitamente definidos, o pacote "segmented" tem a habilidade de estimá-los automaticamente por meio de um algoritmo iterativo que busca minimizar a soma total do erro residual quadrado (113-117).

Em nossa abordagem, um hiperparâmetro, $npsi = 1$, foi especificado na função `segmented()`. Essa configuração permite à função a identificação autônoma de um único ponto de inflexão nos dados.

4.3.4.2. Wrapper de ensacamento para Splines de Regressão Adaptativa Multivariada

O pacote "caret" tem uma função chamada `train()` que é usada para escolher o modelo ideal e estimar o desempenho do modelo a partir do conjunto de dados de treinamento. Um dos hiperparâmetros da função `train()` é o "método". O método *bagEarth* realiza um wrapper de ensacamento para Splines de Regressão Adaptativa Multivariada e refere-se a uma abordagem que combina duas técnicas de aprendizado de máquina: "Ensacamento" (*Bagging*) e Splines de Regressão Adaptativa Multivariada (MARS, do inglês *Multivariate. Adaptive Regression Splines*) (95).

"Wrapper" é um termo genérico em ciência da computação e programação que se refere a um componente de software ou função que "embrulha" ou encapsula outro componente ou função, fornecendo uma interface simplificada ou adicional para interagir com o componente encapsulado. Em outras palavras, um wrapper atua como um intermediário entre o usuário e o componente encapsulado, permitindo que o usuário acesse e utilize o componente de uma maneira mais conveniente ou personalizada. No contexto de aprendizado de máquina, um "wrapper" pode ser usado para criar uma interface personalizada para algoritmos de aprendizado de máquina, facilitando a integração com outros componentes ou simplificando o uso e a

configuração dos algoritmos. Wrappers também podem ser usados para combinar ou modificar algoritmos existentes, como no caso do "wrapper de ensacamento para MARS", que combina a técnica de ensacamento com o algoritmo MARS para melhorar o desempenho e a estabilidade do modelo (95).

Bagging é uma técnica de aprendizado de máquina usada para melhorar a estabilidade e a exatidão dos modelos de aprendizado, reduzindo a variância e o *overfitting*. *Bagging* é um acrônimo para "Bootstrap Aggregating" e funciona treinando vários modelos independentes usando diferentes subconjuntos de dados de treinamento gerados pelo bootstrap (reamostragem com reposição). Os resultados dos modelos individuais são então combinados para produzir uma única previsão agregada (95).

MARS é uma técnica de modelagem não linear, desenvolvido por Jerome H. Friedman em 1991, que estende a regressão linear para lidar com relacionamentos não lineares e interações entre variáveis. A ideia central do MARS é construir um modelo de regressão aproximando a função desconhecida por meio de uma combinação linear de funções básicas, geralmente chamadas de "splines". Cada função básica é uma função por partes, definida por uma série de pontos de junção (*knots*), onde a função muda sua inclinação. As funções básicas podem ser adaptadas aos dados, permitindo que o modelo capture interações e não-linearidades nos dados. O algoritmo MARS constrói o modelo automaticamente, selecionando as funções de base mais relevantes e suas interações (95, 118-120).

A técnica MARS foi usada como uma alternativa flexível e poderosa para modelos de regressão lineares e polinomiais, devido as relações subjacentes entre a variável prolactina e as variáveis HOMA-IR, colesterol total, LDL-c, HDL-c e triglicérides serem desconhecidas e não-lineares.

4.3.4.3. Métricas de avaliação dos modelos

As métricas utilizadas para avaliar a capacidade preditiva do modelo de *machine learning*, que utiliza os métodos de Regressão Segmentada e MARS, foram o coeficiente de determinação" (R^2) eq. [7], *root mean squared error* (RMSE) eq. [8] e *mean absolut error* (MAE) eq. [9]. Essa métricas foram utilizadas para avaliar tanto os modelos treinados, utilizando o conjunto e subconjunto de dados de treino, quanto para avaliar a capacidade de generalização dos modelos, utilizando o conjunto e subconjunto de dados de teste.

$$R^2 = 1 - \left[\frac{\sum_{i=1}^n (y_i^{real} - y_i^{predito})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i^{real} - \bar{y})^2} \right] \quad \text{eq. [7]}$$

onde, y_i^{real} : valor observado da variável dependente na i-ésima observação da amostra; $y_i^{predito}$: valor previsto ou estimado da variável dependente na i-ésima observação da amostra, previsto pelo modelo; \bar{y} : A média dos valores observados da variável dependente (ou resposta) na amostra.

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i^{real} - y_i^{predito})^2} \quad \text{eq. [8]}$$

onde, y_i^{real} : O valor observado da variável dependente (ou resposta) na i-ésima observação da amostra; $y_i^{predito}$: O valor previsto ou estimado da variável dependente (ou resposta) na i-ésima observação da amostra, previsto pelo modelo.

$$MAE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_i^{real} - y_i^{predito}| \quad \text{eq. [9]}$$

onde, y_i^{real} : O valor observado da variável dependente (ou resposta) na i-ésima observação da amostra; $y_i^{predito}$: O valor previsto ou estimado da variável dependente (ou resposta) na i-ésima observação da amostra, previsto pelo modelo.

Foi estabelecido que um desempenho aceitável para o modelo de aprendizado de máquina seria um $R^2 \geq 0,70$ (ou $\geq 70\%$), e MAE e RMSE inferiores ao bias máximo específico para cada exame (73,123,124).

4.3.4.4. Critérios adotados para a comparação entre os resultados médios previstos

Em vista da ausência de um IC95% associada ao resultado médio previsto pelo método MARS, adotou-se uma abordagem conservadora para determinar a equivalência estatística dos resultados médios previstos pelos métodos. Assumiu-se que os resultados produzidos pelos métodos MARS e Regressão Segmentada eram estatisticamente equivalentes quando o resultado médio previsto pelo método MARS se situava dentro do IC95% do resultado médio previsto pelo método de Regressão Segmentada. Além disso, o *bias* analítico estimado pela diferença absoluta entre o resultado médio previsto pelo método Regressão Segmentada e o resultado médio previsto pelo método MARS foi comparado com o *bias* máximo de cada exame. Se o *bias* analítico fosse menor ou igual ao *bias* máximo e os resultados médios previstos pelo método da Regressão Segmentada e MARS fossem estatisticamente equivalentes, foi considerado que os resultados médios estimados para ambos os métodos eram clinicamente equivalentes (Figura 12) (73).

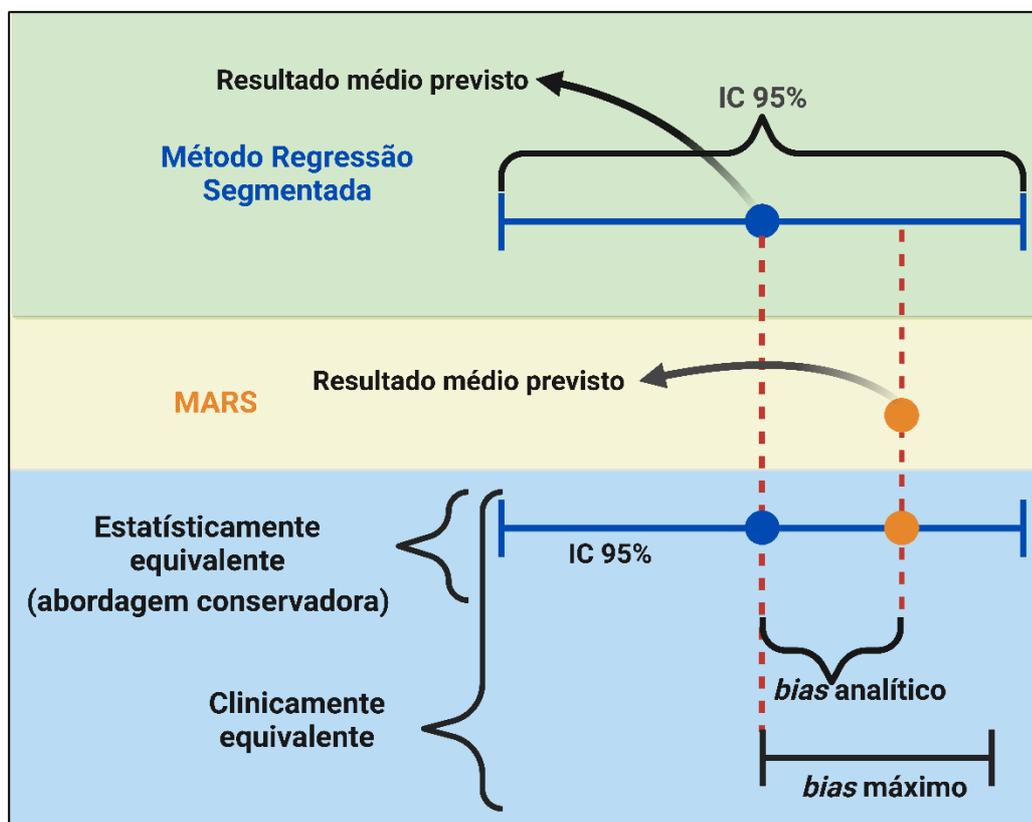


Figura 12 – Diretriz utilizada para avaliar a equivalências estatística e clínica dos resultados médios preditos pelo modelo de *machine learning*. Fonte: Adaptada da referência (73).

4.3.4.5. Critérios adotados para a comparação entre os pontos de inflexão estimados para a prolactina

Os pontos de inflexão estimados pelo método de Regressão Segmentada para os exames do perfil glicídico e lipídico foram comparados.

Os pontos de inflexão e os respectivos IC 95%, considerados adequados para inclusão nesse estudo de comparação, deveriam atender aos critérios de inclusão previamente estabelecidos, conforme apresentado na Tabela 9. Esses critérios garantem a consistência e a qualidade dos dados analisados, proporcionando resultados mais confiáveis e conclusões embasadas (73, 123, 124).

Tabela 9 – Critérios de inclusão estabelecidos para que o exame seja incluído no estudo de comparação entre os pontos de inflexão da prolactina.

- Critério 1: O teste de comparação dos resultados médios dos exames que avaliam o metabolismo glicídico e lipídico nas diferentes de resultados de prolactina, conforme a nova recomendação baseada na classificação metabólica, devem apresentar resultados estatisticamente e clinicamente significativos em pelo menos uma das quatro faixas de resultados de prolactina, isto é, deve haver indícios significativos de aumentos ou diminuições nos resultados médios dos exames que avaliam o metabolismo glicídico e lipídico;
- Critério 2: A métricas de avaliação dos modelos preditivos tanto pelo método de Regressão Segmentada como pelo MARS devem apresentar um $R^2 > 0,70$ (70%) e o MAE e RMSE menor do que o *bias* máximo, isto, é os modelos utilizados para predição dos resultados médios dos exames do metabolismo glicídico e lipídico devem ser generalizáveis;
- Critério 3: O ponto de inflexão estimado pelo método MARS deve estar incluído no IC 95% do ponto de inflexão estimado pelo método de Regressão Segmentada, isto é, os resultados devem ser estatisticamente equivalentes. Além disso, o *bias* analítico entre esses pontos de inflexão deve ser menor do que o *bias* máximo, isto é, devem ser clinicamente equivalentes.

O conceito de ICs sobrepostos foi empregado na análise da significância estatística entre os diversos pontos de inflexão da prolactina associados aos exames de metabolismo glicídico e lipídico, usando o método introduzido por Knol *et al.* (125).

Este método envolve a utilização do gráfico que apresenta os pontos de inflexão com seus respectivos IC de 95%. A partir daí, analisamos os limites inferior e superior dos IC de 95% para cada ponto de inflexão, a fim de verificar a existência de sobreposições nesses intervalos (126-128).

Posteriormente, foi calculado a estimativa do p -valor associado ao teste de igualdade entre os dois pontos de inflexão comparados. A ausência de sobreposição indica uma sobreposição de 0% de dois ICs adjacentes (contíguos), isto é, o limite superior do primeiro intervalo é igual ao limite inferior do segundo intervalo, indicando 0% de sobreposição (129-135).

Quando as variâncias são iguais e a estimativa do efeito dos conjuntos de dados são independentes, o p -valor estimado varia com a porcentagem do IC. Para exemplificar, em um cenários de dois ICs de 83,4% adjacentes com 0% de sobreposição, o p -valor estimado seria de aproximadamente 0,05. Quando o IC aumenta para 93,2%, a probabilidade diminui para 0,01. E, para um IC de 95%, o p -valor é de aproximadamente 0,0056 (126-132).

Foi estimado o IC de 95% para cada ponto de inflexão da prolactina. A diferenças entre as variâncias afeta o resultado do erro tipo I estimado. Portanto, foi calculado a estatística rho (ρ) eq. [10]. Para um $\rho = 1$, as variâncias são consideradas iguais e a probabilidade de erro tipo I seria de 0,0056. Um $\rho \neq 1$, a taxa de erro tipo 1 foi calculada conforme *script* disponível no Apêndice B cujas fórmulas foram baseadas no material suplementar do artigo de Knol *et al.* (125) (Figura 13).

$$\rho = \frac{\left[\frac{(LS_{IC95_2} - LI_{IC95_2})}{3,92} \right]}{\left[\frac{(LS_{IC95_1} - LI_{IC95_1})}{3,92} \right]} \quad \text{eq. [10]}$$

onde, LS_{IC95_2} : limite superior do IC de 95% do ponto de inflexão 2; LI_{IC95_2} : limite inferior do IC de 95% do ponto de inflexão 2; LS_{IC95_1} : limite superior do IC de 95% do ponto de inflexão 1; LI_{IC95_1} : limite inferior do IC de 95% do ponto de inflexão 1; ρ : razão entre desvios padrão de cada um dos pontos de inflexão.

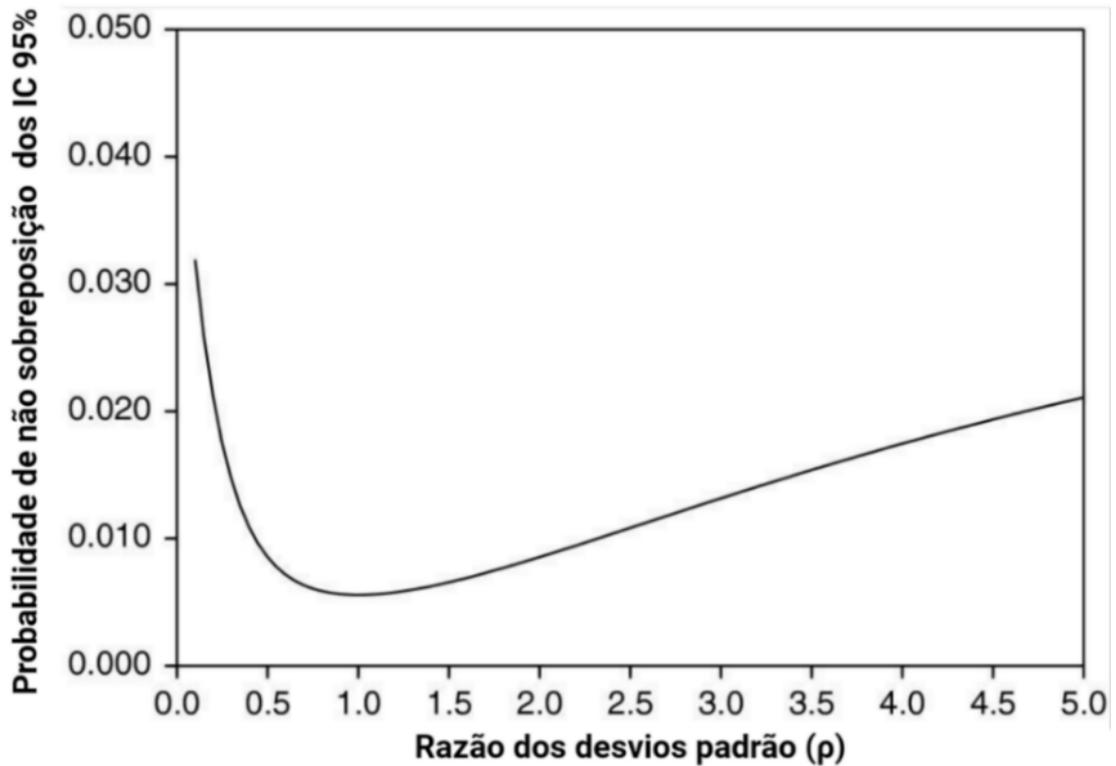


Figura 13 – Relação entre ρ e a probabilidade de intervalos de confiança não sobrepostos sob a hipótese nula (erro tipo 1). Fonte: Adaptada da referência (125).

O critério adotado para determinar a equivalência clínica dos pontos de inflexão estimados para a prolactina foi baseado na equivalência estatística, que requer a sobreposição dos intervalos de confiança de 95%, e na condição de que o *bias* máximo - a diferença entre os pontos de inflexão pareados - fosse inferior ao *bias* máximo estabelecido (Figura 14).

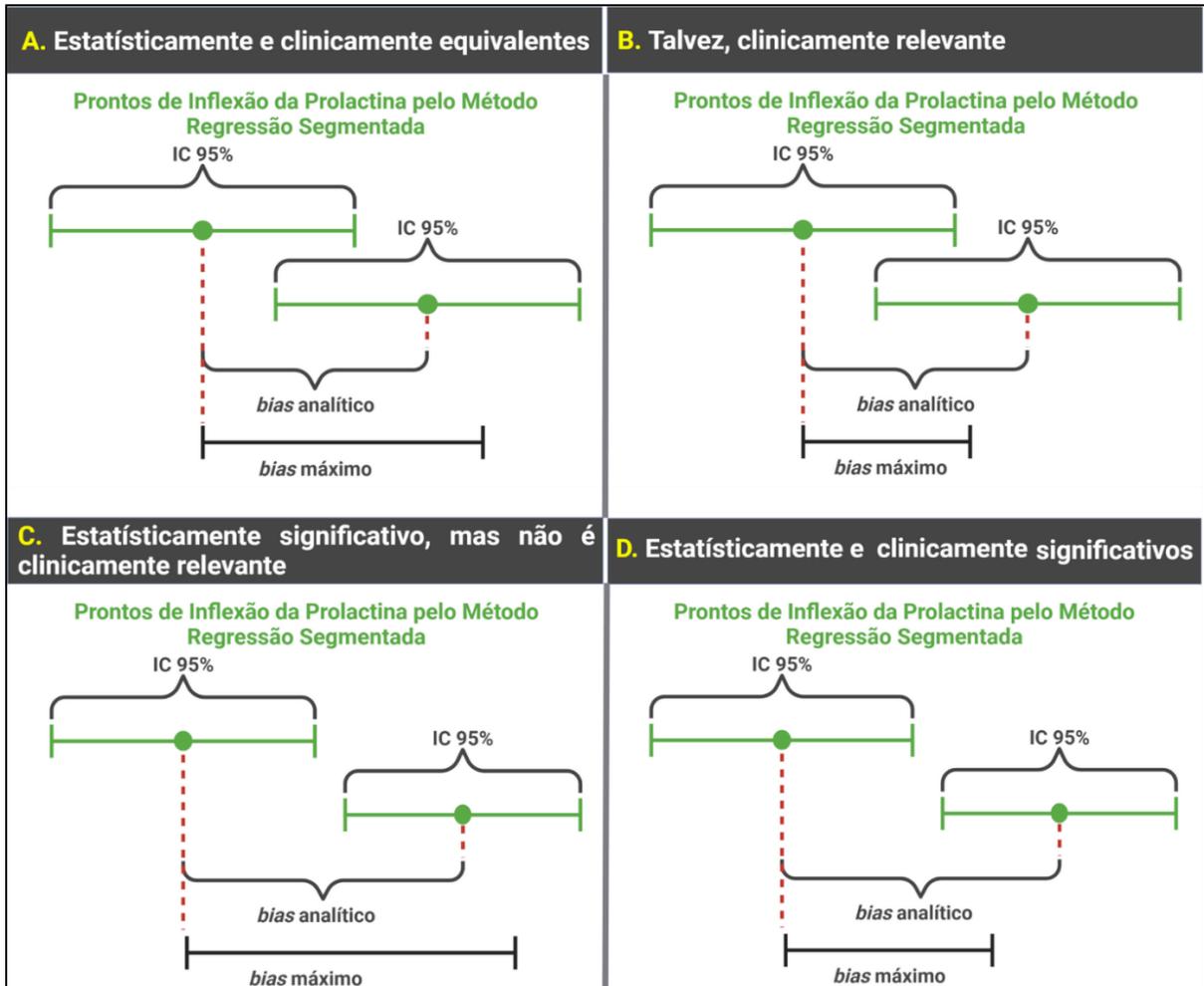


Figura 14 – Diretriz utilizada para avaliar a equivalências estatística e clínica dos pontos de inflexão estimados pelo modelo de *machine learning* para prolactina. Fonte: Adaptada das referências (73,131,132).

4.3.5. Softwares R, Rstudio e pacotes R

Três *scripts* foram elaborados na linguagem de programação R, todos contidos em um arquivo Rmarkdown (com extensão ".Rmd"). Esses *scripts* foram responsáveis por executar análises estatísticas descritivas e inferenciais, gerar gráficos, e treinar e avaliar o modelo de *machine learning*. Os Apêndices A e B, disponíveis através de links que levam a páginas HTML, contêm todos os *scripts* em linguagem R, bem como as fórmulas de referência ou aquelas utilizadas para a análise dos dados.

Para executar os *scripts*, foi necessário instalar diversos "pacotes R". Esses pacotes são bibliotecas de funções e ferramentas que ampliam as capacidades do

programa R, facilitando e otimizando a análise de dados. Cada "pacote R" inclui funções, dados e documentação que simplificam tarefas comuns de análise de dados e criação de gráficos, além de fornecer algoritmos para estatística e *machine learning*. Esses pacotes estão disponíveis para download no Comprehensive R Archive Network (CRAN), que é o repositório padrão para tais recursos.

Os principais “pacotes R” utilizados para a modelagem foram:

- Pacotes “stats” e “rstatix”: realizou o teste estatístico de Kruskal-Wallis, teste post-hoc de Dunn com ajuste do p -valor pelo método de Bonferroni para múltiplas comparações e estimação do parâmetro η do tamanho do efeito que avalia o tamanho do efeito (133,134);
- Pacote “segmented”: utilizado para treinar o modelo de regressão segmentada, em que a relação entre uma variável resposta (HOMA-IR, glicose, insulina, colesterol total, LDL-c, HDL-c e triglicérides) e a mais variável preditora (prolactina) e estimar o ponto de mudança abruptamente em diferentes segmentos dos dados (113-117);
- Pacotes “caret” e “earth”: utilizados para treinar o modelo de aprendizado de máquina pelo método *bagEarth*, que é *wrapper* do método MARS (*Multivariate Adaptive Regression Splines*) e para realizar a validação cruzada *k-fold* ($k = 5$) no segmento de dados que apresentam um comportamento aproximadamente linear (95).

As análises gráficas, análises estatísticas e a modelagem foram realizadas por meio da utilização dos programas R (versão 4.3.0) (134) e RStudio (versão 2022.12.0+353) (135).

4.4.ASPECTOS ÉTICOS

4.4.1. Lei geral de proteção de dados

Com o objetivo de atender a lei nº 13.709, de 14 de agosto de 2018 (Lei Geral de Proteção dos Dados – LGPD), foram aplicadas técnicas para anonimização dos dados pessoais dos pacientes objetivando desassociar cada um dos indivíduos dos seus respectivos resultados laboratoriais (136,137).

A anonimização dos dados foi realizada por meio da substituição manual dos números das Ordens de Serviço de cada paciente, disponíveis no conjunto de dados, pela descrição “Paciente 1”, “Paciente 2”, etc. A substituição da data de nascimento de cada paciente pela idade em anos. Dados pessoais sensíveis como origem racial ou étnica, convicção religiosa, opinião política, filiação a sindicato ou a organização de caráter religioso, filosófico ou político, dado referente à saúde ou à vida sexual, dado genético ou biométrico não estarão contemplados no conjunto de dados gerado para a posterior análise estatística dos resultados laboratoriais (137).

4.4.2. Parecer de comitê de ética

A realização do estudo atendeu a declaração de Helsinki e complementou o projeto de pesquisa já aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), CAAE 25775819.0.0000.5558, intitulado “Avaliação dos efeitos da concentração de Prolactina nos parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes com hiperprolactinemia “do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências da Saúde, parecer 3.739.106.

A execução do presente estudo não envolve recursos financeiros. O Núcleo de Apoio à Pesquisa e o Encarregado de Dados Pessoais ou *Data Protection Officer* (DPO) do Laboratório Sabin aprovaram a realização do estudo desde que o projeto fosse aprovado pelo CEP e os dados fossem anonimizados.

5. RESULTADOS

5.1. AMOSTRAS DE PACIENTES

Os resultados obtidos a partir da análise de exames laboratoriais de 65.795 pacientes consecutivos encaminhados ao Laboratório Sabin para dosagem de lipidograma, glicose, insulina e prolactina foram avaliados. Os dados foram coletados no período de janeiro a junho de 2018, com anonimização e respeito às normas da Lei Geral de Proteção de Dados, empregando codificação de identificadores para desvincular informações pessoais.

A população analisada apresentava idades entre 21 e 75 anos, sendo composta por 51.366 mulheres e 14.429 homens. A hiperprolactinemia (concentrações de prolactina superiores a 25 ng/mL) foi identificada em 4.004 das 51.366 mulheres (7,79%) e em 208 dos 14.429 homens (1,41%).

5.2. CATEGORIZAÇÃO DAS FAIXAS DE CONCENTRAÇÃO DE PROLACTINA

As concentrações de prolactina obtidas foram categorizadas em quatro grandes grupos de distribuição de dados: < 7 ng/mL; ≥ 7 e < 25 ng/mL; ≥ 25 e < 100 ng/mL; e > 100 ng/mL. Os grupos foram estratificados por sexo e os resultados de prolactina comparados entre eles. Para avaliar a significância das diferenças observadas, adotamos o "Quarteto de Critérios de Significância".

A análise comparativa das médias de concentração de prolactina para cada faixa etária revelou diferenças estatísticas significativas entre os sexos. No entanto, essas diferenças não se mostraram relevantes sob uma perspectiva prática. Nos grupos com concentrações de prolactina < 7 ng/mL e ≥ 7 e < 25 ng/mL, os p -valores de 0,00116 e $< 0,00005$ sugerem uma baixa probabilidade de que a diferença observada seja devida ao acaso (0,116% ou ≈ 1 em 1.000 e $< 0,005\%$ ou ≈ 5 em 100.000, respectivamente). No entanto, essas diferenças não atenderam ao "Quarteto de Critérios de Significância" e, portanto, não foram consideradas clinicamente significativas (Tabela 10).

Tabela 10 – Análise da significância estatística e clínica das diferenças dos resultados de prolactina entre os sexos nas diferentes faixas de concentração.

Faixa de PRL	n		Média		p-valor*	Análise da significância clínica
	M	F	M	F		
< 7 ng/mL	6070	12869	5,28	5,33	0,0012	r _{MW} : -0,02 (IC 95%: -0,03 a -0,01) VDA: 51,50% Bias: 0,05 Bias Máximo: 0,69
≥7 a <25 ng/mL	8151	34493	10,43	12,21	<0,0005	r _{MW} : -0,17 (IC 95%: -0,18 a -0,16) VDA: 62,6% Bias: 1,78 Bias Máximo: 1,47
≥25 a <100 ng/mL	195	3840	35,98	37,07	0,0253	r _{MW} : -0,03 (IC 95%: -0,06 a 0,00) VDA: 54,70% Bias: 1,09 Bias Máximo: 4,75
≥100 ng/mL	13	164	161,7 3	151,0 0	0,5343	r _{MW} : 0,04 (IC 95%: -0,09 a 0,20) VDA: 55,20% Bias: 10,73 Bias Máximo: 20,33
Global por sexo	1442 9	51366	53,36	51,40	---	---
Global	65795		11,90		---	---

Nota: * Valor de p do teste de Mann-Whitney para comparar as distribuições dos resultados entre os sexos. PRL: prolactina; Masc: masculino; Fem: feminino; r_{MW}: tamanho do efeito r do Teste Mann-Whitney; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; VDA: tamanho do efeito linguagem comum pelo método Vargha e Delaney's A.

Na presente análise, *outliers* não foram excluídos nem foram aplicados testes estatísticos para sua identificação. Para minimizar sua influência nas análises e lidar com a variação biológica e analítica inerentes aos exames laboratoriais, optou-se por uma estratégia de estratificação dos resultados, baseada em faixas de valores de prolactina. Assim, os 65.795 resultados dos pacientes foram categorizados em 116 faixas de prolactina (Tabela 11). Em seguida, para cada uma dessas faixas, foram

calculadas as médias dos resultados de prolactina e dos exames associados ao metabolismo glicídico e lipídico.

Tabela 11 – Tamanho amostral em 106 partições para cálculo da Média dos resultados de prolactina e exames do metabolismo glicídico e lipídico.

Faixa de PRL	n	Faixa de PRL	n	Faixa de PRL	n	Faixa de PRL	n
<3	775	≥9,5 a <9,7	1045	≥16,3 a <16,5	338	≥27 a <27,5	155
≥3 a <3,5	742	≥9,7 a <10	1451	≥16,5 a <16,7	257	≥27,5 a <28	137
≥3,5 a <3,7	447	≥10 a <10,3	1313	≥16,7 a <17	383	≥28 a <28,5	146
≥3,7 a <4	759	≥10,3 a <10,5	874	≥17 a <17,3	391	≥28,5 a <29	126
≥4 a <4,2	545	≥10,5 a <10,7	821	≥17,3 a <17,5	234	≥29 a <29,5	147
≥4,2 a <4,4	680	≥10,7 a <11	1213	≥17,5 a <17,7	236	≥29,5 a <30	124
≥4,4 a <4,5	357	≥11 a <11,3	1096	≥17,7 a <18	353	≥30 a <32	398
≥4,5 a <4,7	770	≥11,3 a <11,5	728	≥18 a <18,3	317	≥32 a <34	313
≥4,7 a <5	1327	≥11,5 a <11,7	710	≥18,3 a <18,5	206	≥34 a <36	270
≥5 a <5,2	976	≥11,7 a <12	1010	≥18,5 a <18,7	204	≥36 a <38	205
≥5,2 a <5,5	1618	≥12 a <12,3	925	≥18,7 a <19	301	≥38 a <40	185
≥5,5 a <5,7	1133	≥12,3 a <12,5	586	≥19,0 a <19,5	461	≥40 a <42	145
≥5,7 a <6	1907	≥12,5 a <12,7	517	≥19,5 a <20	415	≥42 a <44	108
≥6 a <6,2	1328	≥12,7 a <13	865	≥20 a <20,5	379	≥44 a <46	100
≥6,2 a <6,5	2018	≥13 a <13,3	746	≥20,5 a <21	340	≥46 a <50	151
≥6,5 a <6,7	1383	≥13,3 a <13,5	502	≥21 a <21,5	336	≥50 a <54	116
≥6,7 a <7	2174	≥13,5 a <13,7	495	≥21,5 a <22	323	≥54,0 a <60	147
≥7 a <7,2	1462	≥13,7 a <14	676	≥22,0 a <22,5	299	≥60 a <80	211
≥7,2 a <7,5	2091	≥14 a <14,3	638	≥22,5 a <23	271	≥80 a <100	94
≥7,5 a <7,7	1373	≥14,3 a <14,5	433	≥23 a <23,5	247	≥100 a <110	25
≥7,7 a <8	2082	≥14,5 a <14,7	358	≥23,5 a <24	268	≥110 a <120	24
≥8 a <8,3	1931	≥14,7 a <15	544	≥24 a <24,5	211	≥120 a <140	36
≥8,3 a <8,5	1290	≥15 a <15,3	528	≥24,5 a <25	215	≥140 a <160	30
≥8,5 a <8,7	1231	≥15,3 a <15,5	338	≥25 a <25,5	210	≥160 a <190	30
≥8,7 a <9	1793	≥15,5 a <15,7	339	≥25,5 a <26	199	≥190	32
≥9 a <9,2	1115	≥15,7 a <16	495	≥26 a <26,5	168		
≥9,2 a <9,5	1597	≥16 a <16,3	448	≥26,5 a <27	180		

Nota: PRL, prolactina sérica; n, tamanho amostral.

Os histogramas apresentados exemplificam o efeito da estratificação dos resultados na distribuição do resultados individuais (Figura 15A) e médios (Figura 15B) de prolactina.

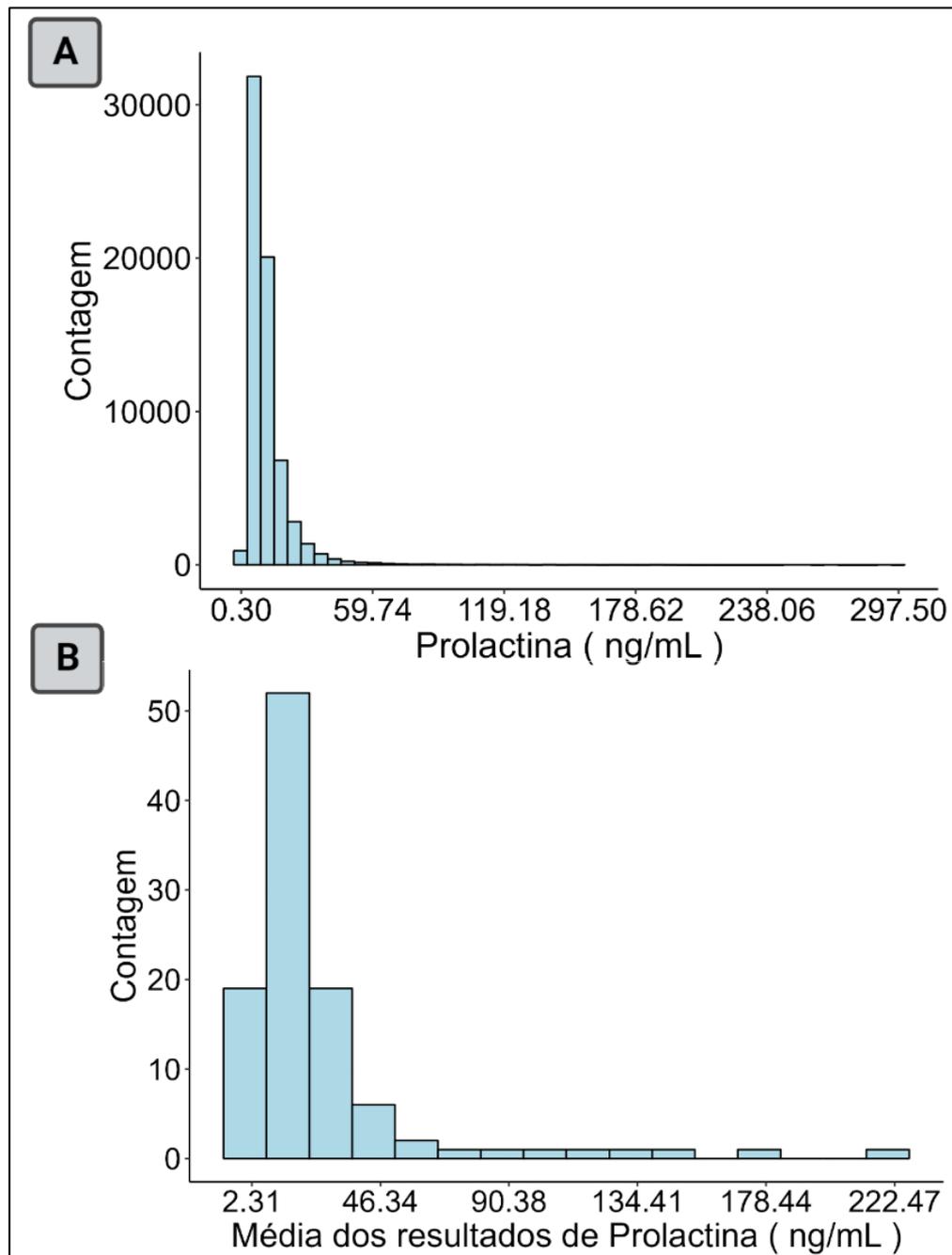


Figura 15 – Histograma dos resultados de prolactina. (A) Distribuição dos 65.795 resultados individuais. (B) Distribuição das 106 resultados médios.

Assim, a análise se concentrou na correlação, comparação e predição entre as médias dos resultados da prolactina e das médias dos exames do metabolismo glicídico e lipídico.

5.3. AVALIAÇÃO DO METABOLISMO GLICÍDICO

Analizamos os parâmetros relacionados às concentrações de HOMA-IR, glicose e insulina. As medidas de posição e dispersão, estão apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12 – Avaliação das medidas de posição e dispersão para os exames da prolactina e do metabolismo glicídico, para as 106 partições da amostra.

Estatísticas	Prolactina	HOMA-IR	Glicose	insulina
n	106	106	106	106
Mínimo	2,31	1,97	83,40	9,38
Moda	15,86	2,29	85,47	10,73
Média	25,95	2,43	87,00	10,97
Mediana	15,67	2,37	85,92	10,84
Máximo	222,47	3,27	97,90	13,04
DP	34,71	0,26	3,05	0,72
Variância	1204,65	0,07	9,34	0,53
IIQ	16,72	0,33	2,67	0,97
Amplitude	220,16	1,30	14,50	3,66

Nota: n: tamanho amostral em partições; DP: desvio padrão; IIQ: intervalo interquartilico; HOMA-IR: *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*.

Os resultados médios para glicose apresentaram uma distribuição com uma alta distorção à direita com pico mais elevado e caudas mais densas em relação a distribuição normal ($k = 16,27$; $Sk = 3,47$), conforme ilustrado na Figura 16A. Além disso, a análise das variâncias entre os diferentes grupos, categorizados por faixas de concentração de prolactina, demonstrou homogeneidade das variâncias (valor $F = 3,99$; p -valor = 0,0098261; $\alpha = 0,005$).

Da mesma forma, os resultados médios para insulina exibiram uma distribuição com uma distorção moderada à direita com pico e caudas similares a uma distribuição normal ($k = 3,15$; $Sk = 0,58$), como retratado na Figura 16B. A análise das variâncias entre os grupos, também categorizados por faixas de concentração de prolactina, demonstrou não homogeneidade das variâncias (valor $F = 29,40$; p -valor < 0,00005; $\alpha = 0,005$).

Finalmente, para o HOMA-IR, os resultados médios mostraram uma distribuição com uma alta distorção à direita e pico mais elevado e caudas densas ($k = 510,22$; $Sk = 13,64$), conforme exibido na Figura 16C. Assim como nos casos anteriores, as variâncias entre os grupos, classificados por faixas de concentração de prolactina, apresentaram uma não homogeneidade das variâncias (valor $F = 18,35$; p -valor $< 0,00005$; $\alpha = 0,005$).

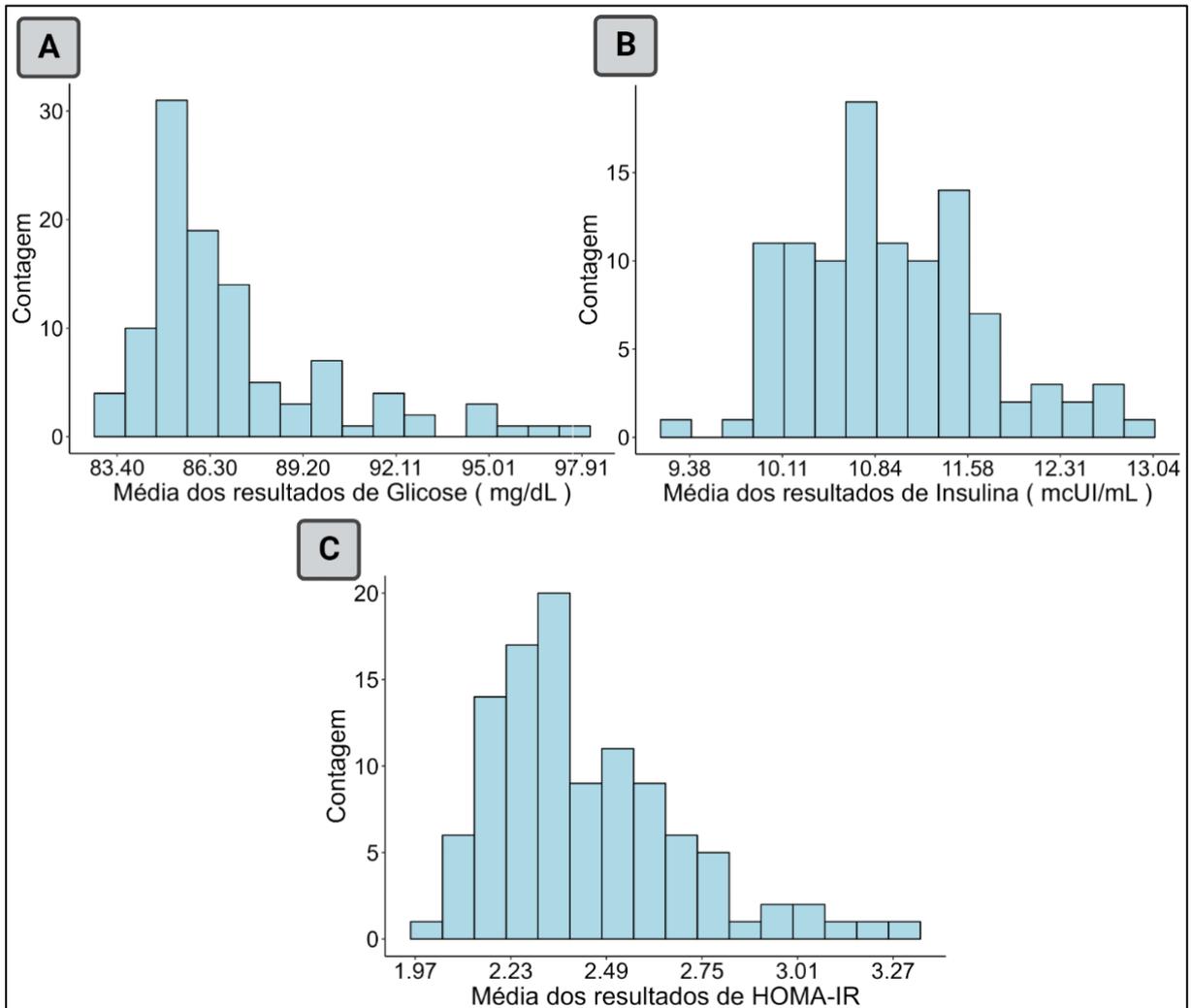


Figura 16 – Histograma dos resultados médios dos exames do perfil glicídico. (A) HOMA-IR. (B) Glicose. (C) Insulina.

O Teste de Kruskal-Wallis e o subsequente teste *post hoc* de Dunn são métodos não paramétricos que não impõem suposições rigorosas sobre a distribuição dos dados, incluindo a suposição de homogeneidade das variâncias. Esses testes operam com base nos rankings dos dados, em vez de seus valores absolutos, o que os torna mais resistentes a desvios das suposições paramétricas. Assim, mesmo na presença de heterogeneidade de variâncias em nossos resultados, ainda é possível utilizar e interpretar os resultados desses testes.

No entanto, é crucial lembrar que a heterogeneidade das variâncias pode influenciar a potência desses testes. Isso significa que eles podem ter menor capacidade de identificar diferenças reais entre os grupos quando as variâncias são significativamente distintas. Portanto, mesmo que possamos interpretar os resultados desses testes na presença de variâncias heterogêneas, devemos proceder com cautela, levando em consideração a possibilidade de que nossos resultados possam ser menos precisos do que se as variâncias fossem homogêneas.

Esta situação destaca a importância de uma análise que integre a significância estatística (p -valor) com a relevância prática das diferenças observadas. Nesse cenário, o "Quarteto de Critérios de Significância" é particularmente útil. De acordo com este conjunto de critérios, uma diferença é considerada relevante do ponto de vista prático se: o p -valor for menor que 0,005; o TDE ϵ^2 for maior que 0,26 ou r_{MW} for maior que 0,50; a VDA for maior que 71%; e o *bias* analítico for maior que o *bias* máximo permitido.

A Tabela 13 ilustra a mediana dos resultados médios de prolactina e dos parâmetros do metabolismo glicídico, com os percentis 25 e 75 (Intervalo Interquartilico) apresentados entre parênteses. Observa-se que os resultados medianos HOMA-IR, insulina e glicose são numericamente superiores quando os valores das concentrações de prolactina foram inferiores a 7 ng/mL. Esses índices apresentam uma diminuição progressiva até a faixa de resultados de prolactina entre 25 e 100 ng/mL, seguida por um aumento em resultados superiores a 100 ng/mL. Este padrão é consistentemente observado em todas as avaliações relativas ao metabolismo glicídico.

Tabela 13 – Parâmetros do metabolismos glicídico quantificados por faixa de prolactina.

Parâmetros	Faixa de resultados de Prolactina (ng/mL)			
	< 7 (n= 17)	≥ 7 e < 25 (n= 60)	≥ 25 e < 100 (n= 23)	≥ 100 (n= 6)
Média PRL (ng/mL)	4,80 (4,04 a 5,80)	14,45 (10,73 a 18,16)	32,96 (27,94 a 43,91)	139,00 (118,30 a 168,58)
Média HOMA-IR	2,76 (2,72 a 2,97)	2,35 (2,24 a 2,46)	2,30 (2,16 a 2,36)	2,47 (2,11 a 2,81)
Média GLI (mg/dL)	92,27 (90,42 a 94,72)	85,82 (85,07 a 87,07)	84,89 (84,25 a 85,94)	85,20 (84,94 a 86,39)
Média INS (mcUI/mL)	11,77 (11,48 a 12,08)	10,77 (10,42 a 11,17)	10,76 (10,19 a 10,95)	11,35 (9,94 a 12,72)

Nota: n: número de médias; PRL: prolactina; HOMA-IR: *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*; GLI: glicose sérica; INS: insulina sérica; CT: colesterol total; LDL-c: LDL colesterol; HDL-c: HDL colesterol; TRIG: triglicérides.

5.3.1. Correlação e Comparação entre Prolactina e o índice HOMA-IR

Ao avaliar as diferenças nas médias dos resultados dos exames de metabolismo glicídico entre as faixas de resultados de prolactina, empregamos o "Quarteto de Critérios de Significância" para determinar a relevância clínica. Notavelmente, para a faixa de resultados de prolactina inferior a 7 ng/mL, observamos diferenças tanto estatisticamente como clinicamente significativas no HOMA-IR em comparação com as faixas de resultados de prolactina de 7 a < 25 ng/mL e de 25 a < 100 ng/dL.

Os resultados foram os seguintes: para a faixa de prolactina de 7 a menos de 25 ng/mL, o p -valor foi menor que 0,000005, o ϵ^2 foi de 0,38, o IC de 95% para ϵ^2 variou de 0,26 a 0,55, a VDA foi de 99,74%, o *bias* analítico foi de 0,48, e o *bias* máximo foi de 0,14. Para a faixa de prolactina de 25 a < 100 ng/dL, os resultados foram semelhantes. Esses resultados estão ilustrados na Figura 17 e detalhados na Tabela 14.

Além disso, o método de Regressão Segmentada identificou o ponto de inflexão de 11,23 ng/mL (IC95%: 9,58 a 12,87 ng/mL) para a prolactina, sugerindo uma correlação linear muito forte ($r = -0,93$; IC 95%: -0,97 a -0,87; p -valor < 0,00000005) entre os resultados médios de prolactina e HOMA-IR abaixo desse ponto de inflexão. Para resultados acima do ponto de inflexão, a correlação linear foi classificada como pobre ($r = 0,36$; IC 95%: 0,14 a 0,55; p -valor = 0,00192933) (Figura 18).

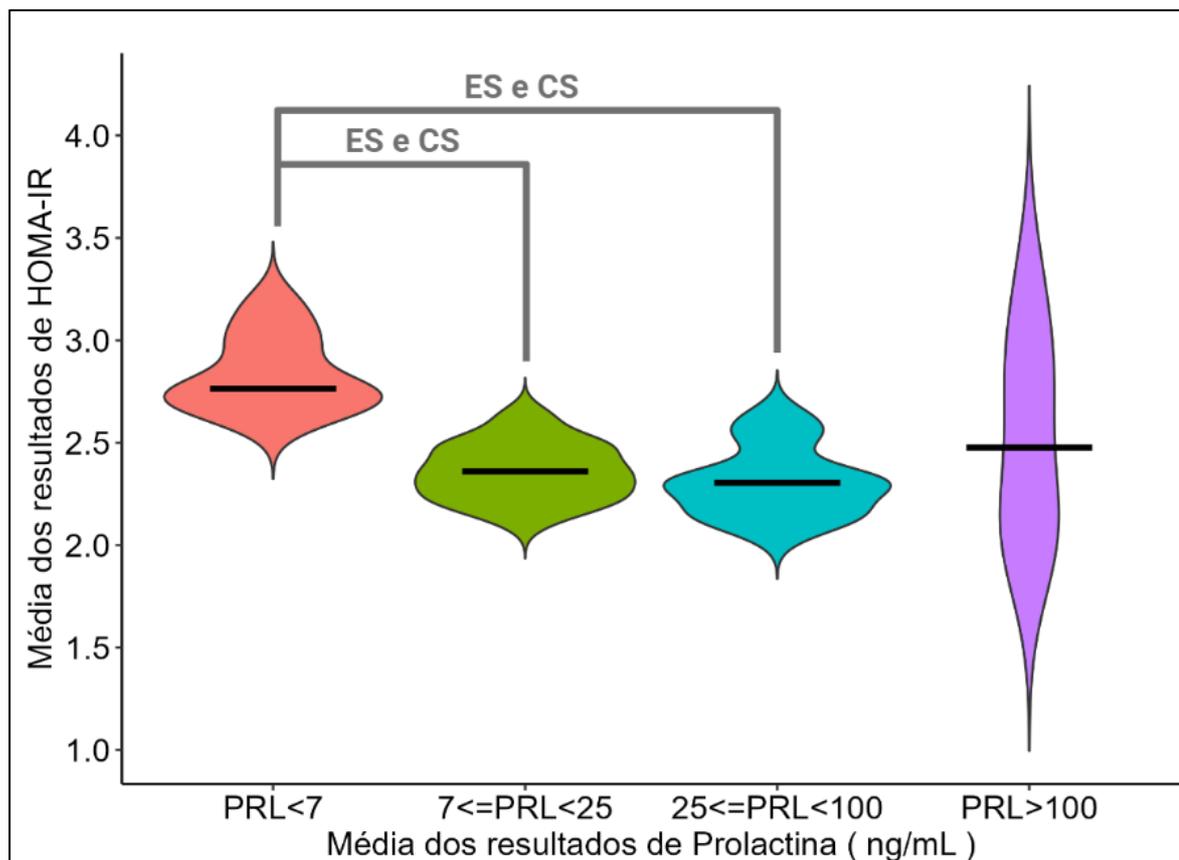


Figura 17 – Gráfico violino de comparação múltipla dos resultados médios do exame de HOMA-IR nas diferentes faixas de concentração média de prolactina. A linha preta contínua indica a mediana das concentrações médias de prolactina. HOMA-IR: *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*; SE: estatisticamente significativa. SC: clinicamente significativa.

Tabela 14 – Análise da significância estatística e clínica das diferenças dos resultados médios de HOMA-IR nas diferentes faixas de concentração média de prolactina.

Análise da Significância estatística (SE)		Análise da Significância Clínica (SC)			
Teste kruskal wallis		Epsilon-quadrado ordinal (ϵ^2)			
p -valor:	< 0,000005	ϵ^2 (IC 95%):	0,38 (0,26 a 0,55)		
teste post-hoc de Dunn		EQA (Modelo 3)			
Faixa de resultados	p -valor	VDA	<i>Bias</i>		
Prolactina (ng/mL)			analítico	<i>Bias</i> Máximo	
< 7	≥ 7 e < 25	< 0,000005	99,74%	0,48	0,14
< 7	≥ 25 e < 100	< 0,000005	99,51%	0,53	

Nota: VDA, tamanho do efeito linguagem comum pelo método Vargha e Delaney's A; EQA, especificação da qualidade analítica.

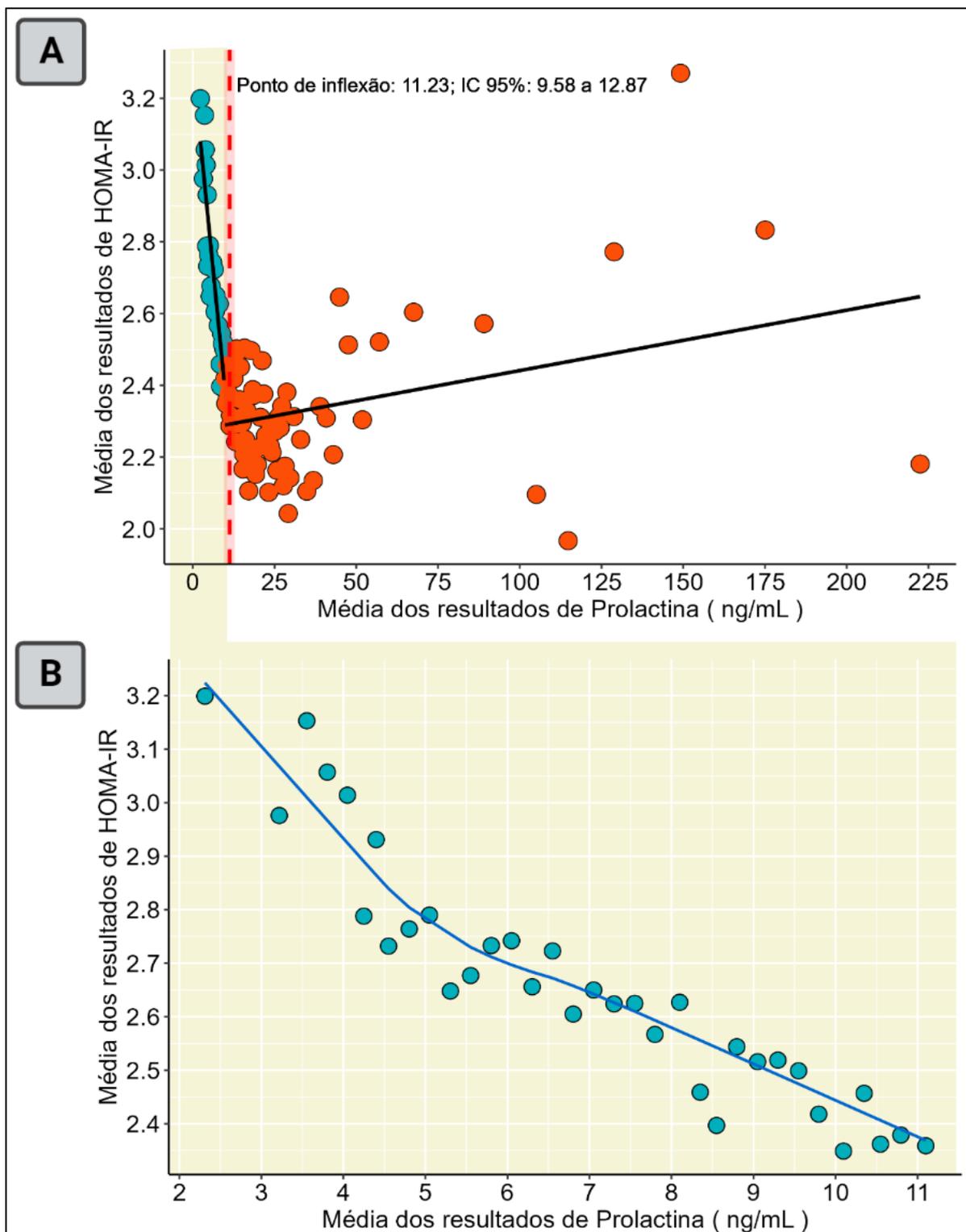


Figura 18 – Gráficos de dispersão dos resultados médios de HOMA-IR e prolactina com as curvas de regressão. (A) Acima: regressão linear (cor preta) para os resultados acima e abaixo do ponto de inflexão (linha vertical tracejada em vermelho) que está representado juntamente com seu IC de 95% (*background* vermelho em torno do ponto de inflexão). (B) Abaixo: trecho gráfico de maior linearidade com a regressão MARS (linha azul).

5.3.2. Correlação e Comparação entre Prolactina e a Glicose

De maneira análoga, observamos que para a faixa de resultados de prolactina inferior a 7 ng/mL, as médias dos resultados de glicose apresentam diferenças clinicamente significativas quando comparadas com as faixas de resultados de prolactina nas categorias de 7 a < 25 ng/mL, de 25 a < 100 ng/dL e \geq 100 mg/dL.

Para a faixa de prolactina de 7 a < 25 ng/mL, o p -valor foi menor que 0,000005, o ϵ^2 foi de 0,50, o IC de 95% para ϵ^2 variou de 0,33 a 0,62, a VDA foi de 99,80%, o *bias* analítico foi de 6,57 mg/dL, e o *bias* máximo foi de 2,38 mg/dL.

Para a faixa de prolactina de 25 a < 100 ng/dL, o p -valor foi menor que 0,000005, o ϵ^2 foi de 0,50, a VDA foi de 100,00%, o *bias* analítico foi de 7,75 mg/dL, e o *bias* máximo foi de 2,38 mg/dL.

Para a faixa de prolactina \geq 100 mg/dL, o p -valor foi de 0,00285, o ϵ^2 foi de 0,50, o IC de 95% para ϵ^2 variou de 0,33 a 0,62, a VDA foi de 91,20%, o *bias* analítico foi de 6,21 mg/dL, e o *bias* máximo foi de 2,38 mg/dL.

Esses resultados estão ilustrados na Figura 19 e detalhados na Tabela 15.

O ponto de inflexão de 10,90 ng/mL (IC95%: 10,09 a 11,72 ng/mL) para prolactina, identificado pelo método de Regressão Segmentada, indica linearidade muito forte ($r = -0,95$; IC 95%: -0,98 a -0,90; p -valor < 0,00000005) entre os resultados médios de prolactina e glicose abaixo do ponto de inflexão. Para resultados acima do ponto de inflexão, a correlação linear foi classificada como pobre ($r = 0,25$; IC 95%: 0,02 a 0,46; p -valor = 0,03113606) (Figura 20).

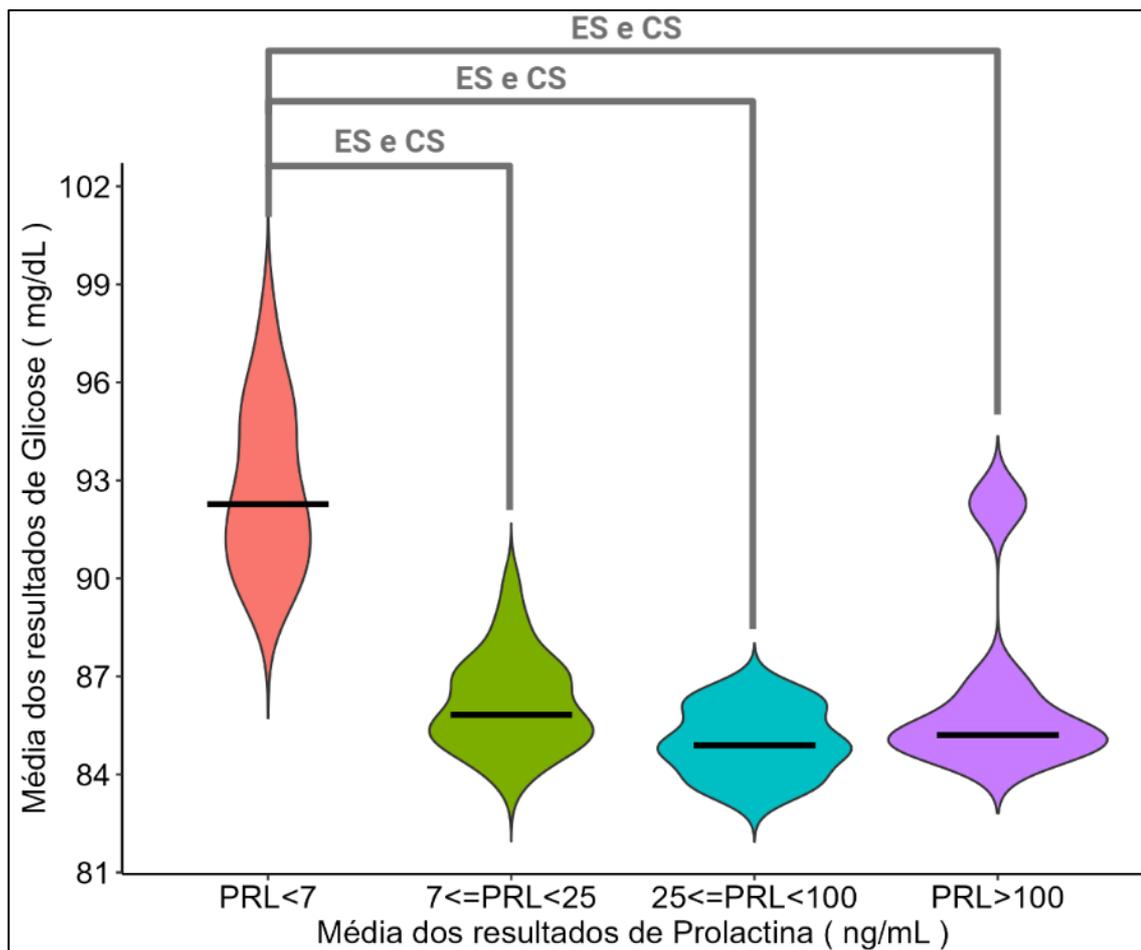


Figura 19 – Gráfico violino de comparação múltipla dos resultados médios do exame de glicose nas diferentes faixas de concentração média de prolactina. A linha preta contínua indica a mediana das concentrações médias de prolactina. SE: estatisticamente significativa. SC: clinicamente significativa.

Tabela 15 – Análise da significância estatística e clínica das diferenças dos resultados médios de glicose nas diferentes faixas de concentração média de prolactina.

Análise da Significância estatística (SE)		Análise da Significância Clínica (SC)	
Teste kruskal wallis		Epsilon-quadrado ordinal (ϵ^2)	
<i>p</i> -valor:	< 0,000005	ϵ^2 (IC 95%):	0,50 (0,33 a 0,62)
teste post-hoc de Dunn		EQA (Modelo 2)	
Faixa de resultados Prolactina (ng/mL)	<i>p</i> -valor	VDA	<i>Bias</i> analítico / <i>Bias</i> Máximo
< 7,00 ≥ 7 e < 25	< 0,000005	99,80%	6,57
< 7,00 ≥ 25 e < 100	< 0,000005	100,00%	7,75 2,38
< 7,00 > 100	0,00285	91,20%	6,21

Nota: VDA, tamanho do efeito linguagem comum pelo método Vargha e Delaney's A; EQA, especificação da qualidade analítica.

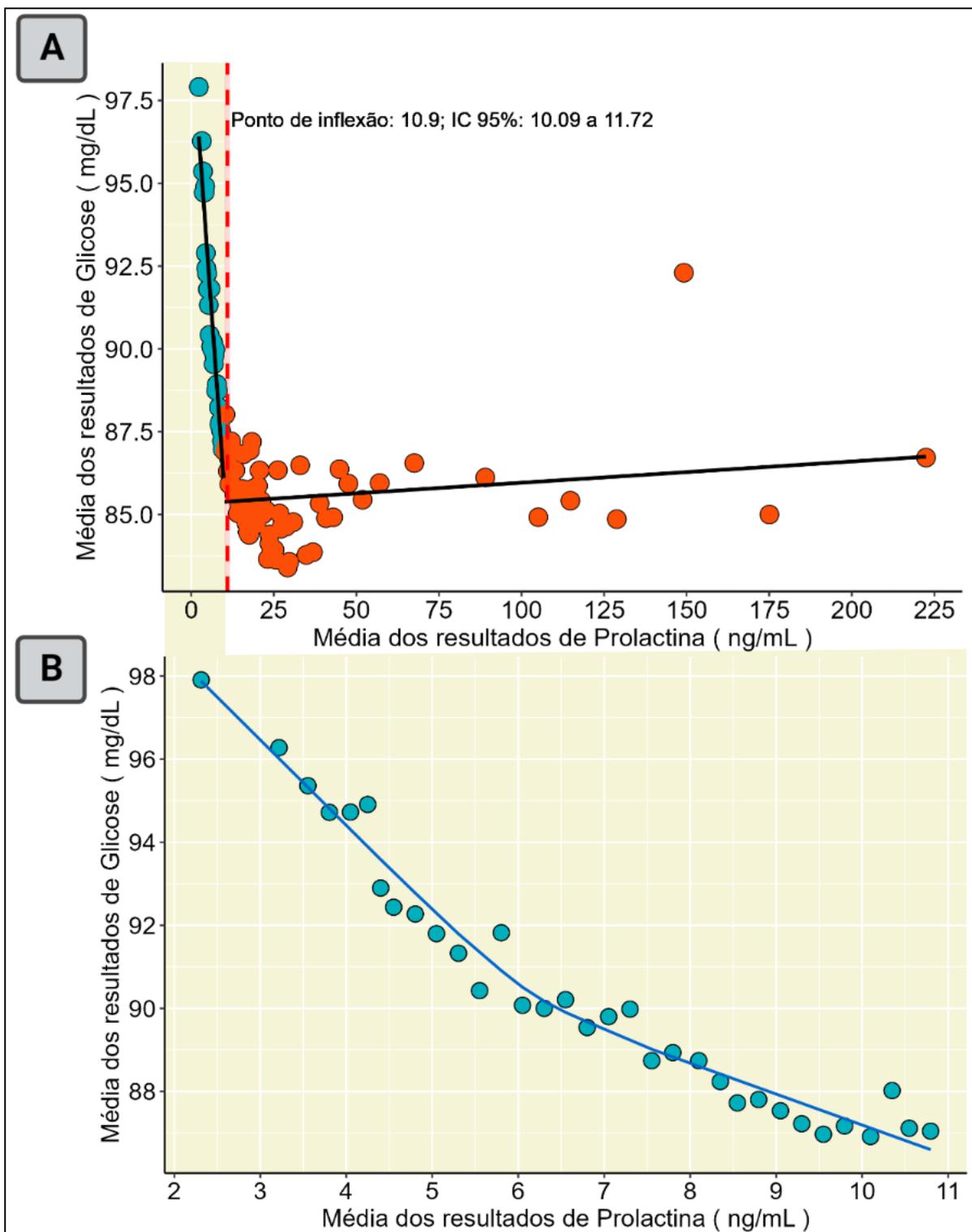


Figura 20 – Gráficos de dispersão dos resultados médios de glicose e prolactina com as curvas de regressão. (A) Acima: regressão linear (cor preta) para os resultados acima e abaixo do ponto de inflexão (linha vertical tracejada em vermelho) que está representado juntamente com seu IC de 95% (*background* vermelho em torno do ponto de inflexão). (B) Abaixo: trecho gráfico de maior linearidade com a regressão MARS (linha azul).

5.3.3. Correlação e Comparação entre Prolactina e a Insulina

Observamos que, para os resultados médios de prolactina < 7 ng/mL, as médias de insulina apresentam diferenças estatisticamente significativas. No entanto, apesar de satisfazerem o critério de VDA, tanto o limite inferior do IC de 95% para ϵ^2 quanto o *bias* analítico não atingem os critérios estabelecidos para ϵ^2 e *bias* máximo.

Essa observação é evidente nas faixas de resultados de prolactina de 7 a < 25 ng/mL, onde o *p*-valor foi menor que 0,000005, o ϵ^2 foi de 0,28, o IC de 95% para ϵ^2 variou de 0,19 a 0,46, a VDA foi de 96,42%, o *bias* analítico foi de 1,05 mg/dL, e o *bias* máximo foi de 2,62 mg/dL.

A mesma observação se aplica à faixa de prolactina de 25 a < 100 ng/dL, onde o *p*-valor foi menor que 0,000005, o ϵ^2 foi de 0,28, IC de 95% para ϵ^2 variou de 0,19 a 0,46, a VDA foi de 89,00%, o *bias* analítico foi de 1,10 mg/dL, e o *bias* máximo foi de 2,62 mg/dL.

Portanto, a análise das diferenças nas médias dos resultados de insulina nas diferentes faixas de prolactina não atende ao "Quarteto de Critérios de Significância". Esses resultados estão ilustrados na Figura 21 e detalhados na Tabela 16.

A análise do ponto de inflexão de 11,35 ng/mL para a prolactina (IC95%: 8,76 a 13,94 ng/mL), estimado pelo método de regressão segmentada, infere que, abaixo deste ponto, existe uma correlação linear moderada ($r = -0,86$; IC 95%: -0,93 a -0,73 *p*-valor $< 0,00000005$) entre os resultados médios de prolactina e HOMA-IR. Para resultados acima do ponto de inflexão, a correlação linear foi classificada como pobre ($r = 0,33$; IC 95%: 0,11 a 0,52; *p*-valor = 0,00458877) (Figura 22).

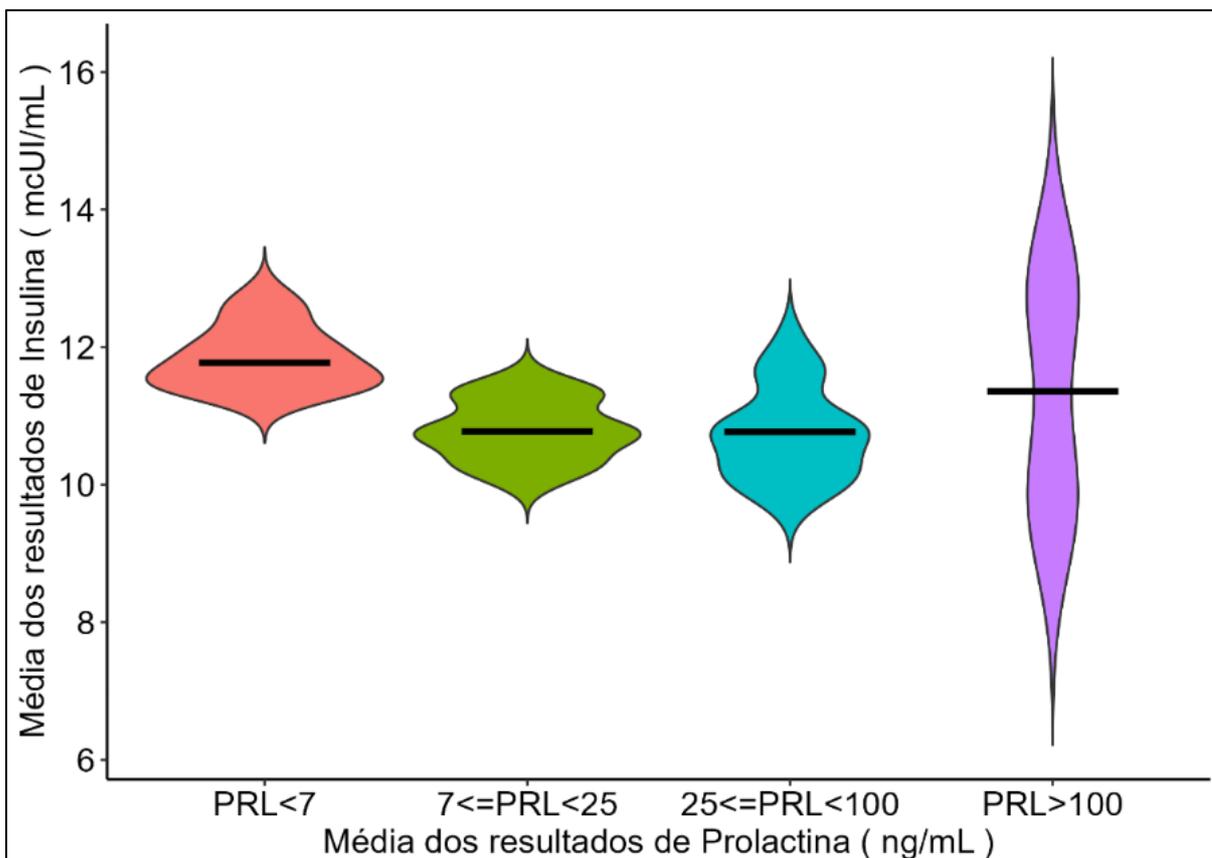


Figura 21 – Gráfico violino de comparação múltipla dos resultados médios do exame de insulina nas diferentes faixas de concentração média de prolactina. A linha preta contínua indica a mediana das concentrações médias de prolactina. SE, estatisticamente significativa. SC, clinicamente significativa.

Tabela 16 – Análise da significância estatística e clínica das diferenças dos resultados médios de insulina nas diferentes faixas de concentração média de prolactina.

Análise da Significância estatística (SE)			Análise da Significância Clínica (SC)		
Teste kruskal wallis			Epsilon-quadrado ordinal (ϵ^2)		
<i>p</i> -valor: < 0,000005			ϵ^2 (IC 95%): 0,28 (0,19 a 0,46)		
teste post-hoc de Dunn			EQA (Modelo 2)		
Faixa de resultados		<i>p</i> -valor	VDA	Bíasis	
Prolactina (ng/mL)				analítico	Máximo
< 7,00	≥ 7 e < 25	< 0,000005	96,42%	1,05	2,62
< 7,00	≥ 25 e < 100	0,00002	89,00%	1,10	

VDA, tamanho do efeito linguagem comum pelo método Vargha e Delaney's A; EQA, especificação da qualidade analítica.

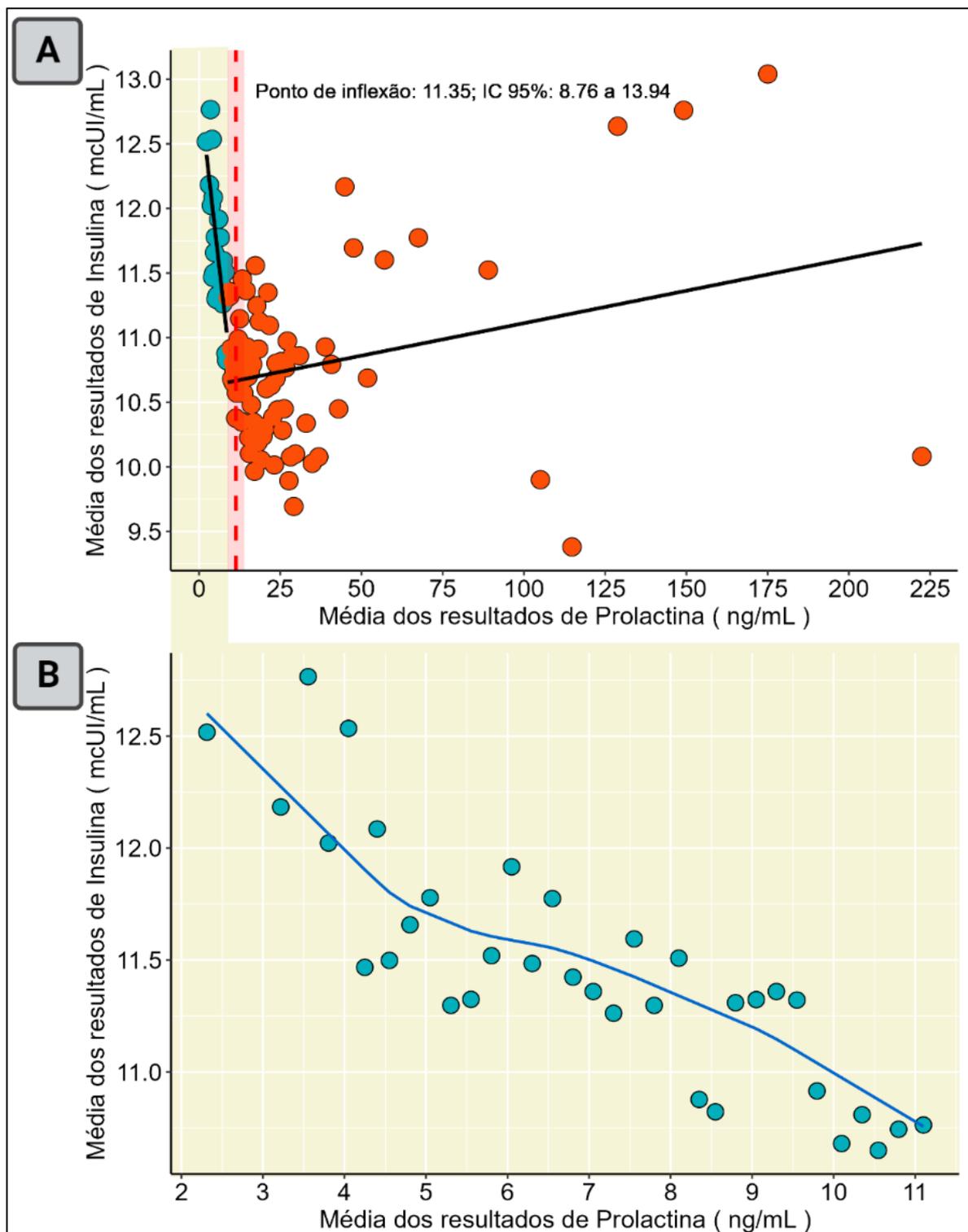


Figura 22 – Gráficos de dispersão dos resultados médios de insulina e prolactina com as curvas de regressão. (A) Acima: regressão linear (cor preta) para os resultados acima e abaixo do ponto de inflexão (linha vertical tracejada em vermelho) que está representado juntamente com seu IC de 95% (*background* vermelho em torno do ponto de inflexão). (B) Abaixo: trecho gráfico de maior linearidade com a regressão MARS (linha azul).

5.4. AVALIAÇÃO DO METABOLISMO LIPÍDICO

Analizamos os parâmetros relacionados às concentrações de colesterol total, LDL-c, HDL-c e triglicérides. As estatísticas descritivas, incluindo medidas de posição e dispersão, estão apresentadas na Tabela 17.

Tabela 17 – Resultados médios com as principais medidas de posição e dispersão para os exames da prolactina e do metabolismo lipídico.

Estatísticas	Prolactina	Colesterol total	LDL-c	HDL-c	Triglicérides
n	106	106	106	106	106
Mínimo	2,31	182,03	104,53	52,756	97,82
Moda	15,86	187,39	109,06	56,918	107,81
Média	25,95	189,88	111,77	55,90	111,57
Mediana	15,67	188,62	110,81	55,980	109,62
Máximo	222,47	207,56	126,48	58,59	134,26
DP	34,71	4,99	4,58	1,35	8,34
Variância	1204,65	24,98	21,02	1,84	69,51
IIQ	16,72	6,77	6,80	2,07	9,25
Amplitude	220,16	25,53	21,95	5,83	36,43

Nota: n, tamanho amostral categorizado em 106 faixas dos resultados médios; DP, desvio padrão; IIQ, intervalo interquartilício.

Os resultados médios para colesterol total apresentaram uma distribuição não normal, com moderada distorção à direita com pico mais elevado e caudas mais densas em relação a distribuição normal ($k = 3,5$; $Sk = 0,81$), conforme ilustrado na Figura 23A. Além disso, a análise das variâncias entre os diferentes grupos, categorizados por faixas de prolactina, demonstrou homogeneidade das variâncias (valor $F = 0,60$; p -valor = $0,61$; $\alpha = 0,005$).

Já os resultados médios para HDL-c exibiram uma distribuição com uma leve distorção à esquerda e um pico mais achatado e caudas mais leves em relação a distribuição normal ($k = 2,42$; $Sk = -0,45$), como retratado na Figura 23B. A análise das variâncias entre os grupos, também categorizados por faixas de concentração de prolactina, demonstrou homogeneidade das variâncias (valor $F = 2,99$; p -valor = $0,0343503$; $\alpha = 0,005$).

Para o LDL-c, por sua vez, exibiram uma distribuição não normal, porém com uma moderada distorção à direita com pico e caudas similares a uma distribuição normal ($k = 2,88$; $Sk = 0,63$), como retratado na Figura 23C. A análise das variâncias entre os grupos, também categorizados por faixas de concentração de prolactina, demonstrou homogeneidade das variâncias (valor $F = 2,29$; p -valor = 0,0818439; $\alpha = 0,005$).

Finalmente, para o triglicérides, os resultados médios mostraram uma distribuição não normal com uma alta distorção à direita com pico mais elevado e caudas mais densas em relação a distribuição normal ($k = 3,50$; $Sk = 1,03$), conforme exibido na Figura 23D. Assim como nos casos anteriores, as variâncias entre os grupos, classificados por faixas de concentração de prolactina, apresentaram uma não homogeneidade das variâncias (valor $F = 4,98$; p -valor < 0,0028693; $\alpha = 0,005$).

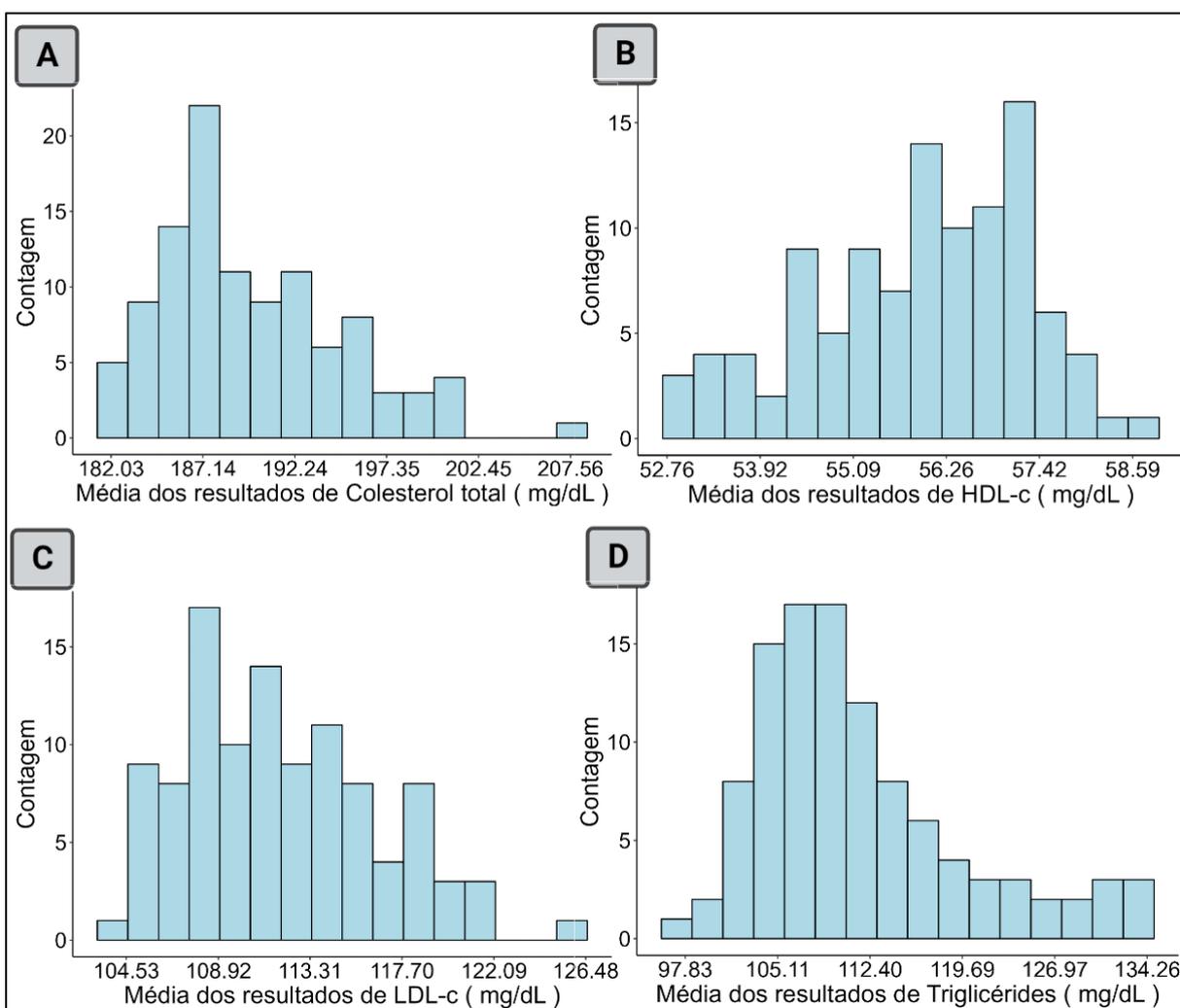


Figura 23 – Histograma dos resultados médios dos exames do metabolismo lipídico (colesterol total, LDL-c, HDL-c e triglicerídeos).

A Tabela 18 exibe a mediana das médias dos resultados para a prolactina e para os parâmetros do metabolismo lipídico. Os percentis 25 e 75, que representam o intervalo interquartil, são apresentados entre parênteses. É perceptível que as medianas dos resultados para o colesterol total, LDL-c e triglicérides são numericamente maiores na faixa de resultados de prolactina inferiores a 7 ng/mL. Estas medianas exibem um declínio progressivo até alcançarem a faixa de resultados de prolactina entre 25 e 100 ng/mL, antes de voltarem a aumentar em resultados superiores a 100 ng/mL. Esse padrão é consistentemente observado em todas as avaliações referentes ao metabolismo lipídico. Como é esperado fisiologicamente, o HDL-c apresenta um comportamento oposto a esta tendência.

Tabela 18 – Parâmetros do metabolismos lipídico quantificados por faixa de prolactina.

Parâmetros	Faixa de resultados de Prolactina (ng/mL)			
	< 7 (n= 17)	≥ 7 e < 25 (n= 60)	≥ 25 e < 100 (n= 23)	> 100 (n= 6)
Média PRL (ng/mL)	4,80 (4,04 a 5,80)	14,45 (10,73 a 18,16)	32,96 (27,94 a 43,91)	139,00 (118,30 a 168,58)
Média CT (mg/dL)	196,86 (195,42 a 198,46)	187,92 (186,25 a 190,70)	185,99 (184,47 a 188,40)	194,50 (193,32 a 195,00)
Média HDL-c (mg/dL)	53,81 (53,26 a 54,26)	55,92 (55,33 a 56,69)	57,03 (56,66 a 57,51)	57,23 (55,76 a 57,41)
Média LDL-c (mg/dL)	118,06 (117,37 a 119,65)	110,50 (108,43 a 112,97)	108,00 (106,66 a 110,65)	114,93 (113,94 a 118,67)
Média TRI (mg/dL)	126,10 (121,41 a 130,90)	108,88 (105,85 a 112,33)	106,53 (103,82 a 110,21)	112,49 (107,07 a 121,78)

Nota: PRL, prolactina; CT, colesterol total; TRI, triglicerídeos.

5.4.1. Correlação e Comparação entre Prolactina e o Colesterol Total

Ao aplicar o "Quarteto de Critérios de Significância" para avaliar as diferenças entre as faixas de resultados de prolactina, identificamos que, para a faixa de resultados de prolactina inferior a 7 ng/mL, foram observadas diferenças clinicamente relevantes no colesterol total quando comparadas com as faixas de resultados de prolactina de 7 a menos de 25 ng/mL, de 25 a menos de 100 ng/dL e superior a 100 mg/dL.

Para a faixa de prolactina de 7 a menos de 25 ng/mL, o p -valor foi menor que 0,000005, o ϵ^2 foi de 0,50, o IC de 95% para ϵ^2 variou de 0,35 a 0,63, a VDA foi de 99,90%, o bias analítico foi de 9,05 mg/dL, e o bias máximo foi de 8,32 mg/dL.

Para a faixa de prolactina de 25 a menos de 100 ng/dL, o p -valor foi menor que 0,000005, o ϵ^2 foi de 0,50, o IC de 95% para ϵ^2 variou de 0,35 a 0,63, a VDA foi de 96,68%, o bias analítico foi de 10,17 mg/dL, e o bias máximo foi de 8,32 mg/dL.

Para a faixa de prolactina superior a 100 mg/dL, o p -valor foi de 0,00105, o ϵ^2 foi de 0,50, o IC de 95% para ϵ^2 variou de 0,35 a 0,63, a VDA foi de 96,38%, o bias analítico foi de 9,09 mg/dL, e o bias máximo foi de 8,32 mg/dL.

Esses resultados estão ilustrados na Figura 24 e detalhados na Tabela 19.

Além disso, o método de Regressão Segmentada identificou o ponto de inflexão de 15,85 ng/mL (IC95%: 13,81 a 17,89 ng/mL) para a prolactina, sugerindo uma correlação linear muito forte ($r = -0,93$; IC 95%: $-0,96$ a $-0,89$; p -valor $< 0,00000005$) entre os resultados médios de prolactina e colesterol total abaixo desse valor (Figura 25). Para resultados acima do ponto de inflexão, a correlação linear foi classificada como razoável ($r = 0,65$; IC 95%: $0,46$ a $0,78$; p -valor $= 0,00000018$) (Figura 22).

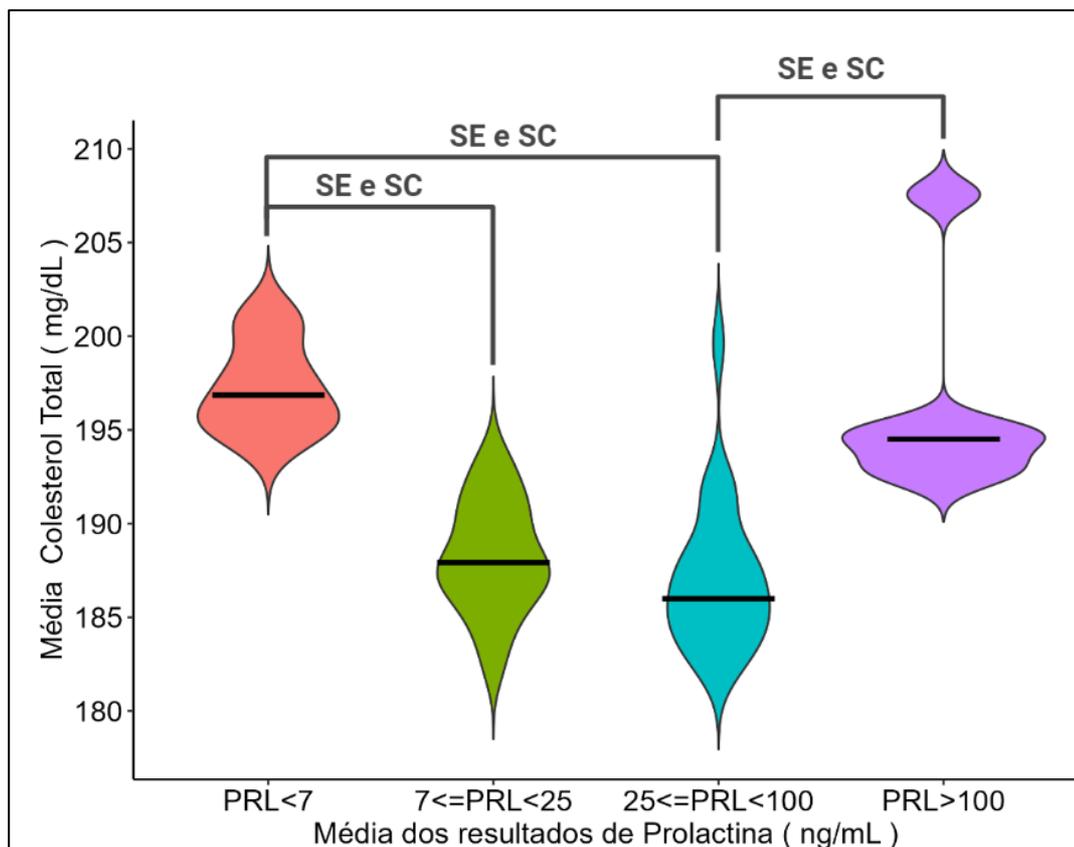


Figura 24 – Gráfico violino de comparação múltipla dos resultados médios do exame de colesterol total nas diferentes faixas de concentração média de prolactina. A linha preta contínua indica a mediana das concentrações médias de prolactina. SE, estatisticamente significativa. SC, clinicamente significativa.

Tabela 19 – Análise da significância estatística e clínica das diferenças dos resultados médios de colesterol total nas diferentes faixas de concentração média de prolactina.

Análise da Significância estatística (SE)			Análise da Significância Clínica (SC)		
Teste kruskal wallis			Epsilon-quadrado ordinal (ϵ^2)		
p -valor: < 0,000005			ϵ^2 (IC 95%): 0,50 (0,35 a 0,63)		
teste post-hoc de Dunn			EQA (Modelo 2)		
Faixa de resultados Prolactina (ng/mL)	p -valor	VDA	Bias		
			analítico (mg/dL)	Máximo (mg/dL)	
< 7,00 ≥ 7 e < 25	< 0,000005	99,90%	9,05		
< 7,00 ≥ 25 e < 100	< 0,000005	96,68%	10,17	8,32	
≥ 25 e < 100 > 100	0,00105	96,38%	9,09		

Nota: VDA, tamanho do efeito linguagem comum pelo método Vargha e Delaney's A; EQA, especificação da qualidade analítica.

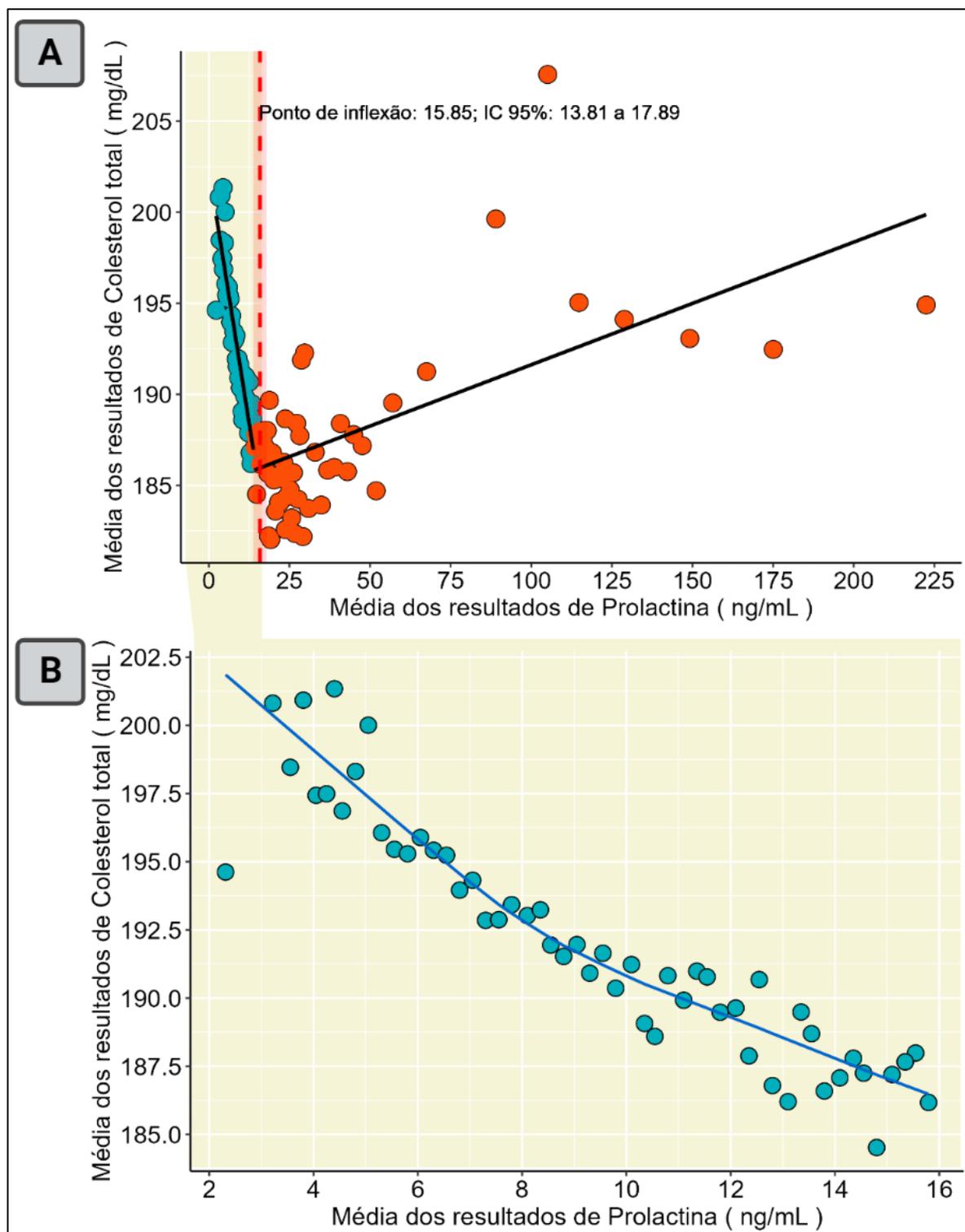


Figura 25 – Gráficos de dispersão dos resultados médios de colesterol total e prolactina com as curvas de regressão. (A) Acima: regressão linear (cor preta) para os resultados acima e abaixo do ponto de inflexão (linha vertical tracejada em vermelho) que está representado juntamente com seu IC de 95% (*background* vermelho em torno do ponto de inflexão). (B) Abaixo: trecho gráfico de maior linearidade com a regressão MARS (linha azul).

5.4.2. Correlação e Comparação entre Prolactina e o HDL-c

De maneira similar, observamos que para a faixa de resultados de prolactina inferior a 7 ng/mL, as médias dos resultados de HDL-c apresentam diferenças clinicamente significativas quando comparadas com as faixas de resultados de prolactina de 25 a menos de 100 ng/dL e superior a 100 mg/dL.

Para a faixa de prolactina de 25 a menos de 100 ng/dL, o p -valor foi menor que 0,000005, o ϵ^2 foi de 0,50, o IC de 95% para ϵ^2 variou de 0,37 a 0,65, a VDA foi de 98,50%, o *bias* analítico foi de 3,28 mg/dL, e o *bias* máximo foi de 2,49 mg/dL.

Para a faixa de prolactina superior a 100 mg/dL, o p -valor foi de 0,00035, o ϵ^2 foi de 0,50, o IC de 95% para ϵ^2 variou de 0,37 a 0,65, a VDA foi de 100,00%, o *bias* analítico foi de 2,65 mg/dL, e o *bias* máximo foi de 2,49 mg/dL.

Esses resultados estão ilustrados na Figura 26 e detalhados na Tabela 20.

O ponto de inflexão de 16,11 ng/mL (IC95%: 14,23 a 17,98 ng/mL) para prolactina, identificado pelo método de regressão segmentada, indica uma correlação linear muito forte ($r = 0,94$; IC 95%: 0,90 a 0,96; p -valor < 0,00000005) entre os resultados médios de prolactina e HDL-c abaixo deste valor (Figura 27). Para resultados acima do ponto de inflexão, a correlação linear foi classificada como pobre ($r = -0,12$; IC 95%: -0,38 a 0,17; p -valor = 0,42066731) (Figura 22).

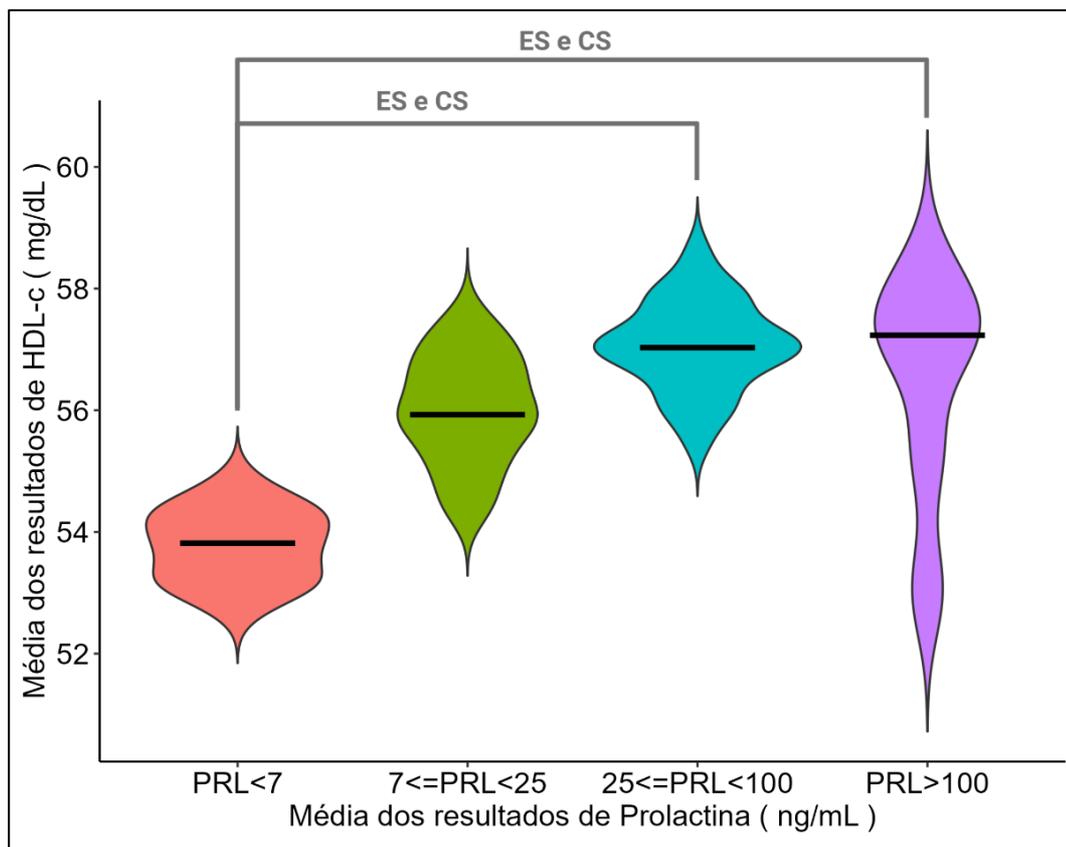


Figura 26 – Gráfico violino de comparação múltipla dos resultados médios do exame de LDL-c nas diferentes faixas de concentração médias de prolactina. A linha preta contínua indica a mediana das concentrações médias de prolactina. SE, estatisticamente significativa. SC, clinicamente significativa.

Tabela 20 – Análise da significância estatística e clínica das diferenças dos resultados médios de HDL-c nas diferentes faixas de concentração média de prolactina.

Análise da Significância estatística (SE)			Análise da Significância Clínica (SC)		
Teste kruskal wallis			Epsilon-quadrado ordinal (ϵ^2)		
<i>p</i> -valor: < 0,000005			ϵ^2 (IC 95%): 0,50 (0,37 a 0,65)		
teste post-hoc de Dunn			EQA (Modelo 2)		
Faixa de resultados Prolactina (ng/mL)		<i>p</i> -valor	VDA	<i>Bias</i> analítico (mg/dL)	<i>Bias</i> Máximo (mg/dL)
< 7	≥ 25 e < 100	< 0,000005	98,50%	3,28	
≥ 7 e < 25	≥ 25 e < 100	0,00165	81,50%	1,05	2,49
< 7	> 100	0,00035	84,30%	2,65	

Nota: VDA, tamanho do efeito linguagem comum pelo método Vargha e Delaney's A; EQA, especificação da qualidade analítica.

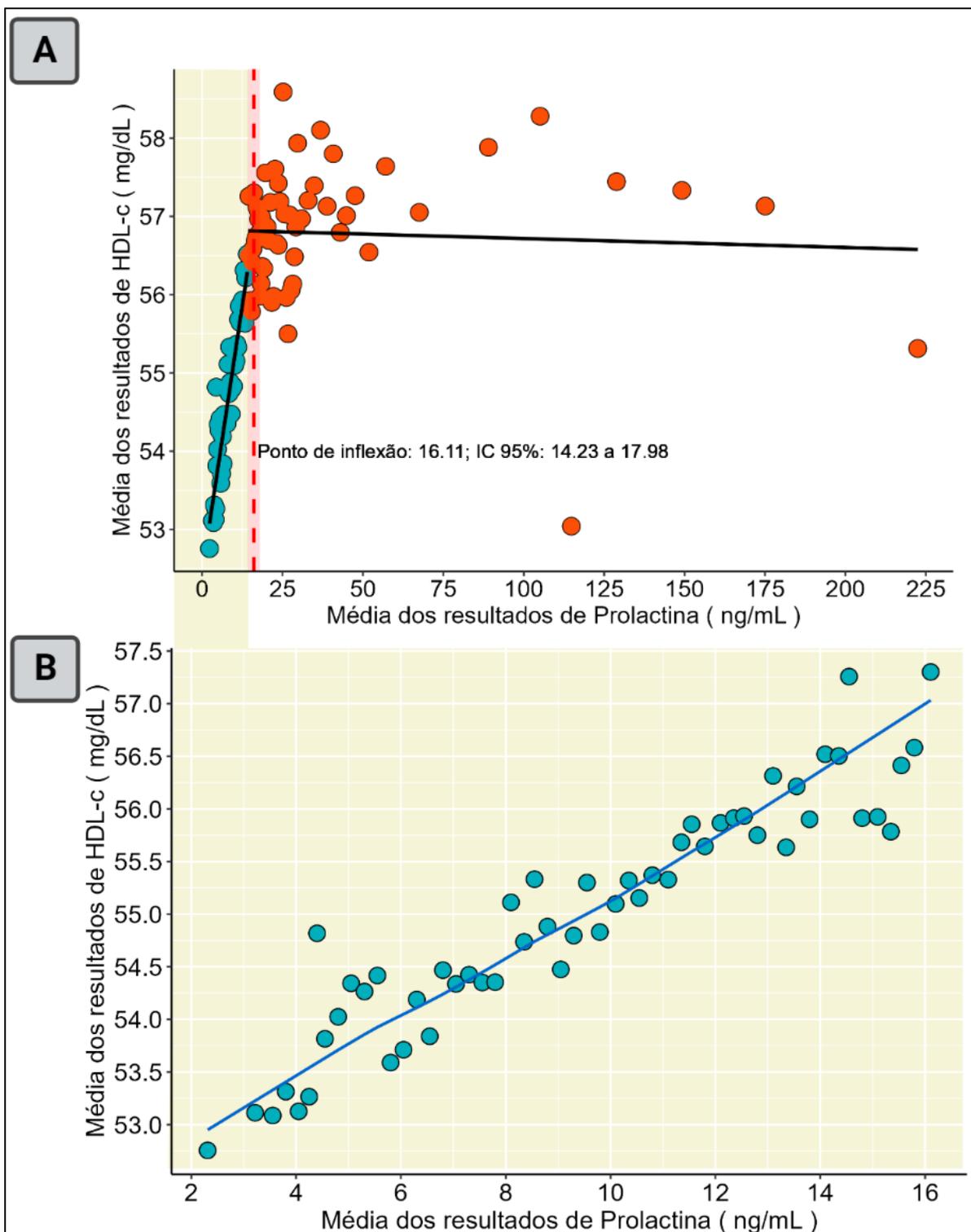


Figura 27 – Gráficos de dispersão dos resultados médios de HDL-c e prolactina com as curvas de regressão. (A) Acima: regressão linear (cor preta) para os resultados acima e abaixo do ponto de inflexão (linha vertical tracejada em vermelho) que está representado juntamente com seu IC de 95% (*background* vermelho em torno do ponto de inflexão). (B) Abaixo: trecho gráfico de maior linearidade com a regressão MARS (linha azul).

5.4.3. Correlação e Comparação entre Prolactina e o LDL-c

Observamos que, para a faixa de resultados de prolactina inferior a 7 ng/mL, as médias dos resultados de LDL-c apresentam diferenças clinicamente significativas quando comparadas com as faixas de resultados de prolactina de 7 a menos de 25 ng/mL e de 25 a menos de 100 ng/dL.

Para a faixa de prolactina de 7 a menos de 25 ng/mL, o p -valor foi menor que 0,000005, o ϵ^2 foi de 0,49, o IC de 95% para ϵ^2 variou de 0,35 a 0,63, a VDA foi de 99,80%, o bias analítico foi de 8,12 mg/dL, e o bias máximo foi de 7,66 mg/dL.

Para a faixa de prolactina de 25 a menos de 100 ng/dL, o p -valor foi menor que 0,000005, o ϵ^2 foi de 0,49, o IC de 95% para ϵ^2 variou de 0,35 a 0,63, a VDA foi de 97,44%, o bias analítico foi de 9,86 mg/dL, e o bias máximo foi de 7,66 mg/dL.

Além disso, identificamos uma diferença clinicamente significativa entre a faixa de resultados de prolactina de 25 a menos de 100 ng/dL e a faixa superior a 100 mg/dL. Para essa comparação, o p -valor foi de 0,00105, o ϵ^2 foi de 0,49, o IC de 95% para ϵ^2 variou de 0,35 a 0,63, a VDA foi de 94,93%, o *bias* analítico foi de 8,23 mg/dL, e o *bias* máximo foi de 7,66 mg/dL.

Esses resultados estão ilustrados na Figura 28 e detalhados na Tabela 21.

Quando analisamos o ponto de inflexão de 16,61 ng/mL para a prolactina (IC95%: 14,49 a 18,73 ng/mL), estimado pelo método de regressão segmentada, sugere que, abaixo deste ponto, existe uma correlação linear muito forte ($r = -0,93$; IC 95%: -0,96 a -0,89; p -valor < 0,00000005) entre os resultados médios de prolactina e HOMA-IR. Para resultados acima do ponto de inflexão, a correlação linear foi classificada como razoável ($r = 0,63$; IC 95%: 0,42 a 0,77; p -valor :0,00000115) (Figura 29).

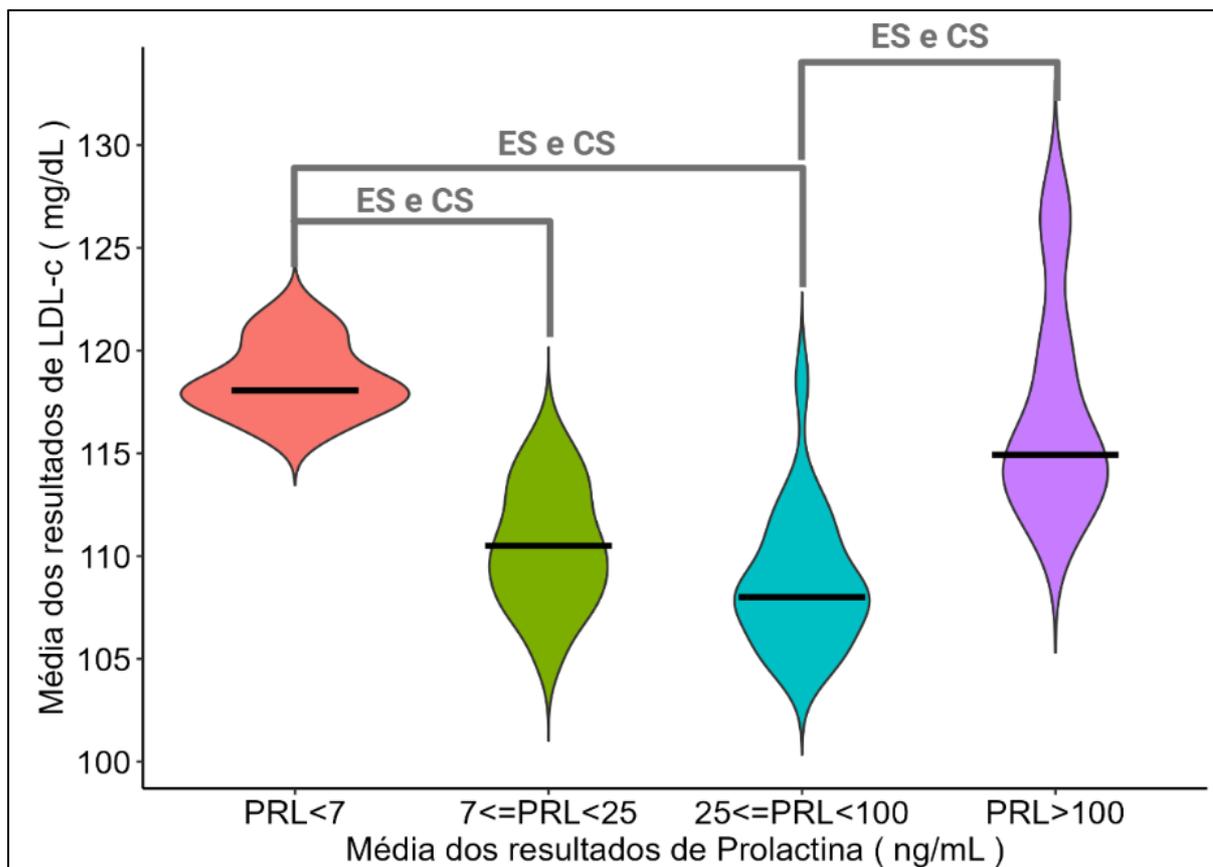


Figura 28 – Gráfico violino de comparação múltipla dos resultados médios do exame de LDL-c nas diferentes faixas de concentração médias de prolactina. A linha preta contínua indica a mediana das concentrações médias de prolactina. SE, estatisticamente significativa. SC, clinicamente significativa.

Tabela 21 – Análise da significância estatística e clínica das diferenças dos resultados médios de LDL-c nas diferentes faixas de concentração média de prolactina.

Análise da Significância estatística (SE)			Análise da Significância Clínica (SC)		
Teste kruskal wallis			Epsilon-quadrado ordinal (ϵ^2)		
<i>p</i> -valor: < 0,000005			ϵ^2 (IC 95%): 0,49 (0,35 a 0,63)		
teste post-hoc de Dunn			EQA (Modelo 2)		
Faixa de resultados Prolactina (ng/mL)	<i>p</i> -valor	VDA	<i>Bias</i> analítico (mg/dL)	<i>Bias</i> Máximo (mg/dL)	
< 7 ≥ 7 e < 25	< 0,000005	99,80%	8,12		
< 7 ≥ 25 e < 100	< 0,000005	97,44%	9,86	7,66	
≥ 25 e < 100 > 100	0,00105	94,93%	8,23		

Nota: VDA, tamanho do efeito linguagem comum pelo método Vargha e Delaney's A; EQA, especificação da qualidade analítica.

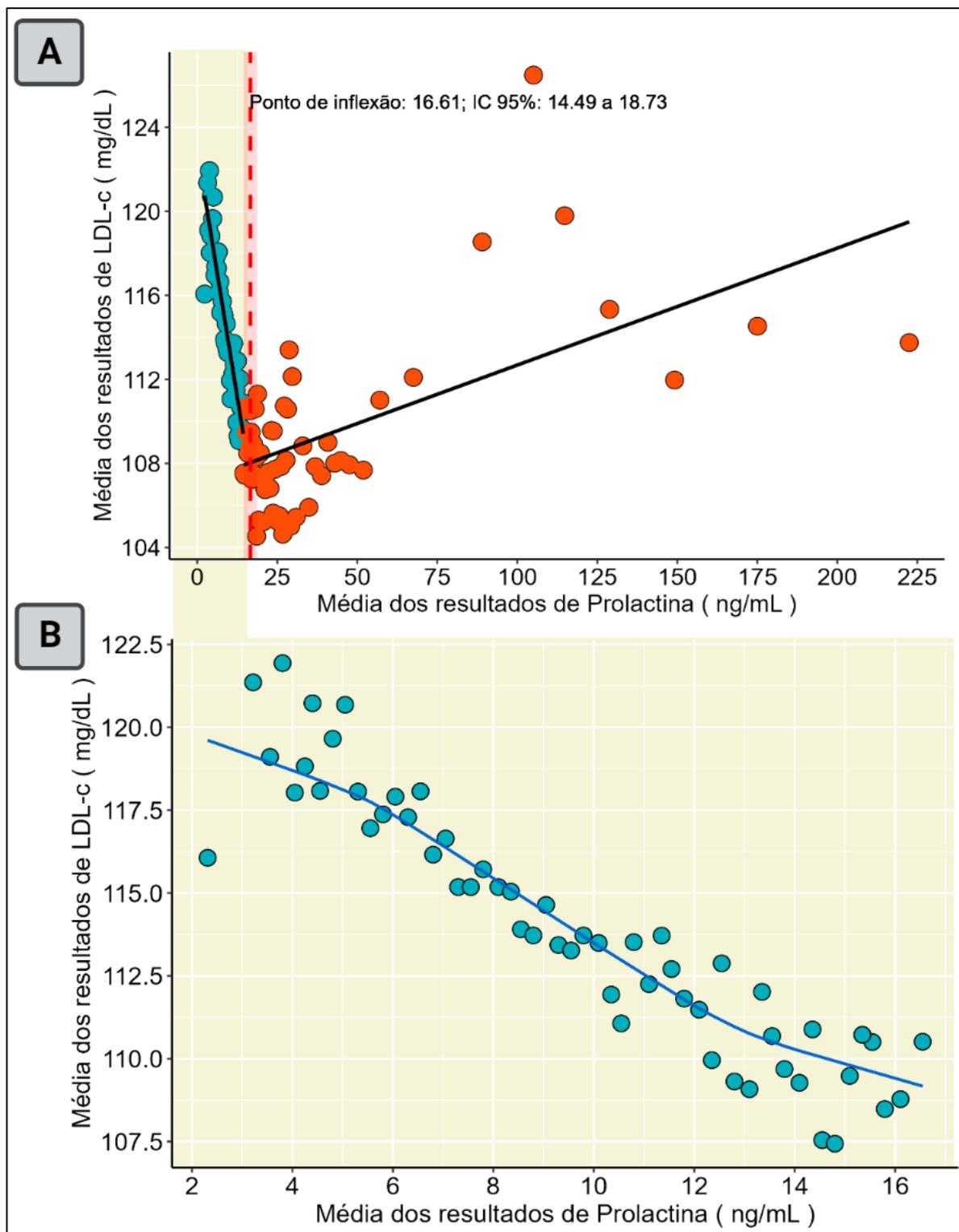


Figura 29 – Gráficos de dispersão dos resultados médios de LDL-c e prolactina com as curvas de regressão. (A) Acima: regressão linear (cor preta) para os resultados acima e abaixo do ponto de inflexão (linha vertical tracejada em vermelho) que está representado juntamente com seu IC de 95% (*background* vermelho em torno do ponto de inflexão). (B) Abaixo: trecho gráfico de maior linearidade com a regressão MARS (linha azul).

5.4.4. Correlação e Comparação entre Prolactina e o Triglicérides

Por fim, observamos que, para a faixa de resultados de prolactina inferior a 7 ng/mL, as médias dos resultados de triglicérides apresentam diferenças clinicamente significativas quando comparadas com as faixas de resultados de prolactina de 7 a menos de 25 ng/mL e de 7 a menos de 100 ng/dL.

Para a faixa de prolactina de 7 a menos de 25 ng/mL, o *p*-valor foi menor que 0,000005, o ϵ^2 foi de 0,42, o IC de 95% para ϵ^2 variou de 0,29 a 0,56, a VDA foi de 99,70%, o *bias* analítico foi de 16,97 mg/dL, e o *bias* máximo foi de 15,88 mg/dL.

Para a faixa de prolactina de 7 a menos de 100 ng/dL, o *p*-valor foi menor que 0,000005, o ϵ^2 foi de 0,42, o IC de 95% para ϵ^2 variou de 0,29 a 0,56, a VDA foi de 100,00%, o *bias* analítico foi de 19,23 mg/dL, e o *bias* máximo foi de 15,88 mg/dL.

Esses resultados estão ilustrados na Figura 30 e detalhados na Tabela 22.

Quando analisamos o ponto de inflexão de 13,08 ng/mL para a prolactina (IC95%: 11,82 a 14,35 ng/mL), estimado pelo método de regressão segmentada, sugere que, abaixo deste ponto, existe uma correlação linear muito forte ($r = -0,94$; IC 95%: -0,97 a -0,89; *p*-valor < 0,00000005) entre os resultados médios de prolactina e triglicérides. Para resultados acima do ponto de inflexão, a correlação linear foi classificada como razoável ($r = 0,54$; IC 95%: 0,34 a 0,69; *p*-valor: 0,00000434) (Figura 31).

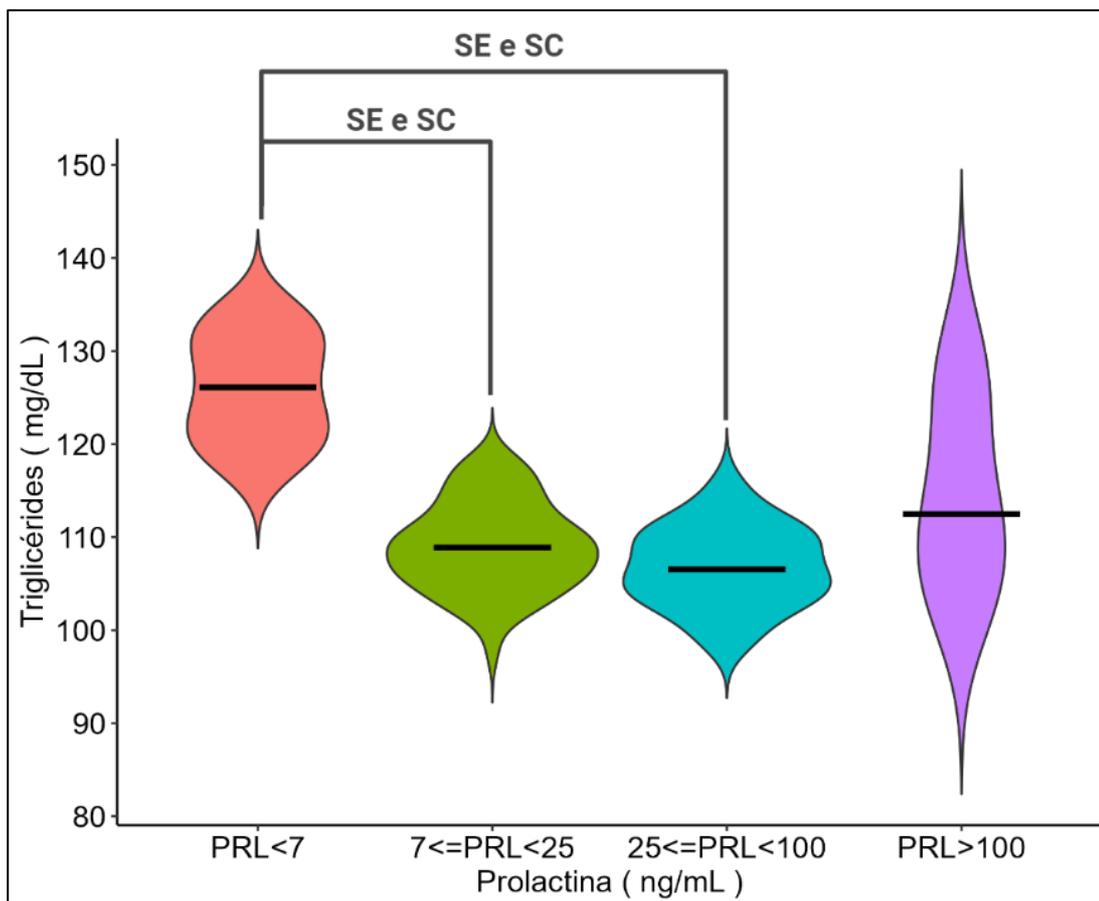


Figura 30 – Gráfico violino de comparação múltipla dos resultados médios do exame de triglicérides nas diferentes faixas de concentração médias de prolactina. A linha preta contínua indica a mediana das concentrações médias de prolactina. SE, estatisticamente significativa. SC, clinicamente significativa.

Tabela 22 – Análise da significância estatística e clínica das diferenças dos resultados médios de triglicérides nas diferentes faixas de concentração média de prolactina.

Análise da Significância estatística (SE)			Análise da Significância Clínica (SC)		
Teste kruskal wallis			Epsilon-quadrado ordinal (ϵ^2)		
p -valor: < 0,000005			ϵ^2 (IC 95%): 0,42 (0,29 a 0,56)		
teste post-hoc de Dunn			EQA (Modelo 2)		
Faixa de resultados Prolactina (ng/mL)	p -valor	VDA	Bias		
			analítico (mg/dL)	Máximo (mg/dL)	
< 7	≥ 7 e < 25	< 0,000005	99,70%	16,97	15,88
< 7	≥ 25 e < 100	< 0,000005	100,00%	19,23	

Nota: VDA, tamanho do efeito linguagem comum pelo método Vargha e Delaney's A; EQA, especificação da qualidade analítica.

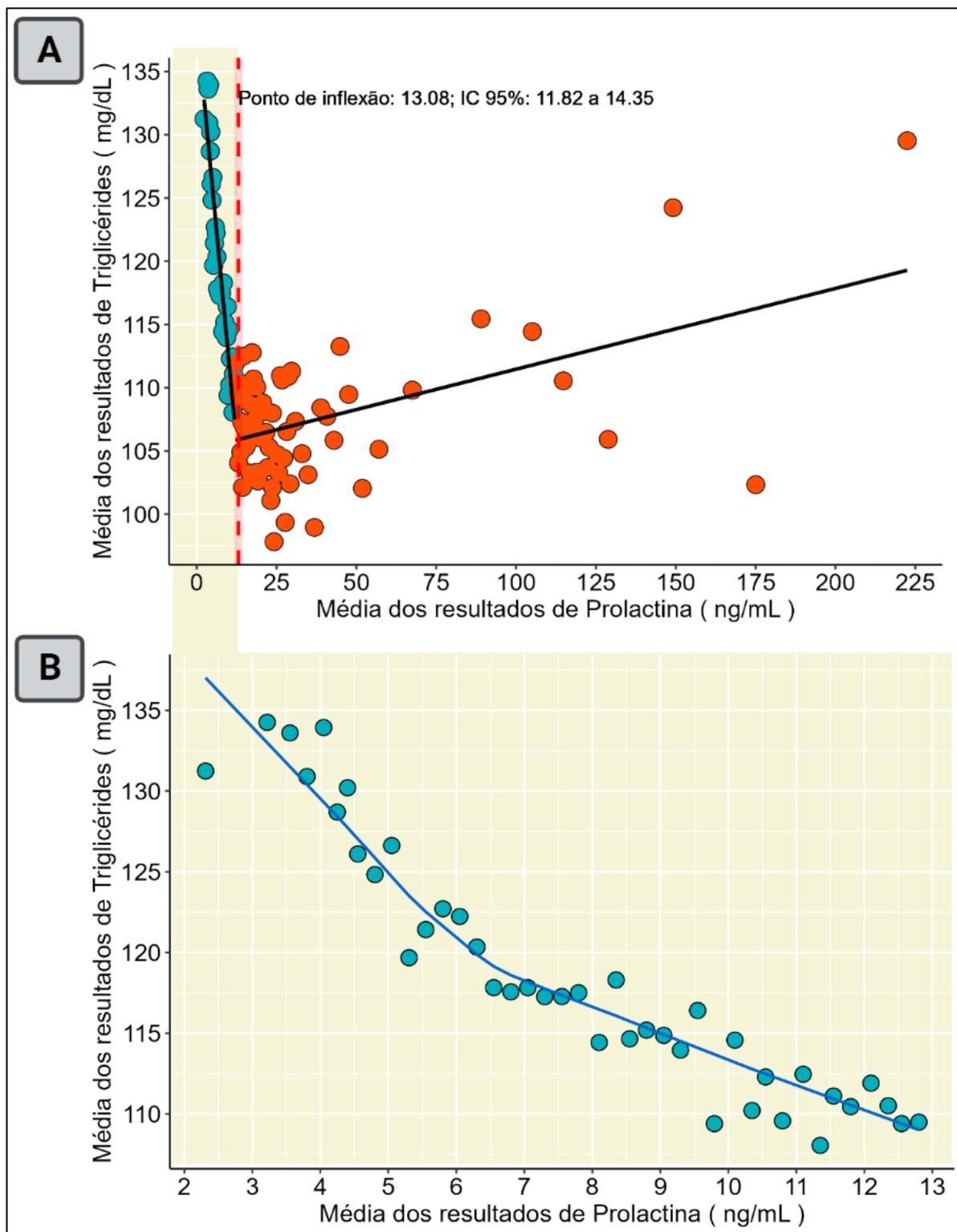


Figura 31 – Gráficos de dispersão dos resultados médios de triglicérides e prolactina com as curvas de regressão. (A) Acima: regressão linear (cor preta) para os resultados acima e abaixo do ponto de inflexão (linha vertical tracejada em vermelho) que está representado juntamente com seu IC de 95% (*background* vermelho em torno do ponto de inflexão). (B) Abaixo: trecho gráfico de maior linearidade com a regressão MARS (linha azul).

5.5.RESULTADOS PREDITIVOS DO MODELO DE *MACHINE LEARNING* E PONTOS DE INFLEXÃO ESTIMADOS PARA A PROLACTINA

5.5.1. Desempenho do modelo e capacidade de generalização

A Tabela 23 apresenta os pontos de inflexão estimados para a prolactina, juntamente com os resultados médios previstos para os exames de perfil glicídico, obtidos através de um modelo de *machine learning* que combinou os métodos de Regressão Segmentada e MARS. Além disso, é possível visualizar de forma compilada os resultados obtidos para as métricas MAE, R^2 e RMSE associadas a cada resultado médio previsto.

Tabela 23 – Critérios utilizados para avaliar a relevância prática das diferenças nos resultados dos exames utilizados como resposta nas diferentes faixas de resultados de prolactina.

Exames	Ponto de Inflexão da Prolactina em ng/mL (IC 95%)	Previsão dos resultados dos Parâmetros do metabolismo glicídico			
		Método de Regressão Segmentada (trecho linear)		Método MARS	
		Previsão (IC 95%)	Métricas de avaliação	Previsão	Métricas de avaliação
HOMA-IR	$\leq 11,23$ (9,58 a 12,87)	$\geq 2,43$ (2,33 a 2,53)	RMSE: 0,08 R^2 : 0,86 MAE:0,06	$\geq 2,46$	RMSE: 0,07 R^2 : 0,88 MAE:0,07
Glicose (mg/dL)	$\leq 10,90$ (10,09 a 11,72)	$\geq 86,35$ (85,52 a 87,18)	RMSE: 1,08 R^2 : 0,90 MAE:0,93	$\geq 86,99$	RMSE: 0,55 R^2 : 0,97 MAE:0,49
Insulina (mcUI/mL)	$\leq 11,35$ (8,76 a 13,94)	$\geq 11,12$ (10,83 a 11,41)	RMSE: 0,35 R^2 : 0,56 MAE:0,31	$\geq 11,22$	RMSE: 0,36 R^2 : 0,55 MAE:0,31

Nota: HOMA-IR: *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*; MARS: Splines de Regressão Adaptativa Multivariada.

Em relação ao HOMA-IR, o modelo que utiliza os métodos de Regressão Segmentada e MARS, exibe qualidade evidente. Isso é corroborado pelos resultados alcançados tanto pelo método de Regressão Segmentada (com MAE=0,08; R^2 =0,86

e $RMSE=0,06$) como pelo MARS (com $MAE=0,07$; $R^2=0,88$ e $RMSE=0,07$). Esses resultados reforçam a linearidade, capacidade preditiva e de generalização do modelo de *machine learning*, visto que a métrica R^2 supera o desempenho mínimo estabelecido ($> 0,70$) e os valores para MAE e RMSE se encontram abaixo do *bias* máximo permitido de 0,14. Portanto, o modelo prediz com confiança resultados médios de HOMA-IR $\geq 2,43$ (IC95%: 2,33 a 2,53) e $\geq 2,46$, estimados respectivamente pelos métodos da Regressão Segmentada e MARS, que estão associados ao ponto de inflexão para prolactina $\leq 11,26$ ng/mL.

No caso da glicose, a qualidade das métricas que utilizam tanto o método de Regressão Segmentada ($MAE=1,08$; $R^2=0,90$; $RMSE=0,93$) como o MARS ($MAE=0,55$; $R^2=0,97$; $RMSE=0,49$), também confirma, a capacidade preditiva e de generalização do modelo de *machine learning*. Dessa forma, o modelo de *machine learning* prediz com confiança resultados médios de glicose $\geq 86,35$ (IC95%: 85,52 a 87,18 mg/dL) e $\geq 86,99$ mg/dL, estimados respectivamente pelos métodos da Regressão Segmentada e MARS, que estão associados ao ponto de inflexão para prolactina $\leq 10,90$ ng/mL.

A insulina, por sua vez, apresenta métricas ruins para o método de Regressão Segmentada ($MAE=0,35$; $R^2=0,56$; $RMSE=0,31$) e o MARS ($MAE=0,36$; $R^2=0,55$; $RMSE=0,31$), demonstrando uma linearidade limitada e uma capacidade preditiva e de generalização prejudicada do modelo de *machine learning*, uma vez que o limite de aceitabilidade ($>0,70$) para a métrica R^2 não foi atendido. Portanto, o modelo não prediz com confiança resultados médios de insulina, associados ao ponto de inflexão para prolactina $\leq 11,35$ ng/mL. Esses resultados corroboram os achados obtidos no estudo de comparação das distribuições dos resultados médios de insulina nas diferentes faixas de concentração de prolactina conforme a nova classificação metabólica, pois nesse estudo comparativo foi identificadas diferenças estatisticamente significativas que não eram clinicamente relevantes.

A Tabela 24, por sua vez, traz os pontos de inflexão estimados para a prolactina, juntamente com os resultados médios previstos para os exames de perfil lipídico e é possível visualizar de forma compilada os resultados obtidos para as métricas MAE, R^2 e RMSE associadas a cada resultado médio previsto.

Tabela 24 – Critérios utilizados para avaliar a relevância prática das diferenças nos resultados dos exames utilizados como resposta nas diferentes faixas de resultados de prolactina.

Exames	Ponto de Inflexão da Prolactina em ng/mL (IC 95%)	Previsão dos resultados dos Parâmetros do metabolismo glicídico e lipídico			
		Método de Regressão Segmentada (trecho linear)		Método MARS	
		Predição (IC 95%)	Métricas de avaliação	Predição	Métricas de avaliação
CT (mg/dL)	≤ 15,85 (13,81 a 17,89)	≥ 187,72 (186,29 a 189,14)	RMSE: 1,80 R ² : 0,86 MAE:1,29	≥ 187,50	RMSE: 1,71 R ² : 0,88 MAE: 1,19
HDL-c (mg/dL)	≤ 16,11 (14,23 a 17,98)	≤ 56,36 (55,98 a 56,74)	RMSE: 0,37 R ² : 0,90 MAE:0,27	≤ 56,37	RMSE: 0,36 R ² : 0,91 MAE: 0,28
LDL-c (mg/dL)	≤ 16,61 (14,49 a 18,73)	≥ 109,59 (108,24 a 110,93)	RMSE: 1,58 R ² : 0,90 MAE:1,30	≥ 109,86	RMSE: 1,81 R ² : 0,88 MAE: 1,47
TRI (mg/dL)	≤ 13,08 (11,82 a 14,35)	≥ 108,98 (106,66 a 111,3)	RMSE: 2,76 R ² : 0,91 MAE:2,26	≥ 110,50	RMSE: 3,17 R ² : 0,92 MAE: 2,24

Nota: HOMA-IR: *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*; GLI: glicose sérica; INS: insulina sérica; CT: colesterol total; LDL-c: LDL colesterol; HDL-c: HDL colesterol; TRIG: triglicérides; MARS: Splines de Regressão Adaptativa Multivariada.

O modelo apresentado demonstra sua qualidade em relação ao colesterol total, conforme evidenciado pelos resultados obtidos tanto pelo método de Regressão Segmentada (com MAE=180, R²=0,86 e RMSE=1,29) quanto pelo MARS (com MAE=1,71, R²=0,88 e RMSE=1,19). Estes resultados não apenas reforçam o ajuste da regressão, mas também destacam a capacidade preditiva e de generalização do modelo de *machine learning*. Isso é evidente, pois a métrica R² ultrapassa o limite de aceitabilidade estabelecido (> 0,70), e os valores para MAE e RMSE estão abaixo do *bias* máximo permitido de 8,32. Portanto, podemos inferir com confiança que o modelo prevê resultados médios de colesterol total ≥ 187,72 mg/dL (IC 95%: 186,29 a 189,14) e ≥ 187,14 mg/dL. Estes resultados são estimados, respectivamente, pelos métodos da Regressão Segmentada e MARS, e estão associados ao ponto de inflexão para prolactina ≤ 15,85 ng/mL.

A qualidade do modelo em relação ao HDL-c é confirmada pelas métricas de avaliação, tanto para o método de Regressão Segmentada (MAE=0,60; $R^2=0,73$; RMSE=0,47) quanto para o MARS (MAE=0,28; $R^2=0,89$; RMSE=0,23). Esses resultados evidenciam a linearidade, a capacidade preditiva e a generalização do *machine learning*. Assim, podemos concluir com confiança que o modelo prevê resultados médios de HDL-c $\leq 56,36$ mg/dL (IC 95%: 55,98 a 56,74 mg/dL) e $\leq 56,22$ mg/dL. Estas previsões são estimadas, respectivamente, pelos métodos da Regressão Segmentada e MARS, e estão associadas ao ponto de inflexão para prolactina $\leq 16,11$ ng/mL.

A qualidade do modelo em relação ao LDL-c é evidenciada tanto pelo método de Regressão Segmentada (MAE=2,24; $R^2=0,73$; RMSE=1,73) quanto pelo MARS (MAE=1,14; $R^2=0,87$; RMSE=0,96). Esses resultados demonstram a correlação, a capacidade preditiva e de generalização do *machine learning*. Assim, podemos inferir com confiança que o modelo de *machine learning* que utiliza os métodos de Regressão Segmentada e MARS prevê resultados médios de LDL-c $\leq 109,59$ (IC 95%: 108,24 a 110,93) e $\leq 109,18$, respectivamente. Essas previsões estão associadas ao ponto de inflexão para prolactina $\leq 16,61$ ng/mL.

Em relação ao triglicérides, a qualidade das métricas de avaliação, baseados tanto no método de Regressão Segmentada (MAE=3,52; $R^2=0,79$; RMSE=2,63) como no MARS (MAE=2,02; $R^2=0,88$; RMSE=1,51), confirmam a linearidade, capacidade preditiva e de generalização do modelo *machine learning*. Portanto, o modelo que utiliza os métodos de Regressão Segmentada e MARS predizem com confiança resultados médios de triglicérides $\leq 108,98$ (IC 95%: 106,66 a 111,3) e $\leq 109,18$, respectivamente, associados ao ponto de inflexão para prolactina $\leq 13,10$ ng/mL.

5.5.2. Comparação entre os resultados médios previstos pelo modelo de *machine learning*

A análise comparativa indica que as previsões médias obtidas pelo método de Regressão Segmentada possuem equivalência estatística e clínica com as geradas pelo método MARS.

Essa equivalência é confirmada por duas observações cruciais. Inicialmente, em cada teste realizado, todas as estimativas médias provenientes do método MARS se situam dentro dos respectivos ICs de 95%, conforme determinado pela Regressão Segmentada. Adicionalmente, em todas as avaliações, o *bias* analítico se revela inferior ao *bias* máximo, como evidenciado na Tabela 25.

Tabela 25 – Verificação da equivalência clínica entre os resultados médios previstos pelo modelo de *machine learning* usando os métodos da Regressão Segmentada e o método MARS.

Exame	Predições feitas pelo modelo de <i>Machine Learning</i>		Média	<i>Bias</i> analítico em valor absoluto	<i>Bias</i> máximo	Equivalência clínica ou prática?
	Método Reg. Seg. (IC 95%)	Método MARS				
HOMA-IR	2,43 (2,33 a 2,53)	2,46	2,44	0,03	5,22% ou 0,13	sim
Glicose (mg/dL)	86,35 (85,52 a 87,18)	86,99	86,67	0,64	2,40% ou 2,07 mg/dL	sim
Insulina (mcUI/mL)	11,12 (10,83 a 11,41)	11,22	11,17	0,10	10,50% ou 1,16 mcUI/mL	sim
Colesterol Total (mg/dL)	187,72 (186,29 a 189,14)	187,93	187,82	0,21	4,38% ou 8,21 mg/dL	sim
HDL-c (mg/dL)	56,36 (55,98 a 56,74)	56,27	56,31	0,09	6,20% ou 3,49 mg/dL	sim
LDL-c (mg/dL)	109,59 (108,24 a 110,93)	110,07	109,83	0,48	7,00% ou 7,65 mg/dL	sim
Triglicérides (mg/dL)	108,98 (106,66 a 111,3)	110,52	109,75	1,54	10,50% ou 11,44 mg/dL	sim

Nota: Reg. Seg.: Regressão Segmentada; IC 95%: intervalo de confiança de 95% do valor médio previsto pelo modelo de *machine learning*; MARS: Splines de Regressão Adaptativa Multivariada; HOMA-IR: *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*; *Bias* Máximo: é a diferença máxima permitida entre os resultados médios previstos pelo método da Regressão Segmentada e pelo método MARS. É calculado como 13% da média dos pontos de inflexão comparados. Essa fonte de especificação é obtida a partir do *bias* desejável baseado nos estudos da variação biológica (Modelo 2 do consenso de Milão) com exceção do HOMA-IR que utiliza o modelo 3 baseado no estado da arte.

5.5.3. Comparação entre os pontos de inflexão estimados para a prolactina e seus quartis com base no intervalo de confiança

De acordo com os critérios de inclusão pré-definidos para a análise comparativa dos pontos de inflexão da prolactina, o ponto de inflexão associado aos resultados médios de insulina foi excluído desta análise. A razão para essa exclusão é que ele não atendia aos critérios 1 e 2, conforme especificado na Tabela 6, presente no subitem 4.3.4.6.

Ao avaliar a equivalência estatística dos pontos de inflexão, a análise gráfica dos IC de 95% dos pontos de inflexão da prolactina (Figura 32) revelou uma sobreposição nos ICs de 95% associados aos exames de glicose e HOMA-IR. Esta sobreposição foi confirmada após a análise dos limites inferior e superior dos ICs de 95% para a glicose (IC 95%:10,09 a 11,72) e HOMA-IR (IC 95%: 9,58 a 12,87).

A análise gráfica também revelou uma sobreposição dos ICs de 95% dos pontos de inflexão da prolactina associados aos exames de colesterol total, HDL-c e LDL-c. Esta sobreposição foi confirmada após a análise dos limites inferior e superior dos ICs de 95% para o colesterol total (IC 95%:13,81 a 17,89), HDL-c (IC 95%:14,23 a 17,98) e LDL-c (IC 95%:14,49 a 18,73).

Os ICs de 95% para os pontos de inflexão da prolactina, relacionados aos exames de metabolismo glicídico (glicose e HOMA-IR), não apresentaram sobreposição com os ICs referentes aos exames de colesterol total, HDL-c e LDL-c, que estão associados ao metabolismo lipídico. No entanto, o IC de 95% para o ponto de inflexão da prolactina associado aos triglicérides (IC 95%: 11,82 a 14,35) exibiu um comportamento estatisticamente distinto dos demais exames do metabolismo lipídico. Foi identificada uma sobreposição discreta com os ICs de 95% dos pontos de inflexão da prolactina, associados aos exames de HOMA-IR e colesterol total. Além disso, constatou-se uma sobreposição quase irrelevante, com o IC de 95% do ponto de inflexão da prolactina relacionado ao HDL-c.

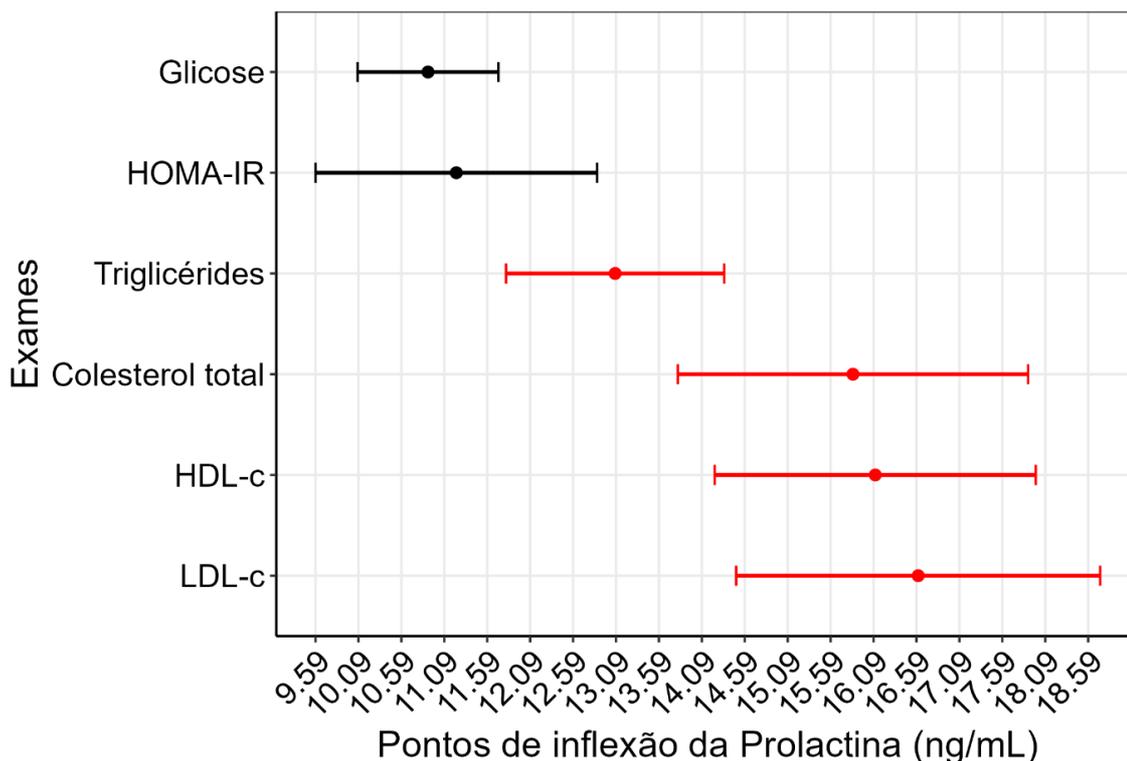


Figura 32 – Pontos de inflexão e IC de 95% dos exames do metabolismo glicídico (cor preta) e lipídico (cor vermelha). IC: Intervalo de confiança.

É relevante observar que, mesmo com a variação nas variâncias dos pontos de inflexão comparados (com rho variando de 0,77 a 2,02), os p -valores estimados, que são dependentes da estatística rho, apresentaram valores entre 0,0055820 e 0,0086360. A interpretação mais eficaz desses resultados da estatística rho é que, na ausência de sobreposição dos ICs de 95%, a escolha de um nível de significância igual a 1% (ou 0,01) é suficiente para identificar diferenças estatísticas entre os pontos de inflexão. Isso se deve ao fato de que os p -valores, na ausência de sobreposição de ICs de 95%, apresentam resultados inferiores a 1% (0,55% a 0,86%). Em outras palavras, a probabilidade de cometer um erro do tipo I (ou falso positivo) - isto é, afirmar que dois pontos de inflexão comparados são estatisticamente diferentes quando não há sobreposição de seus respectivos ICs de 95% - é inferior a 1%.

Além disso, foi identificada uma equivalência clínica entre os pontos de inflexão da prolactina associados aos exames do metabolismo glicídico (HOMA-IR e glicose) e lipídico (colesterol total, HDL-c, LDL-c), exceto o triglicerídeos. O triglicerídeo foi o único exame que apresentou o ponto de inflexão da prolactina com um *bias* analítico maior do que o *bias* máximo, quando comparado com os pontos de inflexão cujos ICs de 95% apresentavam sobreposição parcial (Tabela 26).

Tabela 26 – Verificação da equivalência clínica entre os pontos de inflexão da prolactina associados aos exames do metabolismo glicídico e lipídico.

Comparação (A vs B)	Ponto de Inflexão da Prolactina (IC 95%)		Média	<i>Bias</i> analítico em valor absoluto	<i>Bias</i> máximo	ρ	<i>p</i> -valor pelo método Knol <i>et al.</i> (123)	Equivalência clínica ou prática?
	A	B						
GLI vs HOMA-IR	10,90 (10,09 a 11,72)	11,23 (9,58 a 12,87)	11,06	0,33	1,44	2,02	0,008636	sim
HOMA-IR vs TRI	11,23 (9,58 a 12,87)	13,1 (11,82 a 14,35)	12,16	1,87	1,58	0,77	0,005982	não
TRI vs CT	13,1 (11,82 a 14,35)	15,85 (13,81 a 17,89)	14,47	2,75	1,88	1,61	0,006952	não
TRI vs HDL-c	13,1 (11,82 a 14,35)	16,11 (14,23 a 17,98)	14,60	3,01	1,90	1,48	0,006501	não
CT vs HDL-c	15,85 (13,81 a 17,89)	16,11 (14,23 a 17,98)	15,98	0,26	2,08	0,92	0,005615	sim
CT vs LDL-c	15,85 (13,81 a 17,89)	16,61 (14,49 a 18,73)	16,23	0,76	2,11	1,04	0,005582	sim
HDL-c vs LDL-c	16,11 (14,23 a 17,98)	16,61 (14,49 a 18,73)	16,36	0,50	2,13	1,13	0,005662	sim

Nota: vs: em oposição ou contra (do latim, *versus*); IC 95%: intervalo de confiança de 95% do ponto de inflexão da prolactina; ρ : rho é a razão dos desvios padrão B e A. O desvio padrão de A e B são calculados pela fórmula (Limite Superior do IC95% - Limite Inferior do IC95%) \div 3,92; *Bias* Máximo: é a diferença máxima permitida entre os pontos de inflexão e é calculada como 13% da média dos pontos de inflexão comparados. Essa fonte de especificação é obtida a partir do *bias* desejável baseado nos estudos da variação biológica (Modelo 2 do consenso de Milão), com exceção do HOMA-IR que utiliza o modelo 3 baseado no estado da arte; *p*-valor pelo método Knol *et al.* (123) é calculado para um cenário de 0% de sobreposição de dois intervalos de confiança adjacentes; HOMA-IR: *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*.

6. DISCUSSÃO

A prolactina é um hormônio com funções bem estabelecidas quanto a lactação e regulação do eixo gonadotrófico, todavia, seu papel no controle hidroeletrolítico e do metabolismo energético tem sido descrito. A compreensão da relação entre a concentração de prolactina e os parâmetros que refletem o controle da glicemia tem grande importância na interface entre a fisiologia e a determinação de metas terapêuticas para o controle da hiperprolactinemia em condições patológicas como em pacientes com prolactinomas (138,139).

Nosso estudo é original e contempla a discussão acerca do papel da prolactina no metabolismo intermediário. O caráter inovador do estudo reside na utilização de mais de 60 mil resultados de pacientes não selecionados, distribuídos em 106 partições visando analisar o impacto da média da concentração sérica de prolactina no metabolismo glicídico e lipídico e permitiu a determinação de pontos de corte ou inflexão para essa associação.

Os resultados de prolactina foram equivalentes estatisticamente e clinicamente entre os sexos. Esse estudo de comparação utilizou grande volume de dados e possibilita a detecção de efeitos muito pequenos que são estatisticamente significativos. No entanto, nem todos os efeitos estatisticamente significativos são necessariamente importantes do ponto de vista prático ou clínico. Portanto, foi importante interpretar os resultados considerando o TDE e TDE-LC, bem como a significância estatística. Isso justifica o uso da abordagem conservadora do “Quarteto de critérios de significância”, para identificar diferenças relevantes do ponto de vista prático.

Tradicionalmente, os valores considerados normais de prolactina variam de 1 a 25 ng/mL. A normoprolactinemia e hiperprolactinemia são definidas como concentrações de prolactina inferiores e superiores a 25 ng/mL, respectivamente, com implicações clínicas variadas. Recentemente, concentrações de prolactina sérica entre 25 e \approx 100 ng/mL, observados em ambos os sexos, foram categorizados como HomeoFIT-PRL, devido à sua contribuição para a manutenção e promoção da homeostase metabólica (2,4,140).

Este novo paradigma, fundamentado em evidências clínicas e experimentais, indica que as concentrações de prolactina normais ou discretamente elevadas auxiliam na regulação metabólica, especialmente em condições como diabetes mellitus e obesidade. Portanto, a prolactina, dentro de uma faixa específica que engloba a faixa fisiológica normal (7 a 25 ng/mL) e a faixa HomeoFIT-PRL (25 a \approx 100 ng/mL), desempenha um papel crucial na resposta a desafios fisiológicos ou patológicos, favorecendo a homeostase metabólica (2,4,140).

Por outro lado, estudos sugerem que concentrações < 7 ng/mL ou > 100 ng/mL de prolactina podem ter efeitos metabólicos prejudiciais. Diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólica, resistência à insulina, obesidade, intolerância à glicose e doença hepática gordurosa não alcoólica ocorrem em associação com concentrações circulantes de prolactina muito baixos e muito altos; enquanto a aptidão metabólica (baixo risco e incidência de alterações metabólicas, aumento da sensibilidade à insulina, etc.) associa-se a altas concentrações de prolactina dentro e acima da faixa normal, na zona HomeoFIT-PRL. No entanto, a questão relativa à relação de causalidade entre as concentrações circulantes de prolactina e a homeostase metabólica permanece em aberto (2,4,140).

Nossos achados, utilizando a técnica de amostragem indireta e baseada em um grande volume de dados, são semelhantes aos limites de decisão compilados nos artigos recentes de Macotela *et al.* (2,4) que identificaram um impacto negativo no metabolismo da população em geral quando a concentração de prolactina era < 7 ng/mL. Foi demonstrado que a baixa concentração média de prolactina circulante (< 7 ng/mL) associou-se ao aumento nas concentrações médias de HOMA-IR, glicose, colesterol total, LDL-c e triglicérides e a diminuição na concentração média de HDL-c, sem elevação relevante nas médias de insulina. Considerando que o cálculo do HOMA-IR utiliza os resultados de glicose e insulina, nossos dados sugerem que o impacto observado nos resultados médios do HOMA-IR nas diferentes faixas de concentração de prolactina é, predominantemente, influenciada pela glicose.

Estimamos o ponto de inflexão da prolactina, que sugere o *set point* em que a concentração de prolactina apresenta alta associação com o metabolismo glicídico e lipídico. Abaixo dos pontos de inflexão tanto da glicose (10,90; IC 95%: 10,09 a 11,72) quanto do HOMA-IR (11,23; IC 95%: 9,58 a 12,87), os resultados médios de glicose

e HOMA-IR apresentaram uma correlação linear muito forte com as concentrações médias de prolactina, o que sugere maior sensibilidade do metabolismo glicídico aos efeitos da prolactina. Esses pontos de inflexão se sobrepõem, demonstrando equivalência estatística a um nível de significância de 0,005. Além disso, o *bias* analítico entre esses pontos de inflexão é inferior ao *bias* máximo, demonstrando sua equivalência prática. Esses resultados indicam que a média da concentração de prolactina pode ser um potencial indicador preditivo para a progressão da resistência à insulina e diabetes mellitus.

Alguns autores têm sugerido que a hiperprolactinemia está associada a maior risco de diabetes mellitus tipo 2, seja por efeito direto da prolactina, causando resistência à ação da insulina, seja por inibição do tônus dopaminérgico central (141-143). Estudos sugerem piora da resistência insulínica pós-prandial associada à hiperprolactinemia. (140). Fisiologicamente ocorre hiperinsulinemia secundária à ampliação do estímulo pancreático das células beta pela prolactina, há, também, a diminuição da inibição da gliconeogênese hepática, inibição da ação antilipolítica da insulina e diminuição da captação periférica de glicose (141-143).

Recente metanálise realizada em nosso grupo de pesquisa avaliando 1.221 artigos que analisaram esses parâmetros, sugeriu que a concentração de prolactina no nível superior da normalidade parece ser fator protetor de diabetes mellitus se comparado aos indivíduos com prolactina no limite inferior da normalidade (8).

No que concerne aos pontos de inflexão estimados, se adotarmos os ICs de 95% para cada ponto de inflexão como uma métrica estatística que reflete a incerteza inerente à estimativa do ponto de inflexão, temos a possibilidade de utilizar os limites desses ICs como delimitadores da faixa representativa da "zona cinza", que está associada à incerteza desses pontos de inflexão. Assim, podemos estabelecer o menor limite inferior e o maior limite superior dentre os ICs, que são considerados estatisticamente e clinicamente equivalentes, como os limites dessa "zona cinza".

Os pontos de inflexão tanto para o HOMA-IR (11,23; IC 95%: 9,58,81 a 12,87) como para a glicose (10,90; IC 95%: 10,09 a 11,72) foram considerados equivalentes. Levando em conta os pontos de inflexão e seus respectivos IC de 95%, o modelo de *machine learning* demonstra uma capacidade preditiva robusta (R^2 entre 0,84 e 0,95)

para estimar os resultados médios de glicose e HOMA-IR. Nossos dados sugerem uma alta correlação entre o prejuízo no metabolismo glicídico quando a média da prolactina sérica se situa abaixo do intervalo de 9,58 a 12,87 ng/mL. Este intervalo pode ser interpretado como a "zona cinza" associada ao controle do metabolismo glicídico.

De maneira similar, os pontos de inflexão nos testes de colesterol total (15,85; IC 95%: 13,81 a 17,89), HDL-c (16,11; IC 95%: 14,23 a 17,98) e LDL-c (16,61; IC 95%: 14,49 a 18,73) foram considerados equivalentes. Todavia, a análise destes pontos de inflexão da prolactina associados ao metabolismo lipídico, demonstram um *set point* mais elevado. Levando em conta os pontos de inflexão e seus respectivos ICs de 95%, o modelo de *machine learning* demonstra uma capacidade preditiva robusta (R^2 entre 0,86 e 0,92) ao estimar as médias de colesterol total, HDL-c ou LDL-c baseando-se nas médias de prolactina inferiores à faixa de 13,81 a 18,73 ng/mL. Os nossos dados indicam uma alta correlação entre os resultados médios desses exames do metabolismo lipídico e os resultados médios de prolactina sérica abaixo desta faixa, que pode ser interpretada como a "zona cinza" associada a distúrbios no metabolismo lipídico.

O ponto de inflexão e o IC de 95% para os triglicerídeos apresentaram características singulares, sendo estatisticamente equivalentes aos pontos de inflexão observados nos exames de metabolismo glicídico (glicose e HOMA-IR). Embora os triglicerídeos sejam tradicionalmente classificados como um componente central do metabolismo lipídico, eles têm uma interação complexa com ambos os sistemas metabólicos, lipídico e glicídico. Isso pode explicar a semelhança estatística em seus pontos de inflexão em relação a ambos os sistemas. No metabolismo glicídico, a resistência à insulina, frequentemente medida pelo HOMA-IR, está intrinsecamente ligada às concentrações de triglicerídeos. Isso ocorre porque a resistência à insulina diminui a inibição da lipólise no tecido adiposo, resultando em uma maior liberação de ácidos graxos livres que podem ser convertidos em triglicerídeos pelo fígado (28,38,41,42,143).

Paralelamente, os triglicerídeos desempenham um papel fundamental no metabolismo lipídico como a principal forma de armazenamento de gordura no corpo e no transporte de lipídios dietéticos. Essa conexão dupla e multifacetada com ambos

os sistemas metabólicos é ainda mais complexa devido à influência de fatores individuais, como genética, dieta, atividade física e estresse. Portanto, o ponto de inflexão dos triglicerídeos ser equivalente ao ponto de inflexão dos exames do metabolismo glicídico sugerem essa interação intrincada e multifatorial, ressaltando a complexidade e a interdependência dos nossos sistemas metabólicos (28,38,41,42,143).

Os resultados deste estudo transversal, que utiliza um amplo conjunto de dados, e um modelo de *machine learning* personalizado, corroboram múltiplos estudos de coorte e publicações científicas. Tais estudos têm demonstrado consistentemente que indivíduos apresentando concentrações mais baixas de prolactina circulante estão associados a um risco elevado de desenvolver resistência à insulina, diabetes mellitus e síndrome metabólica (2,4,51,55,56,143-156).

Os resultados obtidos em nosso estudo confirmam que concentrações médias de prolactina < 7ng/mL podem servir como um indicador preditivo potencial para a evolução da resistência à insulina, diabetes mellitus e síndrome metabólica. Esta conjectura é corroborada pelas "zonas cinzas" estimadas para os resultados médios de prolactina, que estão associadas a prejuízos no metabolismo glicídico (9,58 a 12,87 ng/mL) e lipídico (13,81 a 18,73 ng/mL). Notavelmente, abaixo dessas "zonas cinzas", observa-se uma correlação linear muito forte entre as médias das concentrações de prolactina e as médias dos exames de glicose, HOMA-IR, colesterol total, HDL-c e LDL-c.

Nossa pesquisa identificou que, na faixa HomeoFIT-PRL, correspondente à faixa de resultados médios de prolactina entre 25 e 100 ng/mL, a mediana e a distribuição dos resultados médios dos exames metabolismo glicídico e lipídico são predominantemente inferiores em comparação com as demais faixas de resultados médios de prolactina. Essas diferenças se mostraram estatisticamente significativas e clinicamente relevantes, com exceção dos resultados médios de insulina e HDL-c. Os resultados médios de insulina não exibiram diferenças significativas em nenhuma das faixas de prolactina. O HDL-c apresentou resultados médios estatisticamente mais baixos na faixa HomeoFIT-PRL, porém a diferença entre os resultados médios de HDL-c na faixa HomeoFIT-PRL não se mostrou clinicamente relevante quando comparada aos resultados médios de HDL-c na faixa de prolactina entre 7 e 25 ng/mL.

Ao analisarmos o comportamento geral dos resultados médios dos exames do metabolismo glicídico e lipídico, podemos inferir que a faixa HomeoFIT-PRL parece favorecer a homeostase metabólica.

Nosso estudo sugere que, em geral, os resultados médios dos exames do metabolismo glicídico e lipídico tendem a aumentar na faixa de prolactina superior a 100 ng/mL. Em alguns casos, esse aumento é estatisticamente significativo e clinicamente relevante para a amostra analisada. No entanto, a forte correlação entre os resultados médios da prolactina e dos exames do metabolismo glicídico e lipídico, que foi observada para concentrações baixas de prolactina, não foi identificada para concentrações mais altas de prolactina. Isso pode ser devido ao tamanho amostral reduzido dos resultados individuais ($n = 177$, resultados não mostrados – Ver Apêndice A) e médios ($n = 6$) nessa faixa de prolactina.

Importante destacar que o pré-processamento dos resultados pode influenciar significativamente a detecção de padrões, tais como correlações entre variáveis, bem como aumentos e diminuições nos resultados de determinados exames em comparação com outros. Isso é particularmente proeminente em resultados de hormônios, onde a variabilidade biológica é marcante. A variação biológica total se divide em duas partes: individual e do grupo (145-147).

A variação biológica individual é representada pelo coeficiente de variação individual (CVi) e reflete a variação média de uma medida em relação ao ponto de ajuste homeostático dos indivíduos. Por outro lado, a variação biológica do grupo, representada pelo coeficiente de variação do grupo (CVg), descreve a variação de uma medida entre os pontos de ajuste homeostáticos dentro de um grupo de indivíduos (145-147).

Essas informações são extremamente relevantes quando buscamos correlacionar ou identificar padrões nos resultados entre duas medidas com altos CVi e CVg. Os padrões nos resultados podem ser ocultados pela significativa variabilidade biológica, juntamente com as consideráveis variações pré-analíticas (por exemplo, efeitos de medicamentos, hemólise, lipemia, efeitos dos anticoagulantes, armazenamento da amostra, etc.) e analíticas (por exemplo, lotes de reagentes, calibrações, procedimentos de medição, etc.) (148-151).

As variações biológicas e analíticas de um exame podem ter um grande impacto na exatidão e reprodutibilidade da classificação de uma doença. Um teste com grande variação biológica e analítica aumenta a probabilidade do resultado de um paciente cair mais longe de seu verdadeiro ponto de ajuste homeostático. Isso aumenta a probabilidade de classificação errônea do estado de doença subjacente de um paciente. Exames que apresentam menor variação biológica podem ser marcadores melhores a serem seguidos em série para orientar a terapia (148-151).

Essa discussão sobre a influência da variação biológica na interpretação de resultados laboratoriais para o diagnóstico de doenças e seguimento de pacientes pode ser estendida para análises estatísticas de correlações e comparações de resultados para identificação de padrões.

De acordo com as informações disponíveis no site da *European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (EFLM) (<https://biologicalvariation.eu/>), um recurso que compila diversas publicações sobre variação biológica e apresenta os valores medianos de CVi e CVg desses estudos, a prolactina tem um CVi mediano de 29,5% e um CVg mediano de 43%. Esses resultados de CVi e CVg podem ser considerados altos. Portanto, com o intuito de mitigar a influência da magnitude da variação biológica da prolactina assim como da variação biológica dos exames utilizados para avaliar o metabolismo glicídico e lipídico, foi modificada a granularidade dos resultados, isto é, trabalhou-se com médias de resultados de prolactina e dos exames do metabolismo glicídico e lipídico.

Esse foi o principal intuito de ter sido criado 106 partições com base nos resultados de prolactina e calculado a média de prolactina sérica em cada partição e as médias correspondentes aos resultados dos exames do metabolismo glicídico e lipídico. O elevado volume de resultados permitiu que cada média fosse calculada com um tamanho amostral relevante.

Quando se calcula médias de pequenas faixas de resultados, está sendo aplicado uma forma de agregação, que é uma técnica comum em análise de dados que ajuda a reduzir a complexidade e a quantidade de dados a serem analisados, tornando-os mais fáceis de interpretar. Ao se trabalhar com médias em detrimento dos resultados individuais, estamos efetivamente reduzindo a granularidade dos

resultados - passando de muitos pontos de resultados individuais para um conjunto menor de médias representativas. Isso permite que seja observado tendências gerais e padrões nos resultados sem ser sobrecarregado pelos detalhes dos resultados individuais.

A partir dessas 106 médias, foi possível identificar fortes correlações em determinadas faixas de resultados de prolactina, bem como aumentos e diminuições claras nos resultados médios dos exames do metabolismo glicídico e lipídico nas faixas sugeridas pela nova classificação metabólica da prolactina. Em outras palavras, essa estratégia possibilitou a identificação de padrões nos resultados. Se fossem analisados os resultados individuais (ver Apêndice A) e aplicadas as mesmas análises estatísticas utilizadas nos resultados médios, os padrões estatísticos e clinicamente relevantes identificados não seriam discerníveis.

O modelo personalizado de *machine learning*, empregando métodos de regressão segmentada e MARS, demonstrou uma capacidade preditiva excepcional. Este modelo não apenas identificou padrões nos dados com eficácia, mas também facilitou a detecção do ponto de inflexão. Para prevenir o sobreajuste durante a aplicação do método MARS, implementamos a técnica de validação cruzada.

No artigo de opinião publicado por Macotela, Triebel e Clapp (4), os autores sinalizam que o estabelecimento de um valor de corte para as concentrações de prolactina para uso como uma ferramenta de prognóstico para doenças metabólicas cria um problema prático enraizado na variabilidade circadiana e na pulsatilidade da secreção de prolactina, na suscetibilidade da secreção de prolactina a estímulos externos, na variação intraindividual e na variabilidade do ensaio que determina as concentrações de prolactina. Em outras palavras, a variação biológica, pré-analítica e analítica limitaria a utilização de um valor de corte útil para a tomada de decisão médica. Portanto, a pergunta que fica é: Como utilizar as informações deste estudo para ajudar nas tomada de decisão médica e contornar as limitações relacionadas principalmente à variação biológica?

Nosso estudo evidencia que a utilização da média histórica das concentrações de prolactina para cada paciente pode oferecer informações mais precisas sobre a homeostase metabólica. Isso se deve ao fato de que os resultados médios de prolactina exibem uma correlação muito forte com os resultados médios dos exames

metabolismo glicídico e lipídico. Além disso, essa abordagem permite a identificação de possíveis flutuações clinicamente relevantes, que estão associadas à homeostase metabólica e melhora na aplicabilidade das “zonas cinzas” propostas nesse estudo. Contudo, é importante enfatizar que os resultados obtidos neste estudo são aplicáveis apenas aos cenários onde se analisam resultados médios.

Neste estudo, identificamos limitações que merecem consideração. Devido ao desenho transversal do estudo, nos abstermos de estabelecer qualquer relação causal, pois correlação não implica causalidade. A necessidade de futuras investigações longitudinais é, portanto, enfatizada para determinar a relação causal entre as alterações nas concentrações médias de prolactina e alterações no metabolismo glicídico e lipídico.

No tocante à análise por subgrupos, embora acreditemos que os resultados do perfil lipídico e glicídico não apresentam fatores de confusão associados ao sexo e idade que afetem simultaneamente os resultados médios de prolactina e metabolismo glicídico e lipídico, reconhecemos que o nosso estudo não fez distinção entre diferentes grupos de idade e sexo. Essa ausência de estratificação pode ter mascarado possíveis diferenças na correlação entre a prolactina e o metabolismo glicídico e lipídico em diferentes subpopulações. Futuros estudos devem considerar análises estratificadas, incluindo até condições de saúde, como diabetes mellitus ou dislipidemia, que abordem potenciais heterogeneidades.

Ademais, apesar do rigor metodológico empregado para minimizar taxa de falsos positivos na comparação dos resultados dos exames do metabolismo lipídico e glicídico na diferentes faixas de resultados de prolactina, a complexidade das interações, variáveis demográficas e de saúde podem introduzir fatores de confusão não mensurados que impactam nossas estimativas de comparação. Assim, a realização de pesquisas mais aprofundadas que explorem interações multivariadas é uma necessidade emergente.

Por fim, é importante ressaltar que, enquanto nossos dados oferecem um olhar interessante sobre as possíveis correlações entre os resultados médios de prolactina e o metabolismo glicídico e lipídico, estudos com amostragens mais amplas e variadas podem fornecer uma visão mais holística e representativa dessas relações.

7. CONCLUSÃO

Nosso estudo sugere que a influência da prolactina no metabolismo glicídico e lipídico é dependente de sua concentração circulante. A prolactina pode desempenhar um papel mediador na patogênese dos distúrbios do metabolismo da glicose, colesterol total, LDL-c, HDL-c e triglicerídeos.

Determinamos o ponto de inflexão da prolactina capaz de influenciar no metabolismo glicídico, onde a média da prolactina sérica se situa abaixo do intervalo de 9,58 a 12,87 ng/mL, interpretado como a "zona cinza" na regulação metabólica. O comportamento da glicose e HOMA-IR, está intrinsecamente ligado às concentrações de triglicerídeos. Esta ligação provavelmente ocorre porque a resistência à insulina pode reduzir a inibição da lipólise no tecido adiposo, levando a uma maior liberação de ácidos graxos livres que podem ser convertidos em triglicerídeos pelo fígado. Essa possível interação, de caráter intrincado e multifatorial, ressalta a complexidade e a interdependência de nossos sistemas metabólicos.

Desenvolvemos um modelo personalizado de *machine learning* para identificar prejuízos na homeostase metabólica. Essa ferramenta identificou automaticamente o ponto de inflexão da prolactina, a partir do qual se estabeleceu uma correlação linear entre os resultados médios de prolactina e dos exames do metabolismo glicídico e lipídico. A robustez deste estudo é ainda reforçada pelo significativo tamanho amostral.

Nossa pesquisa evidencia que a utilização da média histórica das concentrações de prolactina para cada paciente pode fornecer informações mais precisas para uma melhor compreensão da homeostase metabólica.

REFERÊNCIAS

1. Kirsch P, Kunadia J, Shah S, Agrawal N. Metabolic effects of prolactin and the role of dopamine agonists: A review. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022;13:1002320.
2. Macotela Y, Ruiz-Herrera X, Vázquez-Carrillo DI, Ramírez-Hernandez G, Martínez de la Escalera G, Clapp C. The beneficial metabolic actions of prolactin. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022;13:1001703.
3. Bernard V, Young J, Binart N. Prolactin — a pleiotropic factor in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 2019;15:356–65.
4. Macotela Y, Triebel J, Clapp C. Time for a New Perspective on Prolactin in Metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2020;31:276–86.
5. Abdel Ghafar MT, El-Masry MI. Verification of quantitative analytical methods in medical laboratories. *J Med Biochem* 2021;40:225–36.
6. Killeen AA, Long T, Souers R, Styer P, Ventura CB, Klee GG. Verifying performance characteristics of quantitative analytical systems: calibration verification, linearity, and analytical measurement range. *Arch Pathol Lab Med* 2014;138:1173–81.
7. Pirchio R, Graziadio C, Colao A, Pivonello R, Auriemma RS. Metabolic effects of prolactin. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022;13:1015520.
8. Faria de Castro L, Alves Dos Santos Á, Augusto Casulari L, Ansaneli Naves L, Amorim Amato A. Association between variations of physiological prolactin serum levels and the risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract* 2020;166:108247.
9. Ayad A, Hallawa A, Peine A, Martin L, Fazlic LB, Dartmann G, *et al.* Predicting Abnormalities in Laboratory Values of Patients in the Intensive Care Unit Using Different Deep Learning Models: Comparative Study. *JMIR Med Inform* 2022;10:e37658.
10. Rabbani N, Kim GYE, Suarez CJ, Chen JH. Applications of machine learning in routine laboratory medicine: Current state and future directions. *Clinical Biochemistry* 2022;103:1–7.
11. Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev.* 1996 Dec;17(6):639-69. doi: 10.1210/edrv-17-6-639. PMID: 8969972.
12. Molina P E. *Fisiologia endócrina* 4. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.
13. Burtis CA, Bruns DE. *Tietz Fundamentos de Química Clínica e Diagnóstico Molecular*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016.

14. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev.* 2000 Oct;80(4):1523-631.
15. Saleem M, Martin H, Coates P. Prolactin Biology and Laboratory Measurement: An Update on Physiology and Current Analytical Issues. *Clin Biochem Rev* 2018;39:3–16.
16. Fahie-Wilson MN, John R, Ellis AR. Macroprolactin; high molecular mass forms of circulating prolactin. *Ann Clin Biochem.* 2005 May;42(Pt 3):175-92.
17. Lippi G, Plebani M. Macroprolactin: searching for a needle in a haystack? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 2016;54:519–22. <https://doi.org/10.1515/cclm-2015-1283>.
18. Haddad RA, Giacherio D, Barkan AL. Interpretation of common endocrine laboratory tests: technical pitfalls, their mechanisms and practical considerations. *Clinical Diabetes and Endocrinology* 2019;5:12.
19. Vilar L, Abucham J, Albuquerque JL, Araujo LA, Azevedo MF, Boguszewski CL, et al. Controversial issues in the management of hyperprolactinemia and prolactinomas - An overview by the Neuroendocrinology Department of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism. *Arch Endocrinol Metab* 2018;62:236–63.
20. Vilar L, Naves LA, Rêgo D, Fleseriu M. Avaliação Diagnóstica da Hiperprolactinemia. In: Vilar L, editor. *Endocrinologia clínica*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2021. p.35-70
21. Overgaard M, Pedersen SM. Serum prolactin revisited: parametric reference intervals and cross platform evaluation of polyethylene glycol precipitation-based methods for discrimination between hyperprolactinemia and macroprolactinemia. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 2017;55:1744–53.
22. Gorvin CM. The prolactin receptor: Diverse and emerging roles in pathophysiology. *Journal of Clinical & Translational Endocrinology* 2015;2:85–91. <https://doi.org/10.1016/j.jcte.2015.05.001>.
23. Ferraris J. Is prolactin receptor signaling a target in dopamine-resistant prolactinomas? *Frontiers in Endocrinology* 2023;13.
24. Brooks CL. Molecular Mechanisms of Prolactin and Its Receptor. *Endocr Rev* 2012;33:504–25.
25. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and Its Receptor: Actions, Signal Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice. *Endocrine Reviews* 1998;19:225–68.
26. Brooks CL. Molecular Mechanisms of Prolactin and Its Receptor. *Endocr Rev* 2012;33:504–25.

27. Mortlock RD, Georgia SK, Finley SD. Dynamic Regulation of JAK-STAT Signaling Through the Prolactin Receptor Predicted by Computational Modeling. *Cell Mol Bioeng* 2020;14:15–30.
28. Ben-Jonathan N, Hugo E. Prolactin (PRL) in adipose tissue: regulation and functions. *Adv Exp Med Biol* 2015;846:1–35.
29. Abramicheva PA, Smirnova OV. Prolactin Receptor Isoforms as the Basis of Tissue-Specific Action of Prolactin in the Norm and Pathology. *Biochemistry (Mosc)* 2019;84:329–45.
30. Torre DL, Falorni A. Pharmacological causes of hyperprolactinemia. *Ther Clin Risk Manag* 2007;3:929–51.
31. Pala NA, Laway BA, Misgar RA, Shah ZA, Gojwari TA, Dar TA. Profile of leptin, adiponectin, and body fat in patients with hyperprolactinemia: Response to treatment with cabergoline. *Indian J Endocrinol Metab* 2016;20(2):177–81.
32. Foster-Schubert KE, Cummings DE. Emerging therapeutic strategies for obesity. *Endocr Rev* 2006;27:779–93.
33. Gruzdeva O, Borodkina D, Uchasova E, Dyleva Y, Barbarash O. Leptin resistance: underlying mechanisms and diagnosis. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2019;12:191–8.
34. Zhou Y, Rui L. Leptin signaling and leptin resistance. *Front Med* 2013;7:207–22.
35. Millington GW. The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. *Nutr Metab (Lond)* 2007;4:18.
36. RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci* 2005;8:571–8.
37. Barsh GS, Schwartz MW. Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nat Rev Genet* 2002;3:589–600.
38. Nilsson LA, Roepstorff C, Kiens B, Billig H, Ling C. Prolactin suppresses malonyl-CoA concentration in human adipose tissue. *Horm Metab Res* 2009;41:747–51.
39. Li Y, Li Z, Ngandiri DA, Llerins Perez M, Wolf A, Wang Y. The Molecular Brakes of Adipose Tissue Lipolysis. *Frontiers in Physiology* 2022;13.
40. Reshef L, Olswang Y, Cassuto H, Blum B, Croniger CM, Kalhan SC, *et al.* Glyceroneogenesis and the Triglyceride/Fatty Acid Cycle. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:30413–6.

41. Richard AJ, White U, Elks CM, Stephens JM. Adipose Tissue: Physiology to Metabolic Dysfunction. [Updated 2020 Apr 4]. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-.
42. Yang X-D, Ge X-C, Jiang S-Y, Yang Y-Y. Potential lipolytic regulators derived from natural products as effective approaches to treat obesity. *Frontiers in Endocrinology* 2022;13.
43. Feingold KR, Brinton EA, Grunfeld C. The Effect of Endocrine Disorders on Lipids and Lipoproteins. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, et al., editors. Endotext, South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000.
44. Pelkonen R, Nikkilä EA, Grahne B. Serum lipids, postheparin plasma lipase activities and glucose tolerance in patients with prolactinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1982;16:383–90.
45. 44 - Pala NA, Laway BA, Misgar RA, Dar RA. Metabolic abnormalities in patients with prolactinoma: response to treatment with cabergoline. *Diabetol Metab Syndr* 2015;7:99.
46. Ling C, Svensson L, Odén B, Weijdegård B, Edén B, Edén S, et al. Identification of functional prolactin (PRL) receptor gene expression: PRL inhibits lipoprotein lipase activity in human white adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1804–8.
47. Kumari A, Kristensen KK, Ploug M, Winther A-ML. The Importance of Lipoprotein Lipase Regulation in Atherosclerosis. *Biomedicines* 2021;9:782.
48. Feingold KR. Introduction to Lipids and Lipoproteins. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, et al., editors. Endotext, South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000.
49. Sirohi T, Singh H. Estimation of serum prolactin levels and determination of prevalence of hyperprolactinemia in newly diagnosed cases of subclinical hypothyroidism. *J Family Med Prim Care* 2018;7:1279–82.
50. Albu A, Florea S, Fica S. Is prolactin the missing link in adipose tissue dysfunction of polycystic ovary syndrome patients? *Endocrine* 2016;51:163–73.
51. Chirico V, Cannavò S, Lacquaniti A, Salpietro V, Mandolino M, Romeo PD, et al. Prolactin in obese children: a bridge between inflammation and metabolic-endocrine dysfunction. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2013;79:537–44.
52. Hugo ER, Borcharding DC, Gersin KS, Loftus J, Ben-Jonathan N. Prolactin Release by Adipose Explants, Primary Adipocytes, and LS14 Adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:4006–12.

53. Niknam A, Mahboobifard F, Rahmati M, Firouzi F, Rojhani E, Azizi F, *et al.* The effects of different physiologic concentrations of prolactin in association with reproductive hormones on the incidence of type 2 diabetes mellitus in men: Tehran Lipid and Glucose Study. *BMC Endocr Disord* 2022;22:302.
54. Tuzcu A, Yalaki S, Arikan S, Gokalp D, Bahcec M, Tuzcu S. Evaluation of insulin sensitivity in hyperprolactinemic subjects by euglycemic hyperinsulinemic clamp technique. *Pituitary* 2009;12:330–4.
55. Manshaei N, Shakibaei F, Fazilati M, Salavati H, Negahdary M, Palizban A. An investigation of the association between the level of prolactin in serum and type II diabetes. *Diabetes Metab Syndr* 2019;13:3035–41.
56. Li J, Rice MS, Huang T, Hankinson SE, Clevenger CV, Hu FB, *et al.* Circulating prolactin concentrations and risk of type 2 diabetes in US women. *Diabetologia* 2018;61:2549–60.
57. Huang C, Snider F, Cross JC. Prolactin receptor is required for normal glucose homeostasis and modulation of beta-cell mass during pregnancy. *Endocrinology* 2009;150:1618–26.
58. Grundy SM. Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:629–36.
59. DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am* 2004;88:787–835, ix.
60. Geloneze B, Tambascia MA. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006;50:208–15.
61. Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2019-2020). São Paulo: AC Farmacêutica; 2019. Disponível em: <https://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2020/02/Diretrizes-Sociedade-Brasileira-de-Diabetes-2019-2020.pdf>
62. Son D-H, Lee HS, Lee Y-J, Lee J-H, Han J-H. Comparison of triglyceride-glucose index and HOMA-IR for predicting prevalence and incidence of metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2022;32:596–604.
63. Gayoso-Diz P, Otero-González A, Rodriguez-Alvarez MX, Gude F, García F, De Francisco A, *et al.* Insulin resistance (HOMA-IR) cut-off values and the metabolic syndrome in a general adult population: effect of gender and age: EPIRCE cross-sectional study. *BMC Endocr Disord* 2013;13:47.
64. Geloneze B, Repetto EM, Geloneze SR, Tambascia MA, Ermetice MN. The threshold value for insulin resistance (HOMA-IR) in an admixed population IR in the Brazilian Metabolic Syndrome Study. *Diabetes Res Clin Pract* 2006;72:219–20.

65. Geloneze B, Vasques ACJ, Stabe CFC, Pareja JC, Rosado LEFP de L, Queiroz EC de, *et al.* HOMA1-IR and HOMA2-IR indexes in identifying insulin resistance and metabolic syndrome: Brazilian Metabolic Syndrome Study (BRAMS). *Arq Bras Endocrinol Metab* 2009;53:281–7.
66. Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 2006;23:469–80.
67. Wilson PWF, Grundy SM. The metabolic syndrome: practical guide to origins and treatment: Part I. *Circulation* 2003;108:1422–4.
68. Garber AJ. The metabolic syndrome. *Med Clin North Am* 2004;88:837–46, ix.
69. Paredes S, Fonseca L, Ribeiro L, Ramos H, Oliveira JC, Palma I. Novel and traditional lipid profiles in Metabolic Syndrome reveal a high atherogenicity. *Sci Rep* 2019;9:11792.
70. Lippy RJ. The National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *J Manag Care Pharm* 2003;9:2–5.
71. I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. *Arq Bras Cardiol* 2005;84:3–28.
72. Schober P, Bossers SM, Schwarte LA. Statistical Significance Versus Clinical Importance of Observed Effect Sizes: What Do P Values and Confidence Intervals Really Represent? *Anesth Analg* 2018;126:1068–72.
73. Serdar CC, Cihan M, Yücel D, Serdar MA. Sample size, power and effect size revisited: simplified and practical approaches in pre-clinical, clinical and laboratory studies. *Biochem Med (Zagreb)* 2021;31:010502.
74. Benjamin DJ, Berger JO, Johannesson M, Nosek BA, Wagenmakers EJ, Berk R, *et al.* Redefine statistical significance. *Nat Hum Behav* 2018;2:6–10.
75. Rubanovich AV. Redefining the Critical Value of Significance Level (0.005 instead of 0.05): The Bayes Trace. *Biol Bull Russ Acad Sci* 2019;46:1449–57.
76. Gómez-de-Mariscal E, Guerrero V, Sneider A, Jayatilaka H, Phillip JM, Wirtz D, *et al.* Use of the p-values as a size-dependent function to address practical differences when analyzing large datasets. *Sci Rep* 2021;11:20942.
77. Wasserstein RL, Lazar NA. The ASA Statement on p-Values: Context, Process, and Purpose. *The American Statistician* 2016;70:129–33.
78. Sullivan GM, Feinn R. Using Effect Size—or Why the P Value Is Not Enough. *J Grad Med Educ* 2012;4:279–82.
79. Nuzzo R. Scientific method: Statistical errors. *Nature* 2014;506:150–2.

80. Vidgen B, Yasseri T. P-Values: Misunderstood and Misused. *Frontiers in Physics* 2016;4.
81. Espírito Santo H, Daniel F. Calcular e apresentar tamanhos do efeito em trabalhos científicos (1): as limitações do $P < 0,05$ na análise de diferenças de médias de dois grupos. *Revista Portuguesa de Investigação Comportamental e Social*. 2015; 1(1), 3-16.
82. Vargha A, Delaney HD, Vargha A. A Critique and Improvement of the “CL” Common Language Effect Size Statistics of McGraw and Wong. *Journal of Educational and Behavioral Statistics* 2000;25:101.
83. Mangiafico SS. Summary and Analysis of Extension Program Evaluation in R, versão 1.20.01; 2016. Disponível em: rcompanion.org/handbook/.
84. McGraw KO, Wong SP. A common language effect size statistic. *Psychological Bulletin* 1992;111:361–5.
85. Mastrich Z, Hernandez I. Results everyone can understand: A review of common language effect size indicators to bridge the research-practice gap. *Health Psychol* 2021;40:727–36.
86. Rajkomar A, Dean J, Kohane I. Machine Learning in Medicine. *N Engl J Med* 2019;380:1347–58.
87. Jayatilake SMDAC, Ganegoda GU. Involvement of Machine Learning Tools in Healthcare Decision Making. *Journal of Healthcare Engineering* 2021;2021:e6679512.
88. Ahmed Z, Mohamed K, Zeeshan S, Dong X. Artificial intelligence with multi-functional machine learning platform development for better healthcare and precision medicine. *Database (Oxford)* 2020;2020:baaa010.
89. Hastie T, Tibshirani R, Friedman J. The elements of statistical learning: Data mining, inference, and prediction. New York: Springer Science & Business Media; 2009.
90. Alpaydin E. Introduction to machine learning. 2nd ed. Cambridge, MA: MIT Press; 2010.
91. Bishop CM. Pattern recognition and machine learning. 1st ed. New York: Springer; 2006.
92. Kassambara A. Machine learning essentials. Edition 1. Frankreich: STHDA; 2017.
93. Zheng A. Evaluating machine learning models: a beginner’s guide to key concepts and pitfalls. September 2015, First edition. Sebastopol, Calif.: O’Reilly Media; 2015.

94. Brownlee J. Machine Learning Mastery With R: Get Started, Build Accurate Models and Work Through Projects Step-by-Step. Machine Learning Mastery; 2016.
95. Kuhn M. caret: Classification and Regression Training. R package version 6.0-93, 2022. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=caret>
96. Li J. Assessing the accuracy of predictive models for numerical data: Not r nor r², why not? Then what? PLOS ONE 2017;12:e0183250.
97. Rashidi HH, Tran NK, Betts EV, Howell LP, Green R. Artificial Intelligence and Machine Learning in Pathology: The Present Landscape of Supervised Methods. Acad Pathol 2019;6:2374289519873088.
98. Carobene A, Cabitza F, Bernardini S, Gopalan R, Lennerz JK, Weir C, *et al.* Where is laboratory medicine headed in the next decade? Partnership model for efficient integration and adoption of artificial intelligence into medical laboratories. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM) 2023;61:535–43.
99. Haeckel R, Wosniok W. Observed, unknown distributions of clinical chemical quantities should be considered to be log-normal: a proposal. Clin Chem Lab Med 2010;48:1393–6.
100. Miot HA. Avaliação da normalidade dos dados em estudos clínicos e experimentais. J Vasc Bras 2017;16:88–91.
101. Mishra P, Pandey CM, Singh U, Gupta A, Sahu C, Keshri A. Descriptive Statistics and Normality Tests for Statistical Data. Ann Card Anaesth 2019;22:67–72.
102. Ichihara K, Boyd JC, IFCC Committee on Reference Intervals and Decision Limits (C-RIDL). An appraisal of statistical procedures used in derivation of reference intervals. Clin Chem Lab Med 2010;48:1537–51.
103. Gutkin S. Biostatistics: Issues in study design, analysis, and reporting. In: Gutkin S. Writing High-Quality Medical Publications: A User's Manual. 1st ed. Boca Raton: CRC Press; 2018. p. 121-232.
104. Tomczak M, Tomczak E. The need to report effect size estimates revisited. An overview of some recommended measures of effect size. Trends in Sport Sciences 2014;21.
105. Fritz CO, Morris PE, Richler JJ. Effect size estimates: current use, calculations, and interpretation. J Exp Psychol Gen 2012;141:2–18.
106. Haeckel R, Wosniok W. A new concept to derive permissible limits for analytical imprecision and bias considering diagnostic requirements and technical state-of-the-art. Clin Chem Lab Med 2011;49:623–35.

107. Haeckel R, Wosniok W, Streichert T. Optimizing the use of the “state-of-the-art” performance criteria. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:887–91.
108. Haeckel R, Wosniok W, Gurr E, Peil B. Permissible limits for uncertainty of measurement in laboratory medicine. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:1161–71.
109. Haeckel R, Gurr E, Hoff T, Medicine (DGKL) on behalf of the working group GL of the GS of CC and L. Bias, its minimization or circumvention to simplify internal quality assurance. *LaboratoriumsMedizin* 2016;40:263–70.
110. Haeckel R, Wosniok W, Gurr E. Diagnostic efficiency in models for permissible measurement uncertainty. *LaboratoriumsMedizin* 2017;41:309–15.
111. Ceriotti F, Fernandez-Calle P, Klee GG, Nordin G, Sandberg S, Streichert T, *et al.* Criteria for assigning laboratory measurands to models for analytical performance specifications defined in the 1st EFLM Strategic Conference. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:189–94.
112. Braga F, Panteghini M. Performance specifications for measurement uncertainty of common biochemical measurands according to Milan models. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 2021;59:1362–8.
113. Muggeo VMR. Segmented: an R package to fit regression models with broken-line relationships. *R news* 2008, 8 (1):20-25.
114. Muggeo VMR. Interval estimation for the breakpoint in segmented regression: a smoothed score-based approach. *Aust N Z J Stat* 2017;59:311–22.
115. Muggeo VM, Atkins DC, Gallop RJ, Dimidjian S. Segmented mixed models with random changepoints: a maximum likelihood approach with application to treatment for depression study. *Statistical Modelling* 2014;14:293–313.
116. Muggeo VMR. Testing with a nuisance parameter present only under the alternative: a score-based approach with application to segmented modelling. *Journal of Statistical Computation and Simulation* 2016;86:3059–67.
117. Muggeo VMR. Estimating regression models with unknown break-points. *Statist Med* 2003;22:3055–71.
118. Friedman JH. Multivariate Adaptive Regression Splines. *The Annals of Statistics* 1991;19:1–67.
119. Li DHW, Chen W, Li S, Lou S. Estimation of hourly global solar radiation using Multivariate Adaptive Regression Spline (MARS) – A case study of Hong Kong. *Energy* 2019;186:115857.
120. Huang H, Ji X, Xia F, Huang S, Shang X, Chen H, *et al.* Multivariate adaptive regression splines for estimating riverine constituent concentrations. *Hydrological Processes* 2020;34:1213–27.

121. Mukaka M. A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J* 2012;24:69–71.
122. Akoglu H. User's guide to correlation coefficients. *Turkish Journal of Emergency Medicine* 2018;18:91–3.
123. Estey MP, Cohen AH, Colantonio DA, Chan MK, Marvasti TB, Randell E, *et al.* CLSI-based transference of the CALIPER database of pediatric reference intervals from Abbott to Beckman, Ortho, Roche and Siemens Clinical Chemistry Assays: direct validation using reference samples from the CALIPER cohort. *Clin Biochem* 2013;46:1197–219.
124. Tate JR, Yen T, Jones GRD. Transference and validation of reference intervals. *Clin Chem* 2015;61:1012–5.
125. Knol MJ, Pestman WR, Grobbee DE. The (mis)use of overlap of confidence intervals to assess effect modification. *Eur J Epidemiol* 2011;26:253–4.
126. Goldstein H, Healy MJR. The Graphical Presentation of a Collection of Means. *Journal of the Royal Statistical Society Series A (Statistics in Society)* 1995;158:175–7.
127. Doherty T, Dempster E, Hannon E, Mill J, Poulton R, Corcoran D, *et al.* A comparison of feature selection methodologies and learning algorithms in the development of a DNA methylation-based telomere length estimator. *BMC Bioinformatics* 2023;24:178.
128. Cho J, Seo DM, Uh Y. Clinical Application of Overlapping Confidence Intervals for Monitoring Changes in Serial Clinical Chemistry Test Results. *Ann Lab Med* 2020;40:201–8.
129. Lau CYH, Tov W. Effects of positive reappraisal and self-distancing on the meaningfulness of everyday negative events. *Front Psychol* 2023;14:1093412.
130. Austin PC, Hux JE. A brief note on overlapping confidence intervals. *J Vasc Surg* 2002;36:194–5.
131. Cumming G. Inference by eye: Reading the overlap of independent confidence intervals. *Statist Med* 2009;28:205–20.
132. Cumming G, Calin-Jageman R. Confidence Intervals and Effect Sizes. In: *Introduction to the New Statistics: Estimation, Open Science, and Beyond*. New York: Routledge; 2016. p. 97-127.
133. Kassambara A. rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests. R package version 0.7.2, 2021. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=rstatix>

134. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2022. Disponível em: <https://www.R-project.org/>
135. RStudio Team. RStudio: Integrated Development Environment for R. Boston, MA: RStudio, PBC; 2021. Disponível em: <https://posit.co/>
136. Brasil. Lei nº. 13709, de 14 de agosto de 2018. Lei Geral de Proteção de Dados Pessoais (LGPD). Diário Oficial da União: Seção1, Brasília, DF, n. 157, p. 59, 15 ago 2018. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2018/lei/L13709compilado.htm.
137. Information Commissioner's Office. Anonymisation: managing data protection risk code of practice. Information Commissioner's Office, 2012. Disponível em:
138. Brelje TC, Stout LE, Bhagroo NV, Sorenson RL. Distinctive roles for prolactin and growth hormone in the activation of signal transducer and activator of transcription 5 in pancreatic islets of Langerhans. *Endocrinology*. 2004;145:4162-175.
139. Foss MC, Paula FJ, Paccola GM, Piccinato CE. Peripheral glucose metabolism in human hyperprolactinaemia. *Clin Endocrinol* 1995;43:721-726
140. Martínez de la Escalera G, Macotela Y, Clapp C. A New Experimental Tool Toward Understanding the Regulation of Human Prolactin Secretion and Functions. *Endocrinology* 2022;163:bqac021.
141. Balbach L, Wallaschofski H, Völzke H, Nauck M, Dörr M, Haring R. Serum prolactin concentrations as risk factor of metabolic syndrome or type 2 diabetes? *BMC Endocrine Disorder*. 2013;13:1-8.
142. Serri O, Li L, Mamputu JC, Maingrette F, Renier G. The influences of hyperprolactinemia and obesity on cardiovascular risk markers: effects of cabergoline therapy. *Clin Endocrinol*. 2006;64:366-70
143. Dalmon M, Kamba A, Murakami H, Mizushiri S, Osono S, Yamaichi M, *et al*. Association between sérum levels and insulin resistance in non-diabetic men. *Plos one*. 2017;12(4):e0175204.
144. Clark GO, Kovacs WJ, Foster DW. Glucose, Lipid, and Protein Metabolism. In: Kovacs WJ, Ojeda SR, editors. *Textbook of Endocrine Physiology*. 6th ed. Oxford (UK): Oxford University Press; 2011. p. 411-440.
145. Ricós C, Alvarez V, Cava F, García-Lario JV, Hernández A, Jiménez CV, *et al*. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:491–500.
146. Ricós C, Iglesias N, García-Lario J-V, Simón M, Cava F, Hernández A, *et al*. Within-subject biological variation in disease: collated data and clinical consequences. *Ann Clin Biochem* 2007;44:343–52.

147. Røraas T, Støve B, Petersen PH, Sandberg S. Biological Variation: The Effect of Different Distributions on Estimated Within-Person Variation and Reference Change Values. *Clin Chem* 2016;62:725–36.
148. Chai JH, Ma S, Heng D, Yoong J, Lim W-Y, Toh S-A, *et al.* Impact of analytical and biological variations on classification of diabetes using fasting plasma glucose, oral glucose tolerance test and HbA1c. *Sci Rep* 2017;7:13721.
149. Wu AHB, Wians F, Jaffe A. Biological variation of galectin-3 and soluble ST2 for chronic heart failure: implication on interpretation of test results. *Am Heart J* 2013;165:995–9.
150. Tate J, Ward G. Interferences in immunoassay. *Clin Biochem Rev* 2004;25:105–20.
151. Wanichthanarak K, Jeamsripong S, Pornputtapong N, Khoomrung S. Accounting for biological variation with linear mixed-effects modelling improves the quality of clinical metabolomics data. *Comput Struct Biotechnol J* 2019;17:611–8.
152. Corona G, Wu FC, Rastrelli G, Lee DM, Forti G, O'Connor DB, *et al.* Low prolactin is associated with sexual dysfunction and psychological or metabolic disturbances in middle-aged and elderly men: the European Male Aging Study (EMAS). *J Sex Med* 2014;11:240–53.
153. Wang T, Xu Y, Xu M, Ning G, Lu J, Dai M, *et al.* Circulating Prolactin and Risk of Type 2 Diabetes: A Prospective Study. *Am J Epidemiol* 2016;184:295–301.
154. Zhang P, Ge Z, Wang H, Feng W, Sun X, Chu X, *et al.* Prolactin improves hepatic steatosis via CD36 pathway. *Journal of Hepatology* 2018;68:1247–55.
155. Glinborg D, Altinok M, Mumm H, Buch K, Ravn P, Andersen M. Prolactin is associated with metabolic risk and cortisol in 1007 women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction* 2014;29:1773–9.
156. Wang T, Lu J, Xu Y, Li M, Sun J, Zhang J, *et al.* Circulating prolactin associates with diabetes and impaired glucose regulation: a population-based study. *Diabetes Care* 2013;36:1974–80.

APÊNDICE A – SCRIPT DE ANÁLISE COMPARATIVA E PREDIÇÃO PARA EXAMES DO METABÓLISMO GLICÍDICO E LIPÍDICO EM FUNÇÃO DO PONTO DE INFLEXÃO DA PROLACTINA

O *script* que executa a análise comparativa dos resultados individuais e médios dos exames metabólicos de glicose e lipídios, categorizados de acordo com a nova classificação metabólica, pode ser acessado no GitHub em formato de página HTML. Além disso, este *script* é capaz de identificar o ponto de inflexão da prolactina e fazer previsões sobre os resultados da variável de resposta. O link para acessar o *script* está disponível a seguir:

https://alancdias84.github.io/Mestrado_Mensurando_vs_Prolactina/

Os relatórios em formato HTML, com os resultados das análises gráficas, estatística e preditivas, estão hospedados no GitHub e podem ser acessados através dos links a seguir:

https://alancdias84.github.io/Mestrado_HOMA-IR_vs_Prolactina/

https://alancdias84.github.io/Mestrado_Glicose_vs_Prolactina/

https://alancdias84.github.io/Mestrado_Insulina_vs_Prolactina/

https://alancdias84.github.io/Mestrado_Colesterol_Total_vs_Prolactina/

https://alancdias84.github.io/Mestrado_LDL-c_vs_Prolactina/

https://alancdias84.github.io/Mestrado_HDL-c_vs_Prolactina/

https://alancdias84.github.io/Mestrado_Triglicerides_vs_Prolactina/

APÊNDICE B – SCRIPTS QUE EXECUTAM A ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS DE PROLACTINA ENTRE OS SEXOS E A COMPARAÇÃO ENTRE OS PONTOS DE INFLEXÃO DA PROLACTINA

Existem dois *scripts* distintos disponíveis no GitHub, ambos apresentados em formato de página HTML, que executam análises comparativas relacionadas à prolactina.

O primeiro *script* realiza uma análise comparativa dos resultados individuais de prolactina entre os sexos masculino e feminino. Este pode ser acessado através do seguinte link:

https://alancdias84.github.io/Mestrado_Comparacao_Prolactina_Entre_Sexos/

O segundo *script* executa uma análise comparativa dos pontos de inflexão de prolactina para cada exame do metabolismo glicídico e lipídico. Este pode ser acessado através do seguinte link:

https://alancdias84.github.io/Mestrado_Comparacao_Pontos_Inflexao_Prolactina/