

Leonardo Cordeiro Ferreira dos Santos

Um Modelo Quantitativo de Diagnóstico  
Clínico para a Síndrome de Prader-Willi

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

Rio de Janeiro  
Março de 2015



Leonardo Cordeiro Ferreira dos Santos

**Um Modelo Quantitativo de Diagnóstico  
Clínico para a Síndrome de Prader-Willi**

**Dissertação de Mestrado**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular do Departamento de Genética e Biologia Molecular da UNIRIO

Orientadora: Prof. Carmen Lúcia Antão Paiva

Rio de Janeiro  
Março de 2015



**Leonardo Cordeiro Ferreira dos Santos**

**Um Modelo Quantitativo de Diagnóstico  
Clínico para a Síndrome de Prader-Willi**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular do Departamento de Genética e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UNIRIO. Aprovada pela comissão examinadora abaixo assinada.

**Prof. Carmen Lúcia Antão Paiva**

Orientadora

Departamento de Genética e Biologia Molecular — UNIRIO

**Prof. Pedro Hernan Cabello Acero**

UNIRIO

**Prof. Fernando Regla Vargas**

FIOCRUZ

**Prof. Cláudia Alessandra Fortes Aiub**

UNIRIO

Rio de Janeiro, 2 de Março de 2015

Todos os direitos reservados. Proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, do autor e da orientadora.

### **Leonardo Cordeiro Ferreira dos Santos**

Estudou Engenharia Eletrônica no Instituto Militar de Engenharia, IME (Rio de Janeiro) e se graduou em Administração na Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ. Mestre em Matemática pelo Instituto de Matemática Pura e Aplicada, IMPA (Rio de Janeiro), Mestre em Administração pelo Instituto COPPEAD de Administração da Universidade Federal do Rio de Janeiro e *Master of Research* pela *University of London*.

#### Ficha Catalográfica

Ferreira dos Santos, Leonardo Cordeiro

Um Modelo Quantitativo de Diagnóstico Clínico para a Síndrome de Prader-Willi / Leonardo Cordeiro Ferreira dos Santos; orientadora: Carmen Lúcia Antão Paiva. — Rio de Janeiro : UNIRIO, Departamento de Genética e Biologia Molecular, 2015.

v., 91 f: il. ; 29,7 cm

1. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Genética e Biologia Molecular.

Inclui referências bibliográficas.

1. Genética e Biologia Molecular – Tese. 2. Síndrome de Prader-Willi. 3. Genética Clínica. 4. Modelos de Diagnóstico Clínico. I. Paiva, Carmen Lúcia Antão. II. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. Departamento de Genética e Biologia Molecular. III. Título.

CDD: 576

À Deborah, Caroline e Julia.

## Agradecimentos

O primeiro passo de toda nova jornada é sempre o mais difícil de ser dado, especialmente quando se caminha em terras “nunca dantes navegadas”. A família, como sempre, é o pilar que nos sustenta, o vento que nos propela e o braço que nos protege. Esse trabalho não teria sido possível sem o apoio incondicional da minha família.

À minha orientadora, professora Carmen Lúcia Antão Paiva, do Departamento de Genética e Biologia Molecular da UNIRIO, agradeço com veemência por ter aceitado me orientar e por toda a paciência e amizade. Foram anos tumultuados mas que, esperamos, rendam tenros frutos científicos.

À professora Cristiane Rocha, do Departamento de Biofísica da UNIRIO, pela instigação e incentivos iniciais que foram fundamentais para o meu ingresso no Programa.

Às professoras Cláudia Aiub e Ana Teresa Nogueira Dumans e ao professor Fernando Regla Vargas, do Departamento de Genética e Biologia Molecular da UNIRIO, pelo apoio e simpatia recebidos nos últimos anos.

Aos pacientes e respectivos guardiões, pela compreensão e consentimento em participar deste singelo estudo.

Ao contribuinte brasileiro que, por intermédio da CAPES e de outras agências de fomento, ajudou a financiar este estudo.



*Far better it is to dare mighty things, to win glorious triumphs, even though checkered by failure, than to take rank with those poor spirits who neither enjoy much nor suffer much, because they live in the gray twilight that knows not victory nor defeat.*

Theodore Roosevelt, "The Strenuous Life", 1899.

## Resumo

Ferreira dos Santos, Leonardo Cordeiro; Paiva, Carmen Lúcia Antão. **Um Modelo Quantitativo de Diagnóstico Clínico para a Síndrome de Prader-Willi**. Rio de Janeiro, 2015. 91p. Dissertação de Mestrado — Departamento de Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

A Síndrome de Prader-Willi (SPW) é uma doença genética rara que afeta o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e que apresenta, tipicamente, hipotonia neonatal, obesidade, hipogonadismo e baixa estatura, dentre outros sinais e sintomas. A síndrome é causada pela ausência de expressão gênica na região 15q11–q13 de origem paterna e o diagnóstico definitivo é obtido por meio de testes de biologia molecular, cuja realização no Brasil, no entanto, é limitada pela diminuta oferta de serviços de diagnóstico molecular e pela dificuldade de se identificar o fenótipo de SPW clinicamente. Apesar de existirem na literatura critérios clínicos de diagnóstico da SPW, esses foram desenvolvidos por meio de consensos de especialistas e apresentam desempenho preditivo insatisfatório. Não há critérios clínicos de diagnóstico para a SPW desenvolvidos por emprego de técnicas quantitativas. Este estudo preenche essa lacuna ao desenvolver um critério clínico de diagnóstico da SPW por meio da otimização da AUC da curva ROC em uma amostra de 70 participantes. O modelo proposto apresentou sensibilidade de 87% e especificidade de 93%, desempenho estatisticamente superior aos critérios atuais, e pode ser utilizado facilmente por médicos generalistas. No modelo proposto, seis variáveis clínicas – hipotonia, problemas de alimentação (má sucção), hipogonadismo hipotalâmico, atraso global no desenvolvimento, problemas de comportamento e fácies típica – totalizaram mais de 77.5% do total de pontos do critério clínico, indicando a sua importância para a suspeição do diagnóstico de SPW.

## Palavras-chave

Síndrome de Prader-Willi ; Genética Clínica ; Modelos de Diagnóstico Clínico.

## Abstract

Ferreira dos Santos, Leonardo Cordeiro; Paiva, Carmen Lúcia Antão (advisor). **A Quantitative Clinical Diagnostic Model for the Prader-Willi Syndrome**. Rio de Janeiro, 2015. 91p. Dissertação de Mestrado — Departamento de Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

The Prader-Willi Syndrome (PWS) is a rare genetic disorder that affects the hypothalamic–pituitary–gonadal axis and that presents typically with neonatal hypotonia, obesity, hypothalamic hypogonadism, small stature, among other signs and symptoms. The syndrome results from the lack of paternal expression of the 15q11–q13 region and the definitive diagnosis is made by molecular testing, though the execution of which, in Brazil, is hampered by the scarce supply of genetic and molecular diagnostic services and by the difficulty in identifying the PWS phenotype clinically. Even though clinical criteria for SPW have been proposed in the literature, they were based on consensus of specialists and perform unsatisfactorily in prediction tasks. There are no clinical criteria for SPW developed by the use of quantitative techniques. This study bridges this gap by developing clinical diagnostic criteria for SPW by optimizing the AUC of the ROC curve of a linear combination of multiple clinical variables in a sample of 70 participants. The proposed model displayed sensitivity of 87% and specificity of 93% and superior predictive performance when compared to the current alternatives, and can be easily employed at the bedside by generalist physicians. In the quantitative model, six clinical variables – hypotonia, poor sucking, hypogonadism, global developmental delay, behavioral problems and typical facies – made up for more than 77.5% of the total points used in the clinical model, highlighting their importance to the clinical suspicion of PWS.

## Keywords

Prader-Willi Syndrome ; Medical Genetics ; Clinical Diagnostic Models.

## Lista de Figuras

2.1	Ideograma do cromossomo 15	25
2.2	Algoritmo do diagnóstico molecular da SPW	31
2.3	Curva ROC de um radar hipotético	40
2.4	Exemplos de curvas ROC	41
3.1	Ilustração esquemática do teste de PCR-metilação específica	45
4.1	Curva ROC do critério de Holm	52
4.2	Curva ROC da solução DS	53
4.3	Curva ROC da solução GA	54
4.4	Curva ROC da solução SA	55
4.5	Curva ROC da solução PSO	56
4.6	Comparação solução PSO e Holm	57
4.7	Histogramas das diferenças da AUC	58
4.8	ROCCH do modelo proposto e do critério de Holm	59
5.1	Curva ROC da solução PSO	65
A.1	Termo de compromisso livre e esclarecido	84
B.1	Ficha com os dados dos participantes do estudo	85
D.1	Comparação solução DS e Holm	90
D.2	Comparação solução GA e Holm	91
D.3	Comparação solução SA e Holm	91

## Lista de Tabelas

2.1	Fases nutricionais da SPW – Miller <i>et al.</i> [34]	18
2.2	Critério de diagnóstico clínico de Holm <i>et al.</i>	29
2.3	Critério de diagnóstico clínico de Gunay-Aygun <i>et al.</i>	30
2.4	Exemplo de um sistema classificador binário	36
2.5	Resultados de um sistema classificador hipotético	37
2.6	Medidas de desempenho	37
2.7	Exemplo clínico de uma matriz $2 \times 2$	38
2.8	Capacidade de detecção de um radar hipotético	39
3.1	Seqüência dos <i>primers</i>	46
4.1	Descrição da amostra	50
4.2	Desempenho dos critérios de Holm e Gunay	51
4.3	Resultados da otimização	53
4.4	Resultados da simulação por <i>bootstrap</i>	57
4.5	Testes de hipótese dos experimentos de <i>bootstrap</i>	58
4.6	Modelo proposto de diagnóstico clínico de SPW	60
5.1	Comparação de sensibilidades	62
5.2	Resultados da otimização normalizados	64
5.3	Modelo proposto de diagnóstico clínico da SPW	67
C.1	Valores dos parâmetros utilizados no algoritmo DS	86
C.2	Valores dos parâmetros utilizados no algoritmo GA	87
C.3	Valores dos parâmetros utilizados no algoritmo PSO	88
C.4	Valores dos parâmetros utilizados no algoritmo SA	89

## Lista de Abreviaturas

ATP10A	<i>ATPase class V type 10A</i>
AUC	<i>Area under the curve</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
C15orf2	<i>Chromosome 15 open reading frame 2</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CGH	<i>Comparative genomic hybridization</i>
CI	<i>Centro de imprinting</i>
CPAP	<i>Continuous positive airway pressure</i>
CpG	<i>Citosina-Fosfato-Guanina</i>
CYFIP1	<i>Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1</i>
DMII	<i>Diabetes mellitus type II</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DS	<i>Direct search</i>
DTT	<i>Ditiotreitol</i>
DUPm	<i>Dissomia uniparental materna</i>
EDTA	<i>Ácido etilenodiamino tetra-acético</i>
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i>
fMRI	<i>Functional magnetic resonance imaging</i>
FN	<i>False negative</i>
FP	<i>False positive</i>
GA	<i>Genetic algorithm</i>
GABA	<i>Ácido gama-aminobutírico</i>
GABRB	<i>Gamma-aminobutyric acid receptor, Beta</i>
GH	<i>Growth hormone</i>
GHRH	<i>Growth hormone releasing hormone</i>
GTP	<i>Guanosina trifosfato</i>
HBII	<i>Homo sapiens C/D box snoRNA</i>
HCRT	<i>Hypocretin (orexin) neuropeptide precursor</i>
HERC2	<i>HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IMC	<i>Índice de massa corporal</i>
LH	<i>Luteinizing hormone</i>
MAGEL2	<i>MAGE-like 2</i>
MC2R	<i>Melanocortin 2 receptor</i>
MECP2	<i>Methyl CpG binding protein 2</i>
MKRN3	<i>Makorin ring-finger protein 3</i>
mUPD	<i>Maternal uniparental disomy</i>
NDN	<i>Necdin</i>
NIPA1	<i>Non-imprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome region protein 1</i>
NIPA2	<i>Non-imprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome region protein 2</i>
OCA2	<i>Oculocutaneous albinism II</i>
OXTR	<i>Oxytocin receptor</i>
pb	<i>Pares de base</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
POMC	<i>Pro-opiomelanocortin</i>
PSO	<i>Particle swarm optimization</i>
PWS	<i>Prader-Willi Syndrome</i>

## Lista de Abreviaturas (cont.)

RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
ROCCH	<i>Receiver operating characteristic convex hull</i>
SA	<i>Simulated annealing</i>
SmN	<i>Survival of motor neuron protein</i>
snoRNA	<i>Small nucleolar RNA</i>
SNRPN	<i>Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N</i>
SNURF	<i>SNRPN upstream reading frame</i>
SPW	Síndrome de Prader-Willi
SSRI	<i>Selective serotonin reuptake inhibitor</i>
TN	<i>True negative</i>
TP	<i>True positive</i>
TUBGCP5	<i>Gamma-tubulin complex component 5 protein</i>
UBE3A	<i>Ubiquitin-protein ligase E3A</i>
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivos

## Sumário

1	Introdução	<b>14</b>
1.1	Objetivo	15
1.2	Organização	15
2	Revisão da Literatura	<b>16</b>
2.1	Síndrome de Prader-Willi	16
2.2	Análise de Curvas ROC	36
3	Metodologia	<b>43</b>
3.1	Desenho do Estudo	43
3.2	Pacientes e Voluntários	43
3.3	Material e Métodos	44
3.4	Desenvolvimento do Modelo de Diagnóstico Clínico	47
4	Resultados	<b>50</b>
4.1	Descrição da Amostra	50
4.2	Otimização da AUC	52
4.3	Avaliação do Modelo de Diagnóstico Clínico	56
4.4	Modelo de Diagnóstico Clínico para a SPW	59
5	Discussão	<b>61</b>
5.1	Análise da Amostra	61
5.2	Avaliação dos Critérios de Holm e Gunay	62
5.3	Otimização da AUC	63
5.4	Modelos Quantitativos de Diagnóstico Clínico	65
5.5	Proposta de um Modelo de Diagnóstico Clínico para a SPW	67
5.6	Limitações do Estudo	67
6	Conclusão	<b>69</b>
	Referências Bibliográficas	<b>70</b>
A	Modelo do TCLE	<b>83</b>
B	Modelo da Ficha do Paciente	<b>85</b>
C	Parâmetros das Rotinas de Otimização	<b>86</b>
D	Comparações Adicionais	<b>90</b>

# 1

## Introdução

Cunhado há aproximadamente 20 anos, o termo “medicina baseada em evidências” preconiza a combinação da habilidade clínica individual do médico com as mais recentes evidências científicas externas disponíveis [1]. O desenvolvimento de testes e modelos de diagnóstico precisos é parte fundamental dessa empreitada [2].

Com efeito, modelos de diagnóstico clínico são rotineiramente ensinados e aplicados na prática médica para auxiliar no diagnóstico de inúmeras doenças como, por exemplo, febre reumática [3], endocardite infecciosa [4], tromboembolismo pulmonar [5], tromboembolismo venoso profundo [6], artrite reumatóide [7], além de servir como fatores determinantes para decidir a ordem em que pacientes receberão transplantes de fígado [8–10].

Apesar de avanços recentes no desenvolvimento de processos eficientes de diagnóstico de doenças genéticas raras [11] e na utilização de programas de diagnóstico molecular em larga escala [12] em alguns países, essas tecnologias ainda demorarão a ser implementadas satisfatoriamente na prática médica [13]. Modelos de diagnóstico clínico podem ser alternativas custo e tempo-eficientes para suprir essa demanda.

A Síndrome de Prader-Willi (SPW) é uma doença genética rara, com apresentações típicas de obesidade, hipotonia neonatal, hipogonadismo e hipopigmentação, dentre outras, sendo as duas primeiras as características mais marcantes na progressão natural da doença [14].

A síndrome é causada pela ausência de expressão gênica na região 15q11–q13 de origem paterna e o diagnóstico definitivo é obtido por meio de análise citogenética e/ou molecular. O diagnóstico molecular da SPW envolve procedimentos relativamente simples, mas a realização dos exames moleculares no Brasil pode ser dificultada por, pelo menos, dois fatores.

Em primeiro lugar, o aumento significativo do número de distúrbios genéticos conhecidos praticamente impossibilita a escolha precisa da região do genoma a ser estudada quando não há indicações clínicas claras [15]. Essa

limitação é exacerbada pelo fato de que muitas características fenotípicas são comuns a diversos distúrbios genéticos diferentes [16]. Em segundo lugar, a oferta de serviços de diagnóstico genético no Brasil ainda está muito aquém da demanda. Os centros de análise genética concentram-se, primariamente, na região Sul-Sudeste e são escassos no Nordeste do país. Ademais, não há registros de clínicas ou laboratórios voltados para diagnóstico genético nos estados do AM, AP, RO, RR e TO [17].

Conclui-se, por conseguinte, que a definição de critérios clínicos precisos podem desempenhar papel fundamental na escolha do exame genético mais apropriado, o que também agiliza a movimentação de amostras na deficiente rede de diagnóstico genético brasileira.

Corroborando o estudo de Whittington *et al.* [18], que concluiu que os critérios clínicos de diagnóstico da SPW propostos por Holm *et al.* [19] e Gunay-Aygun *et al.* [20] não produzem previsões satisfatórias para a indicação da realização, ou não, do diagnóstico genético, resultados anteriores obtidos em amostra brasileira apontam que pacientes suspeitos de SPW por esses critérios têm a síndrome confirmada por diagnóstico molecular em pouco menos de 30% dos casos [21]. Justifica-se, assim, a realização de estudos mais detalhados sobre a aplicabilidade dos critérios atuais e a elaboração de critérios alternativos adaptados à realidade brasileira.

## 1.1

### Objetivo

Os objetivos deste trabalho são: (1) analisar criticamente a eficácia dos critérios de Holm *et al.* [19] e Gunay-Aygun *et al.* [20] na indicação clínica para investigação molecular da Síndrome de Prader-Willi e (2) investigar, desenvolver e propor um modelo de diagnóstico clínico alternativo que apresente maior sensibilidade e especificidade na amostra brasileira.

## 1.2

### Organização

Este trabalho contém seis capítulos. O capítulo 2 apresenta uma revisão bibliográfica sobre os aspectos clínicos e genéticos da SPW e sobre técnicas de desenvolvimento de modelos de diagnóstico clínico, com destaque para as metodologias que utilizem a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*). A metodologia de pesquisa é assunto do capítulo 3. Os resultados encontrados são apresentados no capítulo 4 e discutidos no capítulo 5. O capítulo 6 conclui o trabalho.

## 2

## Revisão da Literatura

### 2.1

#### Síndrome de Prader-Willi

##### 2.1.1

##### Relato Inicial de Prader, Labhart e Willi

A Síndrome de Prader-Willi (SPW) foi descrita formalmente pelos médicos suíços Andrea Prader, Alexis Labhart e Heinrich Willi em 1956 [22]. Em apenas sete parágrafos, Prader, Labhart e Willi sintetizaram os principais sinais e sintomas da doença e apontaram as implicações patofisiológicas da síndrome com precisão e abrangência. A descrição inicial da doença foi tão bem-sucedida que por cerca de 30 anos poucos detalhes significativos foram adicionados a ela [23, Apêndice A].

No artigo seminal de Prader, Labhart e Willi, a síndrome foi caracterizada pela apresentação clássica de baixa estatura, acromicria, obesidade, oligofrenia e hipotonia neonatal extrema em todos os nove pacientes da amostra. Os autores também relataram criptorquidismo nos cinco pacientes do sexo masculino.

A hipotonia neonatal extrema foi associada aos problemas de alimentação na infância tipicamente observados nos portadores da síndrome e que são causados, principalmente, pela má-sucção, letargia e adinamia dos neonatos. Os marcos de desenvolvimento infantil – levantar a cabeça, sentar sem apoio, andar – foram observados com atraso significativo em comparação com as crianças normais e também foram relacionados com a hipotonia, que melhora com o passar dos meses. A hiporreflexia neonatal também se normaliza com o início da infância, assim como os problemas de alimentação, que dão lugar ao quadro de obesidade a partir dos dois anos de idade. Um paciente de 17 anos – o mais velho da amostra – já havia desenvolvido *diabetes mellitus* do tipo II (DMII). Esta evolução foi confirmada em estudos posteriores e, hoje, a incidência de DMII é considerada uma das comorbidades mais graves da SPW [24].

Ainda, baseando-se em análises de raspados vaginais das pacientes do sexo feminino, Prader, Labhart e Willi foram capazes de hipotetizar corretamente, sabe-se hoje, que se tratava de um problema de disfunção hipotalâmica e não gonadal. Os autores também especularam, acertadamente, que não se tratava de doença de etiologia primariamente hereditária, *i.e.*, de herança Mendeliana.

Finalmente, os autores concluem o artigo apresentando alguns possíveis diagnósticos diferenciais para a SPW tanto para a fase neonatal (amiotonia congênita de Oppenheim<sup>1</sup>), quanto para a infância e adolescência (Síndrome de Fröhlich, Síndrome de Laurence-Moon-Biedl-Bardet e deficiência do hormônio do crescimento).

### 2.1.2

#### Visão Clínica Atual da Síndrome de Prader-Willi

##### Epidemiologia

Dados epidemiológicos sobre a SPW são escassos e, de certa forma, pouco confiáveis, uma vez que a maioria dos levantamentos utilizou critérios clínicos para estabelecer o diagnóstico, sem a realização de testes moleculares definitivos. Estimativas da prevalência da SPW na população oscilam entre 1:52000 a 1:10000, enquanto que as poucas estimativas de incidência em recém-natos variam entre 1:29000 e 1:16000 [24–29]. Não há estudos sobre a prevalência da SPW no Brasil.

Acredita-se que não haja diferenças de incidência entre gêneros, apesar da incidência observada empiricamente tender para uma predominância da SPW no sexo masculino. Tal fato não é considerado significativo clinicamente por alguns autores, uma vez que, em todas as idades, a suspeição clínica da SPW em pacientes do sexo masculino é mais provável, devido a maior facilidade de se identificar alguns sinais típicos da SPW em meninos, *e.g.*, hipogonadismo na infância e baixa estatura com obesidade na fase adulta [23, 28].

A grande maioria dos relatos da SPW apresenta apenas pacientes brancos. A escassez de relatos de pacientes pertencentes a outros grupos étnicos fez com que se questionasse se haveria diferenças na incidência em grupos étnicos distintos ou se a síndrome seria sub-diagnosticada em determinados grupos,

<sup>1</sup>Atualmente essa doença não é reconhecida no OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*), uma base de dados *online* de doenças genéticas. O epônimo, portanto, tornou-se obsoleto.

como os negros [30]. Atualmente, no entanto, acredita-se que a incidência da SPW seja semelhante em todas as etnias [14].

### História Natural

A descrição inicial de Prader, Labhart e Willi caracterizou a SPW como um quadro inicial de hipotonia neonatal severa, seguido por uma síndrome marcada por obesidade, baixa estatura, criptorquidismo e retardamento mental. À medida em que os relatos clínicos se acumularam, outros sinais e sintomas foram adicionados ao fenótipo global da SPW, destacando-se os distúrbios psiquiátricos e de comportamento, distúrbios do sono, anormalidades na regulação termostática e na percepção da dor [14, 18, 31, 32].

Historicamente, a SPW tem sido descrita como uma doença caracterizada por uma história natural com dois estágios fenotípicos distintos, o primeiro correspondente aos 12 primeiros meses de vida, aproximadamente, e o segundo a partir do segundo ano de vida [33]. Essa divisão era feita, principalmente, devido à aparente mudança repentina na fase nutricional dos pacientes com SPW, que passavam de uma fase marcada por problemas graves de alimentação à uma fase posterior pontuada por hiperfagia com obesidade. Um estudo longitudinal recente, no entanto, aventou a possibilidade de que a evolução dos sinais e sintomas da SPW possa ser mais gradual e complexa do que se imaginara. Miller *et al.* [34] identificaram um total de sete fases nutricionais, apresentadas na tabela 2.1.

Tabela 2.1: Fases nutricionais da SPW – Miller *et al.* [34]

Fase	Idades	Características clínicas
0	Pré-natal	Movimentos fetais reduzidos e pesos ao nascer menores
1a	0 – 9 meses	Hipotonia com dificuldade de alimentação e apetite diminuído
1b	9 – 25 meses	Melhora do apetite e alimentação com crescimento normalizado
2a	2 – 4.5 anos	Ganho de peso sem aumento de apetite ou de ingestão calórica
2b	4.5 – 8 anos	Aumento do apetite e ingestão calórica com saciedade
3	8 anos à fase adulta	Hiperfagia, sem saciedade
4	Fase adulta	Apetite deixa de ser insaciável

Na fase 0, intrauterina, os movimentos fetais são reduzidos e o peso ao nascer é relativamente baixo mas dentro da faixa de normalidade, assim como o comprimento e o IMC [23, Capítulo 5]. Os recém-nascidos com

SPW geralmente nascem a termo, ou com poucas semanas de diferença, e não costumam haver complicações durante o parto [35], com exceção da realização de partos cesarianos em decorrência da apresentação inadequada do nascituro [36]. Recentemente, foram encontradas evidências de restrição de crescimento intrauterino na maioria dos portadores de SPW em uma amostra de 160 pacientes [29]. O hipogonadismo pode ser observado após o parto, especialmente nos recém-natos do sexo masculino com criptorquidismo. O reconhecimento do hipogonadismo nas meninas tende a ocorrer durante a adolescência.

A fase 1 é subdividida em duas subfases. O recém-nascido apresenta hipotonia central severa e ausência de obesidade em toda a fase 1. Na subfase 1a, que se inicia no nascimento e segue até os nove meses de idade (mediana), os recém-natos sofrem graves problemas de alimentação, principalmente em função da má-sucção e do apetite diminuído. Os bebês também apresentam arreflexia, com os reflexos de Moro e de retirada geralmente abolidos, sonolência e letargia [14, 35, 37]. Os problemas de alimentação resultam dificuldade de ganho de peso, o que requer, em muitos casos, alimentação por gavagem e utilização de bicos de mamadeira especiais durante meses. Durante o segundo ano de vida, período que corresponde à subfase 1b, o lactente ganha peso normalmente.

A fase 1 também é marcada pela apresentação dos primeiros sinais e sintomas relacionados ao atraso global do desenvolvimento típico da SPW. Não é incomum as crianças com SPW demorarem mais do que dois anos para andar; alguns andam com quatro anos. Os problemas no desenvolvimento da fala são ainda mais graves. Os infantes com SPW apresentam vocabulário limitado e defeitos significativos na articulação das palavras [32].

A partir do terceiro ano de vida, aproximadamente, o ganho de peso se acelera, uma característica global da fase 2, primeiramente sem mudanças no apetite ou na ingestão calórica (subfase 2a), corroborando os resultados apresentados em [33], que sugeriram que a obesidade pode surgir antes do aumento de interesse por comida e que outros mecanismos patofisiológicos que não sejam relacionados com o controle do apetite pode ser importantes na evolução dos sintomas da SPW. Posteriormente, na subfase 2b, o ganho de peso acelerado é acompanhado de um aumento no apetite e no interesse por comida. É nessa subfase que se nota os primeiros indícios de retardamento mental, que se manifesta como dificuldades de aprendizado no momento em que as crianças com SPW atingem a idade escolar. Da mesma forma, também é nessa fase que se começa a identificar os traços dismórficos comuns na SPW: diâmetro

bifrontal estreito, lábio superior afinado, acromicria e hipopigmentação [38–40].

A hiperfagia é a marca fundamental da fase 3, acompanhada pela manifestação de comportamentos obsessivos na busca por comida e pela insaciedade. Tipicamente, a qualidade da alimentação é secundária à quantidade ingerida e não são raros os relatos de adolescentes se alimentando com rações de animais, objetos não-comestíveis, *e.g.*, pedras, e restos de lixo [14, 31, 35]. A prática de pequenos delitos para a obtenção de comida também é observada. A obesidade na SPW é central em ambos os gêneros e com teor de gordura visceral relativamente menor do que o observado em indivíduos saudáveis.

O hipogonadismo e hipoplasia genital são mais facilmente identificados na fase 3, e são acompanhados por desenvolvimento incompleto das características sexuais primárias e secundárias. Nos meninos, os achados de pênis pequeno, bolsa escrotal hipoplásica e criptorquidismo bilateral são frequentes, enquanto que nas meninas é comum observar hipoplasia dos lábios menores e clitóris, amenorréia ou oligorréia [41]. Infertilidade é a norma em ambos os gêneros, apesar de haver raros relatos de pacientes com SPW do sexo feminino que engravidaram [42, 43]. Não há relatos de fertilidade de pacientes do sexo masculino.

Como o hipogonadismo, a baixa estatura também é comumente observada e considerada clinicamente relevante na fase 3. A deficiência de hormônio do crescimento fez parte da primeira descrição da SPW e desde o relato inicial de Prader, Labhart e Willi sabe-se que a origem dessa anormalidade é hipotalâmica.

Também é na fase 3 que os pacientes com SPW começam a apresentar problemas sérios de comportamento e de personalidade. Comportamentos indicativos de transtorno obsessivo-compulsivo não são raros, com incidência e gravidade comparáveis aos dos pacientes sabidamente sofrendores desse distúrbio psiquiátrico. Sintomas típicos incluem uma preocupação demasiada com ordem, arrumação e simetria, além da compulsão por comida [44].

A fase adulta está incluída tanto na fase 3 quanto na fase 4. Alguns adultos progridem para a fase 4, na qual não mais manifestam um apetite descontrolado associado à incapacidade de se sentir saciado.

Sinnema *et al.* [45] realizaram um dos poucos estudos que analisou um grupo de pacientes com SPW com idade acima dos 50 anos. Dentre as resultados encontrados, os autores identificaram as principais queixas de saúde desses pacientes – doenças cardiovasculares, *diabetes mellitus*, problemas dermatológicos e ortopédicos – e observaram que, em relação ao grupo de controle (adultos

com SPW com idade entre 18 e 49 anos), o nível de dependência de terceiros para a realização de atividades corriqueiras é significativamente maior. Os autores concluem que o declínio funcional do grupo com idade acima de 50 anos sugere que os pacientes com SPW sofram de envelhecimento precoce.

### Fisiopatologia

Os mecanismos fisiopatológicos da SPW ainda não estão totalmente esclarecidos. Enquanto a baixa estatura e o hipogonadismo podem ser atribuídos diretamente à insuficiência hipotalâmica, cuja origem é desconhecida, ainda não se conhece os mecanismos que resultam os demais sinais e sintomas clássicos da síndrome, como a hipotonia neonatal severa, de origem central, a hiperfagia descontrolada e o retardamento mental [14, 31, 32, 41].

A primeira substância suspeita de exercer papel determinante no desenvolvimento do quadro de hiperfagia extrema apresentado pelos pacientes com SPW foi a grelina, um hormônio peptídico produzido principalmente no estômago [46]. Descoberta em 1999, a grelina foi informalmente denominada o “hormônio da fome” e formalmente descrita como um secretagogo do hormônio do crescimento com propriedades orexigênicas, *i.e.*, que estimulam o apetite. Surpreendentemente, o mecanismo regulador da secreção de GH pela grelina independe de mecanismo hipotalâmico, que ocorre por meio do hormônio GHRH [47].

Após a descoberta da grelina, especulou-se que esse hormônio pudesse estar relacionado com a hiperfagia na SPW, uma vez que alguns estudos descobriram que a concentração dela em pacientes com SPW é significativamente elevada quando comparada a controles normais e a controles obesos, tanto em adultos (aumento de três a cinco vezes) [46, 48] quanto em crianças (aumento de três a quatro vezes) [49]. Intervenções que diminuíssem a concentração plasmática da grelina chegaram a ser sugeridas, dentre elas a realização de cirurgias bariátricas [46].

Recentemente, todavia, descobriu-se que os níveis plasmáticos da grelina em pacientes com SPW estão mais relacionados com a fase nutricional em que eles se encontram do que com quaisquer outros fatores e que os níveis de grelina em crianças com SPW apresentam-se elevados muito antes do aparecimento da hiperfagia, particularmente na fase de má-alimentação (fase 1a) [50].

Assim, atualmente, a hipótese metabólica para a hiperfagia na SPW perdeu força e não há associações consistentes entre anormalidades metabólicas e a hiperfagia na SPW [41, 50].

Entretanto, avanços significativos foram dados na busca por uma causa neurológica para a hiperfagia na SPW. Apesar de portadores da SPW não apresentarem anormalidades anatopatológicas no cérebro e medula espinhal [35], resultados recentes obtidos por meio de exames de ressonância magnética funcional (fMRI) evidenciam que indivíduos com SPW apresentam diferentes padrões de atividade cerebral em resposta à estímulos alimentícios quando comparados com grupos de controle. O grupo de portadores de SPW exibiu aumentos significativos na resposta à estímulos alimentícios visuais pós-prandiais em diversas regiões límbicas e paralímbicas, diretamente associadas à saciedade e ao sistema de recompensa dopaminérgico [51, 52]. Ademais, pacientes com SPW apresentaram hipoativação pós-prandial de regiões de controle inibitório – córtex pré-frontal dorsolateral e córtex órbito-frontal [53].

Essas evidências corroboram resultados experimentais anteriores que indicaram que a estimulação ou destruição de certos centros hipotalâmicos de animais podem produzir hipotonia, hiperfagia, obesidade, hipogonadismo, distúrbios de crescimento e hipotermia [35] e de evidências recentes de que o hipotálamo exerce papel importante na regulação da homeostase energética e na regulação da fome [54]. Tais diferenças nos circuitos neuronais dos pacientes com SPW talvez sejam explicadas por evidências de que certas regiões do cérebro desses pacientes apresentam anormalidades de desenvolvimento [55]. Apesar de as amostras terem sido pequenas nesses estudos de fMRI, esses resultados sugerem a existência de uma desregulação nos circuitos neuronais responsáveis pelo controle da fome e saciedade em pacientes com SPW, possivelmente uma consequência de defeitos no desenvolvimento cerebral.

### Complicações

As principais complicações da SPW são aquelas relacionadas à obesidade. A síndrome obesidade-hipoventilação alveolar foi apontada como possível complicação da SPW [35]. Cerca de 25% dos pacientes sofrem de *diabetes mellitus* do tipo II (DMII), com idade média de apresentação igual a 20 anos. Suspeita-se que a hipotonia esteja relacionada com uma história de infecções respiratórias recorrentes e escoliose severa em 50% e 15% dos casos na infância, respectivamente. Relata-se ainda uma alta incidência de fraturas (29%), ulcerações nos membros inferiores (22% em adultos) e distúrbios do sono (20%) [24].

Estima-se que a taxa de mortalidade dos portadores de SPW seja de cerca de 3% por ano em todas as idades e de 7% por ano após os 30 anos de

idade [28]. As causas de morte aparentam ser distintas em diferentes faixas etárias.

A hipotonia severa com hipoventilação é causa de morte comum em lactentes e doenças respiratórias agudas com morte súbita afetam particularmente crianças pequenas. Gastroenterite também foi relatada como causa de morte nessa faixa etária [56].

Relatos iniciais indicavam que a causa de morte mais comum em adultos com SPW era o *cor pulmonale*, provavelmente em decorrência da obesidade mórbida dos pacientes [57]. Complicações vasculares da DMII foram a causa de óbito de um paciente aos 28 anos [35]. Da mesma forma, outras complicações relacionadas à obesidade são causas frequentes de morte em adultos. Há relatos de óbito por distensão gástrica e choque e outros eventos cardiovasculares [56].

### Diagnóstico Diferencial

O diagnóstico diferencial da SPW é complexo por dois motivos principais. Primeiramente, os sinais e sintomas da SPW são pouco específicos, sendo compartilhados por diversas doenças, muitas delas genéticas e raras. Em segundo lugar, a história natural da doença exige um atento acompanhamento clínico do paciente com o objetivo de se excluir doenças à medida que o fenótipo da SPW se revele [14]. O diagnóstico diferencial da SPW é, portanto, extenso e abrange doenças de etiologias diversas.

Na primeira fase da doença, especialmente os primeiros 12 meses, o sinal predominante é a hipotonia neonatal. O diagnóstico diferencial de hipotonia neonatal é amplo e inclui desde sepse neonatal, malformações neurológicas congênitas, depressão do sistema nervoso central, injúria anóxica, hemorragias intracranianas e hipotonia congênita benigna até diversas neuropatias e miopatias [23, Capítulo 2].

Dentre as diversas doenças neuromusculares que se apresentam comumente com hipotonia neonatal, destaca-se a distrofia muscular de Steinert, a amiotrofia muscular espinhal tipo I e a doença de Charcot–Marie–Tooth. Estudos eletromiográficos e de velocidade de condução do impulso nervoso, além de biópsias do tecido muscular são fundamentais para excluir doenças neuromusculares do diagnóstico diferencial, uma vez que esses estudos produzem resultados comprovadamente negativos na SPW. Outras doenças genéticas que também fazem parte do diagnóstico diferencial da hipotonia neonatal severa incluem a síndrome de Zellweger, doença de Pompe, e doença do X frágil [41].

A obesidade, sinal mais marcante da segunda fase da SPW, é um achado

comum em pacientes que sofrem de algum tipo de retardamento mental, mesmo quando a obesidade não está relacionada diretamente com a etiologia da doença, uma vez que a obesidade tende a ser conseqüência do curso natural dessas doenças, que geralmente se associam à inatividade, má-alimentação e falta de estímulos externos. As doenças genéticas freqüentemente associadas com um quadro de obesidade e retardamento mental são: síndrome de Laurence-Moon-Biedl-Bardet, síndrome de Alstrom, síndrome de Borjeson–Forssman–Lehman, síndrome de Cohen, síndrome de Fröhlich, síndrome de Down, síndrome de Angelman, osteodistrofia hereditária de Albright, doença do X frágil, deleções na região 16p11.2, dissomia uniparental materna do cromossomo 14, e doenças relacionadas com o gene *MECP2* [35, 41, 58, 59].

### 2.1.3

#### Etiologia

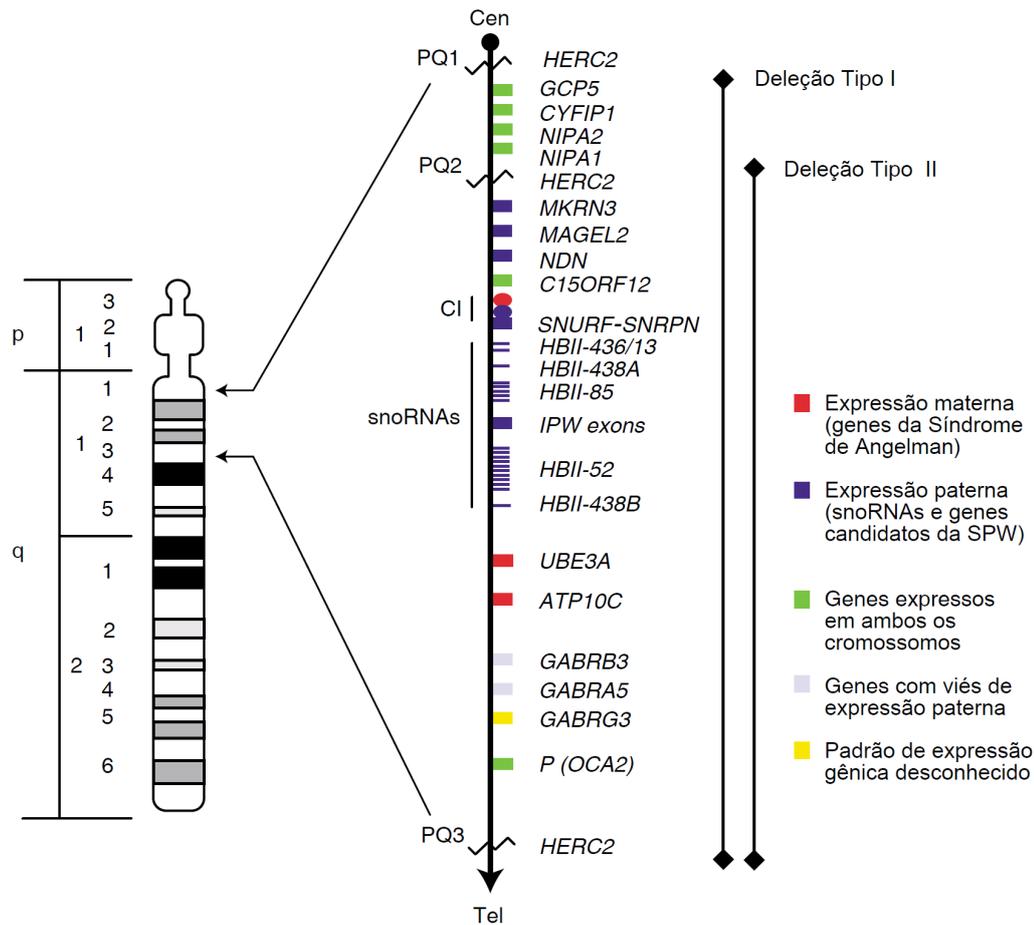
A Síndrome de Prader-Willi é causada pela ausência de expressão gênica na região 15q11–q13 de origem paterna. Juntamente com a Síndrome de Angelman, foi a primeira doença humana relacionada, principalmente, com os conceitos de epigenética e *imprinting* genômico [60].

O *imprinting* genômico é definido como a marcação diferencial dos alelos durante a gametogênese de acordo com o gênero do progenitor, resultando na expressão gênica diferenciada de genes paternos e maternos durante o desenvolvimento. O *imprinting* é um processo epigenético, caracterizado por três etapas: marcação do DNA nos gametas, manutenção da marcação no embrião e nos tecidos do organismo adulto, e posterior reprogramação das marcações no início da gametogênese [61]. Teoricamente, apesar de todos os mecanismos epigenéticos de regulação da expressão gênica descritos em mamíferos poderem atuar no processo de *imprinting*, o mecanismo de metilação de ilhas CpG é o mais compreendido e estudado [62, 63]. O processo de *imprinting* exerce um papel fundamental no desenvolvimento e a expressão de genes “imprintados” varia com o tecido e estágio de desenvolvimento [64].

A etiologia genética e molecular é complexa e requer um entendimento prévio da região 15q11–q13, representada esquematicamente na figura 2.1.

A região 15q11–q13 contém aproximadamente oito milhões de pares de bases e é dividida em quatro regiões: (1) uma região proximal sem *imprinting*, situada entre os pontos de quebra PQ1 e PQ2 e que contém quatro genes de expressão biparental (*NIPA1*, *NIPA2*, *CYFIP1*, *TUBGCP5*); (2) a região da SPW, contendo cinco genes codificantes de proteínas de expressão paterna (*MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN* e *SNURF-SNRPN*), um gene sem introns que é

Figura 2.1: Ideograma do cromossomo 15



expresso bialelicamente nos testículos e paternamente no cérebro (*C15orf2*) e um aglomerado de cinco genes codificantes de snoRNAs (*HBII-436*, *HBII-13*, *HBII-438*, *HBII-85* e *HBII-52*, atualmente conhecidos por *SNORD107*, *SNORD64*, *SNORD109A*, *SNORD116*, *SNORD115*, respectivamente); (3) uma região associada com a Síndrome de Angelman (AS) contendo dois genes de expressão preferencialmente materna (*UBE3A*, *ATP10A*) sem implicações conhecidas para a SPW e (4) uma região distal sem *imprinting* contendo três genes que codificam receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA) (*GABRB3*, *GABRA5*, *GABRG3*) e os genes *OCA2*, associado com o albinismo do tipo II, e *HERC2* [65].

O gene *SNURF-SNRPN* é um gene bicistrônico que codifica a proteína SmN, que participa em eventos de *splicing* alternativo no cérebro, e a proteína SNURF, de função desconhecida. Na extremidade 5' do gene *SNURF-SNRPN* encontra-se uma ilha CpG que abrange o promotor, o exon 1 e o intron 1. Essa é a região que apresenta padrão de metilação diferenciado, de acordo com a origem do alelo: no alelo de origem materna a região encontra-se metilada, enquanto

que no de origem paterna não há metilação. O centro de *imprinting* da região sobrepõe-se ao promotor e ao exon 1 do gene. O gene *SNURF-SNRPN* abriga ainda seis genes que codificam snoRNAs, que são regulados pela expressão do *SNURF-SNRPN* e estão envolvidos no processamento de RNA [41].

Assim, teoricamente, os genes que poderiam estar envolvidos na patogênese da SPW são aqueles de expressão unicamente paterna, uma vez que os demais são expressos nos respectivos alelos maternos. Os genes candidatos são: *MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN*, *SNURF-SNRPN* e os genes relacionados com a expressão dos snoRNAs. Os três primeiros genes estão envolvidos no desenvolvimento e funcionamento cerebral, particularmente os genes *MAGEL2* e *NDN* que são expressos em diversas estruturas cerebrais, especialmente no hipotálamo [65].

Atualmente, três mecanismos genéticos e moleculares são apontados como as principais causas da ausência de expressão gênica da região associada a SPW [59]. Estima-se que 70% a 75% dos casos sejam causados por deleções *de novo* na região 15q11-q13 do alelo de origem paterna [39, 66, 67] e que cerca de 25% a 30% dos casos ocorram devido à ocorrência de dissomia uniparental materna (DUPm) do cromossomo 15 [60]. Defeitos no centro de *imprinting* são responsáveis por até 1% dos casos [68–70]. Mutações na região do centro de *imprinting* herdadas Mendelianamente também causam a doença [71]. Mais recentemente, translocações balanceadas com ponto de quebra no locus *SNURF-SNRPN* [72] e deleções nos genes que codificam um grupo de *small nucleolar RNAs* (snoRNAs) conhecidos como *SNORD116* também foram reconhecidas como possíveis causas da SPW [73].

Resultados de estudos de *microarrays* realizados com DNA obtido de pacientes com diagnóstico molecular de SPW estabelecido, confirmaram que a expressão gênica dos genes da região 15q11-q13 encontra-se completamente abolida. Não houve diferença de expressão gênica dos genes expressos bialelicamente entre os pacientes com dissomia uniparental materna e controles saudáveis, embora foi constatado um aumento significativo na expressão de genes expressos maternalmente entre os grupos com DUP materna e controles. Esses resultados sugerem que as diferenças observadas na expressão dos genes suspeitos podem contribuir para o fenótipo observado clinicamente [74].

Ademais, indivíduos com SPW apresentaram um nível de expressão gênica elevado em genes localizados em outras regiões do genoma, quando comparados ao grupo de controle. Particularmente, a expressão gênica dos genes *HCRT* (orexina), *POMC* (proopiomelanocortina), *OXTR* (receptor de ocitocina), *MC2R* (receptor de melanocortina) e dos genes relacionados com

os receptores de serotonina 3A, 1B e 2B encontrava-se significativamente aumentada. Todos esses genes estão envolvidos com a regulação da fome e da alimentação [75].

Existem diferenças clínicas entre as diferentes etiologias da SPW. Pacientes com deleções cromossômicas tendem a apresentar hipopigmentação e sensibilidade maior a luz solar [39]. Essas diferenças foram confirmadas em estudos posteriores que compararam os pacientes com deleções e os com DUP materna, tendo sido notado, adicionalmente, que a idade materna à gestação dos pacientes com DUP era mais elevada [25, 76, 77]. Os pacientes com DUP materna apresentam um grau mais brando de dermatotilomania, frequência menor de problemas de comportamento, assim como uma habilidade menor com quebra-cabeças e um limiar de dor mais próximo da normalidade. As características faciais também são mais incomuns [78].

A extensão da deleção na região 15q11-q13 também acarreta diferenças na apresentação clínica da SPW. Foram identificados dois tipos de deleção mais comuns nessa região: a deleção do tipo I, caracterizada pela perda dos elementos distais ao ponto de quebra 1 (PQ1 na figura 2.1), próximo ao centrômero, e a deleção do tipo II, no ponto de quebra 2 (PQ2). A deleção do tipo I resulta perda adicional de aproximadamente 500kb de DNA [79, 80].

Diferenças clínicas significativas foram verificadas entre os pacientes com os dois tipos de deleção e DUP materna em diversos testes psicológicos. Pacientes com deleção do tipo I apresentaram resultados piores em escalas de comportamento adaptativo, assim como certos comportamentos obsessivos-compulsivos foram mais evidentes nesse grupo, em comparação aos pacientes com DUP materna. As avaliações das habilidades verbais e matemáticas nos pacientes com deleção do tipo I também foram inferiores às dos demais pacientes. Os autores especularam que a expressão reduzida do gene *NIPA1*, expresso tipicamente no cérebro de camundongos, pode produzir efeito deletério nos pacientes com deleção do tipo I [80]. A correlação entre o expressão dos genes contidos na região entre os pontos de quebra PQ1 e PQ2 – *NIPA1*, *NIPA2*, *CYFIP1*, *TUBGCP5* – e os valores obtidos pelos pacientes com deleção do tipo I em escalas psicológicas e comportamentais padronizadas foi positiva, indicando uma contribuição direta desses genes para o fenótipo. A maior correlação observada foi a relativa ao gene *NIPA2* [81].

#### 2.1.4 Diagnóstico

Até a confirmação da etiologia da SPW, e o posterior desenvolvimento de técnicas moleculares específicas para a detecção dos defeitos genéticos associados com a síndrome, o diagnóstico da doença era eminentemente clínico [22, 35, 37, 38, 57, 82].

Em 1993, o primeiro critério clínico de diagnóstico para a SPW com ampla utilização na literatura foi proposto por um consenso entre sete médicos norte-americanos [19]. O critério clínico definido por Holm e colaboradores, doravante chamado, simplesmente, de critério de Holm, é composto por três categorias de sinais e sintomas clínicos: critérios maiores, menores e auxiliares. A tabela 2.2 apresenta os sinais e sintomas que constituem o critério de Holm. Os critérios auxiliares, apesar de aumentarem a confiança no diagnóstico, segundo os autores, não são utilizados na construção do *score* diagnóstico.

O *score* diagnóstico é construído por meio da verificação da presença dos critérios maiores e menores em pacientes suspeitos de portarem a SPW. A presença de cada um dos critérios maiores soma 1.0 ponto ao *score*, enquanto que a de um menor adiciona 0.5 ponto. Contemplando a natureza bifásica da SPW, a avaliação do *score* final obtido varia de acordo com a idade do paciente. Nas crianças com até três anos de idade, o diagnóstico é feito se o *score* final for maior do que 5.0 pontos, sendo que 4.0 desses devem advir de critérios maiores. Para os pacientes com mais do que três anos de idade, é necessário um total de 8.0 pontos, dos quais 5.0 oriundos dos critérios maiores.

Com o aumento da disponibilidade da testagem molecular, diagnosticamente definitiva, Gunay-Aygun e colaboradores [20] propuseram uma alteração no escopo de aplicação do critério clínico de Holm, assim como sugeriram alterações no próprio critério. Argumentando que a identificação clínica de pacientes suspeitos de SPW é desafiadora devido à falta de especificidade de alguns sinais e sintomas da síndrome e à evolução desses ao longo da história natural da doença, os autores avançaram a idéia de se utilizar o critério clínico para determinar a indicação de realização do teste molecular, assumindo a função de um teste de rastreamento. Gunay-Aygun *et al.* [20] empregaram uma amostra com 90 pacientes com resultado molecular positivo para SPW, dos quais 68 tinham deleções na região 15q11-q13, 21 possuíam dissomia uniparental materna e um paciente apresentava, presumivelmente, defeitos no centro de *imprinting*. O critério de indicação de realização do teste molecular para a SPW está ilustrado na tabela 2.3

Tabela 2.2: Critério de diagnóstico clínico de Holm *et al.* [19]

Critérios Maiores
Hipotonia neonatal e infantil
Problemas de alimentação na infância
Ganho de peso excessivo
Hipogonadismo
Atraso no desenvolvimento
Hiperfagia
Fácies típica
Anormalidades moleculares na região 15q11-q13
Critérios menores
Movimentos fetais diminuídos
Problemas de comportamento
Apnéia do sono
Baixa estatura
Hipopigmentação
Acromicria
Mão estreitas
Miopia / esotropia
Saliva viscosa
Defeitos na articulação da fala
Dermatilomania
Critérios auxiliares
Limiar de dor aumentado
Reflexo emético diminuído
Instabilidade ou alterações no controle térmico
Escoliose ou cifose
Adrenarca precoce
Osteoporose
Habilidade incomum com quebra-cabeças
Exames neuromusculares normais

Tabela 2.3: Critério de diagnóstico clínico de Gunay-Aygun *et al.* [20]

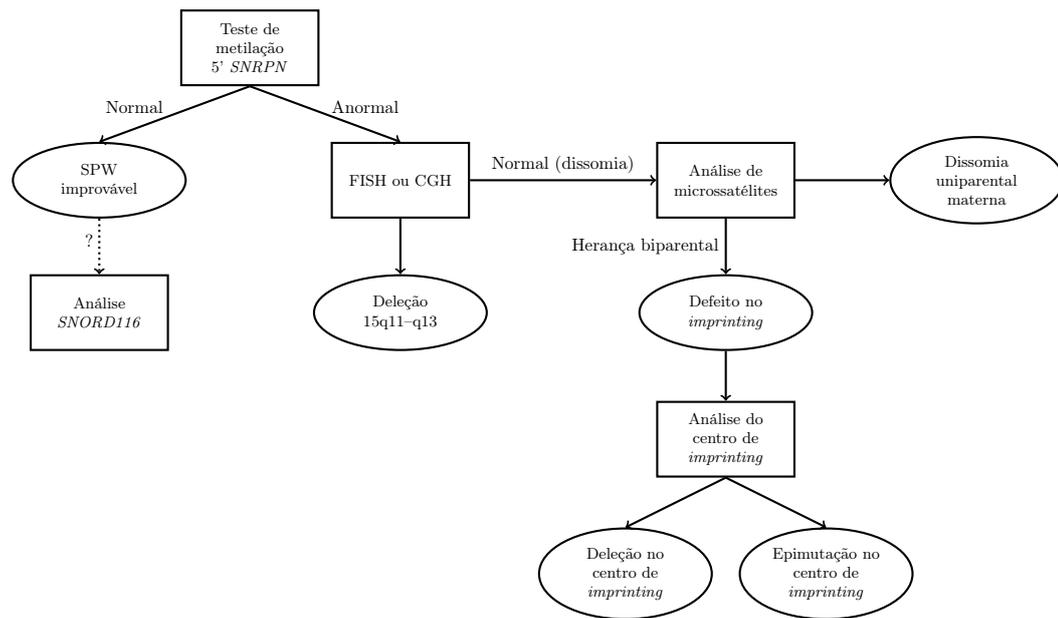
Idade da avaliação	Características suficientes para a indicação de teste molecular
0 a 2 anos	1) Hipotonia com má sucção
2 a 6 anos	1) Hipotonia com histórico de má sucção 2) Atraso global no desenvolvimento
6 a 12 anos	1) Histórico de hipotonia com má sucção 2) Atraso global no desenvolvimento 3) Hiperfagia / obsessão por comida
Acima de 13 anos	1) Deficiência cognitiva; leve retardo mental 2) Hiperfagia / obsessão por comida 3) Hipogonadismo hipotalâmico e/ou problemas de comportamento

Assim como no critério de Holm, a análise clínica dos pacientes suspeitos de SPW no critério de Gunay-Aygun *et al.* [20], doravante chamado de critério de Gunay, é diferente de acordo a idade deles. Os autores sugeriram a testagem molecular para todas crianças com idade entre 0 e 2 anos que apresentem hipotonia com má-sucção. Nas crianças de 2 a 6 anos, o teste molecular estaria indicado se, além da hipotonia com histórico de má-sucção, os pacientes também apresentassem atraso global no desenvolvimento. Na faixa de 6 a 12 anos, a presença de hipotonia com má-sucção, atraso global no desenvolvimento e hiperfagia com obsessão por comida definiria a recomendação do teste. Para os pacientes com mais de 13 anos, a indicação do teste é feita se apresentarem retardo mental ou sinais de deficiência cognitiva, hiperfagia com obsessão por comida e hipogonadismo hipotalâmico e/ou problemas típicos de comportamento, incluindo traços obsessivos-compulsivos.

O diagnóstico molecular da SPW pode ser realizado por diversas técnicas e ensaios [83, 84]. A abordagem que apresenta a maior sensibilidade diagnóstica (99%), sendo capaz de identificar as três causas principais da SPW – deleções, DUP materna e defeitos de *imprinting* – envolve a análise dos padrões de metilação da região 15q11-q13. A estratégia mais comum envolve a digestão do DNA do cromossomo de origem paterna com uma endonuclease de restrição, posterior tentativa de ampliação do éxon 1 do gene *SNRPN* e comparação dos *amplicons* resultantes [85, 86]. Por exemplo, em indivíduos com deleções na região 15q11-q13 que incluam o gene *SNRPN* não há amplificação da região por PCR com os *primers* específicos resultando ausência de banda na electroforese.

A figura 2.2 ilustra o algoritmo completo utilizado no diagnóstico etiológico da SPW (adaptado de [41, 84]).

Figura 2.2: Algoritmo do diagnóstico molecular da SPW



A análise de metilação é o primeiro passo do algoritmo. Um resultado negativo, caracterizado pela ausência de deleções no gene *SNRPN-SNURF*, DUP materna ou defeitos no CI, praticamente exclui o diagnóstico de SPW. Por outro lado, um resultado anormal fecha a diagnóstico de SPW sem, no entanto, identificar a classe molecular. A utilização de técnicas citogenéticas como FISH (*fluorescence in situ hybridization*) ou CGH (*comparative genomic hybridization*) permite identificar deleções na região 15q11-q13, confirmando, ou não, essa possibilidade.

No caso de ausência de deleções, o próximo passo envolve distinguir entre DUP materna e defeitos no centro de *imprinting* por meio da análise de microssatélites, que requer tanto amostras de DNA do paciente quanto de amostras dos respectivos progenitores. Se a análise de microssatélites revelar uma herança biparental, excluindo, portanto, o diagnóstico de DUP materna, presume-se que a etiologia da SPW seja a presença de erros de *imprinting*.

Para identificar a origem dos erros de *imprinting* realiza-se o sequenciamento da região do CI, com o objetivo de se investigar a presença de deleções nessa região. Caso não sejam encontradas evidências de deleções, pressupõe-se que os defeitos de *imprinting* tenham sido causados por mecanismos epigenéticos. A distinção entre essas as duas causas de defeitos de *imprinting* é altamente relevante pois deleções nessa região são herdadas Mendelianamente com uma probabilidade de 50% [69, 87], enquanto que o risco de recorrência de alterações epigenéticas é mínimo.

Recentemente, relatos de pacientes com quadros clínicos típicos de SPW

mas com resultado negativo no teste de metilação e com deleções no gene *SNORD116* sugerem fortemente que o algoritmo de diagnóstico da SPW deva ser modificado. Aconselha-se que seja realizada uma investigação de mutações ou deleções no *locus SNORD116* em todos os pacientes com fenótipo típico da SPW com resultado negativo no teste de metilação [73, 88].

Evidências de alterações pré-natais específicas em pacientes com SPW também podem ser empregadas na indicação de testagem genética de rastreamento durante o período pré-natal. A testagem molecular estaria indicada quando o feto apresentar, a partir do segundo trimestre de gestação, uma combinação de poliidrâmnio, tamanho reduzido para a idade gestacional e crescimento intrauterino assimétrico, com resultados normais em exames de ultrassonografia com Doppler [89].

Ainda, já foram desenvolvidas técnicas de diagnóstico *post-mortem* da SPW. Por meio da análise de expressão gênica dos genes *SNORD115* e *SNORD116* em tecidos, cujos transcritos mostraram-se particularmente estáveis molecularmente *post-mortem*, foi possível excluir o diagnóstico de SPW em uma paciente de 56 anos que havia sido diagnosticada com base em critérios clínicos apenas [90].

### 2.1.5

#### Conduta e Tratamento

Não há cura para a SPW e a conduta médica visa o tratamento dos sintomas da síndrome, além de oferecer recomendações claras aos pais e familiares objetivando a antecipação e remediação das possíveis complicações associadas com a doença [24, 41]. Defende-se que a abordagem deva ser multidisciplinar, em função da complexidade e diversidade das manifestações da doença, geralmente envolvendo uma equipe composta por médicos, nutricionistas, fisioterapeutas, fonoaudiólogos, enfermeiros e outros profissionais [91].

O diagnóstico molecular precoce é importante para que se evite o quadro de obesidade mórbida e suas complicações [24]. Adicionalmente, é fundamental que seja exercido um controle restrito sobre a alimentação e o ambiente alimentar como estratégia principal de prevenção da instalação da obesidade e de complicações correlatas, como a DMII [18, 24, 92]. Táticas de controle utilizadas incluem o trancamento de alimentos em armários, manutenção de uma quantidade pequena de alimentos na residência, monitoramento contínuo do paciente na presença de alimentos, redução das porções servidas, contagem de calorias, inclusão dos pacientes na elaboração dos cardápios diários e oferecimento de alimentos com baixo poder calórico. Um horário rígido de

refeições e consistência na aplicação dessas táticas são fatores determinantes de sucesso [93].

O manejo dos demais sintomas da SPW é mais sutil. Com o objetivo de auxiliar o acompanhamento do desenvolvimento de crianças com SPW até os três anos de idade, foram desenvolvidas curvas padronizadas de crescimento para peso, comprimento, perímetro cefálico, peso por comprimento e IMC (índice de massa corporal) [94].

Muito embora os relatos de gravidez em pacientes com SPW do sexo feminino sejam raros [42, 43], é recomendado que terapias contraceptivas sejam oferecidas a essas pacientes com vida sexual ativa, ou pelo menos que haja uma discussão entre os pacientes e respectivos familiares, objetivando-se evitar os fardos adicionais advindos de uma gravidez não-planejada.

Alguns cuidados devem ser tomados no manejo de pacientes com SPW internados. Crianças e lactentes devem ser monitorados continuamente e cuidadosamente, especialmente aqueles que apresentarem sintomas de hipoventilação, infecções do trato respiratório superior ou gastroenterite. Nos adultos, a apnéia do sono deve ser rapidamente reconhecida e tratada. Dores na região epigástrica acompanhadas por vômitos devem ser consideradas como possíveis sintomas de distensão intestinal aguda, necessitando intervenções apropriadas [56].

Diversas opções de tratamento estão disponíveis, desde esquemas especiais de alimentação nos primeiros anos de vida, prática de exercícios físicos, reeducação comportamental e alimentar, utilização de aparelhos CPAP (*continuous positive airway pressure*) na terapia respiratória e da apnéia do sono, às intervenções farmacológicas [95].

O tratamento com clomifeno, um modulador seletivo dos receptores de estrogênio, em um paciente com SPW do sexo masculino elevou as concentrações séricas de LH (hormônio Luteinizante) e de testosterona e foi capaz de induzir a espermatogênese, sugerindo um potencial uso dessa substância no tratamento do hipogonadismo em pacientes do sexo masculino [82]. A prescrição de inibidores seletivos de recaptação de serotonina (SSRI, *selective serotonin reuptake receptors*) tem se mostrado eficaz na redução da compulsividade e de outros problemas de comportamento apresentados pelos pacientes com a síndrome [44, 96].

A intervenção farmacológica mais bem-sucedida no tratamento dos sintomas da SPW, no entanto, é a reposição do hormônio de crescimento (GH, *growth hormone*). O tratamento com GH em pacientes com SPW foi aprovado formalmente nos EUA em 2000 e na Europa em 2001 e há *guidelines* interna-

cionais específicos para a terapia de reposição de GH em pacientes com SPW [97].

Um dos primeiros relatos de utilização de GH em pacientes com SPW observou um aumento significativo da taxa de crescimento linear e na concentração sérica de IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) [98, 99]. O crescimento linear obtido com o tratamento não aparenta elevar a idade óssea além da idade cronológica dos pacientes [99] e a estatura dos adolescentes ao final do tratamento tende a valores médios da população em geral [41].

Os benefícios da reposição de GH não se limitam aos ganhos de estatura. Diversos ensaios clínicos relatam efeitos positivos da terapia de reposição de GH na composição corpórea – aumento da massa muscular com redução do percentual de gordura – com aumento do nível de mobilidade e atividade física e redução dos problemas de comportamento e melhoras da função respiratória [100, 101]. Especula-se que a reposição de GH também possa aumentar a qualidade do sono nesses pacientes [102] e que a interrupção abrupta do tratamento em crianças possa agravar os problemas de comportamento [103].

O único relato publicado sobre a realização de ensaio clínico de terapia de reposição de GH no Brasil encontrou resultados semelhantes, com franca elevação do IGF-1, redução de massa adiposa e aumento de massa muscular magra em sete pacientes com idades entre seis e 14 anos [104].

Recentemente, ensaios clínicos da terapia de reposição de GH em adultos com SPW que não haviam sido tratados com o hormônio durante a infância ou adolescência demonstraram benefícios semelhantes, com aumentos da massa muscular magra, nível de atividade física e concentrações séricas de IGF-1 e HDL durante o tratamento. No entanto, esses benefícios desapareceram após 12 meses do término do tratamento, indicando a necessidade de um tratamento contínuo com GH [105].

Os efeitos adversos associados à terapia de reposição de GH mais citados na literatura são a piora da escoliose e risco de morte súbita. Há controvérsias a respeito desses relatos, especialmente os de morte súbita em pacientes recém-iniciados na terapia de reposição de GH, uma vez que eles já apresentavam problemas respiratórios relacionados à apnéia do sono e à hipertrofia das adenóides [41, 95].

Entende-se, hoje, que, apesar de a terapia de reposição de GH contribuir para um ganho significativo de estatura nos pacientes com SPW, os principais benefícios do tratamento são os relacionados à melhora na composição corporal e ao aumento da capacidade física, uma vez que esses contribuem sensivelmente para o combate à obesidade [92].

Por esses motivos, o tratamento de reposição de GH é considerado o tratamento padrão na SPW e recomenda-se que seja iniciado a partir de todas as idades [41]. Um consenso internacional preconiza que a reposição de GH deva fazer parte de uma abordagem que também contemple reeducação alimentar e mudanças no estilo de vida. A princípio, o tratamento estaria indicado para todos os pacientes com confirmação do diagnóstico de SPW por análises moleculares, inclusive aqueles com retardamento mental, que não deveria ser um impedimento para o tratamento. No entanto, pacientes com obesidade mórbida, *diabetes mellitus* não-controlada, apnéia do sono severa não-tratada, neoplasias e quadros psicóticos não deveriam receber o tratamento [97].

## 2.2

### Análise de Curvas ROC

#### 2.2.1

##### Classificadores binários

A metodologia da curva de “característica de operação do receptor”, ou *receiver operating characteristic*, doravante simplesmente “curva ROC”, foi desenvolvida na Segunda Guerra Mundial com o objetivo de aprimorar as técnicas de detecção de sinais em radares e sonares [106, Capítulo 1].

A idéia central de um sistema de detecção de sinais, ou de um sistema classificador binário, em geral, é a de identificar corretamente determinado sinal quando ele estiver presente e ignorar quaisquer outros sinais quando o sinal estudado estiver ausente. Idealmente, o sistema classificador não cometerá erros em nenhum dos dois casos. A discussão a seguir baseia-se em explicações e definições semelhantes apresentadas em, dentre outros, [107–113]. Um exemplo desse conceito aplicado no contexto do desenvolvimento original da curva ROC encontra-se na tabela 2.4.

Tabela 2.4: Exemplo de um sistema classificador binário

		Realidade	
		Bombardeiro	Gansos
Radar	Bombardeiro	Acerto	Alarme falso
	Gansos	Ataque	Acerto

Naturalmente, espera-se que as previsões de um sistema de detecção consigam distinguir corretamente um bombardeiro inimigo de uma revoada de gansos, quando comparadas à realidade visual objetiva e incontestável. No entanto, nenhum sistema de detecção de sinais é perfeito e, eventualmente, erros serão cometidos.

Se o sistema anuncia, incorretamente, que um bombardeiro inimigo se aproxima quando, na realidade, trata-se apenas de um grande bando de pássaros, o erro é classificado como um alarme falso, ou “falso positivo” (FP). No entanto, se o sistema acusa a aproximação de aves em vez de sinalizar a chegada de um avião hostil, o erro é classificado como um “falso negativo” (FN).

Em um dado intervalo de tempo, diversas previsões são feitas pelo sistema de radar. Em uma amostra de  $T$  observações os resultados podem ser tabulados como ilustra a tabela 2.5. Nela, o total de FP é dado pelo número  $b$  e o de FN por  $c$ . O total de acertos positivos, *i.e.*, “verdadeiros positivos” ou *true positives* (TP), é igual a  $a$  e o total de acertos negativos, “verdadeiros negativos” ou *true*

*negatives* (TN) é representado por  $d$ . O total de eventos positivos (P) é igual a  $(a + c)$  e o total de negativos (N) é igual a  $(b + d)$ .

Tabela 2.5: Resultados de um sistema classificador hipotético

		Realidade		
		Bombardeiro	Gansos	
Radar	Bombardeiro	$a$	$b$	$a + b$
	Gansos	$c$	$d$	$c + d$
		$P = a + c$	$N = b + d$	$T$

A tabela 2.5 é chamada de “matriz  $(2 \times 2)$ ”, “matriz de confusão” ou “tabela de contingência”, e a partir dela é possível estimar algumas métricas utilizadas para avaliar o desempenho do sistema de classificação, algumas das quais são apresentadas na tabela 2.6.

Tabela 2.6: Medidas de desempenho de um classificador

Sensibilidade	$\text{Prob}[T +   D+] = \frac{a}{a+c}$
Especificidade	$\text{Prob}[T -   D-] = \frac{d}{b+d}$
Valor preditivo positivo (VPP)	$\text{Prob}[D +   T+] = \frac{a}{a+b}$
Valor preditivo negativo (VPN)	$\text{Prob}[D -   T-] = \frac{d}{c+d}$
Acurácia	$\frac{(a+d)}{(a+b+c+d)}$
Prevalência amostral	$\frac{(a+c)}{(a+b+c+d)}$

Essas medidas de desempenho são utilizadas na avaliação de testes diagnósticos em medicina há mais de 40 anos [114]. A sensibilidade de um teste é a habilidade desse teste de identificar corretamente aqueles com a doença em questão, *i.e.*, é igual a probabilidade do resultado do teste ser “positivo” ( $T+$ ) quando o paciente realmente estiver doente ( $D+$ ). Da mesma forma, a especificidade do teste avalia a capacidade do teste em classificar corretamente como saudáveis aqueles sem a doença, *i.e.*, é igual a probabilidade do resultado ser “negativo” ( $T-$ ) quando o paciente estiver saudável ( $D-$ ). Os valores preditivos positivo e negativo informam, respectivamente, a probabilidade do paciente estar doente, dado que o resultado do teste foi positivo, e a probabilidade do paciente não estar doente, dado que o resultado foi negativo. A acurácia é a medida que avalia a capacidade do teste de identificar corretamente tanto os doentes quanto os saudáveis.

Por exemplo, se 100 pacientes com determinada doença forem testados e 65 deles apresentarem um resultado positivo, o teste tem sensibilidade de 65%. Se 100 pacientes sem a doença forem testados e 95 deles apresentarem resultado negativo, a especificidade é de 95%. O VPP, nesse caso, será de 93% e o VPN igual a 73%. A acurácia do teste é 80% e a prevalência amostral de 50%.

É comum a noção de que um teste com especificidade muito alta “inclui” o diagnóstico quando o resultado do teste for positivo e um teste com sensibilidade muito elevada “exclui” o diagnóstico quando o resultado for negativo. Com efeito, se a especificidade de um teste for igual a 99%, um resultado positivo poderia indicar que o paciente realmente tem a doença, uma vez que a probabilidade de falsos positivos seria de 1%. No entanto, o poder diagnóstico de um teste depende de ambas características – sensibilidade e especificidade – e é possível que erros diagnósticos sejam cometidos por meio dessas regras simplificadoras [115].

Enquanto o cálculo da sensibilidade e da especificidade não depende da prevalência da doença na população em geral, *i.e.*, são atributos inerentes ao teste, o cálculo do VPP e VPN depende da prevalência da doença na amostra, no entanto, e nem sempre as fórmulas da tabela 2.6 podem ser utilizadas. Se a prevalência da doença na amostra diferir consideravelmente da prevalência da doença na população em geral, os VPP e VPN não podem ser estimados pelas fórmulas apresentadas. Alternativamente, se a prevalência da doença for conhecida, os VPP e VPN podem ser estimados pela fórmula de Bayes.

$$\begin{aligned} \text{VPP} &= \text{Prob}[D+|T+] \\ &= \frac{\text{Prob}[T+|D+]\text{Prob}[D+]}{\text{Prob}[T+|D+]\text{Prob}[D+] + \text{Prob}[T+|D-]\text{Prob}[D-]} \quad (2-1) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{VPN} &= \text{Prob}[D-|T-] \\ &= \frac{\text{Prob}[T-|D+]\text{Prob}[D+]}{\text{Prob}[T-|D+]\text{Prob}[D+] + \text{Prob}[T-|D-]\text{Prob}[D-]} \quad (2-2) \end{aligned}$$

A tabela 2.7 ilustra uma matriz (2 × 2) em um contexto clínico. O “padrão-ouro” é o teste ou procedimento com melhor capacidade de diagnóstico para uma certa doença. O desempenho de um novo exame diagnóstico deve ser sempre comparado ao do padrão-ouro.

Tabela 2.7: Exemplo clínico de uma matriz 2 × 2

		Padrão-ouro		Total
		Positivo	Negativo	
Exame	Positivo	TP	FP	TP+FP
	Negativo	FN	TN	FN+TN
Totais		TP+FN	FP+TN	<i>N</i>

### 2.2.2

#### Construção e Utilização da Curva ROC

Na realidade da prática médica, poucos testes produzem resultados binários – “positivo” ou “negativo”. A maioria resulta uma escala contínua de valores, *e.g.*, valores de glicemia medidos em mg/dL. Cada valor observado é chamado de *score*. Para que esses valores possam ser utilizados em um critério diagnóstico binário, *i.e.*, uma classificação de “doente” e “não-doente”, deve ser realizada uma dicotomização da escala contínua originalmente obtida.

Por exemplo, se a glicemia de jejum de um dado paciente for maior do que 126 mg/dL ele é considerado “doente”, *i.e.*, diabético; se a glicemia for menor do que 126 mg/dL, ele é considerado “não-doente”. O valor de 126 mg/dL é chamado de ponto de corte ou limiar de discriminação.

A curva ROC é uma representação gráfica que ilustra as mudanças do desempenho de um sistema classificador binário quando o ponto de corte, ou limiar de discriminação, é variado [107]. Essa análise é empregada em aplicações na medicina com o objetivo de avaliar o desempenho preditivo de testes e exames e no desenvolvimento de critérios clínicos de diagnóstico ou prognóstico [116].

A tabela 2.8 ilustra um exemplo de aplicação desse conceito <sup>2</sup>. Um radar hipotético pode operar em seis níveis de potência – de “desligado” a um nível máximo de potência (“Nível 5”) – e cada nível de potência resulta desempenhos preditivos distintos.

Tabela 2.8: Capacidade de detecção de um radar hipotético

Potência do radar	Percentual de aviões detectados corretamente	Percentual de pássaros identificados corretamente
Desligado	0	100
Nível 1	35	93
Nível 2	60	85
Nível 3	85	70
Nível 4	92	30
Nível 5	100	0

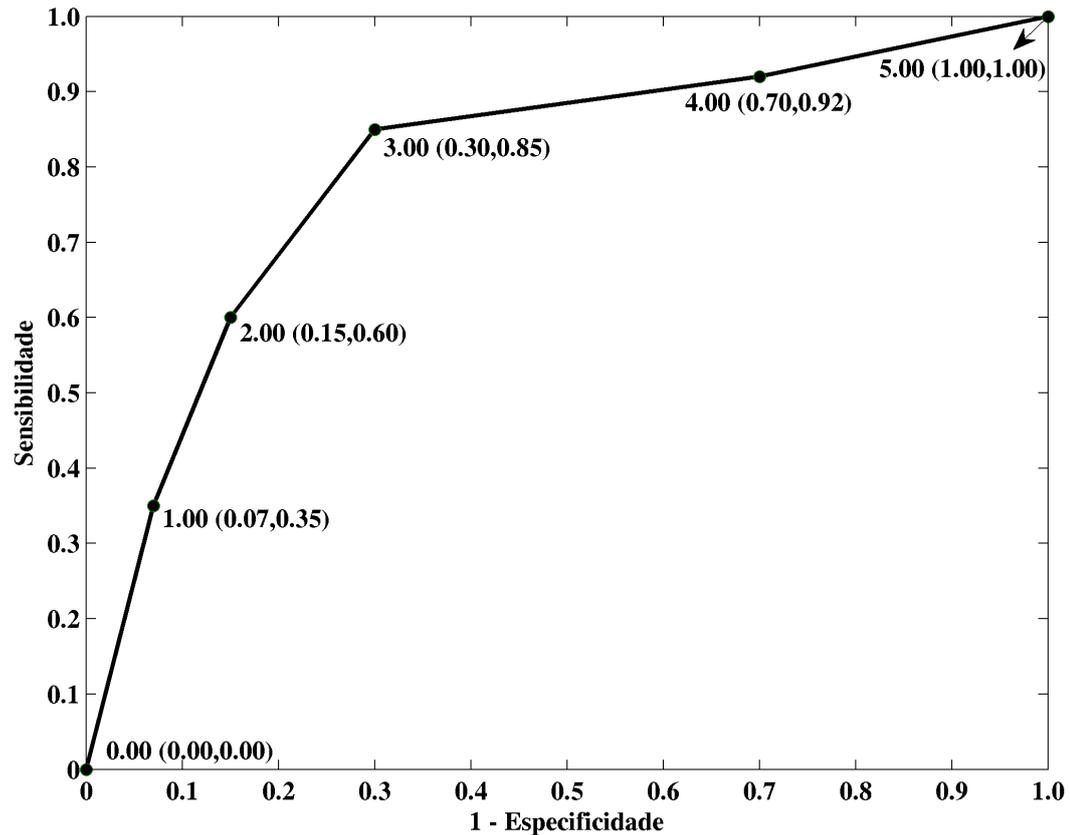
Por exemplo, a operação do radar no nível máximo de potência identifica corretamente 100% dos aviões inimigos, mas não consegue distinguir os pássaros dos aviões, *i.e.*, nesse nível de potência o sistema de detecção apresenta 100% de sensibilidade e 0% de especificidade. Analogamente, o radar desligado não detecta nenhum avião e todos os pássaros são classificados corretamente,

<sup>2</sup>Adaptado de <http://ebp.uga.edu/courses/>.

*i.e.*, o sistema de detecção está operando a 0% de sensibilidade e 100% de especificidade.

A curva ROC associada a esse sistema de classificação está representada na figura 2.3. Tradicionalmente, o eixo das ordenadas corresponde aos valores de *Sensibilidade* e o das abscissas aos valores iguais a  $(1 - \text{Especificidade})$ .

Figura 2.3: Curva ROC de um radar hipotético



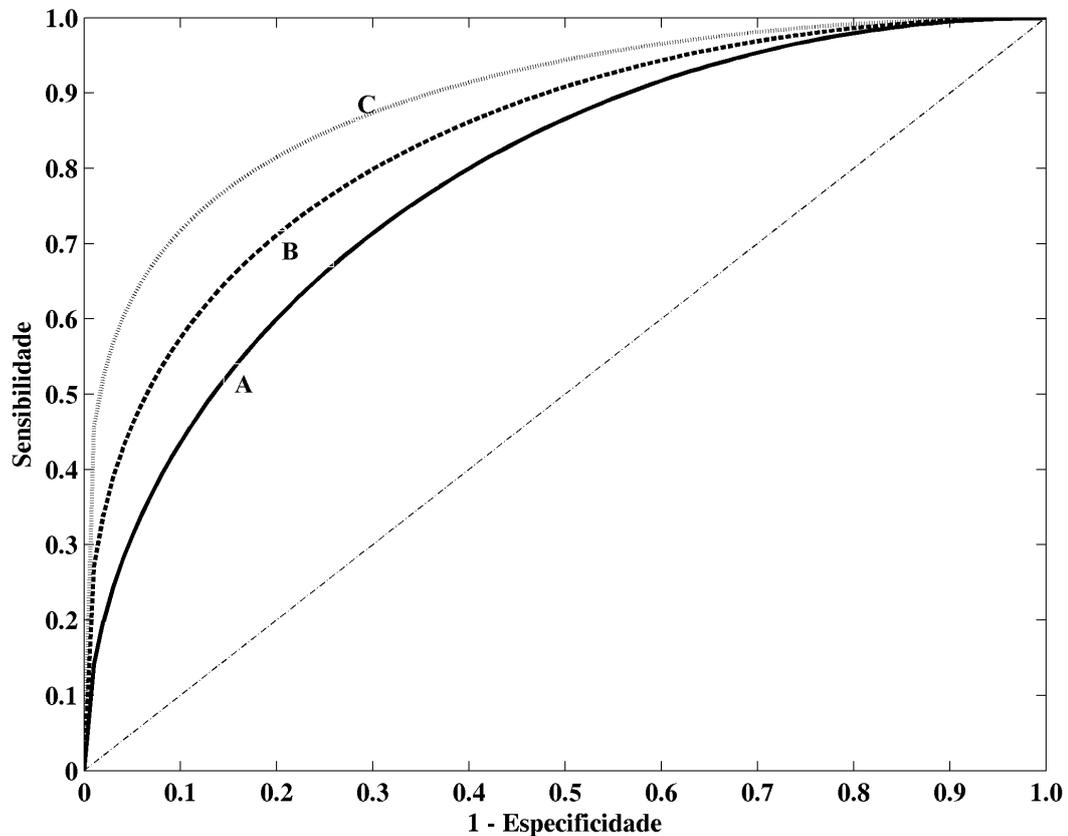
Cada ponto de corte definido corresponde a um “ponto de operação” na curva ROC. No exemplo da figura 2.3, o ponto de corte “0” representa a situação na qual o radar encontra-se desligado e os demais pontos – 1.0 a 5.0 – as diferentes potências de utilização do radar. Cada ponto de corte é acompanhado pelos valores das coordenadas no plano XY (*Sensibilidade*,  $1 - \text{Especificidade}$ ).

O método utilizado para a construção da curva ROC da figura 2.3 é conhecido como o método empírico, *i.e.*, utiliza os dados do modelo sem assumir quaisquer premissas sobre as distribuições de probabilidade das variáveis observadas. Contrapondo-se ao método empírico, a utilização de métodos paramétricos de construção da curva ROC estabelece distribuições de probabilidade *a priori* para as variáveis observadas em cada uma das populações. Por exemplo, no modelo binormal assume-se que o valor de glicemia de paci-

entes diabéticos segue uma distribuição normal com parâmetros  $(\mu_D, \sigma_D^2)$  e a glicemia de pacientes não-diabéticos (saudáveis) uma distribuição normal com parâmetros  $(\mu_S, \sigma_S^2)$ . A partir dessas premissas é necessário estimar os momentos dessas distribuições com os dados observados para se obter a curva ROC paramétrica. Apesar do método empírico não ser relativamente tão sofisticado, a sua utilização na prática médica é suportada por diversos estudos teóricos e empíricos [117].

A medida de desempenho mais comumente extraída de uma curva ROC é o valor da área sob a curva (*area under the curve*), doravante chamada de AUC [108]. Se a AUC for igual a 1.00, o classificador atinge perfeição diagnóstica, *i.e.*, distingue perfeitamente o grupo de pacientes doentes do de pacientes saudáveis, atingindo 100% de sensibilidade e 100% de especificidade. A AUC de um modelo classificador aleatório, *i.e.*, aquele que classifica um paciente como doente ou não-doente aleatoriamente, é igual a 50%. A figura 2.4 apresenta curvas ROC com diferentes áreas sob a curva. A curva ROC “C” apresenta o melhor desempenho e domina as demais em todos os níveis de especificidade. A linha tracejada a 45° representa a curva ROC do modelo aleatório.

Figura 2.4: Exemplos de curvas ROC



A AUC pode ser também representada, matematicamente, pela expressão  $AUC = \text{Prob} [h(D_+) > h(D_-)]$ , onde  $h(D_+)$  representa o valor do *score* de um paciente positivo e  $h(D_-)$  o de um negativo, ambos escolhidos aleatoriamente. Assim, quando maior for a AUC, melhor será a capacidade do critério de distinguir os pacientes positivos dos negativos. A maximização da AUC é freqüentemente empregada em estudos que visam desenvolver critérios clínicos de diagnóstico ou prognóstico [118–125].

## **3**

### **Metodologia**

#### **3.1**

##### **Desenho do Estudo**

Este projeto de pesquisa é do tipo retrospectivo, observacional, transversal, predominantemente analítico e foi elaborado segundo os padrões vigentes de ética em pesquisa com seres humanos, conforme o estipulado na Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. O projeto foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (Parecer 515.696). Todos os responsáveis pelos pacientes e demais participantes foram informados dos objetivos deste projeto e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido voluntariamente, cujo modelo se encontra no Apêndice A.

#### **3.2**

##### **Pacientes e Voluntários**

Foram selecionados pacientes atendidos no Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (66 pacientes) e voluntários da Escola de Medicina e Cirurgia (EMC) da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (15 voluntários), de acordo com os protocolos de inclusão e exclusão, apresentados a seguir. A amostra final do trabalho foi composta por resultados previamente publicados em [21] e por dados adicionais obtidos no período de setembro de 2012 a dezembro de 2014, dos quais os relativos aos novos pacientes foram gentilmente cedidos por Catielly Rocha e os relativos aos voluntários da EMC foram obtidos diretamente com os voluntários, com o suporte técnico do Departamento de Genética e Biologia Molecular da UNIRIO.

Os pacientes que atenderam aos seguintes critérios foram incluídos no estudo:

- i) Idade  $> 2$  anos

- ii) Índice de massa corporal (IMC)  $\geq$  percentil 50 da curva de IMC publicada pelo Centers of Disease Control (CDC) [126] para cada idade e gênero

Foram excluídos da amostra os pacientes que satisfizeram os seguintes requisitos:

- i) Recusa de participação no estudo pelo próprio ou pelos pais ou guardiões
- ii) Diagnóstico clínico de Síndrome de Down. Esse é o único caso em que a exclusão será baseada unicamente em diagnóstico clínico, em função do fenótipo peculiar apresentado por pacientes dessa síndrome

Foram coletadas informações sobre a presença, ou ausência, dos sinais e sintomas da SPW, de acordo com as sugestões em [19]. O modelo do questionário utilizado encontra-se no Apêndice B.

### 3.3

#### Material e Métodos

Todos os reagentes utilizados foram de grau *p.a.* e grau “Biologia Molecular” quando necessário.

#### 3.3.1

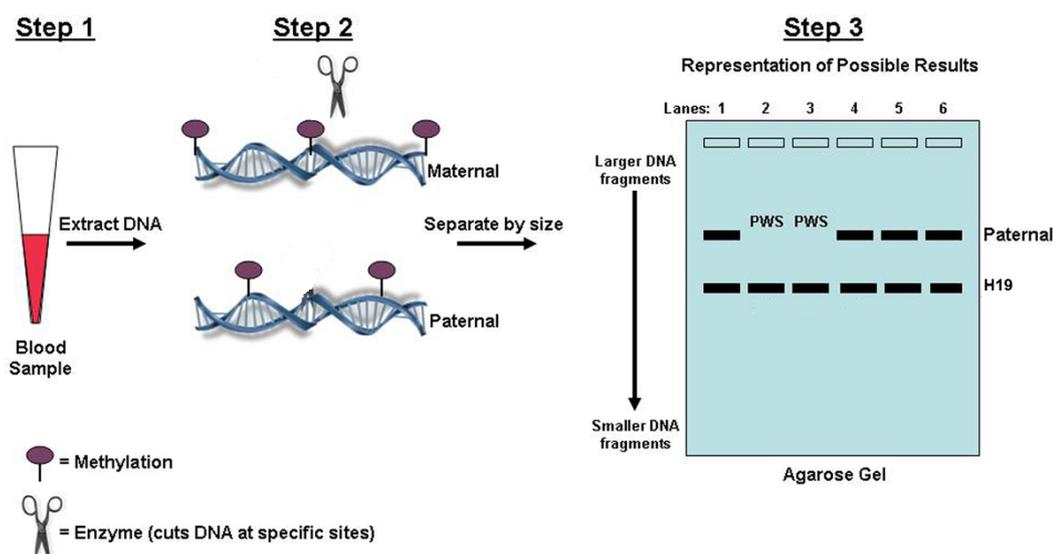
##### Diagnóstico Molecular

A realização do teste molecular diagnóstico da SPW requereu a coleta de 5ml de sangue periférico em tubos com EDTA de todos os participantes.

A análise de alterações no exon 1 do gene *SNURF-SNRPN* na região 15q11–q13 no cromossomo de origem paterna, por meio da técnica de PCR (baseada em metilação do alelo materno), detecta a SPW em aproximadamente 99% dos casos, devido aos padrões do DNA que diferem entre indivíduos normais e pacientes portadores da síndrome [83]. A técnica consiste na reação em cadeia da polimerase-metilação específica, conforme o descrito em [84]. A figura 3.1, adaptada de [127], ilustra esquematicamente as etapas do teste de diagnóstico molecular da SPW.

O teste foi realizado em três etapas: extração do DNA dos pacientes e voluntários, amplificação do DNA pela reação em cadeia de polimerase-metilação específica (PCR-Me) e a realização de electroforese em gel de agarose a 2%, técnica molecular que permite detectar e separar fragmentos específicos de DNA.

Figura 3.1: Ilustração esquemática do teste de PCR-metilação específica



O DNA de cada participante foi extraído do sangue periférico (5ml coletados em tubos com EDTA) utilizando o *kit* de extração de DNA Illustra™ (GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

Na segunda etapa do processo, foi utilizada a endonuclease de restrição McrBC [128, 129] que cliva um sítio de restrição específico presente em cromossomos normais de origem materna mas que não age no cromossomo de origem paterna uma vez que esse não se encontra em estado metilado. Foram encubados 200ng de DNA com 1 $\mu$ L da enzima de restrição McrBC (New England BioLabs, USA), conforme o descrito em [86]. A solução foi suplementada com 0,2 $\mu$ L de GTP, 0,2 $\mu$ L de BSA e 2 $\mu$ L de tampão NE (50mM de NaCl, 10mM de Tris-HCl, 10mM de MgCl<sub>2</sub>, 1mM de DTT, pH 7,9) em banho-maria a 37°C por no mínimo 4 horas. Realizou-se, então, a posterior amplificação do exon-1 do gene *SNRPN* pela PCR-Me, com 25 $\mu$ L de GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, USA), 4 $\mu$ L do DNA digerido, e 1 $\mu$ L de cada *primer* descrito na Tabela 3.1. Os *primers* são fragmentos específicos de DNA que funcionam como pontos de partida para a replicação do DNA, efetuadas pelas enzimas DNA-polimerases. Os produtos da amplificação de um segmento de DNA pela reação em cadeia da DNA-polimerase são chamados de *amplicons*.

Como controle interno da reação, foi utilizado o par de *primers* H19 para amplificação do gene que expressa um RNAm não-codificante a partir do alelo de origem materna, devido à similaridade na composição da seqüência e no estado de metilação com o gene *SNRPN* [130]. Tal amplificação resultou um *amplicon* de 420 pb.

O alelo normal paterno do gene *SNRPN* não metilado e, portanto, não

Tabela 3.1: Sequência dos *primers*

<i>Primer</i>	Sentido	Sequência
<i>SNRPN</i>	Senso	5' -AGGTCATTCCGGTGAGGGAGG-3'
<i>SNRPN</i>	Anti-senso	5' -ACCGCAGACACCCGCAATAGG-3'
<i>H19p1</i>	Senso	5' -GGCAACATGCGGTCTTCAGAC-3'
<i>H19p2</i>	Anti-senso	5' -TCCGGAGACAGGGCTGAGCA-3'

cortado pela enzima McrBC, foi amplificado com os *primers* da Tabela 3.1 e gerou um *amplicon* de 487 pb.

A termocicladora para PCR (Px2 Thermal Cycler, Milford, USA) foi programada da seguinte forma: um ciclo de 5 minutos a 94°C para desnaturação da fita dupla de DNA, 30 ciclos de 96°C por 40 segundos (desnaturação), seguido de 60°C por 60 segundos (hibridação do *primer*), 72°C por 30 segundos (alongamento das cadeias), e um ciclo de 72°C por 7 minutos para a extensão final das cadeias de DNA.

Finalmente, após a etapa da PCR-Me, foi realizada a identificação dos *amplicons* por eletroforese em gel de agarose a 2% em cuba horizontal. O tampão de corrida eletroforética foi o Tris-Ácido acético-EDTA. O produto da eletroforese foi corado com brometo de etídio (30µL de uma solução de 10mg/ml em 300mL de água destilada), visualizado ao transiluminador com luz ultravioleta e fotografado para documentação.

Ainda de acordo com a Figura 3.1, a interpretação do resultado do teste dá-se pela leitura das bandas produzidas na técnica de eletroforese. No caso dos indivíduos normais, os resultados da eletroforese mostram uma banda referente à amplificação do alelo paterno que não estava metilado, e que não sofreu clivagem pela endonuclease McrBC, e uma banda referente à amplificação do gene H19 (controle da PCR-Me). Esses resultados podem ser observados nas bandas (*Lanes*) 1, 4, 5 e 6. Por outro lado, qualquer alteração na região do DNA paterno ocasionará a ausência de amplificação deste trecho do DNA pela PCR-Me e conseqüente ausência de banda visível na eletroforese, correspondendo ao resultado encontrado nas bandas 2 e 3 da Figura 3.1. Assim, deleções na região 15q11-q13 do cromossomo paterno serão detectadas pela técnica e definirão o diagnóstico de SPW. Analogamente, a técnica também permite a identificação de casos de SPW causados por dissomia uniparental materna, já que o resultado da eletroforese também será negativo para a presença da referida banda do *amplicon*.

Essa técnica, no entanto, não discrimina molecularmente as três principais causas de SPW: deleções na região 15q11-q13, dissomia uniparental

materna do cromossomo 15 e defeitos no centro de *imprinting* no cromossomo 15.

### 3.4

#### Desenvolvimento do Modelo de Diagnóstico Clínico

No modelo de diagnóstico clínico da SPW proposto por Holm *et al.* [19], a cada critério maior é atribuído um valor numérico (peso) de 1.0 e a cada critério menor, um peso de 0.5. Dessa forma, por exemplo, se um paciente apresenta dois critérios maiores e um critério menor, seu *score* calculado é igual a  $2.5 = 2 \times 1.0 + 1 \times 0.5$ . Para pacientes com idade acima de três anos, o diagnóstico clínico é confirmado se o valor final computado for maior do que 8.0, sendo 5.0 pontos provenientes de critérios maiores.

Isso em mente, neste trabalho, o desenvolvimento do modelo de diagnóstico clínico consistiu na identificação de pesos alternativos para cada um das variáveis clínicas, de forma que o resultado preditivo do modelo seja o melhor possível em termos da área sob a curva (AUC) da curva ROC do critério obtido, quando comparado a qualquer outra combinação de pesos. Em outras palavras, a combinação de pesos que maximiza o valor da AUC da curva ROC associada determina o modelo de diagnóstico clínico ótimo.

#### 3.4.1

##### Modelo de otimização

Para realizar a maximização da AUC da curva ROC, optou-se pela utilização de algoritmos de otimização global. Existem inúmeros algoritmos de otimização global sugeridos na literatura (ver, por exemplo, [131]) e optou-se pela utilização de quatro algoritmos disponíveis no software de computação científica MATLAB [132]. Os algoritmos empregados foram o de busca direta (*direct search*, DS) [133], algoritmo genético (*genetic algorithm*, GA) [134], enxame de partículas (*particle swarm*, PSO) [135] e arrefecimento simulado (*simulated annealing*, SA) [136]. Os parâmetros utilizados na execução das rotinas do MATLAB encontram-se no Apêndice C.

Antes de detalhar a formulação matemática empregada no desenvolvimento do modelo foi necessário definir os objetos matemáticos utilizados.

Sejam  $n$  o número de participantes na amostra e  $m$  o número de variáveis clínicas utilizadas no modelo de diagnóstico. No critério de Holm, por exemplo, existem 18 sinais clínicos que foram considerados, de fato, embora tenham sido apresentados 19 variáveis clínicas no trabalho original. No entanto, excluiu-se a variável relacionada à presença de deleções ou quaisquer anormalidades

moleculares na região 15q11–q13 no cromossomo de origem paterna, incluindo dissomia materna, uma vez que essa variável determina perfeitamente a presença da doença, *i.e.*, trata-se exatamente do padrão-ouro utilizado para o diagnóstico da doença. Além disso, tal critério não é clínico, *per se*, mas laboratorial.

Seja  $\mathbf{y}$  um vetor coluna de dimensões  $(n \times 1)$ , onde  $y_i$  correspondente ao resultado do exame de diagnóstico molecular do participante  $i$ , para  $i \in \{1, \dots, n\}$ . Por exemplo, se  $y_i = 1$ , o paciente apresentou resultado positivo (doente) e se  $y_i = 0$ , o resultado foi negativo e o paciente não sofre da doença (saudável).

Seja  $\boldsymbol{\omega}$  um vetor de dimensões  $(m \times 1)$ , onde  $\omega_j$  correspondente ao peso atribuído ao critério  $j$ , com  $j \in \{1, \dots, m\}$ , no modelo de diagnóstico clínico. Assim, no critério de Holm, aos critérios maiores seriam atribuídos pesos  $\omega_{\text{maior}} = 1$  e aos menores, pesos  $\omega_{\text{menor}} = 0.5$ .

Seja  $\mathbf{X}$  uma matriz de dimensões  $(n \times m)$ , onde cada elemento  $X_{ij}$  corresponde à presença ( $X_{ij} = 1$ ) ou ausência ( $X_{ij} = 0$ ) do sinal clínico  $j$  no paciente  $i$ . O vetor de *scores*  $\mathbf{s}$ , de dimensões  $(n \times 1)$  é igual ao produto  $\mathbf{X}\boldsymbol{\omega}$  e, juntamente com as informações contidas em  $\mathbf{y}$ , é utilizado para a construção da curva ROC associada aos pesos  $\omega_j$ .

É comum definir tanto a curva ROC quanto a função que retorna a área sob a curva em função do vetor  $\mathbf{s}$  [137]. Como neste caso a matrix  $\mathbf{X}$  é constante em toda a análise, pode-se definir a função AUC de uma forma mais simplificada. Seja  $\text{AUC}(\boldsymbol{\omega}) : \mathbb{R}^m \rightarrow [0, 1]$ , a função que retorna a AUC sob a curva ROC determinada pelo critério definido pelo conjunto de pesos  $\boldsymbol{\omega}$ . Por definição, a função AUC é limitada e, devido ao princípio da invariância da curva ROC, é homogênea em grau 0, *i.e.*,  $\text{AUC}(k\boldsymbol{\omega}) = \text{AUC}(\boldsymbol{\omega}), \forall k \in \mathbb{R}$ . Na realidade, a função AUC é invariante a qualquer transformação monotônica do vetor  $\boldsymbol{\omega}$ , uma vez que a ordenação dos *scores* é preservada por essas transformações [106, cap. 1].

Tais propriedades da função AUC permitem que se restrinja o espaço de soluções de  $\mathbb{R}^m$  a  $[0, 1]^m$  pois sempre será possível dividir o vetor ótimo  $\boldsymbol{\omega}^*$  por  $[(\max w_j^*) + \epsilon]$ ,  $\epsilon > 0$ , obtendo-se um novo vetor ótimo  $\boldsymbol{\omega}^{**}$  que retorna o mesmo valor ótimo  $\text{AUC}^*$  e com  $\omega_j^{**} < 1, \forall j$ .

Portanto, o problema de otimização a ser resolvido pode ser representado por:

$$\begin{aligned} & \underset{\boldsymbol{\omega}}{\text{Max}} && \text{AUC}(\boldsymbol{\omega}) \\ & \text{sujeito a} && 0 \leq \omega_i \leq 1, \quad i = 1, \dots, m. \end{aligned} \tag{3-1}$$

### 3.4.2

#### Comparação com os modelos atuais

Uma vez resolvido o problema de otimização 3-1, pode-se comparar a solução encontrada com os modelos de diagnóstico clínico de Holm e Gunay, calculando-se estatísticas tradicionais como sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, dentre outras.

Adicionalmente, pode-se comparar diretamente a AUC do critério ótimo com a do critério de Holm, permitindo uma avaliação mais ampla do desempenho desses critérios em níveis diferentes de sensibilidade e especificidade.

Com o objetivo de se realizar inferências estatísticas sobre a superioridade de um modelo sobre o outro, pode-se estimar intervalos de confiança da diferença da AUC dos critérios competidores [118, 119, 121, 138]. Em função do tamanho relativamente pequeno da amostra, a abordagem de *bootstrapping*, sugerida no artigo seminal de Efron [139], foi a empregada para a obtenção de intervalos de confiança da distribuição empírica da diferença entre as AUC de dois critérios de diagnóstico competidores [140, cap. 13]. Tal abordagem provou-se eficiente e mais satisfatória do que os intervalos de confiança paramétricos [119, 138]. Foram realizados experimentos de simulação por *bootstrap* com 100.000 replicações para a obtenção de intervalos de confiança da diferença entre a AUC dos critérios obtidos pelos modelos de otimização e a do critério de Holm.

## 4 Resultados

### 4.1 Descrição da Amostra

A amostra final do estudo consistiu em 81 observações, das quais 15 corresponderam aos pacientes com resultado do teste de PCR-Me positivo e 66 aos pacientes com resultado negativo. Das observações correspondentes aos pacientes com resultado negativo, oito foram excluídas da amostra porque esses pacientes não apresentaram quaisquer critérios clínicos dos 18 analisados e nada contribuiriam ao modelo de diagnóstico clínico, *i.e.*, independentemente dos pesos ótimos encontrados, o resultado do *score* do modelo seria sempre nulo. A tabela 4.1 apresenta algumas características da amostra final de 73 observações (15 positivos e 58 negativos).

Tabela 4.1: Descrição da amostra

Critério clínico	% Amostra	% (+)	% (-)	S	E	$\chi^2$	valor-p
Hipotonia	57,5	93,3	48,3	0,93	0,52	9,90	0,0017
Problemas de alimentação	68,5	100,0	60,3	1,00	0,40	8,68	0,0032
Ganho de peso excessivo	56,2	60,0	55,2	0,60	0,45	0,11	0,7370
Hipogonadismo	37,0	66,7	29,3	0,67	0,71	7,14	0,0076
Atraso no desenvolvimento	83,6	100,0	79,3	1,00	0,21	3,71	0,0540
Hiperfagia	80,8	93,3	77,6	0,93	0,22	1,91	0,1673
Fácies típica	41,1	60,0	36,2	0,60	0,64	2,79	0,0950
Movimentos fetais diminuídos	17,8	26,7	15,5	0,27	0,84	1,01	0,3144
Problemas de comportamento	58,9	86,7	51,7	0,87	0,48	6,01	0,0142
Apnéia do sono	31,5	40,0	29,3	0,40	0,71	0,63	0,4270
Baixa estatura	35,6	60,0	29,3	0,60	0,71	4,90	0,0269
Hipopigmentação	21,9	33,3	19,0	0,33	0,81	1,44	0,2305
Mãos e pés pequenos	39,7	66,7	32,8	0,67	0,67	5,72	0,0167
Mão estreitas	35,6	60,0	29,3	0,60	0,71	4,90	0,0269
Miopia / esotropia	23,3	26,7	22,4	0,27	0,78	0,12	0,7283
Saliva viscosa	20,5	33,3	17,2	0,33	0,83	1,89	0,1692
Defeitos na fala	64,4	80,0	60,3	0,80	0,40	2,01	0,1565
Dermatilomania	49,3	73,3	43,1	0,73	0,57	4,36	0,0369

As colunas “% Amostra”, “% (+)” e “% (-)” da tabela 4.1 apresentam os percentuais de prevalência de cada critério clínico em toda a amostra, nos pacientes positivos e nos pacientes negativos, respectivamente. Alguns crité-

rios foram relativamente prevalentes em toda a amostra, como o atraso no desenvolvimento psicomotor e a hiperfagia, enquanto outros foram mais prevalentes apenas nos pacientes positivos – hipotonia, problemas na alimentação, problemas de comportamento e defeitos na articulação da fala.

As sensibilidades e especificidades de cada variável clínica também se encontram na tabela 4.1, nas colunas “S” e “E”, respectivamente. Os valores de sensibilidade refletem, naturalmente, os percentuais de prevalência dos sinais clínicos no grupo de pacientes com resultado positivo no teste de PCR-Me.

Finalmente, nas duas últimas colunas da tabela 4.1, denominadas  $\chi^2$  e **valor-p**, estão os resultados dos testes qui-quadrado de todas as variáveis clínicas consideradas no critério de Holm. Os resultados do teste  $\chi^2$  da tabela indicaram que em apenas oito variáveis clínicas foi possível rejeitar a hipótese nula de independência a 5%: hipotonia, problemas de alimentação, hipogonadismo, problemas de comportamento, baixa estatura, acromicria, mãos estreitas e dermatilomania.

A aplicação dos critérios de Holm e Gunay na amostra gerou os resultados apresentados na tabela 4.2.

Tabela 4.2: Desempenho dos critérios de Holm e Gunay

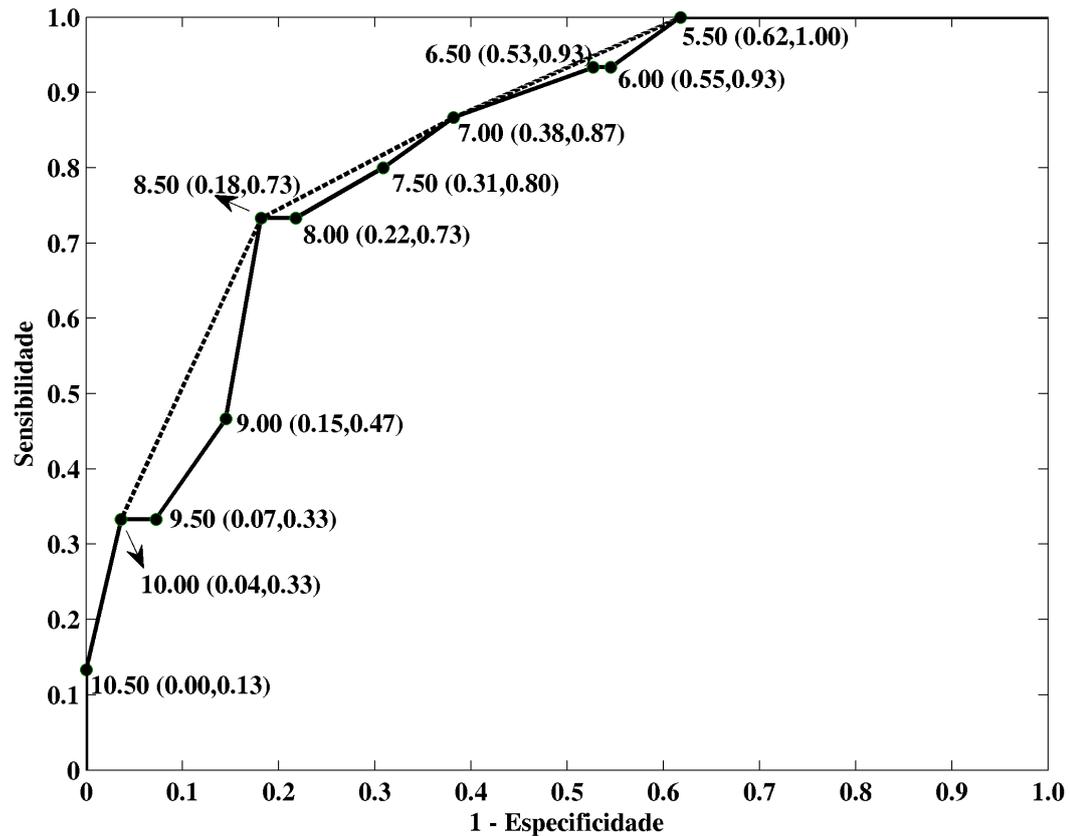
Estatística	Holm	Gunay
Sensibilidade	0,733	0,933
Especificidade	0,741	0,517

Com o objetivo de ilustrar a análise da curva ROC, a figura 4.1 apresenta a curva ROC para o critério de Holm. A linha tracejada corresponde à envoltória convexa da curva ROC (*ROC convex hull* – ROCCH).

Como o critério de Holm é subdividido em duas faixas etárias – menores e maiores de três anos de idade – foi necessário excluir três observações da amostra para que se fosse possível desenhar a curva ROC, uma vez que o ponto de corte do critério de Holm é diferente em cada faixa etária. Essas três observações corresponderam aos pacientes com idade entre dois e três anos de idade. Dessa forma, essa sub-amostra de 70 participantes foi a utilizada em todas as análises apresentadas no restante deste trabalho.

Na curva ROC da figura 4.1, cada ponto de corte equivale a um par (1 - especificidade, sensibilidade). O valor de corte igual a 8.0, localizado nas coordenadas (0.22,0.73), corresponde ao critério clínico original de Holm *et al.* [19] e que, na amostra, apresentou sensibilidade de 0.73 e especificidade de 0.78 (1-0.22). Análise similar pode ser feita nos demais pontos de corte, que vão de 5.5 (0.62,1.00) a 10.5 (0.00,0.13). Por exemplo, o valor de corte 5.5

Figura 4.1: Curva ROC do critério de Holm



corresponde ao ponto no qual a sensibilidade do critério é de 100%, *i.e.*, não há falsos-negativos, e a especificidade é de 0.38. Nota-se que o ponto de corte 8.5 possui desempenho superior ao originalmente proposto, uma vez que para o mesmo valor de sensibilidade (0.73) opera a uma especificidade de 0.82.

## 4.2

### Otimização da AUC

A tabela 4.3 apresenta o resultado das otimizações da AUC, para cada algoritmo de otimização. Os valores máximos da AUC para cada algoritmo encontram-se na linha “AUC<sub>max</sub>”.

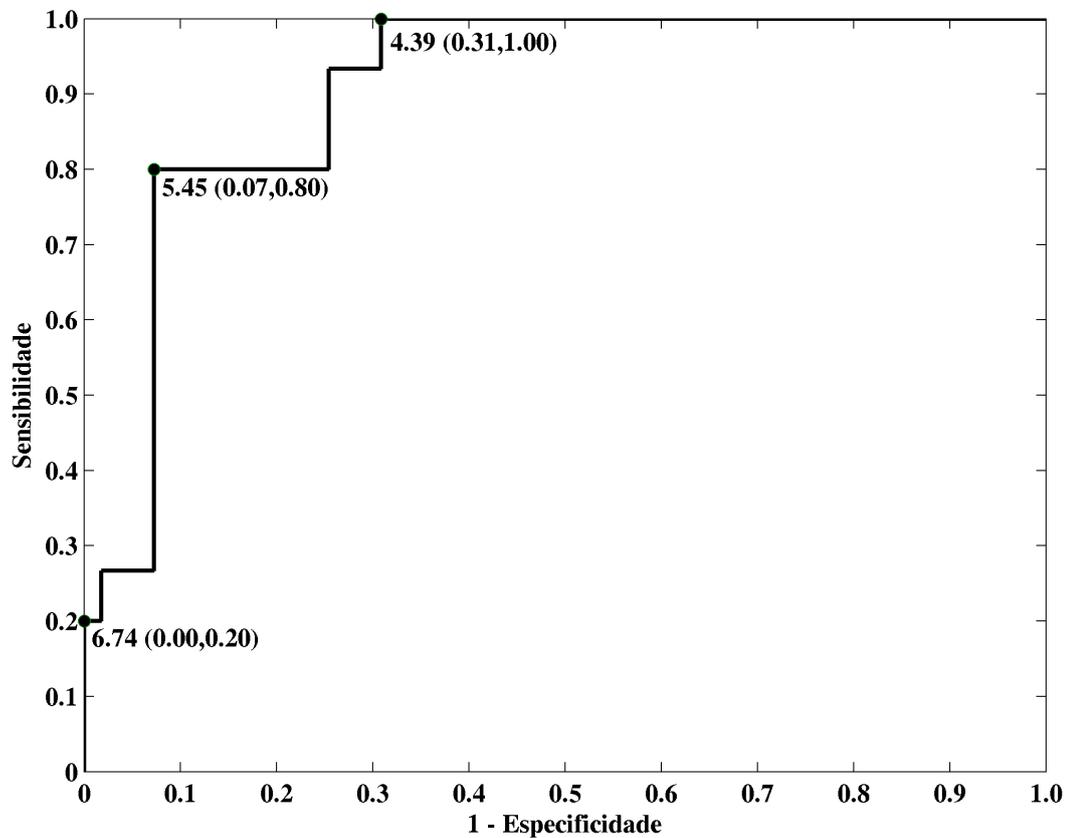
A curva ROC obtida a partir da solução encontrada pelo algoritmo de otimização DS está representada na figura 4.2. Os pontos marcados na figura correspondem aos pontos de operação pertencentes à envoltória convexa da curva ROC. Percebe-se que o ponto cujo valor de corte é igual a 5.45 oferece um desempenho bastante satisfatório, com sensibilidade igual a 80% e especificidade de 93%.

A solução encontrada pelo algoritmo GA encontra-se na figura 4.3. O ponto correspondente ao valor de corte de 5.51 tem um desempenho semelhante

Tabela 4.3: Resultados da otimização

Critério clínico	DS	GA	PSO	SA
AUC <sub>max</sub>	0,9055	0,9006	0,9115	0,8909
Hipotonia	0,9159	0,8984	0,9468	0,6320
Problemas de alimentação	1,0000	0,8702	0,9908	0,9439
Ganho de peso excessivo	0,0691	0,0427	0,0068	0,0012
Hipogonadismo	0,3914	0,4076	0,7752	0,2144
Atraso no desenvolvimento	0,8833	0,8830	0,8334	0,8903
Hiperfagia	0,4904	0,4612	0,0333	0,0025
Fácies típica	0,0110	0,0175	0,4933	0,0020
Movimentos fetais diminuídos	0,0109	0,0328	0,0026	0,0256
Problemas de comportamento	0,6765	0,9787	0,6552	0,8671
Apnéia do sono	0,0332	0,0322	0,0020	0,0336
Baixa estatura	0,5984	0,8155	0,2811	0,5387
Hipopigmentação	0,2562	0,2187	0,0652	0,0159
Mãos e pés pequenos	0,2417	0,2146	0,1618	0,0808
Mão estreitas	0,6636	0,6938	0,3159	0,2198
Miopia / esotropia	0,4366	0,4909	0,1895	0,1020
Saliva viscosa	0,4248	0,4267	0,1588	0,2277
Defeitos na fala	0,0894	0,0459	0,0050	0,0190
Dermatilomania	0,3374	0,3243	0,1374	0,1408

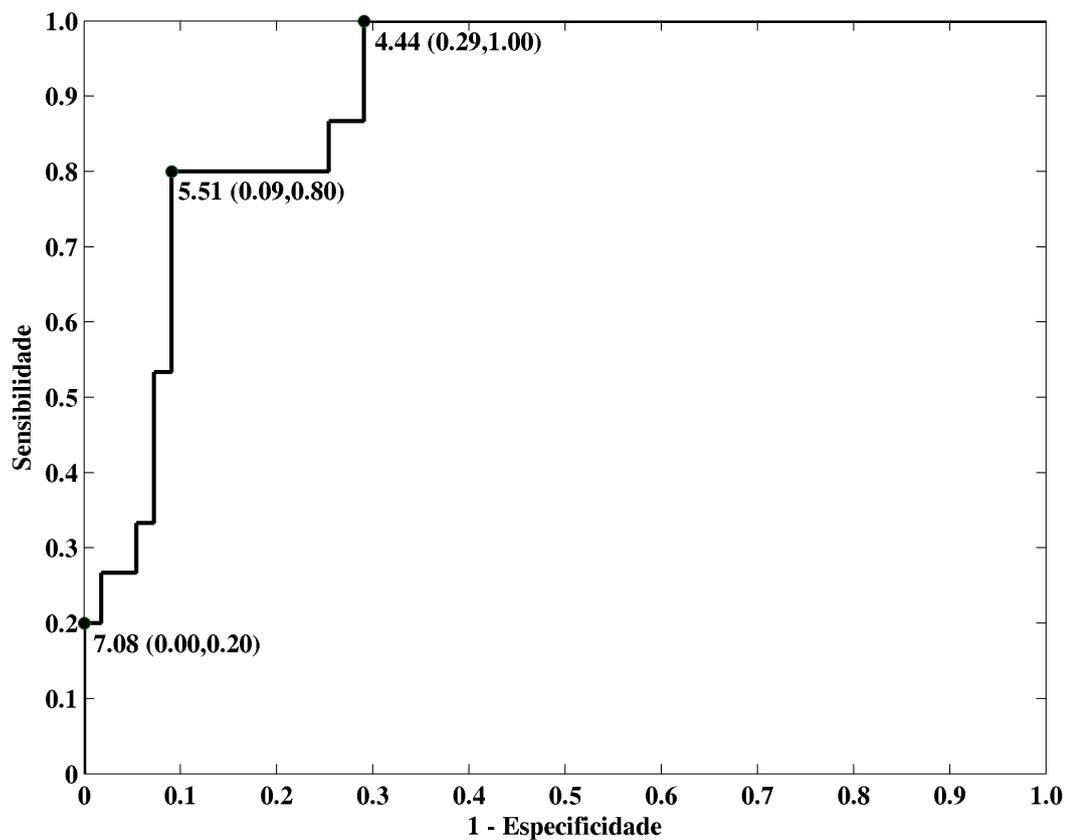
Figura 4.2: Curva ROC da solução DS – AUC = 0.9055



ao ponto de valor de corte 5.45 da figura 4.2, discutido anteriormente, com sensibilidade igual a 80% e especificidade de 91%.

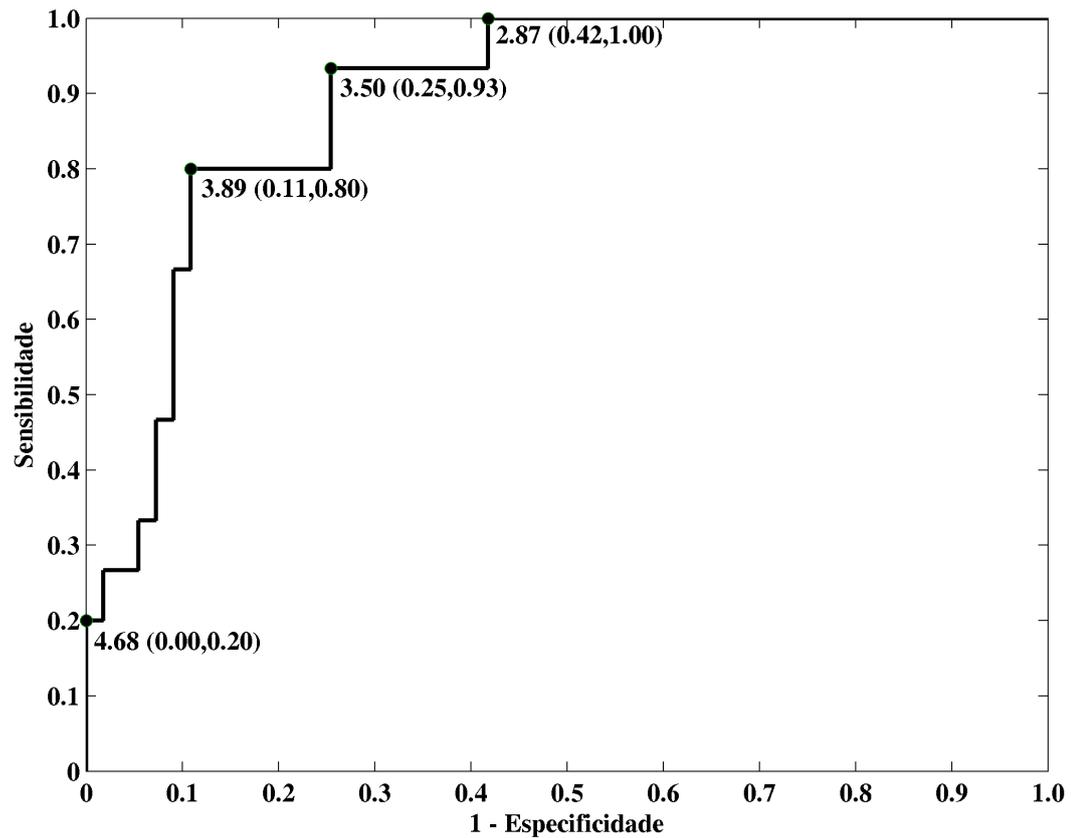
Apesar de a solução encontrada pelo algoritmo GA ter produzido o terceiro maior valor da AUC, esse conjunto de pesos gerou o ponto de operação com sensibilidade de 100% com maior valor de especificidade de todos os quatro algoritmos. Esse ponto corresponde ao valor de corte igual a 4.44, que opera a 100% de sensibilidade e a 71% de especificidade. Em comparação, os pontos que operam a 100% de sensibilidade das demais soluções operam a 69%, 64% e 58% de especificidade, respectivamente para os algoritmos DS, PSO e SA.

Figura 4.3: Curva ROC da solução GA – AUC = 0.9006



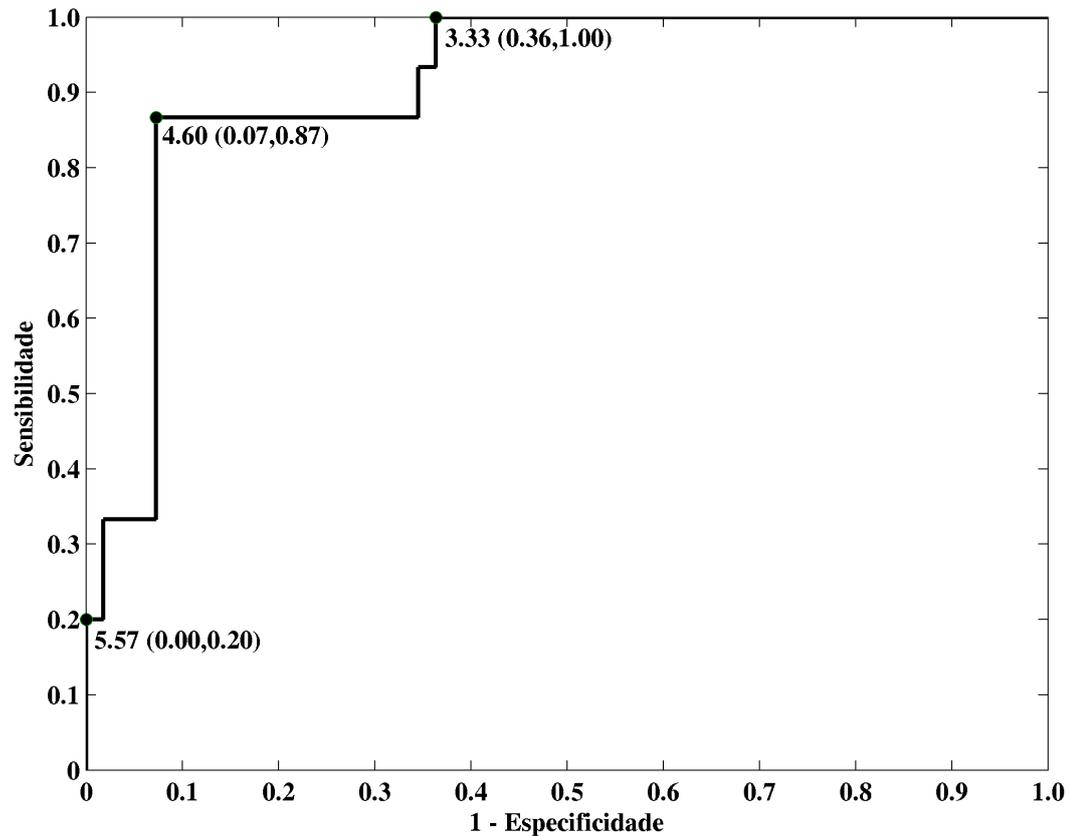
A figura 4.4 ilustra a curva ROC relativa à solução do algoritmo SA. Nessa curva, dois pontos de operação são dignos de nota. O primeiro, cujo valor de corte é igual a 3.50, opera a uma sensibilidade de 93% e a uma especificidade de 75%, enquanto que o segundo, com valor de corte igual a 3.89, opera a 80% de sensibilidade e a 89% de especificidade, sendo, portanto, inferior aos pontos com valores de corte iguais a 5.45 na solução DS e 5.51 na solução GA.

Figura 4.4: Curva ROC da solução SA – AUC = 0.8909



A curva ROC de maior área dentre as geradas pelas soluções dos quatro algoritmos encontra-se na figura 4.5. A solução encontrada pelo algoritmo PSO permite a construção de um modelo de diagnóstico que alcança elevados valores de sensibilidade – 87% – e especificidade – 93% – com um ponto de corte igual a 4.60.

Figura 4.5: Curva ROC da solução PSO – AUC = 0.9115



### 4.3

#### Avaliação do Modelo de Diagnóstico Clínico

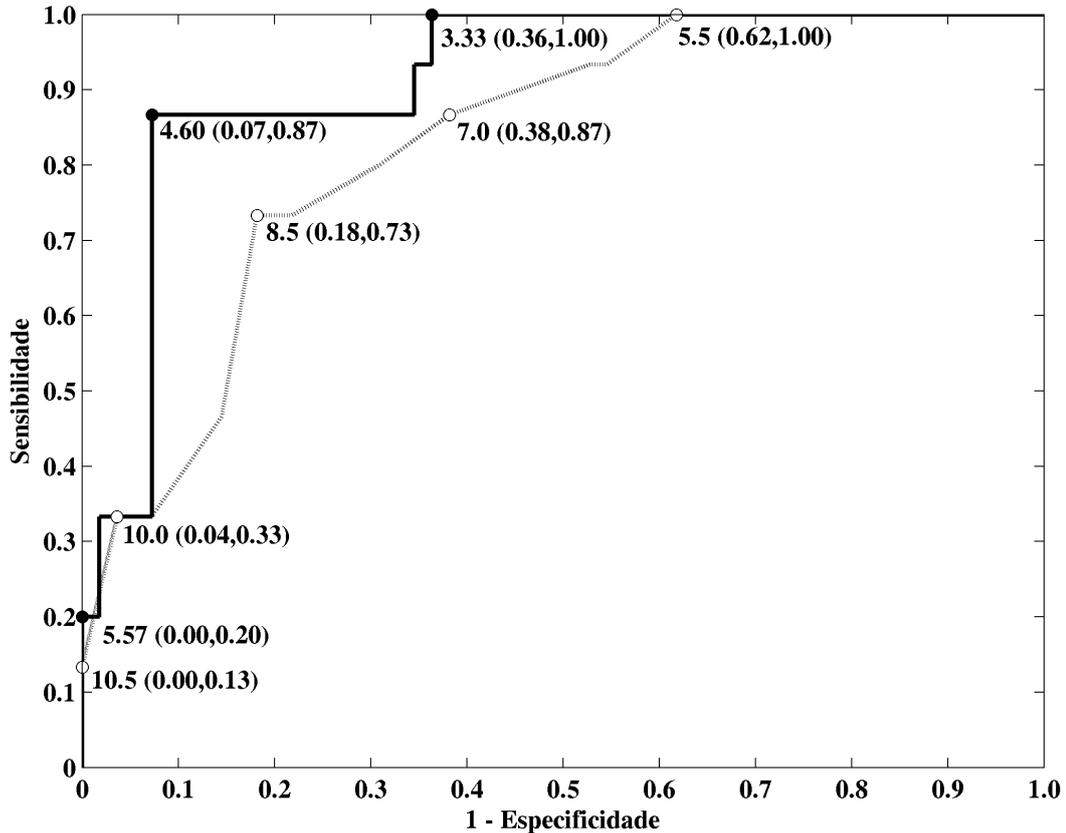
Nesta seção, os resultados obtidos pelos diferentes algoritmos de otimização são analisados à luz do critério de Holm, com destaque aos resultados obtidos pelo algoritmo PSO.

São apresentados também os resultados das simulações de *bootstrap*, realizadas com o objetivo de se calcular intervalos de confiança para a diferença entre as áreas sob as curvas ROC produzidas pelos algoritmos e a AUC da curva ROC do critério de Holm. Em posse desses intervalos de confiança, é possível realizar testes de hipótese relativos à superioridade de cada solução em relação ao critério de Holm.

Inicialmente, na figura 4.6, foram comparadas a curva ROC do algoritmo PSO com a do critério de Holm. Nota-se que todos os pontos de operação relevantes da curva ROC PSO se encontram em posição dominante em relação aos pontos de operação do critério de Holm. Por exemplo, a uma sensibilidade de %100, a curva ROC PSO opera a especificidade de %64, comparados a %38 do critério de Holm, um ganho de %26. Similarmente, a um nível de sensibilidade de %87, a curva ROC PSO opera a %93 de especificidade, enquanto

a curva ROC do critério de Holm alcança apenas %62 de especificidade, um aumento de %31 em um nível de sensibilidade particularmente significativo. Análises semelhantes relativas às demais soluções de otimização – DS, GA e SA – geraram figuras que podem ser encontradas no Apêndice D.

Figura 4.6: Comparação solução PSO e Holm



Os histogramas relativos às distribuições das diferenças entre as áreas sob as curvas ROC do critério de Holm e os critérios derivados das soluções de otimização encontram-se na figura 4.7.

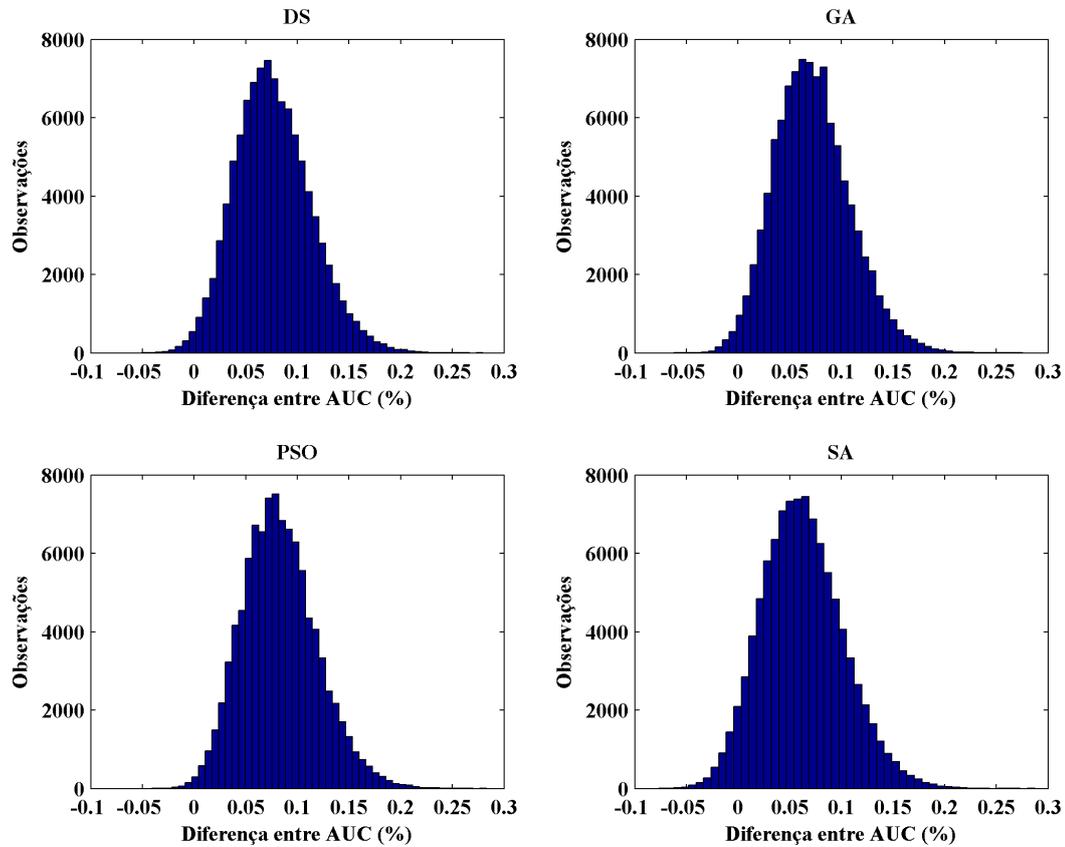
De uma forma geral, as distribuições apresentam assimetria levemente positiva, com caudas mais longas no lado positivo. Não há indícios visuais claros de diferenças notáveis entre as distribuições das diferentes soluções de otimização. A tabela 4.4 apresenta algumas estatísticas dessas distribuições.

Tabela 4.4: Resultados da simulação por *bootstrap*

Algoritmo	Média	Mediana	Moda	DP	p2.5	p5.0	p25	p75	p95	p97.5
DS	7,68	7,45	6,67	3,68	1,09	2,06	5,09	10,00	14,12	15,52
GA	7,20	6,97	6,91	3,65	0,79	1,64	4,67	9,52	13,58	15,03
PSO	8,29	8,06	8,24	3,61	1,94	2,79	5,76	10,55	14,67	16,06
SA	6,25	6,06	6,42	3,93	-0,85	0,18	3,52	8,79	13,09	14,55

A coluna DP corresponde ao desvio-padrão, e as colunas p2.5, p5.0, p25,

Figura 4.7: Histogramas das diferenças da AUC estimadas pelo método de *bootstrap* para cada solução de otimização



p75, p95 e p97.5 aos percentis 2.5, 5.0, 25, 75, 95 e 97.5, respectivamente. A distribuição das diferenças de AUC produzida pela solução do algoritmo PSO apresentou as maiores média (8.29%), mediana (8.06%) e moda (8.24%), assim como o menor desvio-padrão (3.61%).

Finalmente, foi possível realizar um teste de hipóteses no qual a hipótese nula  $H_0$  equivale à hipótese de que a diferença entre as áreas sob as curvas de uma solução específica e a do critério de Holm é igual a zero. De acordo com os resultados da tabela 4.5, rejeitou-se a hipótese nula com as soluções geradas por todos os algoritmos empregados, com maior destaque para a solução do algoritmo PSO, que apresentou o menor valor-p (0.0035).

Tabela 4.5: Testes de hipótese dos experimentos de *bootstrap*

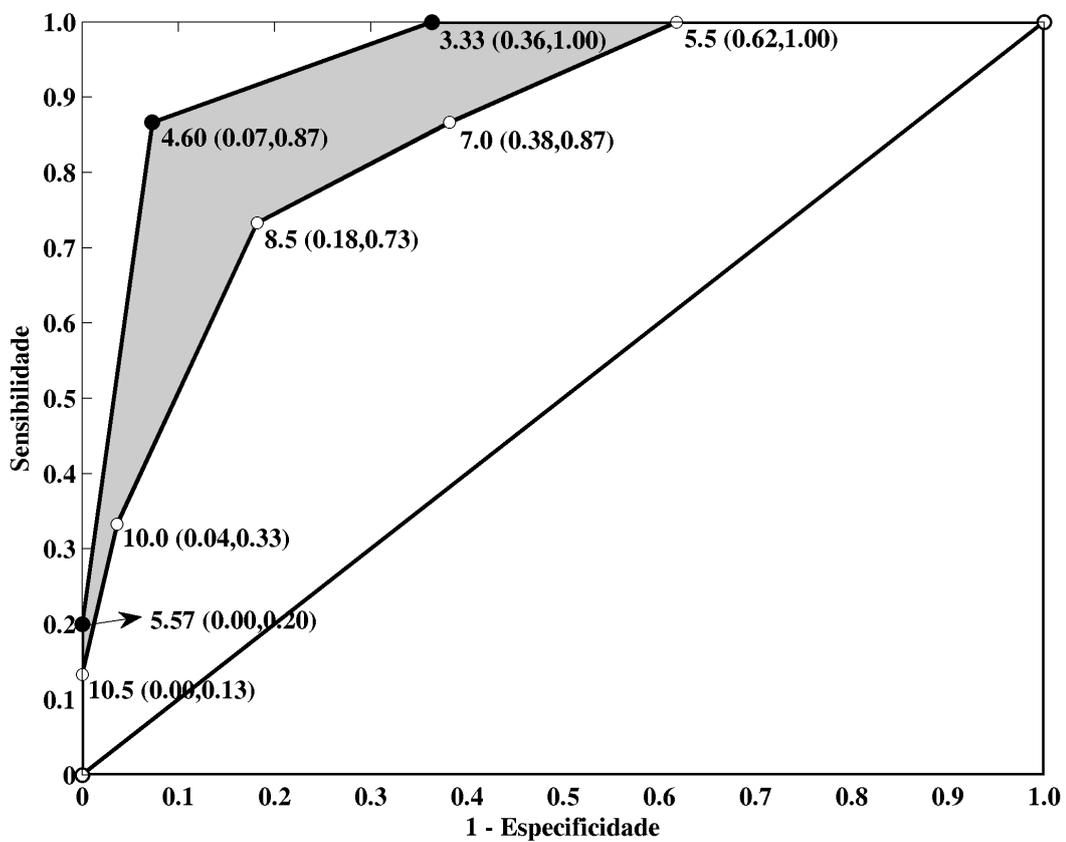
Algoritmo	Valor-p, $H_0 : \text{dif}_{\text{AUC}} = 0$
DS	0,0094
GA	0,0127
PSO	0,0035
SA	0,0445

#### 4.4

#### Modelo de Diagnóstico Clínico para a SPW

Com base nos resultados encontrados, propõe-se o critério diagnóstico definido pela solução encontrada pelo algoritmo PSO como alternativa significativamente superior ao critério de Holm para o diagnóstico clínico da Síndrome de Prader-Willi. A figura 4.8 ilustra a diferença entre as envoltórias convexas dos dois critérios, confirmando o achado de que o critério PSO domina integralmente o de Holm. A área hachurada equivale a uma diferença de aproximadamente 8.5%.

Figura 4.8: ROCCH do modelo proposto e do critério de Holm



Na tabela 4.6 estão colocados, lado a lado, os diferentes pesos atribuídos a cada variável clínica de ambos os critérios, assim como os respectivos pontos de corte.

Tabela 4.6: Modelo proposto de diagnóstico clínico de SPW

Sinais e sintomas da SPW	Holm	Proposta
Hipotonia	1,0000	0,9556
Problemas de alimentação	1,0000	1,0000
Ganho de peso excessivo	1,0000	0,0069
Hipogonadismo	1,0000	0,7823
Atraso no desenvolvimento	1,0000	0,8412
Hiperfagia	1,0000	0,0336
Fácies típica	1,0000	0,4978
Movimentos fetais diminuídos	0,5000	0,0026
Problemas de comportamento	0,5000	0,6613
Apnéia do sono	0,5000	0,0020
Baixa estatura	0,5000	0,2837
Hipopigmentação	0,5000	0,0658
Mãos e pés pequenos	0,5000	0,1633
Mão estreitas	0,5000	0,3188
Miopia / esotropia	0,5000	0,1912
Saliva viscosa	0,5000	0,1603
Defeitos na fala	0,5000	0,0051
Dermatilomania	0,5000	0,1387
Ponto de corte	8,0000	4,6000

## 5 Discussão

### 5.1 Análise da Amostra

Todos os pacientes com teste de metilação positivo apresentaram problemas de alimentação e atraso no desenvolvimento, enquanto que em apenas 26.7% deles foram relatados movimentos fetais diminuídos e miopia ou esotropia. Nos pacientes negativos, os critérios clínicos mais prevalentes foram os problemas de alimentação, atraso no desenvolvimento, hiperfagia e problemas na articulação da fala. Ainda, a maior diferença na prevalência dos critérios clínicos entre os dois grupos foi observada nos critérios de hipotonia, problemas de alimentação e hipogonadismo, confirmando os primeiros relatos da SPW [22, 35]. Por sua vez, ganho de peso excessivo e miopia/esotropia foram observados em, praticamente, a mesma proporção em ambos os grupos. A aparente falta de importância do ganho de peso excessivo e obesidade também já foi relatada [77].

As variáveis clínicas de maior especificidade foram hipogonadismo, movimentos fetais diminuídos, apnéia do sono, baixa estatura, hipopigmentação, mãos estreitas, miopia/esotropia e saliva viscosa. A maioria dos critérios menores de Holm apresentou valores de especificidade maiores do que 0.65 (8 em 11), sugerindo que esse critérios possam ser mais úteis para o diagnóstico clínico da SPW do que se imaginava.

A tabela 5.1 compara as sensibilidades encontradas por Gunay *et al.* [20] com as observadas na amostra.

As variações mais marcantes entre a amostra deste estudo e a utilizada para definir o critério de Gunay ocorreram nos critérios maiores “ganho de peso excessivo” e “hipogonadismo”, e nos critérios menores “movimentos fetais diminuídos”, “baixa estatura” e “saliva viscosa”. Em todos esses casos, a sensibilidade desses critérios na amostra de Gunay-Aygun *et al.* [20] foi consideravelmente superior à observada na amostra deste estudo. No entanto,

Tabela 5.1: Comparação entre a amostra do estudo e a utilizada em Gunay-Aygun *et al.* [20]

Critérios maiores	Amostra	Gunay-Aygun <i>et al.</i> [20]
Hipotonia	93,3	97,5
Problemas de alimentação	100,0	95,7
Ganho de peso excessivo	60,0	95,0
Hipogonadismo	66,7	95,6
Atraso no desenvolvimento	100,0	97,8
Hiperfagia	93,3	93,4
Fácies típica	60,0	49,4

Critérios menores	Amostra	Gunay-Aygun <i>et al.</i> [20]
Movimentos fetais diminuídos	26,7	89,3
Problemas de comportamento	86,7	82,1
Apnéia do sono	40,0	36,8
Baixa estatura	60,0	86,0
Hipopigmentação	33,3	47,0
Mãos e pés pequenos	66,7	74,7
Mão estreitas	60,0	69,0
Miopia / esotropia	26,7	49,2
Saliva viscosa	33,3	82,5
Defeitos na articulação da fala	80,0	93,1
Dermatilomania	73,3	61,3

dentre os critérios cuja sensibilidade variou muito entre as amostras, apenas faz parte dos critérios maiores empregados no critério de Gunay – “hipogonadismo” – o que pode explicar a alta sensibilidade do critério de Gunay na amostra deste estudo, apesar das variações observadas.

## 5.2

### Avaliação dos Critérios Clínicos de Holm e Gunay

Corroborando os resultados de [18] e [21], o desempenho de ambos os critérios clínicos atualmente propostos na literatura para o diagnóstico da SPW foi mediano.

O critério de Gunay (S=0.93, E=0.52), uma simplificação do critério de Holm, apresentou desempenho deveras leniente, com uma taxa de falso positivos de quase 50%. Esse desempenho é fraco, tendo em vista que se trata de uma doença genética de baixíssima incidência e sem tratamento solidamente estabelecido, condições que desfavorecem critérios de alta sensibilidade em detrimento da especificidade. Além disso, o exame molecular de diagnóstico não está disponível amplamente no Brasil e, quanto o está, seu custo é proibitivo para a maioria da população.

Já o critério de Holm – modificado de forma a excluir a variável relativa à presença de deleções na região 15q11-q13 ou de outras anormalidades citogenéticas ou moleculares nessa região – apresentou desempenho um pouco melhor em termos de sensibilidade (0.73) e especificidade (0.74), porém ainda aquém do desempenho obtido pelo modelo proposto neste trabalho ( $S=0.87$ ,  $E=0.93$ ).

Percebeu-se também que o ponto de corte do critério de Holm para pacientes acima de 3 anos pode ser alterado para 8.5, pois o desempenho do critério nesse ponto de operação foi superior ao do ponto de corte sugerido originalmente, que é igual a 8.0.

Além dessa mudança, o critério de Holm pode sofrer outras duas alterações. A primeira relaciona-se com a presença de anormalidades moleculares na região 15q11-q13. Como o padrão-ouro do diagnóstico da SPW é exatamente a descoberta de tais alterações, essa variável perde o sentido. Gunay-Aygun *et al.* [20] já haviam excluído esse quesito.

Em segundo lugar, a restrição de que parte do total de pontos do critério de Holm deva ser oriunda dos critérios maiores – 4 em um total de 5 para menores de 3 anos e 5 em um total de 8 para os maiores de três anos – pode ser abolida. Tal restrição mostrou-se inócua uma vez que nenhum participante deixou de ser classificado como positivo por causa dela e diversos participantes com resultado negativo por não terem atingido o total mínimo ainda assim cumpriram com a exigência.

### 5.3

#### Otimização da AUC

O algoritmo que alcançou a melhor marca para a área sob a curva ROC do modelo de diagnóstico associado foi o algoritmo PSO, com uma  $AUC_{\max}$  igual a 0.9115, seguido pelo algoritmo de busca direta (DS), com uma  $AUC_{\max} = 0.9055$ , pelo algoritmo GA ( $AUC_{\max} = 0.9006$ ) e pelo algoritmo SA ( $AUC_{\max} = 0.8909$ ).

A variação dos pesos dados a cada critério clínico por cada algoritmo foi pequena, em geral, com algumas exceções. Enquanto o algoritmo PSO atribuiu um peso igual a 0.7752 ao hipogonadismo, os demais algoritmos atribuíram pesos consideravelmente menores: DS (0.3914), GA (0.4076) e SA (0.2144). O mesmo ocorreu com o sinal de fácies típica, cujos pesos atribuídos pelos demais algoritmos foram quase 40 vezes menores do que o atribuído pelo algoritmo PSO. Já o peso atribuído pelo PSO à hiperfagia foi significativamente menor do que os atribuídos pelos algoritmos DS e GA.

Apesar dessas variações, alguns sinais/sintomas receberam pesos altos em todos os critérios – hipotonia, problemas de alimentação, atraso no desenvolvimento e problemas de comportamento. Por outro lado, alguns parecem não ser tão relevantes para o diagnóstico clínico da SPW, de acordo com os quatro algoritmos: ganho de peso excessivo, movimentos fetais diminuídos, apnéia do sono e defeitos na articulação da fala.

Fazendo uso da propriedade de invariância das curvas ROC, é possível redefinir os pesos de forma que a soma deles seja igual a um (ou 100%), permitindo, assim, que se possa analisar os pesos relativos de cada variável na composição final do *score*. O resultado dessa normalização encontra-se na tabela 5.2.

Tabela 5.2: Resultados da otimização normalizados

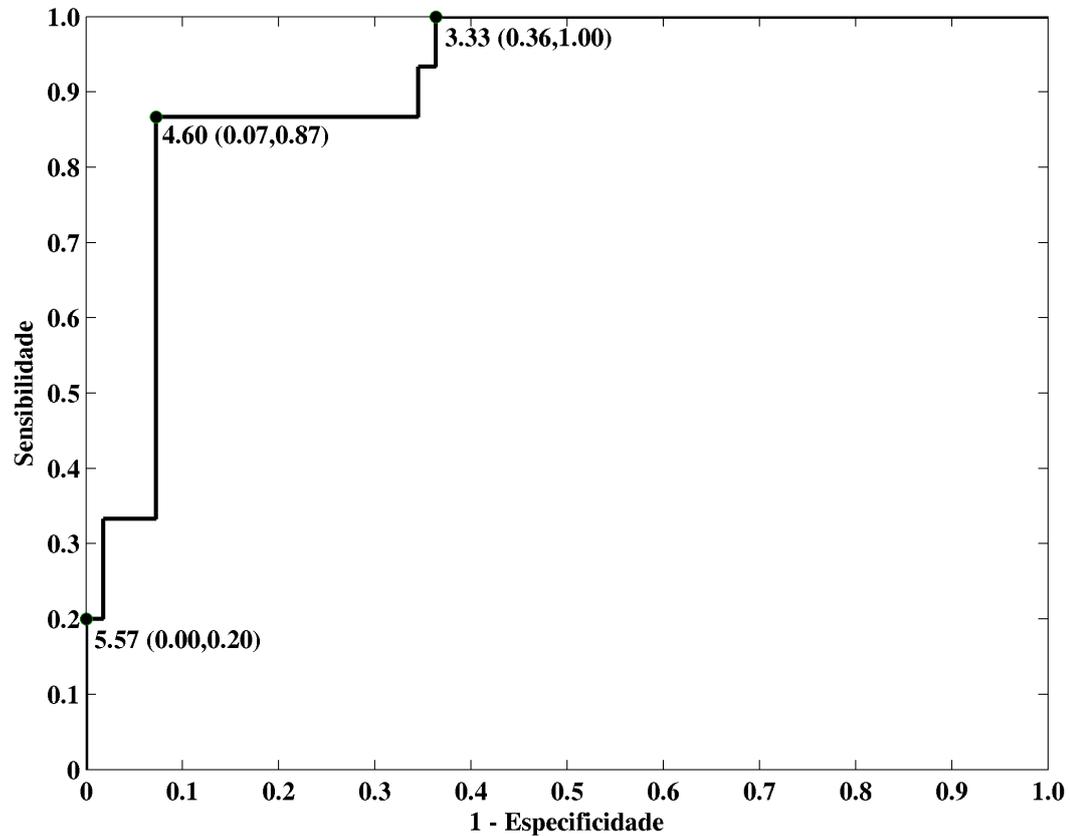
Algoritmo	DS	GA	PSO	SA
AUC <sub>max</sub>	0,9055	0,9006	0,9115	0,8909
Hipotonia	12,2	11,4	15,6	12,7
Problemas de alimentação	13,3	11,1	16,4	19,0
Ganho de peso excessivo	0,9	0,5	0,1	0,0
Hipogonadismo	5,2	5,2	12,8	4,3
Atraso no desenvolvimento	11,7	11,2	13,8	18,0
Hiperfagia	6,5	5,9	0,5	0,1
Fácies típica	0,1	0,2	8,1	0,0
Movimentos fetais diminuídos	0,1	0,4	0,0	0,5
Problemas de comportamento	9,0	12,5	10,8	17,5
Apnéia do sono	0,4	0,4	0,0	0,7
Baixa estatura	7,9	10,4	4,6	10,9
Hipopigmentação	3,4	2,8	1,1	0,3
Mãos e pés pequenos	3,2	2,7	2,7	1,6
Mão estreitas	8,8	8,8	5,2	4,4
Miopia / esotropia	5,8	6,2	3,1	2,1
Saliva viscosa	5,6	5,4	2,6	4,6
Defeitos na fala	1,2	0,6	0,1	0,4
Dermatilomania	4,5	4,1	2,3	2,8

Conclui-se que apenas seis variáveis – hipotonia, problemas de alimentação, hipogonadismo, atraso no desenvolvimento, problemas de comportamento e fácies típica – totalizam 77.5% do total de pontos da solução PSO.

A curva ROC do algoritmo PSO é destacada novamente na figura 5.1. A solução encontrada pelo algoritmo PSO permite a construção de um modelo de diagnóstico que alcança elevados valores de sensibilidade – %87 – e especificidade – 93% – com um ponto de corte igual a 4.60. Esses valores indicam que, dos 15 pacientes positivos, 13 foram corretamente identificados,

*i.e.*, houve apenas dois falsos-negativos, e que, dos 55 pacientes negativos, 51 foram corretamente classificados, *i.e.*, somente quatro pacientes saudáveis foram falsamente diagnosticados com SPW.

Figura 5.1: Curva ROC da solução PSO – AUC = 0.9115



#### 5.4

#### Desenvolvimento de Modelos Quantitativos para Diagnóstico Clínico

A abordagem de maximização da AUC da curva ROC no desenvolvimento de modelos de diagnóstico é largamente empregada na literatura, particularmente em estudos de biomarcadores oncológicos [137, 141, 142] e em técnicas de diagnósticos radiológicos [143, 144]. Foram sugeridos modelos paramétricos e que apresentam soluções analíticas [141, 144], assim como modelos livres de premissas a respeito da distribuição da amostra [137, 145]. Uma discussão mais detalhada sobre a abordagem de maximização da AUC da curva ROC pode ser encontrada em [106, cap. 4].

Nesses trabalhos, os diferentes critérios clínicos ou biomarcadores foram combinados de forma linear, *i.e.*, o *score* calculado para cada paciente é uma combinação linear dos critérios clínicos. No presente estudo, optou-se também por uma forma funcional linear para o cálculo do *score* e pela utilização de

uma abordagem estatística não-paramétrica, livre de quaisquer premissas sobre as distribuições das observações positivas (indivíduos portadores da SPW) e negativas (indivíduos saudáveis) [106, Capítulo 10]. Naturalmente, essa escolha permite uma maior flexibilidade na montagem do problema, apesar de exigir a utilização de uma abordagem computacional intensa, uma vez que as soluções são encontradas por métodos numéricos.

O presente estudo permitiu a reflexão sobre a viabilidade de se desenvolver modelos quantitativos de diagnóstico clínico, em geral, e para o diagnóstico da SPW, em particular.

Primeiramente, demonstrou-se a praticabilidade da utilização de algoritmos de otimização global na maximização da AUC da curva ROC de um critério de diagnóstico, uma abordagem, até então, inédita na literatura.

O objetivo desses algoritmos é encontrar a solução global de modelos complexos – freqüentemente não-lineares, porém limitados ou sob restrições – na presença de múltiplos ótimos locais. A aplicação desses algoritmos é ampla, desde a alocação de recursos financeiros em carteiras de investimento e o desenho de malhas logísticas eficientes à previsão da estrutura terciária de proteínas [146].

Demonstrou-se também que a utilização de modelos quantitativos no desenvolvimento de critérios clínicos de diagnóstico não só pode, como deve, ser inserida no contexto maior da “medicina baseada em evidências”. Os avanços computacionais incessantes permitem que tais ferramentas sejam facilmente implementados em planilhas eletrônicas ou em aplicativos para *smart phones*, podendo ser utilizados à beira do leito por médicos com conhecimentos clínicos básicos, agilizando o encaminhamento dos pacientes com resultados positivos para serviços mais especializados. Naturalmente, a avaliação do clínico especializado, seja ele um pediatra ou geneticista, não deve nunca se render à tirania dos modelos quantitativos mas sim incorporar tais ferramentas ponderadamente, como ditam os preceitos fundamentais da medicina baseada em evidências [1, 2].

Ademais, a simples categorização, presente em diversos critérios clínicos de diagnóstico, em “critérios maiores” e “critérios menores” baseada em “consensos de especialistas” deve ser substituída por modelos quantitativos, desenvolvidos também por esses mesmos especialistas, porém utilizando-se técnicas quantitativas modernas e sofisticadas. Este estudo preenche esta lacuna ilustrando a aplicação, de forma integrada, de metodologias conhecidas há décadas com o objetivo de resolver um problema clínico até o momento sem solução satisfatória.

## 5.5

### Proposta de um Modelo de Diagnóstico Clínico para a SPW

Finalmente, foi possível construir um modelo de diagnóstico clínico de indicação de realização de testes moleculares em pacientes suspeitos de SPW com elevada precisão. Confirmando-se os resultados deste estudo em outras amostras, pode até ser possível utilizar o modelo proposto para diagnosticar a doença, caso o nível elevado de especificidade seja mantido em amostras de validação. Reproduz-se, na tabela 5.3, o modelo proposto para o diagnóstico clínico da SPW.

Tabela 5.3: Modelo proposto de diagnóstico clínico da SPW

Sinais e sintomas da SPW	Pesos
Hipotonia	0,9556
Problemas de alimentação	1,0000
Ganho de peso excessivo	0,0069
Hipogonadismo	0,7823
Atraso no desenvolvimento	0,8412
Hiperfagia	0,0336
Fácies típica	0,4978
Movimentos fetais diminuídos	0,0026
Problemas de comportamento	0,6613
Apnéia do sono	0,0020
Baixa estatura	0,2837
Hipopigmentação	0,0658
Mãos e pés pequenos	0,1633
Mão estreitas	0,3188
Miopia / esotropia	0,1912
Saliva viscosa	0,1603
Defeitos na fala	0,0051
Dermatilomania	0,1387
Ponto de corte	4,6000

## 5.6

### Limitações do Estudo

O presente estudo padece de algumas limitações que podem diminuir a capacidade de generalização dos resultados encontrados para populações maiores.

Primeiramente, como a avaliação clínica de cada paciente/participante não foi efetuada pelo mesmo médico, é possível que exista algum nível de heterogeneidade na avaliação da presença de algum sinal ou sintoma da SPW. Naturalmente, o desenho ideal de pesquisa imporia a realização da avaliação

clínica por um único clínico, o que reduziria esse viés de pesquisa efetivamente a zero. No entanto, esse desenho torna-se impraticável uma vez que, por se tratar de uma doença rara, as amostras obtidas fatalmente serão compostas por pacientes oriundos de outras unidades de saúde no Rio de Janeiro e até de outros estados.

A segunda limitação do estudo está relacionada ao tamanho da amostra. Essa é uma dificuldade que afeta todos os estudos sobre doenças raras em geral, e a SPW, em particular. Para tentar contornar esse impecilho, pode-se realizar procedimentos de validação dos modelos desenvolvidos para se verificar a consistência e robustez dos resultados encontrados [147, Capítulo 17]. Um desses procedimentos contempla exatamente a realização de experimentos de simulação por *bootstrap* discutidos na seção anterior.

A terceira limitação do estudo advém do fato de não ter sido feita distinção entre as três etiologias mais comuns de SPW: deleção dos tipos I e II e dissomia uniparental materna. Teoricamente, é razoável deduzir que haja diferenças clínicas entre esses fenótipos uma vez que a perda de expressão gênica difere em magnitude e gravidade nesses três casos. Com efeito, algumas dessas diferenças já foram descritas empiricamente [74, 78, 80, 81]. Assim, idealmente, desenvolver-se-ia um modelo de diagnóstico clínico para cada uma dessas etiologias. No entanto, limitações relativas ao tamanho da amostra impedem a tomada desse curso de ação.

## 6

### Conclusão

- Os critérios de Holm e Gunay apresentaram desempenho insatisfatório, corroborando estudos anteriores.
- O ponto de corte ótimo para o critério de Holm pode ser alterado para 8.5, em vez de 8.0.
- A exigência de que parte dos pontos totais do critério de Holm venha dos critérios maiores pode ser abolida.
- O critério maior de Holm relacionado à presença de anormalidades moleculares na região 15q11-q13 deve ser eliminado.
- É possível desenvolver modelos quantitativos de diagnóstico clínico para a SPW com propriedades estatísticas superiores aos modelos de diagnóstico clínico atualmente propostos na literatura.
- Os algoritmos evolutivos de otimização global mostraram-se poderosos na determinação dos pesos ótimos das variáveis clínicas utilizadas do desenvolvimento do modelo clínico de diagnóstico.
- Foi proposto um modelo de diagnóstico clínico simples e de fácil implementação, capaz de distinguir um paciente portador da SPW de um outro saudável em mais de 91% dos casos. O modelo proposto apresentou uma sensibilidade de 87% e especificidade de 93%.
- No modelo proposto, apenas seis variáveis clínicas – hipotonia, problemas de alimentação na infância, hipogonadismo hipotalâmico, atraso global no desenvolvimento, problemas de comportamento e fácies típica – totalizaram mais de 77.5% do total de pontos, indicando a sua importância para a suspeição do diagnóstico de SPW.

## Referências Bibliográficas

- [1] Druss, B. (2005). “Evidence based medicine: does it make a difference?” *BMJ: British Medical Journal* 330.7482, 92 (citado nas págs. 14, 66).
- [2] Sackett, D. L. *et al.* (1996). “Evidence based medicine: what it is and what it isn’t”. *BMJ: British Medical Journal* 312.7023, 71–72 (citado nas págs. 14, 66).
- [3] Dajani, A. S. *et al.* (1992). “Guidelines for the diagnosis of rheumatic fever: Jones criteria, 1992 update”. *Journal of the American Medical Association* 268.15, 2069–73 (citado na pág. 14).
- [4] Durack, D. T., Lukes, A. S. e Bright, D. K. (1994). “New criteria for diagnosis of infective endocarditis: utilization of specific echocardiographic findings”. *American Journal of Medicine* 96.3, 200–9 (citado na pág. 14).
- [5] Belle, A. van *et al.* (2006). “Effectiveness of managing suspected pulmonary embolism using an algorithm combining clinical probability, d-dimer testing, and computed tomography”. *Journal of the American Medical Association* 295.2, 172–179 (citado na pág. 14).
- [6] Wells, P. S. *et al.* (2006). “Does this patient have deep vein thrombosis?” *Journal of the American Medical Association* 295.2, 199–207 (citado na pág. 14).
- [7] Aletaha, D. *et al.* (2010). “2010 Rheumatoid arthritis classification criteria”. *Arthritis & Rheumatism* 62.9, 2569–2581 (citado na pág. 14).
- [8] Kamath, P. S. e Kim, W. R. (2007). “The model for end-stage liver disease (MELD)”. *Hepatology* 45.3, 797–805 (citado na pág. 14).
- [9] Child, C. G. e Turcotte, J. G. (1964). “Surgery and portal hypertension”. *Major Problems in Clinical Surgery* 1, 1–85 (citado na pág. 14).
- [10] Pugh, R. N. H. *et al.* (1973). “Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices”. *British Journal of Surgery* 60.8, 646–649 (citado na pág. 14).

- [11] Zemojtel, T. *et al.* (2014). “Effective diagnosis of genetic disease by computational phenotype analysis of the disease-associated genome”. *Science Translational Medicine* 6.252, 252ra123 (citado na pág. 14).
- [12] Mayor, S. (2014). “Programme for genetic diagnosis of rare diseases proves feasible for routine clinical practice”. *BMJ: British Medical Journal* 349.1 (citado na pág. 14).
- [13] Jacob, H. J. (2013). “Next-Generation Sequencing for Clinical Diagnostics”. *New England Journal of Medicine* 369.16, 1557–1558 (citado na pág. 14).
- [14] Cassidy, S. B. (1984). “Prader-Willi Syndrome”. *Current Problems in Pediatrics* 14.1, 1–55 (citado nas págs. 14, 18–21, 23).
- [15] Ledbetter, D. H. (2008). “Cytogenetic Technology – Genotype and Phenotype”. *New England Journal of Medicine* 359.16, 1728–1730 (citado na pág. 14).
- [16] Mefford, H. C., Batshaw, M. L. e Hoffman, E. P. (2012). “Genomics, Intellectual Disability, and Autism”. *New England Journal of Medicine* 366.8, 733–743 (citado na pág. 15).
- [17] Horovitz, D. D. G. *et al.* (2013). “Genetic services and testing in Brazil”. English. *Journal of Community Genetics* 4.3, 355–375 (citado na pág. 15).
- [18] Whittington, J *et al.* (2002). “Relationship between clinical and genetic diagnosis of Prader-Willi Syndrome”. *Journal of Medical Genetics* 39.12, 926–932 (citado nas págs. 15, 18, 32, 62).
- [19] Holm, V. A. *et al.* (1993). “Prader-Willi Syndrome: consensus diagnostic criteria”. *Pediatrics* 91.2, 398–402 (citado nas págs. 15, 28, 29, 44, 47, 51).
- [20] Gunay-Aygun, M. *et al.* (2001). “The changing purpose of Prader-Willi Syndrome clinical diagnostic criteria and proposed revised criteria”. *Pediatrics* 108.5, E92 (citado nas págs. 15, 28, 30, 61–63).
- [21] Rocha, C. *et al.* (2013). *A clinical and genetic study of patients suspected of having Prader-Willi Syndrome: a critical analysis of Holm and Gunay-Aygun’s criteria*. English. Ed. por Netherlands, S. Poster apresentado na 9th European Cytogenetics Conference, 29 Junho – 2 Julho, Dublin, Irlanda (citado nas págs. 15, 43, 62).
- [22] Prader, A., Labhart, A. e Willi, H. (1956). “Ein Syndrom von Adipositas, Kleinwuchs, Kryptorchismus und Oligophrenie nach myatonieartigem Zustand im Neugeborenenalter”. *Schweizerische medizinische Wochenschrift* 86, 1260–1261 (citado nas págs. 16, 28, 61).

- [23] Butler, M., Lee, P. e Whitman, B. (2006). *Management of Prader-Willi Syndrome*. Ed. por Springer. Prader-Willi Syndrome Association (USA) (citado nas págs. 16–18, 23).
- [24] Butler, J. V. *et al.* (2002). “Prevalence of, and risk factors for, physical ill-health in people with Prader-Willi Syndrome: a population-based study”. *Developmental Medicine and Child Neurology* 44.4, 248–255 (citado nas págs. 16, 17, 22, 32).
- [25] Butler, M. G. (1990). “Prader-Willi Syndrome: current understanding of cause and diagnosis”. *American Journal of Medical Genetics* 35.3, 319–32 (citado nas págs. 17, 27).
- [26] Burd, L. *et al.* (1990). “Prevalence study of Prader-Willi syndrome in North Dakota”. *American Journal of Medical Genetics* 37.1, 97–99 (citado na pág. 17).
- [27] Åkefeldt, A., Gillberg, C. e Larsson, C. (1991). “Prader-Willi Syndrome in a Swedish rural county: epidemiological aspects”. *Developmental Medicine & Child Neurology* 33.8, 715–721 (citado na pág. 17).
- [28] Whittington, J. E. *et al.* (2001). “Population prevalence and estimated birth incidence and mortality rate for people with Prader-Willi Syndrome in one UK Health Region”. *Journal of Medical Genetics* 38.11, 792–798 (citado nas págs. 17, 23).
- [29] Lioni, T. *et al.* (2015). “A population-based profile of 160 Australians with Prader-Willi Syndrome: Trends in diagnosis, birth prevalence and birth characteristics”. *American Journal of Medical Genetics Part A* 167.2, 371–378 (citado nas págs. 17, 19).
- [30] Butler, M. G., Weaver, D. D. e Meaney, F. J. (1982). “Prader-Willi Syndrome: are there population differences?” *Clinical Genetics* 22.5, 292–4 (citado na pág. 18).
- [31] Cassidy, S. B. (1997). “Prader-Willi Syndrome”. *Journal of Medical Genetics* 34.11, 917–23 (citado nas págs. 18, 20, 21).
- [32] Cassidy, S. B. e Driscoll, D. J. (2009). “Prader-Willi Syndrome”. *European Journal of Human Genetics* 17.1, 3–13 (citado nas págs. 18, 19, 21).
- [33] Butler, J. V. *et al.* (2010). “The transition between the phenotypes of Prader-Willi Syndrome during infancy and early childhood”. *Developmental Medicine and Child Neurology* 52.6, e88–93 (citado nas págs. 18, 19).

- [34] Miller, J. L. *et al.* (2011). “Nutritional phases in Prader–Willi syndrome”. *American Journal of Medical Genetics Part A* 155.5, 1040–1049 (citado na pág. 18).
- [35] Zellweger, H. e Schneider, H. J. (1968). “Syndrome of Hypotonia-Hypomentia-Hypogonadism-Obesity (HHHO) or Prader-Willi Syndrome”. *American Journal of Diseases of Children* 115.5, 588–98 (citado nas págs. 19, 20, 22–24, 28, 61).
- [36] Butler, M. G. *et al.* (2009). “Is gestation in Prader-Willi Syndrome affected by the genetic subtype?” English. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 26.8, 461–466 (citado na pág. 19).
- [37] Bray, G. A. *et al.* (1983). “The Prader-Willi Syndrome: A Study of 40 Patients and a Review of the Literature”. *Medicine* 62.2, 59–80 (citado nas págs. 19, 28).
- [38] Hall, B. D. e Smith, D. W. (1972). “Prader-Willi Syndrome”. *The Journal of Pediatrics* 81.2, 286–293 (citado nas págs. 20, 28).
- [39] Butler, M. G., Meaney, F. J. e Palmer, C. G. (1986). “Clinical and cytogenetic survey of 39 individuals with Prader-Labhart-Willi Syndrome”. *American Journal of Medical Genetics* 23.3, 793–809 (citado nas págs. 20, 26, 27).
- [40] Butler, M. G. e Meaney, F. J. (1987). “An anthropometric study of 38 individuals with Prader-Labhart-Willi Syndrome”. *American Journal of Medical Genetics* 26.2, 445–55 (citado na pág. 20).
- [41] Cassidy, S. B. *et al.* (2012). “Prader-Willi Syndrome”. *Genetics in Medicine* 14.1, 10–26 (citado nas págs. 20, 21, 23, 24, 26, 30, 32, 34, 35).
- [42] Åkefeldt, A., Törnhage, C.-J. e Gillberg, C. (1999). “A woman with Prader–Willi Syndrome gives birth to a healthy baby girl”. *Developmental Medicine & Child Neurology* 41.11, 789–789 (citado nas págs. 20, 33).
- [43] Schulze, A. *et al.* (2001). “Fertility in Prader-Willi syndrome: a case report with Angelman syndrome in the offspring”. *Acta Pædiatrica* 90.4, 455–459 (citado nas págs. 20, 33).
- [44] Dykens, E. M., Leckman, J. F. e Cassidy, S. B. (1996). “Obsessions and compulsions in Prader-Willi Syndrome”. *Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines* 37.8, 995–1002 (citado nas págs. 20, 33).
- [45] Sinnema, M. *et al.* (2012). “Aging in Prader-Willi Syndrome: twelve persons over the age of 50 years”. *American Journal of Medical Genetics. Part A* 158a.6, 1326–36 (citado na pág. 20).

- [46] Cummings, D. E. *et al.* (2002). “Elevated plasma ghrelin levels in Prader-Willi Syndrome”. *Nature Medicine* 8.7, 643–4 (citado na pág. 21).
- [47] Kojima, M. *et al.* (1999). “Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach”. *Nature* 402.6762, 656–660 (citado na pág. 21).
- [48] DelParigi, A. *et al.* (2002). “High circulating ghrelin: a potential cause for hyperphagia and obesity in Prader-Willi Syndrome”. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87.12, 5461–4 (citado na pág. 21).
- [49] Haqq, A. M. *et al.* (2003). “Serum Ghrelin Levels Are Inversely Correlated with Body Mass Index, Age, and Insulin Concentrations in Normal Children and Are Markedly Increased in Prader-Willi Syndrome”. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88.1. PMID: 12519848, 174–178 (citado na pág. 21).
- [50] Kweh, F. A. *et al.* (2015). “Hyperghrelinemia in Prader-Willi Syndrome begins in early infancy long before the onset of hyperphagia”. *American Journal of Medical Genetics Part A* 167.1, 69–79 (citado na pág. 21).
- [51] Shapira, N. A. *et al.* (2005). “Satiety dysfunction in Prader-Willi syndrome demonstrated by fMRI”. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 76.2, 260–262 (citado na pág. 22).
- [52] Holsen, L. M. *et al.* (2006). “Neural mechanisms underlying hyperphagia in Prader-Willi Syndrome”. *Obesity* 14.6, 1028–37 (citado na pág. 22).
- [53] Holsen, L. M. *et al.* (2012). “Importance of reward and prefrontal circuitry in hunger and satiety: Prader-Willi Syndrome vs simple obesity”. *International Journal of Obesity* 36.5, 638–47 (citado na pág. 22).
- [54] Bereket, A. *et al.* (2012). “Hypothalamic obesity in children”. *Obesity Reviews* 13.9, 780–98 (citado na pág. 22).
- [55] Yamada, K. *et al.* (2006). “Brain developmental abnormalities in Prader-Willi Syndrome detected by diffusion tensor imaging”. *Pediatrics* 118.2, e442–8 (citado na pág. 22).
- [56] Schrandt-Stumpel, C. T. *et al.* (2004). “Prader-Willi Syndrome: causes of death in an international series of 27 cases”. *American Journal of Medical Genetics. Part A* 124a.4, 333–8 (citado nas págs. 23, 33).
- [57] Lurance, B. M., Brito, A. e Wilkinson, J. (1981). “Prader-Willi Syndrome after age 15 years”. *Archives of Disease in Childhood* 56.3, 181–6 (citado nas págs. 23, 28).

- [58] Gunay-Aygun, M., Cassidy, S. B. e Nicholls, R. D. (1997). “Prader-Willi and other syndromes associated with obesity and mental retardation”. *Behavior Genetics* 27.4, 307–24 (citado na pág. 24).
- [59] Buiting, K. *et al.* (2014). “Clinical utility gene card for: Prader-Willi Syndrome”. *European Journal of Human Genetics* 22, 1–3 (citado nas págs. 24, 26).
- [60] Nicholls, R. D. *et al.* (1989). “Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in nondeletion Prader-Willi Syndrome”. *Nature* 342.6247, 281–5 (citado nas págs. 24, 26).
- [61] Hall, J. G. (1990). “Genomic imprinting: review and relevance to human diseases”. *American Journal of Human Genetics* 46.5, 857–873 (citado na pág. 24).
- [62] Hall, J. G. (1992). “Genomic Imprinting and Its Clinical Implications”. *New England Journal of Medicine* 326.12. PMID: 1538729, 827–829 (citado na pág. 24).
- [63] Wood, A. J. e Oakey, R. J. (2006). “Genomic Imprinting in Mammals: Emerging Themes and Established Theories”. *PLoS Genetics* 2.11, e147 (citado na pág. 24).
- [64] Reik, W., Dean, W. e Walter, J. (2001). “Epigenetic Reprogramming in Mammalian Development”. *Science* 293.5532, 1089–1093 (citado na pág. 24).
- [65] Butler, M. G. (2011). “Prader-Willi Syndrome: Obesity due to Genomic Imprinting”. *Current Genomics* 12.3, 204–15 (citado nas págs. 25, 26).
- [66] Ledbetter, D. H. *et al.* (1981). “Deletions of chromosome 15 as a cause of the Prader-Willi Syndrome”. *New England Journal of Medicine* 304.6, 325–9 (citado na pág. 26).
- [67] Butler, M. G. e Palmer, C. G. (1983). “Parental origin of chromosome 15 deletion in Prader-Willi Syndrome”. *Lancet* 1.8336, 1285–6 (citado na pág. 26).
- [68] Reis, A. *et al.* (1994). “Imprinting mutations suggested by abnormal DNA methylation patterns in familial Angelman and Prader-Willi syndromes”. *American Journal of Human Genetics* 54.5, 741–747 (citado na pág. 26).
- [69] Ohta, T. *et al.* (1999). “Imprinting-mutation mechanisms in Prader-Willi Syndrome”. *American Journal of Human Genetics* 64.2, 397–413 (citado nas págs. 26, 31).
- [70] Buiting, K. *et al.* (2003). “Epimutations in Prader-Willi and Angelman syndromes: A Molecular Study of 136 Patients with an Imprinting de-

- fect”. *The American Journal of Human Genetics* 72.3, 571–577 (citado na pág. 26).
- [71] Nicholls, R. D., Saitoh, S. e Horsthemke, B. (1998). “Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes”. *Trends in Genetics* 14.5, 194–200 (citado na pág. 26).
- [72] Wirth, J. *et al.* (2001). “A translocation breakpoint cluster disrupts the newly defined 3’ end of the SNURF-SNRPN transcription unit on chromosome 15”. *Human Molecular Genetics* 10.3, 201–210 (citado na pág. 26).
- [73] Bieth, E. *et al.* (2015). “Highly restricted deletion of the SNORD116 region is implicated in Prader-Willi Syndrome”. *European Journal of Human Genetics* 23.2, 252–255 (citado nas págs. 26, 32).
- [74] Bittel, D. C. *et al.* (2003). “Microarray analysis of gene/transcript expression in Prader-Willi Syndrome: deletion versus UPD”. *Journal of Medical Genetics* 40.8, 568–74 (citado nas págs. 26, 68).
- [75] Bittel, D. C. *et al.* (2007). “Whole genome microarray analysis of gene expression in Prader-Willi Syndrome”. *American Journal of Medical Genetics. Part A* 143.5, 430–42 (citado na pág. 27).
- [76] Robinson, W. P. *et al.* (1991). “Molecular, cytogenetic, and clinical investigations of Prader-Willi Syndrome patients”. *American Journal of Human Genetics* 49.6. 1684085[pmid] *Am J Hum Genet*, 1219–1234 (citado na pág. 27).
- [77] Gillessen-Kaesbach, G. *et al.* (1995). “DNA methylation based testing of 450 patients suspected of having Prader-Willi syndrome”. *J Med Genet* 32.2, 88–92 (citado nas págs. 27, 61).
- [78] Cassidy, S. B. *et al.* (1997). “Comparison of phenotype between patients with Prader-Willi Syndrome due to deletion 15q and uniparental disomy 15”. *American Journal of Medical Genetics* 68.4, 433–40 (citado nas págs. 27, 68).
- [79] Nicholls, R. D. e Knepper, J. L. (2001). “Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes”. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 2, 153–75 (citado na pág. 27).
- [80] Butler, M. G. *et al.* (2004). “Behavioral differences among subjects with Prader-Willi Syndrome and type I or type II deletion and maternal disomy”. *Pediatrics* 113.3 Pt 1, 565–73 (citado nas págs. 27, 68).
- [81] Bittel, D. C., Kibiryeva, N. e Butler, M. G. (2006). “Expression of 4 genes between chromosome 15 breakpoints 1 and 2 and behavioral

- outcomes in Prader-Willi Syndrome”. *Pediatrics* 118.4, e1276–83 (citado nas págs. 27, 68).
- [82] Hamilton, C. R., Scully, R. E. e Kliman, B. (1972). “Hypogonadotropism in Prader-Willi Syndrome: Induction of puberty and spermatogenesis by clomiphene citrate”. *The American Journal of Medicine* 52.3, 322–329 (citado nas págs. 28, 33).
- [83] Wevrick, R. e Francke, U. (1996). “Diagnostic test for the Prader-Willi Syndrome by SNRPN expression in blood”. *The Lancet* 348.9034, 1068–1069 (citado nas págs. 30, 44).
- [84] Ramsden, S. *et al.* (2010). “Practice guidelines for the molecular analysis of Prader-Willi and Angelman syndromes”. *BMC Medical Genetics* 11.1, 70 (citado nas págs. 30, 44).
- [85] Young, I. D. (1995). “Diagnosing Prader-Willi Syndrome”. *Lancet* 345.8965, 1590 (citado na pág. 30).
- [86] Martinez, F. *et al.* (2006). “Robust, easy, and dose-sensitive methylation test for the diagnosis of Prader-Willi and Angelman syndromes”. *Genetic Testing* 10.3, 174–7 (citado nas págs. 30, 45).
- [87] Horsthemke, B. e Wagstaff, J. (2008). “Mechanisms of imprinting of the Prader-Willi/Angelman region”. *American Journal of Medical Genetics Part A* 146A.16, 2041–2052 (citado na pág. 31).
- [88] Anderlid, B.-M. *et al.* (2014). “Small mosaic deletion encompassing the snoRNAs and SNURF-SNRPN results in an atypical Prader-Willi Syndrome phenotype”. *American Journal of Medical Genetics Part A* 164.2, 425–431 (citado na pág. 32).
- [89] Gross, N. *et al.* (2015). “Prader-Willi Syndrome can be diagnosed prenatally”. *American Journal of Medical Genetics Part A* 167.1, 80–85 (citado na pág. 32).
- [90] Falaleeva, M. *et al.* (2013). “Molecular Characterization of a Patient Presumed to Have Prader-Willi Syndrome”. *Clinical Medicine Insights: Case Reports* 6, 79–86 (citado na pág. 32).
- [91] Goldstone, A. P. *et al.* (2008). “Recommendations for the diagnosis and management of Prader-Willi Syndrome”. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93.11, 4183–97 (citado na pág. 32).
- [92] Bridges, N. (2014). “What is the value of growth hormone therapy in Prader-Willi Syndrome?” *Archives of Disease in Childhood* 99.2, 166–70 (citado nas págs. 32, 34).

- [93] Butler, M. G. (2006). “Management of obesity in Prader-Willi Syndrome”. *Nature Clinical Practice. Endocrinology and Metabolism* 2.11, 592–3 (citado na pág. 33).
- [94] Butler, M. G. *et al.* (2011). “Growth Standards of Infants With Prader-Willi Syndrome”. *Pediatrics* 127.4, 687–695 (citado na pág. 33).
- [95] Goldstone, A. P. (2004). “Prader-Willi Syndrome: advances in genetics, pathophysiology and treatment”. *Trends Endocrinol Metab* 15.1, 12–20 (citado nas págs. 33, 34).
- [96] Dykens, E. e Shah, B. (2003). “Psychiatric Disorders in Prader-Willi Syndrome”. English. *CNS Drugs* 17.3, 167–178 (citado na pág. 33).
- [97] Deal, C. L. *et al.* (2013). “Growth Hormone Research Society workshop summary: consensus guidelines for recombinant human growth hormone therapy in Prader-Willi Syndrome”. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 98.6, E1072–87 (citado nas págs. 34, 35).
- [98] Lee, P. D. K. *et al.* (1987). “Linear growth response to exogenous growth hormone in Prader-Willi Syndrome”. *American Journal of Medical Genetics* 28.4, 865–871 (citado na pág. 34).
- [99] Angulo, M., Castro-Magana, M. e Uy, J. (1991). “Pituitary Evaluation and Growth Hormone Treatment in Prader-Willi Syndrome”. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 4.3, 167 (citado na pág. 34).
- [100] Eiholzer, U. *et al.* (1998). “Treatment with human growth hormone in patients with Prader-Labhart-Willi Syndrome reduces body fat and increases muscle mass and physical performance”. English. *European Journal of Pediatrics* 157.5, 368–377 (citado na pág. 34).
- [101] Burman, P., Ritzen, E. M. e Lindgren, A. C. (2001). “Endocrine dysfunction in Prader-Willi Syndrome: a review with special reference to GH”. *Endocrine Reviews* 22.6, 787–99 (citado na pág. 34).
- [102] Haqq, A. M. *et al.* (2003). “Effects of Growth Hormone on Pulmonary Function, Sleep Quality, Behavior, Cognition, Growth Velocity, Body Composition, and Resting Energy Expenditure in Prader-Willi Syndrome”. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88.5, 2206–2212 (citado na pág. 34).
- [103] Böhm, B., Ritzén, E. M. e Lindgren, A. C. (2015). “Growth hormone treatment improves vitality and behavioural issues in children with Prader-Willi Syndrome”. *Acta Paediatrica* 104.1, 59–67 (citado na pág. 34).
- [104] Kuo, J. Y. *et al.* (2007). “Síndrome de Prader-Willi: aspectos metabólicos associados ao tratamento com hormônio de crescimento”. pt. *Ar-*

- quivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 51, 92–98 (citado na pág. 34).
- [105] Butler, M. G. *et al.* (2013). “Effects of growth hormone treatment in adults with Prader-Willi Syndrome”. *Growth Hormone and IGF Research* 23.3, 81–7 (citado na pág. 34).
- [106] Zou, K. *et al.* (2011). *Statistical Evaluation of Diagnostic Performance: Topics in ROC Analysis*. Chapman & Hall/CRC Biostatistics Series. Taylor & Francis (citado nas págs. 36, 48, 65, 66).
- [107] Metz, C. E. (1978). “Basic principles of ROC analysis”. *Seminars in Nuclear Medicine* 8.4, 283–98 (citado nas págs. 36, 39).
- [108] Hanley, J. A. e McNeil, B. J. (1982). “The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve”. *Radiology* 143.1, 29–36 (citado nas págs. 36, 41).
- [109] Zweig, M. H. e Campbell, G. (1993). “Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine”. *Clinical Chemistry* 39.4, 561–77 (citado na pág. 36).
- [110] Dwyer, A. J. (1997). “In pursuit of a piece of the ROC”. *Radiology* 202.3, 621–5 (citado na pág. 36).
- [111] Erkel, A. R. van e Pattynama, P. M. (1998). “Receiver operating characteristic (ROC) analysis: basic principles and applications in radiology”. *European Journal of Radiology* 27.2, 88–94 (citado na pág. 36).
- [112] Metz, C. E. (2006). “Receiver operating characteristic analysis: a tool for the quantitative evaluation of observer performance and imaging systems”. *Journal of the American College of Radiology* 3.6, 413–22 (citado na pág. 36).
- [113] Zou, K. H., O’Malley, A. J. e Mauri, L. (2007). “Receiver-operating characteristic analysis for evaluating diagnostic tests and predictive models”. *Circulation* 115.5, 654–7 (citado na pág. 36).
- [114] McNeil, B. J., Keeler, E. e Adelstein, S. J. (1975). “Primer on Certain Elements of Medical Decision Making”. *New England Journal of Medicine* 293.5, 211–215 (citado na pág. 37).
- [115] Pewsner, D. *et al.* (2004). “Ruling a diagnosis in or out with “SpPIn” and “SnNOut”: a note of caution”. *BMJ* 329.7459, 209–213 (citado na pág. 38).
- [116] Hanley, J. A. (1989). “Receiver operating characteristic (ROC) methodology: the state of the art”. *Critical Reviews in Diagnostic Imaging* 29.3, 307–35 (citado na pág. 39).

- [117] Lasko, T. A. *et al.* (2005). “The use of receiver operating characteristic curves in biomedical informatics”. *Journal of Biomedical Informatics* 38.5, 404–415 (citado na pág. 41).
- [118] Schafer, H. (1994). “Efficient confidence bounds for ROC curves”. *Statistics in Medicine* 13.15, 1551–1561 (citado nas págs. 42, 49).
- [119] Rutter, C. M. (2000). “Bootstrap estimation of diagnostic accuracy with patient-clustered data”. *Academic Radiology* 7.6, 413–419 (citado nas págs. 42, 49).
- [120] Cortes, C. e Mohri, M. (2003). “AUC optimization vs. error rate minimization”. Em: *Advances in Neural Information Processing Systems, 2003. NIPS 2003*. Vol. 16 (citado na pág. 42).
- [121] — (2004). “Confidence intervals for the area under the ROC curve”. Em: *Advances in Neural Information Processing Systems, 2004. NIPS 2004*. Vol. 17 (citado nas págs. 42, 49).
- [122] Boström, H. (2005). “Maximizing the Area under the ROC Curve Using Incremental Reduced Error Pruning”. Em: *Proceedings of the International Conference on Machine Learning 2005 – Workshop on ROC Analysis in Machine Learning*. ACM Press (citado na pág. 42).
- [123] Calders, T. e Jaroszewicz, S. (2007). “Efficient AUC optimization for classification”. Em: *Knowledge Discovery in Databases: PKDD 2007*. Ed. por Kok, J. *et al.* Vol. 4702. Lecture Notes in Computer Science. Springer Berlin Heidelberg. Cap. 8, 42–53 (citado na pág. 42).
- [124] Castro, C. e Braga, A. (2008). “Optimization of the Area under the ROC Curve”. Em: *Neural Networks, 2008. SBRN '08. 10th Brazilian Symposium on*, 141–146 (citado na pág. 42).
- [125] Donmez, P. e Carbonell, J. G. (2009). “Active Sampling for Rank Learning via Optimizing the Area Under the ROC Curve”. Em: *Proceedings of the 31th European Conference on IR Research on Advances in Information Retrieval. ECIR '09*. Toulouse, France: Springer-Verlag, 78–89 (citado na pág. 42).
- [126] Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics (2000). *CDC growth charts* (citado na pág. 44).
- [127] FAST – Foundation for Angelman Syndrome Therapeutics (2008). *Genetic Testing for Angelman Syndrome 101*. <http://www.cureangelman.org/au/what-testing101.html> [Acesso em 12 de setembro de 2013] (citado na pág. 44).

- [128] Sutherland, E., Coe, L. e Raleigh, E. A. (1992). “McrBC: a multisubunit GTP-dependent restriction endonuclease”. *Journal of Molecular Biology* 225.2, 327–348 (citado na pág. 45).
- [129] Stewart, F. J. *et al.* (2000). “Methyl-specific DNA binding by McrBC, a modification-dependent restriction enzyme”. *Journal of Molecular Biology* 298.4, 611–622 (citado na pág. 45).
- [130] Bartholdi, D *et al.* (2009). “Epigenetic mutations of the imprinted IGF2-H19 domain in Silver-Russell Syndrome (SRS): results from a large cohort of patients with SRS and SRS-like phenotypes”. *Journal of Medical Genetics* 46.3, 192–197 (citado na pág. 45).
- [131] Liberti, L. e Maculan, N. (2006). *Global optimization: from theory to implementation*. Vol. 84. Springer (citado na pág. 47).
- [132] MATLAB (2014). *Version 8.4 (R2014b)*. Natick, Massachusetts: The MathWorks Inc. (citado na pág. 47).
- [133] Kolda, T. G., Lewis, R. M. e Torczon, V. (2006). *A generating set direct search augmented Lagrangian algorithm for optimization with a combination of general and linear constraints*. Rel. téc. Sandia National Laboratories (citado na pág. 47).
- [134] Pedersen, J. T. e Moulton, J. (1996). “Genetic algorithms for protein structure prediction”. *Current Opinion in Structural Biology* 6.2, 227–231 (citado na pág. 47).
- [135] Kennedy, J. e Eberhart, R. (1995). “Particle swarm optimization”. Em: *Proceedings of the IEEE International Conference on Neural Networks, 1995*. Vol. 4, 1942–1948 (citado na pág. 47).
- [136] Ingber, L. (1993). “Simulated annealing: Practice versus theory”. *Mathematical and Computer Modelling* 18.11, 29–57 (citado na pág. 47).
- [137] Pepe, M. S. e Thompson, M. L. (2000). “Combining diagnostic test results to increase accuracy”. *Biostatistics* 1.2, 123–40 (citado nas págs. 48, 65).
- [138] Bandos, A. I., Rockette, H. E. e Gur, D. (2006). “Resampling Methods for the Area Under the ROC Curve”. Em: *Proceedings of the Third Workshop on ROC Analysis in Machine Learning – ROCML06* (citado na pág. 49).
- [139] Efron, B. (1979). “Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife”. *The Annals of Statistics* 7.1, 1–26 (citado na pág. 49).
- [140] Efron, B. e Tibshirani, R. (1994). *An Introduction to the Bootstrap*. Chapman & Hall/CRC Monographs on Statistics & Applied Probability. Taylor & Francis (citado na pág. 49).

- [141] Su, J. Q. e Liu, J. S. (1993). “Linear Combinations of Multiple Diagnostic Markers”. *Journal of the American Statistical Association* 88.424, 1350–1355 (citado na pág. 65).
- [142] Debashis, G. (2004). *Semiparametric models and estimation procedures for binormal ROC curves with multiple biomarkers*. Report. The University of Michigan Department of Biostatistics Working Paper Series. Berkeley Electronic Press (citado na pág. 65).
- [143] Tax, D. M. J., Duin, R. P. W. e Arzhaeva, Y. (2006). “Linear model combining by optimizing the Area under the ROC curve”. Em: *Pattern Recognition, 2006. ICPR 2006. 18th International Conference on*. Vol. 4, 119–122 (citado na pág. 65).
- [144] Jin, H. e Lu, Y. (2009). “The optimal linear combination of multiple predictors under the generalized linear models”. *Statistics & Probability Letters* 79.22, 2321–2327 (citado na pág. 65).
- [145] Pfeiffer, R. M. e Bur, E. (2008). “A Model Free Approach to Combining Biomarkers”. *Biometrical Journal* 50.4, 558–570 (citado na pág. 65).
- [146] Pardalos, P. M. e Romeijn, H. (2002). *Handbook of Global Optimization – Vol. 2. Nonconvex Optimization and Its Applications*. Springer (citado na pág. 66).
- [147] Steyerberg, E. (2008). *Clinical Prediction Models: A Practical Approach to Development, Validation, and Updating*. Statistics for Biology and Health. Springer (citado na pág. 68).

**A**

**Modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Figura A.1: TCLE

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Eu, \_\_\_\_\_,

responsável por \_\_\_\_\_,

declaro ter lido a carta de informação a respeito do projeto de pesquisa:

***Desenvolvimento e avaliação de modelos quantitativos de diagnóstico clínico da Síndrome de Prader-Willi.***

Assim, autorizo meu filho e/ou minha filha menor de idade a participar deste estudo e acredito ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações que li ou que leram para mim, descrevendo o mesmo. Eu discuti com o médico a minha decisão de participar deste estudo. Ficaram claros os objetivos e os propósitos desta pesquisa, os procedimentos a serem realizados, os desconfortos, riscos e as garantias de confidencialidade, além de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também, que a minha participação é isenta de despesas, exceto os inerentes à locomoção e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar, quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável legal

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Assinatura de testemunha

\_\_\_\_\_  
Data

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação deste estudo.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável pelo estudo

\_\_\_\_\_  
Data

## B

### Modelo da Ficha do Paciente

Figura B.1: Ficha com os dados dos participantes do estudo

**PROJETO: Desenvolvimento e avaliação de modelos quantitativos de diagnóstico clínico da Síndrome de Prader-Willi.**

#### FICHA DO PACIENTE

Nome do Paciente:	Prontuário:	
Idade (anos e meses):	Peso:	Altura:
Data de nascimento:	Data da consulta:	

<b>Critérios Para Diagnóstico Clínico da SPW</b>	
Marcar abaixo os sinais e sintomas apresentados pelo paciente	
<input type="checkbox"/>	Hipotonia neonatal com modesta melhora com a idade
<input type="checkbox"/>	Dificuldade de alimentação na infância, com necessidade de algum tipo de alimentação especial, e má evolução ponderal
<input type="checkbox"/>	Ganho excessivo de peso na curva de peso-altura após 12 meses, mas antes dos 6 anos
<input type="checkbox"/>	Características faciais típicas: olhos amendoados, lábio superior pouco espesso, escafocefalia
<input type="checkbox"/>	Hipogonadismo: hipoplasia genital ou maturação gonadal retardada, dependendo da idade
<input type="checkbox"/>	Atraso global do desenvolvimento psicomotor (< 6 anos); retardo mental leve ou dificuldades de aprendizado (> 6 anos)
<input type="checkbox"/>	Hiperfagia e/ou obsessão por comida
<input type="checkbox"/>	Diminuição dos movimentos fetais ou letargia infantil com melhora com a idade
<input type="checkbox"/>	Problemas de comportamento; 5 ou mais destes: fúria, acessos de violência e comportamento obsessivo-compulsivo, argumentativo, opositor, inflexível, manipulador, possessivo, teimoso, mentiroso, cleptomania.
<input type="checkbox"/>	Distúrbios do sono ou apnéia do sono
<input type="checkbox"/>	Baixa estatura até os 15 anos
<input type="checkbox"/>	Hipopigmentação; pele e cabelos (em relação aos familiares)
<input type="checkbox"/>	Mãos e pés pequenos para idade
<input type="checkbox"/>	Mãos delgadas com borda ulnar reta
<input type="checkbox"/>	Anormalidades oculares (miopia, esotropia)
<input type="checkbox"/>	Saliva viscosa com crostas nos cantos dos lábios
<input type="checkbox"/>	Problemas na articulação das palavras na fala
<input type="checkbox"/>	Lesões de pele (dermatotilexomania)

## C

### Parâmetros iniciais das rotinas de otimização

Tabela C.1: Valores dos parâmetros utilizados no algoritmo DS; “[]” denota o valor *default* do MATLAB e  $eps = 2.2204 \times 10^{-16}$ .

Parâmetro	DS
Cache	on
CacheSize	[]
CacheTol	[]
CompletePoll	[]
CompleteSearch	[]
Display	[]
InitialMeshSize	0.01
InitialPenalty	[]
MaxFunEvals	[]
MaxIter	[]
MaxMeshSize	[]
MeshAccelerator	on
MeshContraction	[]
MeshExpansion	[]
MeshRotate	[]
OutputFcns	[]
PenaltyFactor	[]
PlotFcns	[]
PlotInterval	[]
PollingOrder	[]
PollMethod	gpspositivebasis2n
ScaleMesh	[]
SearchMethod	@GPSPositiveBasis2N
TimeLimit	[]
TolBind	eps
TolCon	eps
TolFun	eps
TolMesh	eps
TolX	eps
UseParallel	[]
Vectorized	[]

Tabela C.2: Valores dos parâmetros utilizados no algoritmo GA; “[ ]” denota o valor *default* do MATLAB e  $eps = 2.2204 \times 10^{-16}$ .

Parâmetro	GA
CreationFcn	[ ]
CrossoverFcn	[ ]
CrossoverFraction	[ ]
Display	[ ]
DistanceMeasureFcn	[ ]
EliteCount	[ ]
FitnessLimit	[ ]
FitnessScalingFcn	[ ]
Generations	[ ]
HybridFcn	[ ]
InitialPenalty	[ ]
InitialPopulation	[ ]
InitialScores	[ ]
MigrationDirection	[ ]
MigrationFraction	[ ]
MigrationInterval	[ ]
MutationFcn	[ ]
OutputFcns	[ ]
ParetoFraction	[ ]
PenaltyFactor	[ ]
PlotFcns	[ ]
PlotInterval	[ ]
PopInitRange	[ ]
PopulationSize	100
PopulationType	[ ]
SelectionFcn	[ ]
StallGenLimit	[ ]
StallTest	[ ]
StallTimeLimit	[ ]
TimeLimit	[ ]
TolCon	eps
TolFun	eps
UseParallel	[ ]
Vectorized	[ ]

Tabela C.3: Valores dos parâmetros utilizados no algoritmo PSO; “[ ]” denota o valor *default* do MATLAB e  $\epsilon = 2.2204 \times 10^{-16}$ .

Parâmetro	PSO
CreationFcn	@pswcreationuniform
Display	'final'
DisplayInterval	1
FunValCheck	'off'
HybridFcn	[ ]
InertiaRange	[0.1000 1.1000]
InitialSwarm	[ ]
InitialSwarmSpan	2000
MaxIter	'200*numberofvariables'
MaxTime	Inf
MinFractionNeighbors	0.2500
ObjectiveLimit	-Inf
OutputFcns	[ ]
PlotFcns	[ ]
TolFun	2.2204e-16
SelfAdjustment	1.4900
SocialAdjustment	1.4900
StallIterLimit	20
StallTimeLimit	Inf
SwarmSize	'min(100,10*numberofvariables)'
UseParallel	0
Vectorized	'off'

Tabela C.4: Valores dos parâmetros utilizados no algoritmo PSO; “[ ]” denota o valor *default* do MATLAB e  $eps = 2.2204 \times 10^{-16}$ .

Parâmetro	SA
AnnealingFcn	[ ]
TemperatureFcn	[ ]
AcceptanceFcn	[ ]
TolFun	eps
StallIterLimit	[ ]
MaxFunEvals	[ ]
TimeLimit	[ ]
MaxIter	[ ]
ObjectiveLimit	[ ]
Display	[ ]
DisplayInterval	[ ]
HybridFcn	[ ]
HybridInterval	[ ]
PlotFcns	[ ]
PlotInterval	[ ]
OutputFcns	[ ]
InitialTemperature	[ ]
ReannealInterval	[ ]
DataType	[ ]

D

Comparação das soluções de otimização com o critério de Holm

Figura D.1: Comparação solução DS e Holm

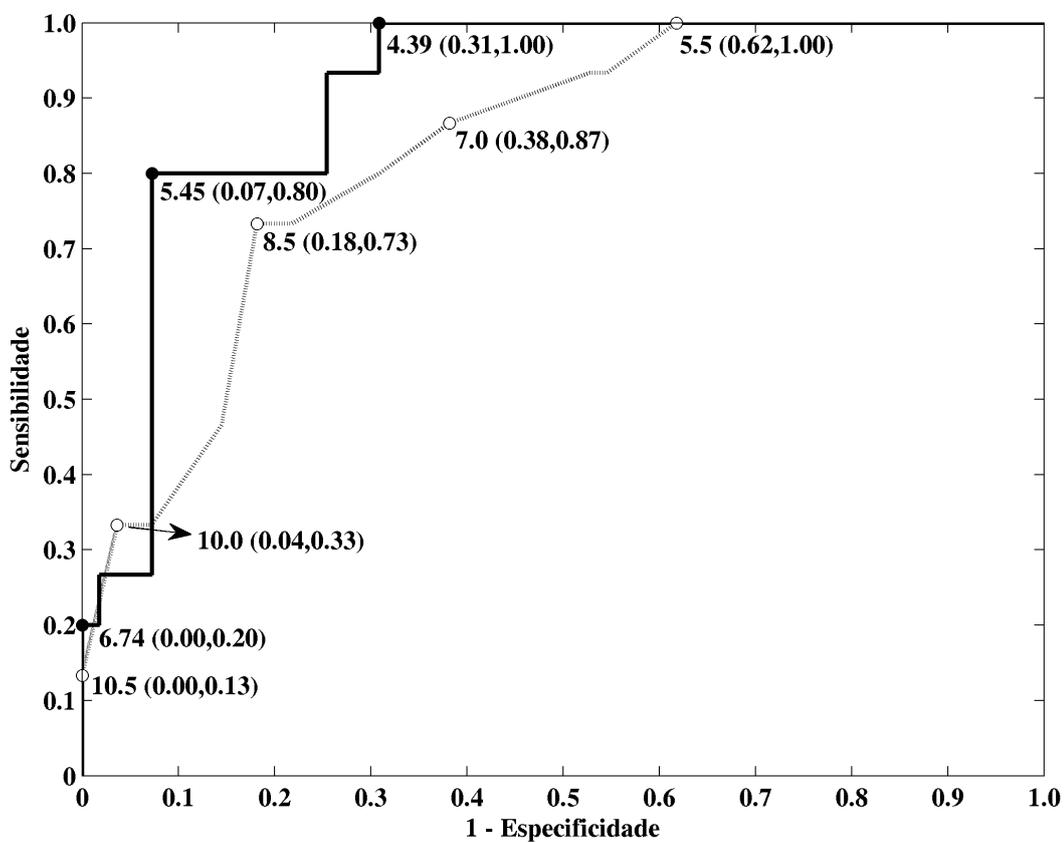


Figura D.2: Comparação solução GA e Holm

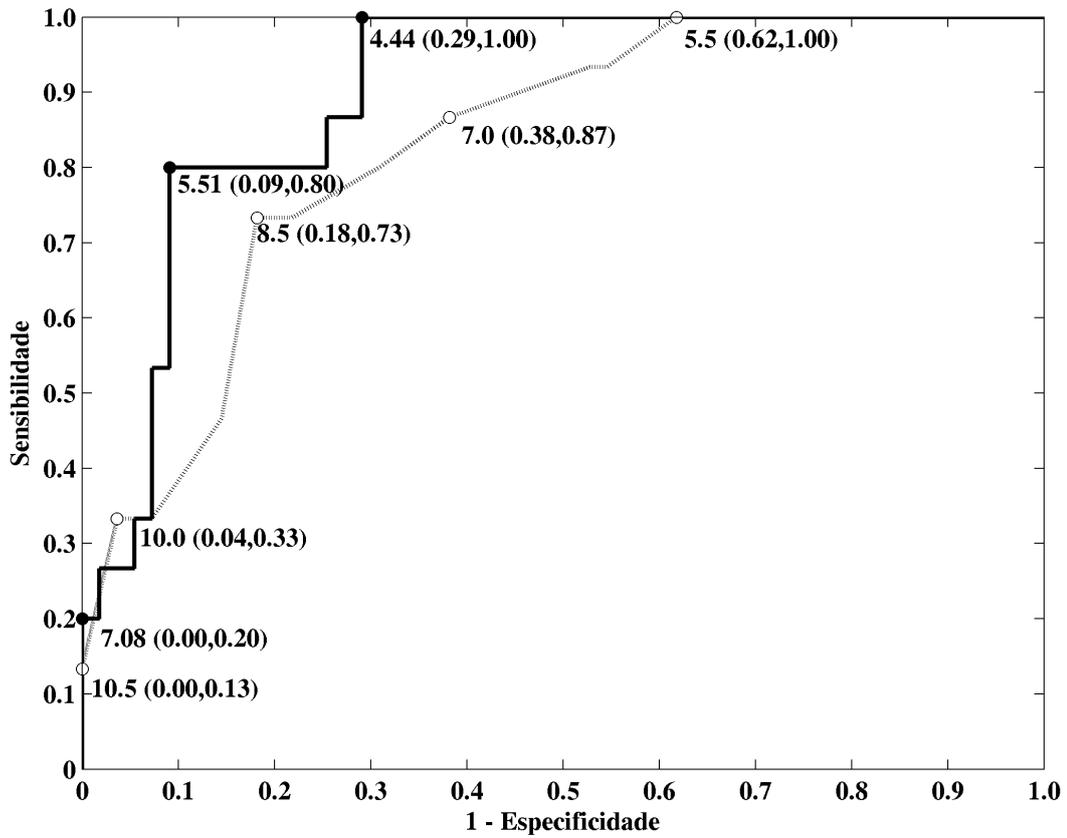


Figura D.3: Comparação solução SA e Holm

