



Universidade de Aveiro Departamento de Química  
2017

**Eva Patrícia da  
Silva Feiteira**

**Caraterização do perfil lipídico e hormonal de  
crianças em risco de desenvolverem esteatose  
hepática não alcoólica**





Universidade de Aveiro Departamento de Química  
2017

**Eva Patrícia da  
Silva Feiteira**

**Caraterização do perfil lipídico e hormonal de  
crianças em risco de desenvolverem esteatose  
hepática não alcoólica**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, especialização em métodos biomoleculares, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria do Rosário Gonçalves dos Reis Marques Domingues, Professora Associada com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor António Frederico Ramos Morais Cerveira, Assistente Graduado Sénior de Patologia Clínica – Responsável da seção de Bioquímica Clínica do Centro Hospitalar Baixo Vouga, E.P.E. Aveiro.

Apoio financeiro da FCT, da União Europeia, QREN, no âmbito do Programa Operacional Temático Fatores de Competitividade (COMPETE).

Apoio financeiro à unidade de investigação QOPNA (projeto PEst-C/QUI/UI0062/2013; FCOMP-01-0124-FEDER-037296).



Associação  
de  
Escolas  
Superiores  
de  
Educação  
Tecnológica





Aos meus pais e ao meu irmão  
pelo apoio incondicional.



## **O júri**

presidente

**Professor Doutor Francisco Manuel Lemos Amado**

Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Doutora Luisa Alejandra Helguero**

Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Ciências Médicas da Universidade de Aveiro

**Doutor António Frederico Ramos Morais Cerveira**

Assistente Graduado Sénior de Patologia Clínica – Responsável da seção de Bioquímica Clínica do Centro Hospitalar Baixo Vouga, E.P.E. Aveiro.

## **agradecimentos**

Em primeiro lugar agradeço aos meus orientadores, a Professora Rosário Domingues e o Doutor Frederico Cerveira, por toda a dedicação, apoio, amizade e ensinamentos ao longo deste ano. Aprendi imenso convosco. Muito obrigada.

A todo grupo de espectrometria de massa por tornarem tudo mais fácil, pelos bons momentos e pelo companheirismo. Obrigada. Agradeço em especial à Tânia, por ter sido incansável, por tudo o que me ensinou e pela pessoa que é, e à Mariana por estar sempre presente.

Agradeço à Professora Rita Ferreira e ao Professor Pedro Domingues pela colaboração neste trabalho.

Agradeço às Doutoradas Rosa Dantas e Márcia Alves, do Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Nutrição, e aos técnicos do Serviço de Patologia Clínica, do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, por me receberem tão bem e pela preciosa ajuda neste trabalho.

Aos meus pais, ao meu irmão, ao meu namorado e à minha melhor amiga por estarem sempre comigo em todos os momentos e por serem as pessoas maravilhosas que são. Tudo o que sou hoje é graças a vocês. Obrigada por tudo.

Não posso também deixar de agradecer às minhas meninas, a Sara, a Juliana, a Sofia e a Paula pela amizade ao longo destes 6 anos.

A todos, um sincero obrigada.



## palavras-chave

esteatose hepática não alcoólica, crianças, obesidade, perfil fosfolipídico, adipocinas, inflamação, metabolismo lipídico, métodos de diagnóstico, espectrometria de massa, lipidômica

## resumo

A esteatose hepática não alcoólica (EHNA) é a forma mais prevalente de doença hepática crônica, com uma incidência de 10-20% na população pediátrica. Embora os mecanismos fisiopatológicos subjacentes a esta patologia pediátrica não sejam totalmente conhecidos, sabe-se que existem vários fatores de risco para o desenvolvimento e patogênese da EHNA, dos quais se destaca a obesidade. Neste contexto, existe um interesse crescente em encontrar novos métodos de diagnóstico para que exista um diagnóstico precoce da doença, em especial em crianças com risco de desenvolverem EHNA. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar alterações no perfil de adipocinas e em proteínas associadas à inflamação, e de fosfolípidos recorrendo, respetivamente, à técnica Slot Blot e a GC-MS, TLC à espectrometria de massa, no plasma de crianças com excesso de peso e obesas, que poderão estar correlacionadas com o desenvolvimento da EHNA.

Não se observaram diferenças significativas nos parâmetros analisados em crianças com excesso de peso quando comparadas com crianças com peso normal. No entanto, os resultados obtidos permitiram observar diferenças no perfil de adipocinas e de proteínas associadas à inflamação do plasma em crianças obesas verificando-se uma diminuição significativa dos níveis plasmáticos de adiponectina, leptina e HSL comparativamente às crianças não obesas. A análise dos extratos fosfolipídicos obtidos por TLC, permitiu observar um aumento significativo de LPC e uma diminuição significativa de PC. A análise dos ácidos gordos por GC-MS demonstrou uma diminuição significativa do ácido gordo C16:0, no grupo de crianças obesas. Pela análise estatística multivariada e discriminante aplicada aos resultados obtidos por HPLC-MS e MS/MS observaram-se um aumento significativo no perfil de espécies moleculares das SM e LPC e uma diminuição significativa das PE, nomeadamente SM (d40: 1), SM (d40: 0), SM (d36: 3), LPC (18:0) e a PE (o-32: 2 ou p-32: 1).

Concluindo, a abordagem lipidômica usada neste trabalho demonstrou ser eficaz na análise e identificação de classes de fosfolípidos de crianças em risco de desenvolverem EHNA e de crianças saudáveis, permitindo distinguir ambas as condições. A abordagem lipidômica poderá ser utilizada como método de diagnóstico para o reconhecimento de alterações no perfil de fosfolípidos em crianças em risco de desenvolverem EHNA prevenindo o surgimento da doença.

**keywords**

Non-alcoholic fatty liver disease, children, obesity, phospholipid profile, adipokines, inflammation, lipid metabolism, diagnostic methods, mass spectrometry, lipidomic

**abstract**

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most prevalent form of chronic liver disease, with an incidence of 10-20% in the pediatric population. Although the pathophysiological mechanisms underlying NAFLD still not clear, it is known that there are several risk factors for the development and pathogenesis of NAFLD, being obesity the most important one. Additionally, diagnosis of NAFLD is a very difficult task, since this pediatric pathology is a chronic and asymptomatic disease. In this context, there is a growing interest for the development of new diagnostic methods for the early diagnosis of the disease, especially in children at risk of developing NAFLD. Thus, the aim of this work is to evaluate changes in the adipokine profile and phospholipid, using Slot Blot technique and GC-MS, TLC and mass spectrometry-based approaches in overweight and obese children, which may be correlated with the development of NAFLD.

No significant differences were observed in the parameters analyzed in overweight children when compared with normal weight children. Plasma adipokine and proteins associated with inflammation profile analysis of obese children and significant decrease in adiponectin, leptin and HSL levels were obtained when compared with non-obese children. The lipid extracts obtained from plasma fractionated by TLC revealed a significant increase in the PC content and a significant decrease in the LPC content for obese children group. Analysis of the fatty acid profile performed by GC-MS demonstrated a significant decrease of the C16:0 fatty acid in obese children. The multivariate and discriminant statistical tests applied to the results obtained by HPLC-MS and MS/MS, showed significant increase in the profile of SM and LPC and significant decrease of PE molecular species, namely SM (d40: 1), SM (d40: 0), SM (d36: 3), LPC (18:0) and PE (o-32: 2 or p-32: 1).

In conclusion, the lipidomic approach used in this work has been shown to be effective in the identification and characterization of the phospholipid profile of children at risk of developing NAFLD and healthy children, allowing to distinguish both conditions. The lipidomics approach can be used as a tool for the recognition of phospholipid profile alterations in children at risk of NAFLD that may contribute for the early diagnosis and to prevent the onset of the disease.

# Índice

<b>Índice de Tabelas</b> .....	iii
<b>Índice de Figuras</b> .....	v
<b>Abreviaturas</b> .....	ix
<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1 Esteatose hepática alcoólica vs. Esteatose hepática não alcoólica.....	1
1.2 Etiologia da esteatose hepática não alcoólica associada com a obesidade e possível correlação com a obesidade em crianças .....	3
1.2.1 Resistência à insulina.....	10
1.2.2 Dislipidémias .....	11
1.3 Processo inflamatório e enzimático na esteatose hepática não alcoólica .....	12
1.4 Métodos de diagnóstico da esteatose hepática não alcoólica em crianças .....	15
1.5 Lipidómica no estudo da esteatose hepática não alcoólica.....	17
1.6 Objetivo.....	21
<b>2. Materiais e Métodos</b> .....	25
2.1. Reagentes .....	25
2.2 Crianças em estudo e critério de seleção .....	26
2.3 Caracterização do perfil de adipocinas e de proteínas associadas ao processo inflamatório .....	26
2.4 Extração de fosfolípidos do plasma de crianças em risco de desenvolverem esteatose hepática não alcoólica .....	27
2.5 Quantificação de fosfolípidos através do ensaio da quantificação de fósforo.....	28
2.6 Separação das classes de fosfolípidos por cromatografia de camada fina (TLC)	29
2.7 Análise e quantificação de ácidos gordos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS).....	30
2.8 Análise e quantificação das classes de fosfolípidos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (HPLC-MS).....	31

2.9 Análise estatística .....	32
<b>3. Caraterização do perfil de adipocinas, proteínas associadas à inflamação e fosfolipídico do plasma de crianças em risco de desenvolverem EHNA .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1 Caraterização do perfil de adipocinas, de proteínas associadas à inflamação e fosfolipídico de plasma crianças com excesso de peso.....</b>	<b>38</b>
3.1.1 Caraterização da amostra.....	38
3.1.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos .....	39
3.1.3 Caraterização do perfil de adipocinas e de proteínas associadas à inflamação	41
3.1.4 Quantificação de fósforo no extrato fosfolipídico de plasma.....	42
3.1.5 Separação e quantificação de cada classe de fosfolípido por TLC.....	42
3.1.4 Análise do perfil de ácidos gordos por GC-MS .....	44
<b>3.2 Caraterização do perfil de adipocinas, de proteínas associadas à inflamação e fosfolipídico do plasma de crianças com obesidade.....</b>	<b>45</b>
3.2.1 Caraterização da amostra.....	45
3.2.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos .....	46
3.2.3 Caraterização do perfil de adipocinas e de proteínas associadas à inflamação	47
3.2.4 Quantificação de fósforo no extrato fosfolipídico de plasma.....	48
3.2.5 Separação e quantificação de cada classe de fosfolípido por TLC.....	49
3.2.6 Análise do perfil de ácidos gordos por GC-MS.....	51
3.2.7 Análise do perfil de fosfolípidos por HPLC-MS/MS .....	52
<b>4. Discussão.....</b>	<b>75</b>
<b>5. Conclusão e Perspetivas Futuras.....</b>	<b>85</b>
<b>6. Bibliografia .....</b>	<b>89</b>
<b>7. Anexos .....</b>	<b>99</b>

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Resumo dos estudos publicados sobre a avaliação de possíveis biomarcadores lipídicos na progressão da EHNA para uma esteato-hepatite, utilizando uma abordagem lipidômica como método de diagnóstico pouco invasivo. ....	18
<b>Tabela 2</b> – Caracterização das crianças com e sem excesso de peso em termos de sexo, idade, IMC, percentil do IMC. Os valores médios de IMC estão apresentados como média ± desvio-padrão. *** P<0,001 vs. Sem excesso de peso (ANOVA <i>Bonferroni's Multiple Comparison Test</i> ) .....	38
<b>Tabela 3</b> – Parâmetros bioquímicos de crianças com e sem excesso de peso. A <b>negrito</b> valores que se encontram nos valores aceitáveis dos valores de referência e a <b>negrito e sublinhado</b> valores que se encontram acima dos valores de referência. Os valores médios de cada parâmetro estão apresentados como média ± desvio-padrão.....	40
<b>Tabela 4</b> - Quantificação de fosfolípidos totais no extrato lipídico de plasma de crianças sem e com excesso de peso. Os resultados encontram-se representados em termos de médio ± desvio-padrão de 5 réplicas biológicas. ....	42
<b>Tabela 5</b> - Caracterização das crianças não obesas e obesas em termos de sexo, idade, IMC e percentil do IMC. Os valores médios de IMC estão apresentados como média ± desvio-padrão. *** P<0,001 vs. Não obesos (ANOVA <i>Bonferroni's Multiple Comparison Test</i> ) .....	45
<b>Tabela 6</b> – Parâmetros bioquímicos de crianças com e sem excesso de peso. A <b>negrito</b> valores que se encontram nos valores aceitáveis dos parâmetros de referência e a <b>negrito e sublinhado</b> valores que se encontram acima dos valores de referência. Os valores médios de cada parâmetro estão apresentados como média ± desvio-padrão. ** P<0,01 vs. Não obesos (ANOVA <i>Bonferroni's Multiple Comparison Test</i> ).....	47
<b>Tabela 7</b> - Quantificação de fosfolípidos totais no extrato lipídico de plasma de crianças não obesas e obesas. Os resultados encontram-se representados em termos de médio ± desvio-padrão de 5 réplicas biológicas. * P<0,05 vs. Não obesos (ANOVA <i>Bonferroni's Multiple Comparison Test</i> ).....	49
<b>Tabela 8</b> – Lista das 192 espécies de fosfolípidos identificadas usando o software MZ mine versão 2.21 e usando o software Xcalibur versão 3.0. As espécies moleculares foram identificadas através da massa observada com recurso à base de dados LIPID MAPS Lipidomics Gateway (118). * Espécies identificadas usando o software Xcalibur ;** Sem informação do espectro MS/MS. A classe das LPC, PC, PE e SM foram analisadas no modo positivo na forma de iões [M+H] <sup>+</sup> . A classe das PC também foi analisada no modo negativo sob a forma de aductos de acetato [M+CH <sub>3</sub> COO] <sup>-</sup> . ....	59
<b>Tabela 9</b> – Lista das 40 espécies moleculares de fosfolípidos que variam mais estatisticamente entre crianças obesas e crianças não obesas. ....	67

<b>Tabela 1.A</b> - Valores de referência pediátricos de IMC, percentil do IMC e sua interpretação. Adaptado de (148).....	99
<b>Tabela 1.B</b> – Valores de referência pediátricos para cada parâmetro avaliado nas crianças em estudo (149).....	99

## Índice de Figuras

**Figura 1** - Evolução da EHNA. Adaptado de Dietrich et al. (2). A maioria dos indivíduos com obesidade desenvolvem EH na ausência de consumo de álcool. Cerca de 30% dos indivíduos desenvolvem inflamação (esteato-hepatite) e progridem para cirrose e, em último, caso para um carcinoma hepatocelular. A EHNA, devido à sua alta prevalência, é reconhecida, mundialmente, como a doença hepática mais frequente. .... 2

**Figura 2** - Alterações nas células no transporte de FFA para acumulação de TG no fígado no músculo-esquelético, na EHNA. Adaptado de Fabbrini et al.(1). A translocase de AG (FAT, do inglês fatty acid translocase) e CD36 regulam o uptake de FFA do plasma para o fígado e músculo-esquelético. A expressão da CD36 e do conteúdo proteico é menor no tecido adiposo e maior no fígado e no músculo-esquelético, havendo assim o aumento de conteúdo TGIH. .... 5

**Figura 3** – Visão geral do metabolismo das lipoproteínas. Adaptado de Jiang et al.(44). As lipoproteínas humanas são predominantemente produzidas no intestino delgado e fígado. No intestino delgado ocorre a formação dos quilomicrons, que contêm as apoB48, apoA-I, apoC-I, apoC-II e apoC-III. As partículas remanescentes são absorvidas pelos hepatócitos. O fígado produz a apoB-100, incorporada nas VLDL. Esta é hidrolisada na circulação sanguínea e convertida em IDL e LDL. Ambas podem ser incorporadas nos hepatócitos. A lipoproteína de alta densidade (HDL, do inglês high-density lipoprotein) prematura torna-se madura na circulação e tem um papel importante no transporte de colesterol reverso. .... 8

**Figura 4** - Inter-relações fisiológicas entre o metabolismo dos AG, resistência à insulina, dislipidémias e conteúdo de TGIH na EHNA. Adaptado de Fabbrini et al.(1). A taxa de libertação de FFA do tecido adiposo e libertação no fígado e no músculo-esquelético é maior em pessoas obesas com EHNA, o que resulta num maior uptake dos FFA pelo fígado e músculo. Adicionalmente, a lipogénese de novo intra-hepática dos FFA é maior em indivíduos com EHNA do que aqueles que têm níveis normais de TGIH, o que contribui para uma maior acumulação intracelular de AGs. A produção e secreção de TG em VLDL é maior em indivíduos com EHNA, o que promove o mecanismo de remoção de TGIH, contudo a taxa de secreção não é adequadamente compensada com a taxa de produção de TG. Aumentando os níveis plasmáticos de glucose e insulina associados à EHNA há estimulação da lipogénese de novo e inibição da oxidação dos AG, pela ativação dos SREBP-1 e ChREBP. Estes metabolitos fazem com que haja o aumento dos níveis intracelulares de FFA que não são oxidados ou exportados sob a forma de VLDL-TG, mas são esterificados em TG e armazenados como lipid droplets. .... 9

**Figura 5** - Metabolitos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios derivados dos PUFAs  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3. Adaptado de Scorletti *et al.*(85). As ciclo-oxigenases (COX) e as lipoxigenases (LOX) convertem o ácido araquidónico em eicosanóides. Estes são lípidos com função sinalizadora e têm um importante papel na regulação da inflamação, nestes lípidos estão incluídos as prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos. Estes eicosanóides têm o papel principal na regulação da produção

de citocinas pró-inflamatórias. Por outro lado, os eicosanóides derivados do ácido eicopentaenoico têm um efeito anti-inflamatório. Os PUFAs  $\omega$ -3 são substratos num grupo de mediadores lipídicos, as resolvinas e as protectinas..... 14

**Figura 6-** Caraterização do perfil de adipocinas e de proteínas associadas à inflamação presentes no plasma, pela técnica Slot Blot, de crianças sem e com excesso de peso, nomeadamente da grelina, adiponectina leptina, proteína C reativa e hormona sensível à lípase. Os resultados encontram-se representados em termos de médio  $\pm$  desvio-padrão. .... 41

**Figura 7-** Separação das diferentes classes de fosfolípidos do extrato lipídico de plasma de crianças com e sem excesso de peso. As classes de fosfolípidos foram identificadas, ou seja a lisofosfatidilcolina (LPC), a esfingomiéline (SM) e a fosfatidilcolina (PC), por comparação com padrões de fosfolípidos puros aplicados e devidamente identificados (P1, P2 e P3) na mesma placa de TLC. P1- fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (PG); P2- lisofosfatidilcolina (LPC), esfingomiéline (SM), fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PE); P3- ácido fosfatídico (PA). .... 43

**Figura 8** – Quantificação relativa das 3 classes de fosfolípidos identificadas após separação por TLC em crianças com e sem excesso de peso. Os resultados encontram-se representados em termos de médio  $\pm$  desvio-padrão de 4 réplicas biológicas (n=4). LPC-lisofosfatidilcolina, SM-esfingomiéline e PC- fosfatidilcolina. .... 44

**Figura 9** – Composição de ácidos gordos nos extratos fosfolipídicos de amostras de crianças sem e com excesso de peso. O perfil de ácidos gordos foi obtido pela análise dos cromatogramas e espetros de massa recorrendo de GC-MS. Os resultados encontram-se representados em termos de médio  $\pm$  desvio-padrão de 3 réplicas biológicas (n=3). .... 44

**Figura 10-** Caraterização de adipocinas presentes no plasma, pela técnica Slot Blot, de crianças não obesas e obesas, nomeadamente da grelina, adiponectina, leptina, proteína C reativa e hormona sensível à lípase. Os resultados encontram-se representados em termos de médio  $\pm$  desvio-padrão. \* P<0.05 vs. Não obesos (t-test não emparelhado)..... 48

**Figura 11-** Separação das diferentes classes de fosfolípidos em crianças não obesas e obesas por TLC. As classes de fosfolípidos foram identificadas, ou seja a lisofosfatidilcolina (LPC), a esfingomiéline (SM) e a fosfatidilcolina (PC), por comparação com padrões de fosfolípidos puros aplicados e devidamente identificados (P1, P2 e P3) na mesma placa de TLC. P1- fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (PG); P2- lisofosfatidilcolina (LPC), esfingomiéline (SM), fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PE)..... 50

**Figura 12-** Quantificação relativa das 3 classes de fosfolípidos identificadas após separação por TLC em crianças não obesas e obesas. Os resultados encontram-se representados em termos de médio  $\pm$  desvio-padrão de 3 réplicas biológicas (n=3). LPC-lisofosfatidilcolina, SM-esfingomiéline e PC- fosfatidilcolina. \* P<0.05 vs. Não obesos (ANOVA Bonferroni's Multiple Comparison Test) ..... 51



<b>Figura 13</b> – Composição de ácidos gordos nos extratos fosfolipídicos de amostras de crianças não obesas e obesas. O perfil de ácidos gordos foi obtido pela análise dos cromatogramas e espetros de massa recorrendo à técnica GC-MS. Os resultados encontram-se representados em termos de médio ± desvio-padrão de 3 réplicas biológicas (n=3). **P<0.01 vs. Não obesos (ANOVA Bonferroni's Multiple Comparison Test).....	52
<b>Figura 14</b> – Cromatograma geral obtido por HPLC-MS e MS/MS com a separação de cada classe de fosfolípidos, em diferentes tempos de retenção, presentes nas amostras de crianças não obesas e obesas. A classe das PE elui entre os 4-6 min, a classe das PC elui entre os 16-20 min, a classe das SM elui entre os 20-22 min e finalmente a classe das LPC elui entre os 25-28 min. ....	53
<b>Figura 15-</b> (A) Espetro de HPLC-MS, no modo positivo, no tempo de retenção entre os 16-20 min, onde se pode observar as espécies mais abundantes de PC; (B) Exemplo de um espetro de HPLC-MS/MS do ião de m/z 782,5 da espécie molecular PC (36:4) com o ião caraterístico da cabeça polar, colina, de m/z 184,1, bem como as perdas neutras de -256 Da e -304 Da dos ácidos gordos C16:0 e C20:4, respetivamente. ....	54
<b>Figura 16-</b> (A) Espetro de HPLC-MS, no modo negativo, no tempo de retenção entre os 16-20 min, onde se pode observar as espécies mais abundantes de PC; (B) Espetro de HPLC-MS/MS do ião de m/z 816,5 da espécie molecular PC (34:2) com os iões [RCOO] <sup>-</sup> de m/z 255,2 e de m/z 279,2 correspondentes aos ácidos gordos C16:0 e C18:2, respetivamente, a perda de -74 Da correspondente à perda caraterística de -CH <sub>3</sub> COOCH <sub>3</sub> , o ião de m/z 168,0 correspondente à cabeça polar di-metilada e o ião de m/z 78,9 que corresponde à perda do HPO <sub>3</sub> <sup>-</sup> na cabeça polar. ....	55
<b>Figura 17-</b> (A) Espetro de HPLC-MS, no modo positivo, no tempo de retenção entre os 25-28 min, onde se pode observar das espécies mais abundantes de LPC. (B) Exemplo de um espetro de MS/MS do ião de m/z 496,3 da espécie molecular LPC (C16:0) com o ião caraterístico da cabeça polar, colina+grupo fosfato, de m/z 184,1, bem como a perda neutra de -256 Da do ácido gordo C16:0.....	56
<b>Figura 18-</b> (A) Espetro de HPLC-MS, no modo positivo, no tempo de retenção entre os 20-22 min, das espécies mais abundantes de SM. (B) Exemplo de um espetro de HPLC-MS/MS do ião de m/z 703,5 da espécie molecular SM (d34:1, SM d18:1/16:0) com o ião caraterístico da cabeça polar, colina+grupo fosfato, de m/z 184,1, bem como a perda neutra de colina-H <sub>2</sub> O (183-18 Da), representado pelo ião de m/z 502,5. A azul está representado a esfingosina (d18:1) e a verde o ácido gordo de cada espécie molecular de SM.....	57
<b>Figura 19</b> – Exemplo de um espetro de MS/MS do ião de m/z 636,4 da espécie molecular PE (28:0, PE 14:0/14:0) com a perda caraterística da cabeça polar, de 141 Da, bem como o ião [RCO] <sup>-</sup> dos ácidos gordos de cada espécie molecular que neste caso corresponde aos 2 ácidos gordos C14:0.....	58

<b>Figura 20-</b> Análise de componentes principais (PCA) com 192 espécies moleculares de fosfolípidos identificadas. O primeiro componente em PCA cruzar todas as 192 espécies moleculares detetadas contabiliza 31,7% da variância geral.....	66
<b>Figura 21-</b> T-test não emparelhado com um p-value <0,05 com todas as 192 espécies moleculares detetadas. Os pontos roxos e cinza representam as 192 espécies de fosfolípidos identificadas. Os pontos roxos representam as 76 espécies moleculares que apresentaram diferenças significativas entre grupos das crianças obesas e as crianças não obesas. Os pontos cinzentos representam as espécies moleculares cujas diferenças entre crianças obesas e não obesas não diferem significativamente. ....	67
<b>Figura 22-</b> Volcano Plot das 76 espécies moleculares estatisticamente significativas. Os pontos roxos e cinzentos representam as 76 espécies de fosfolípidos estatisticamente diferentes. Os pontos roxos representam as espécies moleculares cujas diferenças entre grupos as crianças obesas e não obesas contribuíram mais para a diferença estatística. Os pontos cinzentos representam as espécies moleculares cujas diferenças entre as crianças não obesas e obesas não diferem significativamente nos parâmetros definidos.....	69
<b>Figura 23-</b> Mínimos Quadrados Parciais- Análise Discriminante (PLS-DA) com 192 espécies moleculares de fosfolípidos identificadas. O primeiro componente no PLS-DA intersecta todas as 192 espécies moleculares detetadas representando cerca de 31,3% da variância geral. ....	70
<b>Figura 24-</b> Lista de Importância Variável na Projeção (VIP, do inglês Variable Importance in the Projection). ....	71

## Abreviaturas

**AA** – ácido araquidónico

**ACN** – acetonitrilo

**AF** – ácido fórmico

**AG** – ácidos gordos

**AGS** – ácidos gordos saturados

**ALT** – alanina aminotransferase

**AMPK** - proteína cinase ativada pelo AMP  
(do inglês, *AMP-activated kinase*)

**ANOVA** – análise de variância (do inglês,  
*analysis of variance*)

**apoB-100** – apolipoproteína B-100

**APPL1** – proteína adaptadora fosfotirosina  
que interage com o domínio PH e zíper da  
leucina 1 (do inglês, *adaptor protein  
containing pleckstrin homology domain,  
phosphotyrosine binding domain and  
leucine zipper motif*)

**AST** – aspartato aminotransferase

**ChREBP** - proteína de ligação de elemento  
responsivo a hidratos de carbono (do inglês,  
*carbohydrate responsive element binding  
protein*)

**CL** – cardiolipina (do inglês, *cardiolipin*)

**CoA** – coenzima A

**COX**- ciclo-oxigenase

**CPT** – carnitina palmitoiltransferase

**DM2** – diabetes *mellitus* tipo II

**DPA** – ácido docosa-hexaenoico (do inglês  
*docosapentaenoic acid*)

**EH** – esteatose hepática

**EHA** – esteatose hepática alcoólica

**EHNA** – esteatose hepática não alcoólica

**EPA** – ácido eicosapentaenoico (do inglês  
*eicosapentaenoic acid*)

**FAT** – translocase de ácidos gordos (do  
inglês *fatty acid translocase*)

**FFA** – ácidos gordos livres (do inglês, *free  
fatty acids*)

**FL** – fosfolípido

**GC-FID** – cromatografia gasosa acoplada a  
um detetor de ionização de chama (do inglês  
*gas chromatography– flame ionization  
detector*)

**GC-MS** – cromatografia gasosa acoplada à  
espetrometria de massa (do inglês *gas  
chromatography–mass spectrometry*)

**HDL** - lipoproteína de alta densidade (do  
inglês *high density lipoprotein*)

**HDL-C** - colesterol-lipoproteína de alta  
densidade (do inglês *high-density  
lipoprotein cholesterol*)

**HETE** – ácido hidroxeicosatetraenóico (do  
inglês *hydroxyeicosatetraenoic acid*)

**HPLC** – cromatografia líquida de alta  
eficiência (do inglês *high-performance  
liquid chromatography*)

**HPLC-MS e MS/MS** – cromatografia  
líquida acoplada à espetrometria de massa e  
à espetrometria de massa tandem (do inglês  
*liquid chromatography–mass spectrometry  
and mass spectrometry tandem*)

**HSL** – hormona sensível à lípase (do inglês,  
*hormone-sensitive lípase*)

**IDL** - lipoproteína de densidade intermédia  
(do inglês *intermediate density lipoprotein*)

**IL** – interleucina

**IMC**- índice de massa corporal

**IRM** – imagem por ressonância magnética

**JAK/STAT** – cinase Janus/ transdutor de sinal e ativador de transcrição (do inglês, *janus kinase/ signal transducer and activator of transcription*)

**LDL** – lipoproteína de baixa densidade (do inglês *low density lipoprotein*)

**LDL-C** - colesterol-lipoproteína de baixa densidade (do inglês *low density lipoprotein cholesterol*)

**LDN** – lipogénese *de novo*

**LOX** – lipoxigenase

**LPC** – lisofosfatidilcolina (do inglês *lysophosphatidylcholine*)

**LPL** – lipoproteína lípase

*m/z* – massa/carga

**Mttp** - proteína de transferência de triglicéridos microsomais (do inglês *microsomal triglyceride transfer protein*)

**MUFAs** – ácidos gordos monoinsaturados (do inglês *monounsaturated fatty acids*)

**oxLDL** – lipoproteína de baixa densidade oxidada

**PA-** ácido fosfatídico (do inglês, *phosphatidic acid*)

**PAI-1** - inibidor do ativador do plasminogénico-1 (do inglês *plasminogen activator inhibitor-1*)

**PC** – fosfatidilcolina (do inglês *phosphatidylcholine*)

**PCA** – análise de componentes principais (do inglês, *principal component analysis*)

**PCR** – proteína C reativa

**PE** – fosfatidiletanolamina (do inglês *phosphatidylethanolamine*)

**PG** – fosfatidilglicerol (do inglês *phosphatidylglycerol*)

**PI** – fosfatidilinositol (do inglês, *phosphatidylinositol*)

**PKA** – proteína cinase A (do inglês, *protein kinase A*)

**PLS-DA** - mínimos quadrados parciais-análise discriminante (PLS-DA, do inglês *partial least square – discriminant analysis*)

**PPARs** - recetores ativados por proliferador de peroxisoma (do inglês, *peroxisome proliferator-activated receptors*)

**PS** – fosfatidilserina (do inglês, *phosphatidylserine*)

**PUFAs** – ácidos gordos polinsaturados (do inglês *polyunsaturated fatty acids*)

**RI** – resistência à insulina

**SM** – esfingomiéline (do inglês, *sphingomyelin*)

**SOCS** – supressores da sinalização de citocinas (do inglês, *suppressors of cytokine signaling*)

**SREBPs** - proteínas reguladoras do elemento regulador do esterol (do inglês, *sterol regulatory element-binding proteins*)

**TG** – triglicérideos

**TGIIH** – triglicérideos intra-hepáticos

**TLC** – cromatografia de camada fina (do inglês *thin-layer chromatography*)

**TNF- $\alpha$**  - fator de necrose tumoral- $\alpha$  (do inglês *tumor necrosis factor- $\alpha$* )

**TSH** – hormona estimuladora da tiroide (do inglês *thyroid-stimulating hormone*)

**US** - ultrassonografia

**VIP** - importância variável na projeção (VIP, do inglês *variable importance in the projection*)

**VLDL** – lipoproteína de muito baixa densidade (do inglês *very low density lipoprotein*)



# 1. Introdução

---





## 1. Introdução

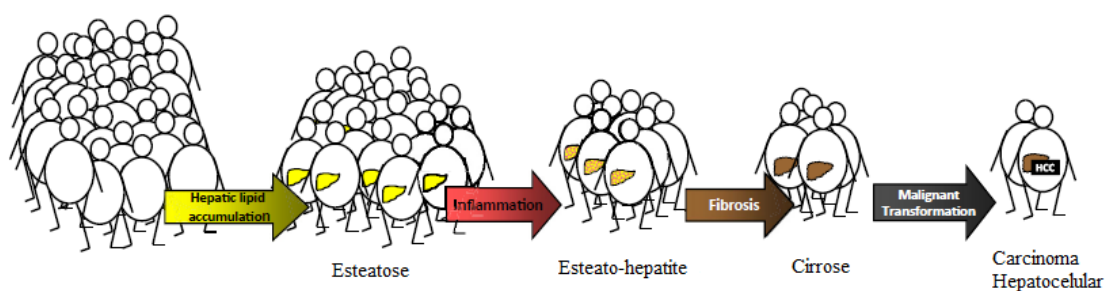
### 1.1 Esteatose hepática alcoólica vs. Esteatose hepática não alcoólica

O fígado é o principal órgão metabólico que executa um conjunto diversificado de funções bioquímicas necessárias para a homeostasia metabólica de todo o organismo. Devido ao aumento progressivo do consumo exagerado de lipídios e hidratos de carbono pode haver uma acumulação excessiva de triglicerídeos intra-hepáticos (TGIH) (1). Isto tem consequências ao nível do metabolismo da glucose, dos ácidos gordos (AG) e das lipoproteínas como também pode causar inflamação no fígado, com consequente disfunção deste órgão e aparecimento de patologias relacionadas, como é o caso da esteatose hepática (EH) (1,2).

A EH desenvolve-se quando a taxa de absorção de AG (consumo e síntese com subsequente esterificação em triglicerídeos (TG)) é maior que a taxa de excreção de AG (oxidação e secreção), resultando, desta forma, na acumulação excessiva TG nas células do parênquima hepático e/ou no tecido adiposo (3). Há dois tipos de EH: a esteatose hepática alcoólica (EHA) que tem como causa o consumo excessivo de álcool, e a esteatose hepática não alcoólica (EHNA), que está associada a uma manifestação mais generalizada e subjacente a disfunções metabólicas e fortemente relacionada com fatores de risco tais como a resistência à insulina, dislipidémias e, principalmente, à obesidade (3,4). Estas estão incluídas num vasto conjunto de fatores de risco que constituem uma síndrome metabólica, sendo esta, por definição, um conjunto de fatores fisiológicos, bioquímicos, clínicos e metabólicos interligados que aumentam, exponencialmente, o risco de ocorrer doenças cardiovasculares (5).

Na EHA o consumo excessivo de etanol é o principal fator subjacente ao desenvolvimento desta patologia. O álcool, ao contrário de outras drogas, é uma fonte substancial de energia, fornecendo cerca de 7.1 kcal por grama. Este valor excede a energia fornecida por grama de hidratos de carbono ou proteínas (6). O principal órgão que metaboliza o álcool é o fígado. Este tem duas principais vias para o fazer, recorrendo à via álcool desidrogenase ou pelo sistema microsomal de oxidação do etanol, via citocromo P-450 2E1 (6–10). A primeira via é responsável pela biossíntese de ácidos gordos e lipoproteínas e a segunda via é responsável pela ocorrência do *stress* oxidativo que, consequentemente, leva à inflamação do fígado (7).

Por outro lado, a EHNA é caracterizada pela acumulação excessiva de TG nos hepatócitos, criando um desequilíbrio entre o armazenamento e a remoção de lípidos no fígado (4,11,12). Isto acontece porque há o aumento do consumo de uma dieta com alto valor calórico/hidratos de carbono e lípidos, levando ao aumento da lipogénese *de novo* (LDN) no fígado e ao aumento da lipólise no tecido adiposo. A LDN é denominada também como síntese endógena de AG e é caracterizada por converter o excesso de hidratos de carbono consumidos pela dieta em AG para armazenamento, uma vez que os AG possuem maior valor energético que os hidratos de carbono. Assim, no fígado, quando há um aumento da LDN, há maior acumulação de AG intra-hepáticos, na forma de TG (13). Relativamente à lipólise no tecido adiposo, esta refere-se ao processo catabólico da desagregação dos TG armazenados nas células do tecido adiposo e com libertação de ácidos gordos livres (FFA, do inglês *free fatty acids*) e glicerol para corrente sistémica, nomeadamente para o fígado. Assim, o aumento da lipólise do tecido adiposo, faz com que o armazenamento de FFA no fígado seja maior (14). Estes mecanismos levam ao desenvolvimento de disfunções metabólicas e/ou a fatores de risco metabólicos, tais como a obesidade, que propiciam o desenvolvimento da EHNA (11,14). Devido à formação da esteatose, os macrófagos e outras células imunes são recrutados para o fígado e libertam citocinas pró-inflamatórias (14,15). Este estado de inflamação faz com que a EHNA evolua para uma esteato-hepatite, podendo progredir para cirrose e, em último caso para um carcinoma hepatocelular, podendo ser necessário transplantação (Figura 1) (14).



**Figura 1**- Evolução da EHNA. Adaptado de Dietrich *et al.* (2). A maioria dos indivíduos com obesidade desenvolvem EH na ausência de consumo de álcool. Cerca de 30% dos indivíduos desenvolvem inflamação (esteato-hepatite) e progridem para cirrose e, em último, caso para um carcinoma hepatocelular. A EHNA, devido à sua alta prevalência, é reconhecida, mundialmente, como a doença hepática mais frequente.

O mecanismo de biossíntese de ácidos gordos e a acumulação de lípidos no fígado na EHNA ainda não está completamente clarificado (16), contudo sabe-se que ocorre um aumento do metabolismo das lipoproteínas, como TG, colesterol, lipoproteína de baixa densidade (LDL, do inglês *low density lipoprotein*) e aumento da sua libertação para a corrente sistémica, levando ao aumento dos níveis de LDL plasmáticos (16–18). Para além das lipoproteínas, verifica-se níveis aumentados de enzimas como a alanina aminotransferase (ALT) e a aspartato aminotransferase (AST), e de FFA quando comparados com indivíduos saudáveis (16–20). Em análise, o nível aumentado das enzimas ALT e AST e dos FFA é característico de uma disfunção hepática e da presença de dislipidémias, podendo ser um importante biomarcador que revela que um indivíduo possa estar perante uma situação de EHNA, como será explicitado posteriormente neste capítulo.

Recentemente, foi reportado que mais de 50% dos adultos nos 27 países da união europeia têm excesso de peso ou são obesos e apresentam EHNA (12). Há também evidências que indivíduos com elevados valores de índice de massa corporal (IMC) e obesidade visceral são mais suscetíveis a desenvolverem a EHNA (1). Deste modo, a EHNA pode ser considerada endémica na Europa e é uma potencial ameaça para a saúde pública (12). Mundialmente, a EHNA tem uma elevada prevalência na América do Sul e Médio Oriente e uma baixa prevalência no continente africano (21). Tem também surgido o aumento progressivo da obesidade infantil, a nível mundial, e o primeiro caso de EHNA em idade pediátrica foi reportado em 1983 por Moran *et al.*(22). Adicionalmente, a EHNA pediátrica é maioritariamente assintomática e, frequentemente é apenas diagnosticada em fase avançada da doença quando encontrados níveis elevados de aminotransferases acidentalmente ou após um rastreio de comorbidades relacionadas com a obesidade (23,24).

### **1.2 Etiologia da esteatose hepática não alcoólica associada com a obesidade e possível correlação com a obesidade em crianças**

Segundo a Direção Geral da Saúde a obesidade é uma doença em que o excesso de gordura corporal acumulada pode atingir graus capazes de afetar a saúde. O excesso de gordura resulta de sucessivos balanços energéticos positivos, em que a quantidade de energia ingerida é superior à quantidade de energia dispensada. Os fatores que determinam este desequilíbrio são complexos e incluem fatores genéticos, metabólicos,

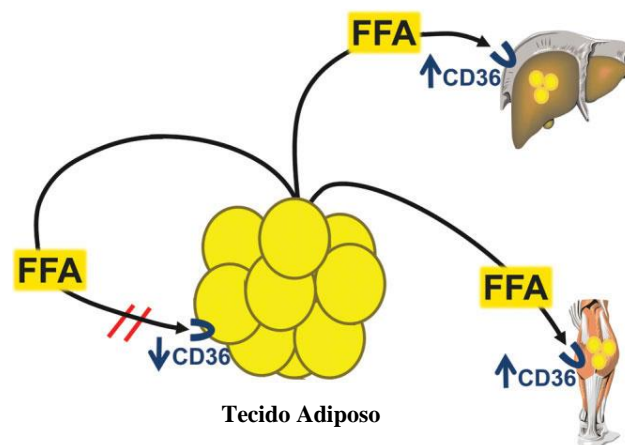
ambientais e comportamentais. Este desequilíbrio tende a perpetuar-se, pelo que a obesidade é uma doença crónica (25).

A prevalência de excesso de peso e obesidade em crianças e adolescentes aumentou nas últimas décadas, sendo neste momento a principal ameaça para a saúde pública a nível mundial (26), nomeadamente, em Portugal, sendo considerado em 2017 o quinto país da Europa com maior taxa de crianças obesas (27,28). Uma criança é considerada obesa se o percentil do seu IMC for igual ou superior a 95 comparativamente ao percentil do IMC de crianças do mesmo sexo e idade. Por outro lado, uma criança apresenta excesso de peso se o percentil do seu IMC for igual ou superior a 85 e inferior a 95 comparativamente ao percentil do IMC de crianças do mesmo sexo e idade (29). Em Portugal, no ano de 2015, diversos estudos demonstraram que numa população de crianças com idades entre os 6 e os 8 anos mais de 35% apresentavam excesso de peso e que mais de 14% são obesas (28). Adicionalmente, verificou-se que numa população de adolescentes portugueses (10-18 anos) o excesso de peso é superior em 30% e a obesidade em 8% relativamente a esta mesma população (28). Na obesidade infantil para além da alimentação ser rica em gorduras e hidratos de carbono, podem também estar presentes fatores genéticos, problemas socioeconómicos e o sedentarismo (26–29). Sendo a obesidade associada ao desenvolvimento da EHNA as crianças obesas ou com excesso de peso são mais propensas a desenvolver EHNA. Assim, de modo a prevenir que as crianças desenvolvam esta doença crónica, é fundamental conhecer os mecanismos subjacentes de como a obesidade pode estar envolvida no processo patológico da esteatose, para atuar ao nível da prevenção e do diagnóstico precoce.

A esteatose, tendo como origem a obesidade, desenvolve-se quando a taxa de consumo AG e a sua síntese com subsequente esterificação em TG é maior que a taxa de oxidação e secreção dos AG intra-hepáticos. Contudo, a quantidade de TG presente nos hepatócitos representa uma complexa interação de vários fatores: a) entre a concentração hepática de AG que deriva dos FFA do plasma libertados pela hidrólise de TG do tecido adiposo e pelos FFA libertados a partir da hidrólise dos TG circulantes, b) a lipogénese *de novo* de TG, c) a oxidação de AG e d) exportação da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL, do inglês *very low density lipoprotein*)-TG para a circulação sistémica (1). A contribuição relativa de cada uma destas vias na EHNA foi definida por Donnelly *et al.*(30). Estes reportaram que 59% da formação da EH provém dos FFA não esterificados circulantes, 26% da LDN e 15% da dieta. Isto sugere que na ausência de uma dieta rica em AG, a produção excessiva de AG pelo tecido adiposo é a principal

fonte que contribui para o excesso de acumulação de TG no fígado, sendo por este motivo a obesidade a principal causa de EH.

A taxa de consumo hepático de FFA depende do fornecimento sistêmico de FFA por parte do tecido adiposo para o fígado (Figura 2) e a capacidade do fígado transportar os FFA. A maior parte dos FFA libertados para o fígado provêm do tecido adiposo, esses FFA entram na circulação sistêmica e através da artéria hepática e da veia porta são libertados no fígado (1). Num estudo por Mittendorfer *et al.*(31), verificou-se que a taxa de AG libertados para a circulação sistêmica aumenta, diretamente, com o aumento de massa gorda, logo a taxa de FFA libertados é maior em indivíduos obesos do que em indivíduos não obesos. Adicionalmente, foi evidenciado que a expressão genética e/ou o conteúdo da proteínas membranares FAT/CD36, também são importantes reguladores da absorção de FFA plasmáticos para o músculo-esquelético, fígado e tecido adiposo (32). Estas proteínas estão aumentadas no fígado, mas diminuídas no tecido adiposo em indivíduos obesos com EHNA em comparação com indivíduos obesos que têm valores normais de TGIH (Figura 2). Logo, isto sugere que em obesos com EHNA as proteínas membranares FAT/CD36 redirecionam os FFA plasmáticos para o músculo-esquelético e para o fígado, aumentando ainda a acumulação dos FFA no fígado (1,32). Assim, é possível verificar que alterações na lipólise no tecido adiposo e nos TG circulantes (Figura 4) e a presença das proteínas FAT/CD36 no fígado (Figura 2) estão envolvidos na formação da esteatose.



**Figura 2** - Alterações nas células no transporte de FFA para acumulação de TG no fígado no músculo-esquelético, na EHNA. Adaptado de Fabbrini *et al.*(1). A translocase de AG (FAT, do inglês *fatty acid translocase*) e CD36 regulam o *uptake* de FFA do plasma para o fígado e músculo-esquelético. A expressão da CD36 e do conteúdo proteico é menor no tecido adiposo e maior no fígado e no músculo-esquelético, havendo assim o aumento de conteúdo TGIH.

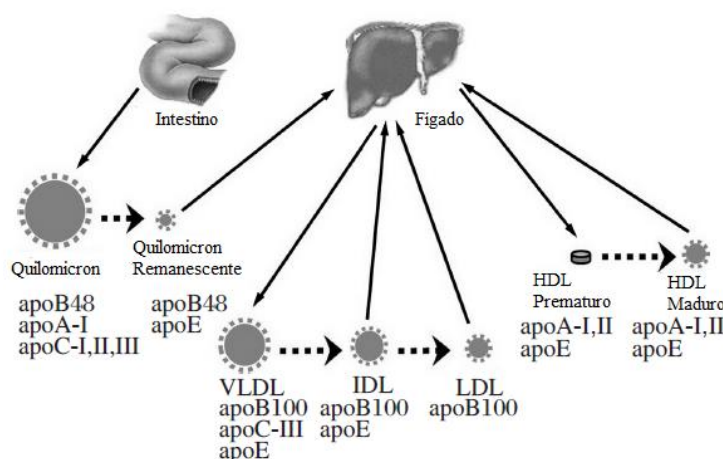
A lipogénese *de novo* (LDN) é um dos possíveis mecanismos responsável pela acumulação de AG no fígado. Quando os indivíduos obesos ingerem glucose em excesso, há uma maior conversão da glucose em piruvato, durante a glicólise, e conseqüentemente pela ação da enzima piruvato desidrogenase é formada a acetil- coenzima A (CoA). Esta é convertida a malonil-CoA pela ação da acetil-CoA carboxilase e por diversos ciclos de reações metabólicas forma-se uma molécula de palmitato, favorecendo, deste modo, a biossíntese de AG (33). A taxa da LDN é regulada por enzimas, nomeadamente o complexo da síntese dos AG, a acetil-CoA carboxilase, a diacilglicerol aciltransferase 1 e 2, a estearoil-CoA desaturase 1 e por vários fatores de transcrição nucleares, tais como as proteínas reguladoras do elemento regulador do esterol (SREBPs, do inglês *sterol regulatory element-binding proteins*), proteínas de ligação a elementos sensíveis a hidratos de carbono (ChREBP, do inglês *carbohydrate responsive element binding protein*), o recetor  $\alpha$  liver X, o recetor farnesoide X e os recetores ativados pelo proliferador do peroxissoma (PPARs, do inglês *peroxisome proliferator-activated receptors*) (33). A LDN hepática é regulada independentemente pela insulina e pela glucose através da ativação do SREBP-1c e da ChREBP, respetivamente (Figura 4) (1). Mitsuyoshi *et al.*(34) e Kohjima *et al.*(35) verificaram, em humanos com EHNA, níveis hepáticos aumentados de expressão de genes, como os SREBP-1 e PPAR- $\alpha$ . Adicionalmente, foi reportado que há uma elevada contribuição da LDN para a produção total de TGIH em indivíduos com EHNA (36). Esta contribuição é responsável por 15 a 23% da produção de AG, na forma de TGIH, sendo estes posteriormente excretados, para a circulação sistémica, em VLDL-TG (30,36). Contudo, em indivíduos normais a contribuição da LDN na produção total de TGIH é menor, sendo a incorporação de AG inferior a 5% (30). Como já foi referido anteriormente, a via LDN tem uma baixa contribuição na síntese de TG podendo ter um papel importante na regulação metabólica. Tendo em conta esta ideia, foi evidenciado que o primeiro intermediário da LDN, o malonil-CoA, inibe a atividade da carnitina palmitoiltransferase-1 (CPT-1) prevenindo, assim, a entrada de FFA na mitocôndria, impedindo a ocorrência da oxidação dos AG (37). Corroborando esta ideia, Kohjima *et al.*(35) verificaram que em indivíduos com EHNA a expressão da CPT-1 hepática é baixa, logo há uma maior prevenção da entrada de FFA para o interior da mitocôndria e, conseqüentemente há inibição da oxidação dos FFA.

Em indivíduos saudáveis, a oxidação dos AG intra-hepatocelulares ocorre primariamente dentro da mitocôndria. Os AG são transportados para dentro da matriz

mitocondrial pela CPT-1 e pela CPT-2, formando duas unidades *fatty acil-CoA* (libertando acetil-CoA) a cada ciclo havendo di-hidrogenação, hidratação e reações de clivagens que envolvem enzimas solúveis que são reguladas pelo PPAR- $\alpha$  (38). O acetil-CoA resultante da oxidação dos AG pode entrar no ciclo do ácido tricarboxílico para a oxidação completa e produzir energia para o fígado ou pode ser condensado para formar corpos cetônicos que são transportados para outros tecidos (37). Mas há evidências que em indivíduos com EHNA há anormalidades nas mitocôndrias que estão relacionadas com a patogênese desta doença (39–42). Estas anormalidades são lesões na ultraestrutura, deleção do DNA mitocondrial, diminuição da atividade dos complexos da cadeia respiratória e, conseqüentemente, uma oxidação diminuída dos AG. Para além disto, Ibdah *et al.*(40) estudaram a disfunção mitocondrial em modelo animal e verificaram que as mitocôndrias em ratinhos com EHNA eram grandes e dilatadas, em pouca quantidade e a matriz mitocondrial apresentava inclusões paracristalinas e densas, indicando disfunção mitocondrial. Em análise, se existe um decréscimo da oxidação do AG, a LDN será favorecida, logo a acumulação de AG será maior, o que contribuirá para a formação de esteatose. Adicionalmente, como já foi referido anteriormente, há uma menor expressão da CPT-1 o que vai inibir a oxidação dos AG.

Por fim, com a esteatose, ocorre a acumulação também de VLDL nos hepatócitos. As VLDL são lipoproteínas produzidas no fígado e libertadas na corrente sistémica (1). Estas são formadas a partir dos quilomicrons formados após a ingestão de uma dieta rica em ácidos gordos e colesterol (Figura 3) (43). Pela ação da lipoproteína lípase (LPL) os lípidos presentes nos quilomicrons são usados pelos tecidos periféricos, e os quilomicrons são transformados em quilomicrons remanescentes e captados pelo fígado (43,44). Este órgão produz a apolipoproteína B-100 (apoB-100) pela ação da proteína de transferência de triglicerídeos microsomais (Mttp, do inglês *microsomal triglyceride transfer protein*) (45) que vai ser incorporada nos quilomicrons remanescentes, originando, assim, as VLDL, o que por sua vez são precursoras das LDL (Figura 3) (43). Os TG podem ser armazenados nos hepatócitos, como acima mencionado, ou incorporados nas VLDL e excretados para a corrente sanguínea. A VLDL uma vez no sangue, o seu conteúdo de TG vai diminuindo pela ação da LPL, formando a lipoproteína de densidade intermédia (IDL, do inglês *intermediate density lipoprotein*) e posteriormente, a LDL, tendo esta uma elevada quantidade de colesterol (44). A LDL circulante é absorvida pelo fígado pela ligação da LDL ao recetor LDL (Figura 3) (43,44). Deste modo, com o aumento da excreção das VLDL para a corrente sistémica, os níveis de LDL plasmáticos e,

consequentemente, de colesterol livre irão também aumentar ocorrendo, assim, complicações na saúde dos indivíduos, como por exemplo dislipidémias e doenças cardiovasculares como será explicitado posteriormente nesta dissertação. O aumento da excreção das VLDL na EHNA já foi evidenciado na literatura como referido de seguida.

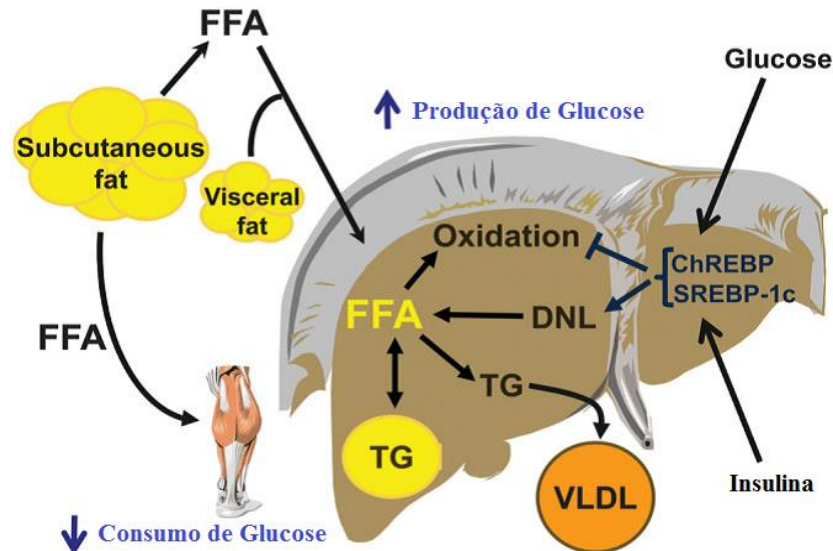


**Figura 3** – Visão geral do metabolismo das lipoproteínas. Adaptado de Jiang *et al.*(44). As lipoproteínas humanas são predominantemente produzidas no intestino delgado e fígado. No intestino delgado ocorre a formação dos quilomícrons, que contêm as apoB48, apoA-I, apoC-I, apoC-II e apoC-III. As partículas remanescentes são absorvidas pelos hepatócitos. O fígado produz a apoB-100, incorporada nas VLDL. Esta é hidrolisada na circulação sanguínea e convertida em IDL e LDL. Ambas podem ser incorporadas nos hepatócitos. A lipoproteína de alta densidade (HDL, do inglês *high-density lipoprotein*) prematura torna-se madura na circulação e tem um papel importante no transporte de colesterol reverso.

Os AG que são esterificados com TG e excretados nas VLDL derivam de várias fontes (1,45). Por exemplo, Lewis *et al.*(45) verificaram que em indivíduos com valores normais de TGIH, cerca de 70% dos AG incorporados em VLDL-TG têm origem do plasma sistémico, ou seja da dieta, e os restantes 30% derivam de fontes não sistémicas, incluindo a LDN hepática. Os AG intra-hepatocelulares que não sofrem oxidação são esterificados em TG e incorporados em VLDL, e são libertados para a circulação sistémica ou armazenados no fígado. Segundo Adiels *et al.*(46) e Fabbrini *et al.*(47) os níveis de VLDL-TG são elevados em indivíduos com EHNA quando comparados com os indivíduos normais, sendo que os níveis de VLDL-TG são o dobro em indivíduos obesos com EHNA. O aumento dos níveis de VLDL-TG é principalmente devido ao aumento da contribuição dos AG não sistémicos, pois estes têm origem nos mecanismos acima mencionados, como a LDN (47). Adicionalmente, foi evidenciado a relação entre os níveis de VLDL-TG e o conteúdo de TGIH (47). Verificou-se que as VLDL-TG aumentam linearmente com o aumento do conteúdo TGIH, mas em indivíduos com



EHNA a concentração de VLDL-TG estagna, independentemente do conteúdo de TGIH. Portanto, o aumento da taxa de secreção pelo fígado da VLDL-TG em indivíduos com EHNA não é capaz de compensar o aumento da taxa de produção de TGIH, de modo que a esteatose mantêm-se (Figura 4) (47).



**Figura 4** - Inter-relações fisiológicas entre o metabolismo dos AG, resistência à insulina, dislipidémias e conteúdo de TGIH na EHNA. Adaptado de Fabbrini *et al.*(1). A taxa de libertação de FFA do tecido adiposo e libertação no fígado e no músculo-esquelético é maior em pessoas obesas com EHNA, o que resulta num maior *uptake* dos FFA pelo fígado e músculo. Adicionalmente, a lipogénese *de novo* intra-hepática dos FFA é maior em indivíduos com EHNA do que aqueles que têm níveis normais de TGIH, o que contribui para uma maior acumulação intracelular de AGs. A produção e secreção de TG em VLDL é maior em indivíduos com EHNA, o que promove o mecanismo de remoção de TGIH, contudo a taxa de secreção não é adequadamente compensada com a taxa de produção de TG. Aumentando os níveis plasmáticos de glucose e insulina associados à EHNA há estimulação da lipogénese *de novo* e inibição da oxidação dos AG, pela ativação dos SREBP-1 e ChREBP. Estes metabolitos fazem com que haja o aumento dos níveis intracelulares de FFA que não são oxidados ou exportados sob a forma de VLDL-TG, mas são esterificados em TG e armazenados como *lipid droplets*.

Em suma, pode-se afirmar que a obesidade tem um papel fundamental no desenvolvimento da EHNA. Os indivíduos obesos devido ao seu estilo de vida têm maior propensão em armazenar AG no fígado, sob a forma de TGIH, favorecendo o desenvolvimento da EHNA. O aumento de TGIH vai despoletar uma disfunção no metabolismo lipídico, uma vez que vai aumentar a lipogénese *de novo* intra-hepática e diminuir a oxidação dos AG, promovendo deste modo a acumulação de TG no fígado. Por outro lado, o metabolismo lipoproteico também é afetado, pois há o aumento da produção e excreção da VLDL-TG para a corrente sistémica, contudo não o suficiente para prevenir a formação da esteatose.

### 1.2.1 Resistência à insulina

A diabetes mellitus tipo II (DM2), e consequentemente a resistência à insulina (RI), têm maior prevalência em indivíduos obesos, e esta muitas vezes está associada à EHNA (48,49). A associação entre a obesidade e a RI é uma possível relação de causa-efeito, uma vez que em estudos em humanos e ratinhos (50,51) indicaram que o aumento de peso está intimamente relacionado com a diminuição da sensibilidade à insulina. Existem várias vias para esta relação causa-efeito da obesidade e RI, como mecanismos endócrinos, inflamatórios e neuronais, tal como revisto em (52).

A insulina, em indivíduos normais, inibe a lipólise pelo tecido adiposo e a secreção de VLDL pelo fígado (53). Por outro lado, numa situação de obesidade que induz a RI há um maior desenvolvimento da EH pois há aumento da libertação de FFA do tecido adiposo para o fígado, podendo estes serem reesterificados em TG, aumentando, assim, a excreção de VLDL pelo fígado (53,54). Este mecanismo fisiopatológico parece ser mais funcional na presença de grande quantidade de tecido adiposo visceral, pois os adipócitos viscerais são mais sensíveis à lipólise do que os adipócitos subcutâneos. Esta hipótese é suportada por estudos que referem que indivíduos com EHNA apresentaram níveis de FFA elevados e uma débil supressão da lipólise pela insulina (55,56). Para além disto, a acumulação visceral de gordura está positivamente correlacionada com a EH e RI hepática, contudo também há evidências que a EH está associada à RI, independentemente da presença de gordura visceral (56). Mas, no entanto, existem duas teorias que afirmam que a RI pode promover a EHNA ou que a RI surge após já estar instalada a acumulação lipídica no fígado, como revisto em (11). Tendo em conta estas teorias, a associação entre a RI e a acumulação lipídica hepática é causada pelo efeito duplo que a insulina possui, ou seja a produção hepática de glucose (gluconeogénese) e a LDN no fígado. Este órgão controla a homeostasia dos níveis de glucose no sangue pela gluconeogénese e este processo é inibido pela insulina. Numa situação de RI hepática, esta inibição não é mais efetiva e o pâncreas compensa aumentando a produção de insulina para manter os normais níveis de glucose (57). Este aumento vai estimular a LDN, aumentando desta forma a produção lipídica (58). Na LDN um dos principais fatores de transcrição presente para este mecanismo, tal como mencionado na obesidade, é a SREBP-1 (Figura 4). A inibição da gluconeogénese e a ativação da via lipogénica requerem ambas o recetor de insulina. Tendo em conta a segunda teoria, esta surgiu devido a relação entre EH e RI ser um ciclo vicioso, em que a RI sistémica leva à EH e

vice-versa (11). Os mecanismos presentes associados à EHNA e à RI, envolvem, à semelhança da obesidade e a EHNA, alterações no consumo de AG, na LDN, na oxidação do AG e na secreção das VLDL (Figura 4) (11). Em modelo animal com uma dieta rica em AG, verificou-se uma sobre-expressão da SREBP-1 e do ChREBP (Figura 4) o que aumenta esta associação EHNA-RI (59). Também se apurou que há um aumento da incorporação de AG pela CD36 hepática levando ao aumento da acumulação de TG (60) e que o recetor *α liver* ativa o SREBP-1 e ChREBP (61). Um outro mecanismo associado à EHNA-RI é a oxidação dos AG, em que se verificou, em modelo animal com EHNA-RI (62), uma diminuição cerca de 50% da oxidação mitocondrial dos AG. Para além disso, em outro modelo animal com EHNA-RI, os ratinhos apresentaram um aumento da excreção de VLDL devido ao aumento da expressão da Mtp (63).

Tendo em conta, que a RI pode ser uma consequência da obesidade e em que ambas ocorre o aumento da libertação das VLDL para a corrente sanguínea, as crianças obesas com EHNA podem desenvolver uma dislipidémia secundária, tendo uma elevada probabilidade de desenvolverem doenças cardiovasculares.

### 1.2.2 Dislipidémias

A dislipidémia é o termo usado para designar todas as anomalias quantitativas ou qualitativas nos lípidos no sangue. Esta é genericamente caracterizada por haver elevados níveis de TG e/ou colesterol-lipoproteína de baixa densidade (LDL-C, do inglês *low-density lipoprotein cholesterol*) ou baixas concentrações de colesterol-lipoproteína de elevada densidade (HDL-C, do inglês *high-density lipoprotein cholesterol*) (64–66). As dislipidémias são os principais fatores de risco para a ocorrência de doenças cardiovasculares, sendo estas as principais causas de morte dos países desenvolvidos, incluindo Portugal (64,66). As dislipidémias representam um fator de risco para o aparecimento de aterosclerose, uma vez que há acumulação de lípidos nas paredes das artérias podendo levar à obstrução parcial ou total do fluxo sanguíneo que chega ao coração e ao cérebro (66).

Aproximadamente 20-80% dos indivíduos com EHNA têm dislipidémia secundária, muitas vezes em consequência da obesidade. Muito raramente pode ocorrer EHNA associada a dislipidémias por razões genéticas (dislipidémia primária) (64). Os indivíduos com obesidade, RI e/ou DM2 apresentam mudança comum no perfil metabólico que é a alteração dos níveis séricos de lípidos, assim, verifica-se que há uma

forte correlação entre estas doenças crônicas e o surgimento da EHNA (64,67). Nos indivíduos com EHNA a forma mais comum de dislipidemia secundária é a dislipidemia aterogénica, pois apresentam níveis elevados de TG, LDL-C e níveis baixos HDL-C. Vários estudos demonstram isto mesmo em adultos, como Hamaguchi *et al.*(68) , Brea *et al.*(69) e Bril *et al.*(70). Em crianças obesas com EHNA também foi verificado o mesmo por Pacifico *et al.*(71) e por outros autores (53,72,73). Nestes estudos, os autores também verificaram que as crianças com EHNA possuíam um alto índice de RI. Para além disto, recentemente, Gökçe *et al.*(74) estudaram, em pacientes pediátricos, a espessura média da íntima da carótida, como marcador da aterosclerose. Os autores verificaram que essa espessura em crianças obesas com EHNA é significativamente maior do que nas crianças saudáveis. Adicionalmente, foi também reportado que 20-80% das crianças com EHNA apresentam hipertrigliceridemia e/ou hipercolesterolemia (75). Há também evidências que revelam que a presença de uma dislipidemia prolongada pode aumentar a expressão e a atividade do SREBP-1c que afeta adversamente o perfil lipídico e a síntese de lipoproteínas no fígado, incluindo o aumento dos níveis de TG, VLDL e LDL e diminuição dos valores de HDL (76,77). Mas tal como na RI, ainda não há a certeza se as dislipidémias provocam ou derivam da EHNA.

Em suma, verifica-se que em situações de RI e dislipidémias associadas à EHNA ocorrem com frequência nos indivíduos que apresentam obesidade ou excesso de peso. Contudo, atualmente não se conhece todos os mecanismos fisiopatológicos associados às dislipidémias que levam à formação da EHNA em crianças, sabendo-se apenas que os TG, LDL-C e HDL-C estão alterados em crianças obesas com EHNA. Por fim, salienta-se que EHNA é um importante potenciador para a ocorrência de doenças cardiovasculares, sendo por isso importante fazer um diagnóstico precoce em crianças.

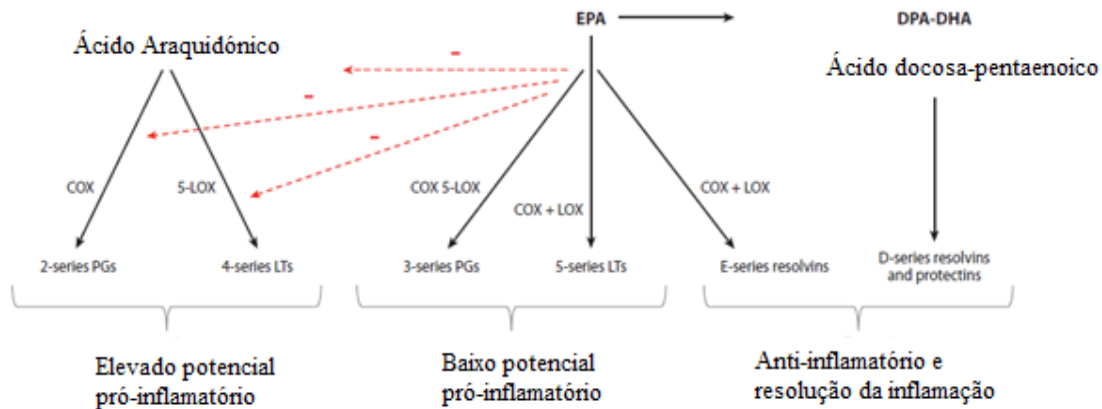
### **1.3 Processo inflamatório e enzimático na esteatose hepática não alcoólica**

A EHNA está associada a estados de inflamação crónica e ao aumento do *stress* oxidativo (53,64). Estudos demonstraram que crianças com EHNA apresentam níveis elevados do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , do inglês *tumor necrosis factor- $\alpha$* ), proteína C reativa (PCR), LDL oxidada (oxLDL, do inglês *oxidized low-density lipoprotein*), do inibidor do ativador do plasminogénio-1 (PAI-1, do inglês *plasminogen activator inhibitor-1*) e níveis diminuídos de adiponectina em comparação com os controlos (78–81). Em análise, verifica-se que a reação inflamatória estimula a expressão

do PAI-1 e, conseqüentemente, das moléculas de adesão nas células do endotélio, provocando uma disfunção endotelial no fígado (64). Adicionalmente, Pacifico *et al.* (82) verificaram em 400 crianças obesas com EHNA que os níveis de PCR são maiores do que o controle. Os elevados níveis de LDL na EHNA podem também ser um dos fatores associados ao processo inflamatório, uma vez que a LDL penetra na íntima das artérias no estado inicial da aterosclerose, liga-se à matriz proteoglicana, onde a LDL pode sofrer oxidação e/ou modificações enzimáticas e transformar-se em oxLDL. A oxLDL é imunogénica e ativa as células do endotélio, os monócitos e as células T. Adicionalmente, a oxLDL é tóxica em altas concentrações e poderá ser a causa da apoptose celular na aterosclerose. Os efeitos imunes e pró-inflamatórios da oxLDL são mediados por vários fatores, entre os quais os fosfolípidos inflamatórios, como a lisofosfatidilcolina (LPC, do inglês *lysophosphatidylcholine*) (83).

Um estudo que avaliou a composição de AG plasmáticos de indivíduos com EHNA revelou que o seu perfil lipídico era rico em ácidos gordos  $\omega$ -6 e pobre em  $\omega$ -3 (84). Os principais ácidos gordos polinsaturados (PUFAS, do inglês *polyunsaturated fatty acids*)  $\omega$ -6 são ácido linoleico (C18:2  $\omega$ -6) que é o precursor do ácido araquidónico (AA) (C20:4  $\omega$ -6) (85–87). O AA é um precursor dos mediadores pró-inflamatórios, que se formam pela ação da ciclo-oxigenase (COX) 2 e da lipoxigenase (LOX). A COX-2 converte o AA em prostangladinas e a LOX em converte o AA em leucotrienos (Figura 5), que estimulam a produção da PCR, PAI-1, TNF- $\alpha$  e interleucina (IL) -6 (87). Em análise, uma dieta rica em PUFAS  $\omega$ -6 prejudica o estado da EH ajudando a evoluir para uma esteato-hepatite, uma vez que o estado de inflamação no fígado é maior. Há evidências que também revelam que em indivíduos com EHNA com uma dieta rica em PUFAS  $\omega$ -6 o risco de desenvolverem doenças cardiovasculares é maior devido à produção de precursores pró-inflamatórios, como revisto em (87,88). Por outro lado, os PUFAS  $\omega$ -3 como o ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3  $\omega$ -3), precursor do ácido eicosapentaenoico (EPA, do inglês *eicosapentaenoic acid*) (C20:5  $\omega$ -3), do ácido docosa-pentaenoico (DPA, do inglês *docosapentaenoic acid*) (C22:5  $\omega$ -3) e do ácido docosa-hexaenoico (DHA, do inglês *docosahexaenoic acid*) (C22:6  $\omega$ -3), são precursores de moléculas anti-inflamatórias como as resolvinas (Figura 5), prevenindo o desenvolvimento da EH pelo aumento da oxidação dos AG, via PPAR- $\alpha$ , e pela diminuição da lipogénese *de novo*, via SREBP-1, como revisto em (85,87,88). Os PUFAs  $\omega$ -3 EPA e o DPA são convertidos pela LOX em resolvinas e em protectinas. Estas têm um efeito anti-inflamatório, pois regulam a circulação e a ativação de células que causam a inflamação, tais como os granulócitos,

macrófagos e linfócitos (Figura 5) (85). Deste modo, de forma a prevenir que EH evolua para uma esteato-hepatite é necessário que haja um equilíbrio entre o rácio PUFAS  $\omega$ -3/ $\omega$ -6. Os benefícios de uma dieta rica em PUFAS  $\omega$ -3 foi estudado em crianças com EHNA por Mager *et al.*(89), Janczyk *et al.*(90) e Boyraz *et al.*(91).



**Figura 5** - Metabolitos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios derivados dos PUFAS  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3. Adaptado de Scorletti *et al.*(85). As ciclo-oxigenases (COX) e as lipoxigenases (LOX) convertem o ácido araquidónico em eicosanóides. Estes são lípidos com função sinalizadora e têm um importante papel na regulação da inflamação, nestes lípidos estão incluídos as prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos. Estes eicosanóides têm o papel principal na regulação da produção de citocinas pró-inflamatórias. Por outro lado, os eicosanóides derivados do ácido eicopentaenoico têm um efeito anti-inflamatório. Os PUFAs  $\omega$ -3 são substratos num grupo de mediadores lipídicos, as resolvinas e as protectinas.

A obesidade é a principal causa para o surgimento da EHNA, portanto as crianças terão uma grande quantidade de gordura visceral no tecido adiposo. Foi relatado recentemente que o tecido adiposo é um tecido endócrino que produz múltiplas proteínas, como as adipocinas adiponectina e leptina e a hormona sensível à lipase (HSL, do inglês *hormone-sensitive lipase*) (92). Por outro lado, as citocinas como o TNF- $\alpha$ , a IL-6, IL-1, IL-8, IL-18 são excretadas pelas células inflamatórias infiltrando-se no tecido adiposo. A desregulação das adipocinas/citocinas está profundamente envolvido na patogénese da EHNA (92). Mais especificamente, o desequilíbrio das adipocinas/citocinas resulta no agravamento da RI, da EH e na, conseqüente progressão de uma simples esteatose para uma esteato-hepatite (92,93). A adiponectina é anti-inflamatória e tem um papel importante na regulação dos metabolismos lipídicos e da glucose. Contudo em indivíduos que apresentem uma grande quantidade de gordura visceral no tecido adiposo esta adipocina é pouco sintetizada (53,92). Deste modo, níveis elevados de TNF- $\alpha$  e níveis baixos de adiponectina estão associados ao desenvolvimento da EHNA (92). Foi

verificado por Musso *et al.*(81), Zou *et al.*(94), Lebensztejn *et al.*(95) e Boyraz *et al.*(96) que crianças obesas com EHNA apresentavam níveis baixos de adiponectina. Outra adipocina associada à EHNA é a leptina, esta desempenha um papel crucial na regulação da homeostasia da energia e em funções metabólicas. A leptina é excretada pelo tecido adiposo e, primeiramente, reflete-se no armazenamento de energia corporal e, secundariamente, nas mudanças bruscas de ingestão de calorias, ou seja esta adipocina atua na regulação da fome dos indivíduos. A leptina também pode atuar como uma adipocina pró-inflamatória contribuindo para a progressão da EHNA (97). Num estudo em crianças obesas com EHNA verificaram que os níveis de leptina estavam elevados, o que significa que não há controle da sensação de fome, logo o consumo de ácidos gordos é maior favorecendo os processos subjacentes ao desenvolvimento da EH (95).

A EH vai causar uma lesão no fígado e o principal parâmetro associado a esta lesão é o aumento dos níveis das aminotransferases ALT e AST (98). Ambas catabolizam aminoácidos permitindo que estes entrem no ciclo do ácido cítrico (99). Adicionalmente, sabe-se que a ALT é específica de uma lesão no fígado enquanto a AST pode ser um biomarcador em lesões do fígado, coração, músculo-esquelético, rim e cérebro (99). Em vários estudos em crianças obesas com EHNA verificou-se este aumento das aminotransferases, tendo a ALT um aumento mais significativo do que a AST (53,71–73,100). Em suma, os níveis das aminotransferases ALT e AST e do painel lipídico e hormonal estão alterados na EHNA. Assim, para que seja possível diagnosticar a EHNA em crianças é necessário compreender quais os métodos de diagnóstico que são usados atualmente, como será descrito de seguida.

#### **1.4 Métodos de diagnóstico da esteatose hepática não alcoólica em crianças**

Atualmente os métodos de diagnóstico mais usados em crianças são os testes da função hepática, a ultrassonografia (US), imagem por ressonância magnética (IRM) e a biopsia hepática (23,24,101). A EHNA pediátrica é maioritariamente assintomática e, frequentemente são encontrados níveis elevados de aminotransferases acidentalmente ou após um rastreio de comorbidades relacionadas com a obesidade (23,24). As crianças também podem apresentar dor no quadrante superior direito, fadiga ou indisposição. Mais de 90% das crianças com EHNA são obesas e com adiposidade central. Numa análise abdominal é evidente uma hepatomegalia em cerca de 33%-55% das crianças, mas em

alguns casos esta situação é difícil de avaliar pela presença da massa de adiposidade central (24).

Na clínica, os primeiros métodos de diagnóstico a serem realizados em crianças obesas em que se suspeite que possam ter EHNA são os testes da função hepática (ALT, AST) e a US, acompanhados com testes em que se verifique que hajam disfunções metabólicas, tal como a caracterização do perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL e TG), medição da hemoglobina A1c ou hemoglobina glicada (identificação dos níveis de glicémia durante os dois meses anteriores à colheita) e da glicose e testes da função da tiroide (TSH, do inglês *thyroid-stimulating hormone*) (23,24,101). A US hepática é uma técnica pouco invasiva e é amplamente utilizada na clínica para detetar a infiltração de gordura nos hepatócitos (23). Contudo, com a US apenas se verifica se a criança tem uma esteatose média ou severa e não permite o diagnóstico numa fase inicial da doença. Se for realizada uma IRM é possível delinear as áreas dos hepatócitos com gordura de uma esteatose média e severa. Isto sugere que a ultrassonografia revela um diagnóstico inconclusivo, uma vez que é incapaz de identificar a regressão ou progressão do conteúdo de gordura dos hepatócitos em crianças com EHNA. A progressão da doença em crianças pode ser prevenida pela redução precoce de peso, o que diminui a infiltração de gordura nos hepatócitos. Isto pode ser observado através de uma IRM, contudo este método não é realizado com muita frequência, na clínica, devido ao seu custo (23).

A biopsia hepática é um método muito invasivo e só deve ser realizada se houver incerteza no diagnóstico (particularmente em crianças com menos de 10 anos ou não obesas), se verificar, por US, que a doença está num estado mais avançado ou por persistência dos valores elevados das aminotransferases (ALT e/ou AST) após 3-6 meses da mudança do estilo de vida (24). Contudo, este método é o único onde é permitido distinguir entre uma simples esteatose e uma possível progressão para uma esteato-hepatite (23).

Por fim, verifica-se que não existe nenhum método de diagnóstico pouco invasivo, usado na clínica, em que seja possível detetar a doença em estágios iniciais em crianças com EHNA. Tendo em conta os métodos de diagnóstico usados atualmente e a elevada prevalência da EHNA em crianças é cada vez mais emergente que existam métodos de diagnóstico em que seja possível diagnosticar a doença em estágios iniciais e evitar que esta progrida para estados mais graves. Alguns trabalhos têm sido publicados na literatura para avaliar a variação dos lípidos plasmáticos e em tecido hepático a nível molecular na EHNA, como será apresentado no sub-capítulo seguinte.



### **1.5 Lipidômica no estudo da esteatose hepática não alcoólica**

A lipidômica é amplamente definida como o estudo à grande escala de vias e redes de lípidos celulares em sistemas biológicos (102). A lipidômica pode ser usada para identificar o perfil molecular de espécies de lípidos em diferentes amostras biológicas, sendo por isso um método apazível para analisar a distribuição característica de lípidos e fosfolípidos em cada tipo de tecidos ou biofluidos, bem como detetar diferenças de perfil de lípidos entre dois ou mais grupos de estudo associadas a diferentes estados metabólicos, em saúde e em doença. Este método tem um grande potencial de aplicação para o estudo e diagnóstico de doenças, em especial de doenças associadas com distúrbios no metabolismo lipídico, como a EHNA e doenças cardiovasculares (102). Assim, é de prever que estudos de lipidômica possam permitir a descoberta de possíveis biomarcadores lipídicos, podendo ser estes utilizados para o diagnóstico precoce ou avaliar a progressão da EHNA (102).

Na literatura existem alguns estudos que revelam a importância da lipidômica como possível método de diagnóstico pouco invasivo na progressão da EHNA para uma esteato-hepatite, em modelo animal e humanos, dando mais ênfase ao estado de esteato-hepatite. Contudo, não existe, ainda na literatura, estudos de análise lipidômica em EHNA pediátrica. Os diferentes estudos de lipidômica publicados sobre a EHNA foram apenas realizados em adultos ou em modelo animal usando o tecido hepático, obtido por uma biópsia, ou o plasma. Até à data foram encontrados poucos artigos onde se usou a abordagem lipidômica na progressão da EHNA. Neste sub-capítulo serão analisados esses artigos, como explicitado na Tabela 1.

**Tabela 1** – Resumo dos estudos publicados sobre a avaliação de possíveis biomarcadores lipídicos na progressão da EHNA para uma esteato-hepatite, utilizando uma abordagem lipidômica como método de diagnóstico pouco invasivo.

<b>Autores</b>	<b>Possíveis biomarcadores</b>	<b>Modelo</b>	<b>Tipo de amostra</b>	<b>Métodos utilizados*</b>
Puri <i>et al.</i> (103)(2007)	↑ lípidos totais, DAG, TG, colesterol livre IH, PUFAs $\omega$ -6, ésteres de colesterol ↓ PC e PE	Humanos	Tecido hepático	Separação das diferentes classes de lípidos – <b>TLC</b> Perfil lipídico de AG – <b>GC-FID</b>
Puri <i>et al.</i> (104)(2009)	↑ MUFAs (C18 e C16), AGS (C16), PUFAs $\omega$ -6 e ácidos HETE ↓ PUFAs $\omega$ -3 nas PC e plasmalogénios	Humanos	Plasma	Separação das diferentes classes de lípidos – <b>TLC</b> – e dos fosfolípidos – <b>HPLC</b> Perfil lipídico de AG – <b>GC-FID</b> Análise e quantificação dos eicosanóides – <b>LC-MS e MS/MS</b>
Loomba <i>et al.</i> (105) (2015)	↑ ácidos HETE	Humanos	Plasma	Análise e quantificação dos eicosanóides – <b>LC-MS e MS/MS</b>
Gorden <i>et al.</i> (106) (2011)	↑ DAG ↓ plasmalogénios	Humanos e Animal	Tecido hepático	Identificação dos glicerofosfolípidos – <b>ESI-MS e MS/MS</b> Separação e análise dos DAG – <b>TLC e MS</b>
Serviddio <i>et al.</i> (107) (2016)	↑ oxisterois	Animal	Tecido hepático	Separação dos oxisterois por <b>TLC</b> e quantificação por <b>GC-MS</b>

\*cromatografia de camada fina (**TLC**, do inglês *thin-layer chromatography*); cromatografia líquida de alta eficiência (**HPLC**, do inglês *high-performance liquid chromatography*); cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização de chama (**GC-FID**, do inglês *gas chromatography – flame ionization detector*); cromatografia líquida acoplada à espetrometria de massa e à espetrometria de massa tandem (**LC-MS e MS/MS**, do inglês *liquid chromatography–mass spectrometry and mass spectrometry tandem*); ionização por eletrospray de espetrometria de massa (**ESI-MS/MS**); cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa (**GC-MS**, do inglês *gas chromatography–mass spectrometry*)

Puri *et al.*(103), em 2007, foram os primeiros a estudar o perfil lipídico, usando tecido hepático, de indivíduos com EHNA comparativamente a indivíduos normais. Os autores verificaram que na EHNA houve um aumento dos níveis de lípidos totais, diacilglicerídeos (DAG), TG, colesterol livre intra-hepático, PUFAs, do rácio  $\omega$ -6/ $\omega$ -3, ésteres de colesterol e de fosfatidilserina, porém os níveis de FFA permaneceram inalterados. Contudo, os níveis de fosfatidilcolina (PC, do inglês *phosphatidylcholine*), LPC e fosfatidiletanolamina (PE, do inglês *phosphatidylethanolamine*) diminuíram (103). Mais tarde os mesmos autores, fizeram uma análise dos lípidos plasmáticos, nomeadamente os fosfolípidos e plasmalogénios, e dos metabolitos eicosanóides de indivíduos com EHNA e esteato-hepatite (104). Os indivíduos com EHNA apresentaram,

relativamente ao controlo, níveis elevados de ácidos gordos monoinsaturados (MUFAs, do inglês *monounsaturated fatty acids*), como o ácido oleico (18:1  $\omega$ -9) e o ácido palmitoleico (16:1  $\omega$ -7), de ácidos gordos saturados (AGS), como o ácido palmítico (16:0) e de PUFAS  $\omega$ -6. Porém os níveis dos PUFAS  $\omega$ -3 encontravam-se diminuídos nas espécies moleculares PC, PE e nos plasmalogénios totais. Contudo, estes autores não quantificaram a quantidade de cada classe de fosfolípidos presentes no plasma de doentes com EHNA bem como não analisaram as diferentes espécies moleculares de cada classe de fosfolípidos. Para além disto, os autores verificaram que havia uma particularidade na progressão da EHNA para uma esteato-hepatite. Foi observado um aumento dos níveis dos metabolitos do AA resultantes da ação lipoxigenase, como o ácido 5-hidroxiicosatetraenóico, normalmente conhecido como o ácido HETE (do inglês, *hydroxyicosatetraenoic acid*) associado ao aumento do *stress* oxidativo (104). Adicionalmente, Loomba *et al.*(105) estudaram metabolitos dos PUFAs, como biomarcadores da progressão da EHNA, uma vez que o *stress* oxidativo está envolvido no desenvolvimento da esteato-hepatite. Por outro lado, Gorden *et al.*(106) verificaram, em humanos, níveis significativamente elevados de DAG. Esta evidência parece contribuir para os níveis aumentados de TG. A síntese dos TG é realizada pela diacilglicerol acil transferase, tendo como principal percurso o DAG, logo com o aumento dos níveis de DAG os níveis de TG podem estar também aumentados (1,106). Para além disto, os elevados níveis de DAG levam à ativação da proteína cinase C o que aumenta a proliferação celular podendo levar à fibrose, ou seja ao penúltimo estado da progressão da EHNA (Figura 1). Os mesmos autores observaram que havia uma diminuição dos níveis hepáticos de plasmalogénios na EHNA e na esteato-hepatite (106). Os plasmalogénios são um tipo de fosfolípidos caracterizados pela ligação éter entre o glicerol e uma das cadeias de AG e são sintetizados no retículo endoplasmático e mais expressos em elevado estado de *stress* oxidativo (102). Em análise, conclui-se que os níveis elevados de DAG e diminuídos de plasmalogénios podem ser importantes biomarcadores na progressão da doença. De salientar, Puri *et al.*(103,104) também verificaram estes mesmos resultados.

Num estudo recente (107) foi analisado o efeito de diferentes dietas na progressão da EHNA, em tecido hepático de modelo animal, usando uma abordagem lipidómica. Os autores verificaram que numa dieta rica em AG e colesterol as concentrações de oxisterois eram superiores às restantes dietas. Os oxisterois são metabolitos do colesterol que são produzidos no fígado durante o processo inflamatório. Estes podem ser

sintetizados enzimaticamente ou por autooxidação do colesterol (107). Este estudo revela o papel da interação de metabolitos de lípidos e de colesterol na lesão hepática durante o desenvolvimento e progressão da EHNA. Para além disso, o aumento de concentração de oxiesterois induz vários mecanismos celulares e moleculares nas células hepáticas, incluindo o *stress* oxidativo nos hepatócitos e a libertação de fatores pró-inflamatórios e pró-fibronogénicos nos macrófagos que aumentam a patogenicidade da EHNA para uma esteato-hepatite (108).

Em suma, tendo em conta os estudos apresentados verifica-se que há alguns lípidos que variam com a progressão da EHNA, tais como os níveis aumentados de DAG, TG, PUFAS  $\omega$ -6, ácidos HETE e de oxiesterois. Comitantemente, também constatou-se níveis diminuídos de PUFAS  $\omega$ -3 nas classes de fosfolípidos PC e nos plasmalogénios. No entanto, há que ter em atenção que os resultados observados foram obtidos em estudos isolados, havendo a necessidade de validação desses mesmos resultados com mais estudos. Por outro lado, cada estudo apresentado tinha o seu objetivo portanto os autores analisaram um número específico de lípidos, como por exemplo Puri *et al.* (103,104) analisaram uma vasta quantidade de lípidos enquanto que Serviddio *et al.* (107) focaram-se na análise dos oxiesterois. Para além disso, foram usados métodos de análise diferentes para a caracterização do perfil lipídico e separação e quantificação das diferentes classes de lípidos, sendo por isso necessário mais estudos para validar o método de análise mais adequado a usar. Contudo, a lipidómica parece apresentar um grande potencial como método de diagnóstico no estudo e na progressão da EHNA.

## 1.6 Objetivo

A EHNA é uma doença crónica e assintomática com elevada prevalência em idade pediátrica associada à acumulação de TG nas células hepáticas e, conseqüentemente, ao processo inflamatório. Os métodos de diagnóstico existentes atualmente não permitem que haja um diagnóstico precoce desta doença, sendo por isso emergente o surgimento de novos métodos de diagnóstico. Tendo em conta que não existem estudos em que foram analisadas as diferentes classes de fosfolípidos em plasma e que não existe reportado o estudo do perfil lipídico da EHNA em crianças usando uma abordagem lipidómica, é necessária mais investigação nesta área pediátrica com o intuito de encontrar biomarcadores lipídicos para que seja possível fazer um diagnóstico precoce ou já com a EHNA instalada evitar que haja a progressão da doença.

Assim, o objetivo deste trabalho baseia-se na quantificação fosfolípidos de plasma de crianças em risco de desenvolverem EHNA, dando mais ênfase às crianças com excesso de peso e obesas. Pretende-se, ainda, analisar o perfil das adipocinas e de proteínas associadas à inflamação através da técnica Slot Blot nas crianças em estudo. Adicionalmente, também pretende-se analisar o perfil de espécies moleculares de diferentes classes de fosfolípidos com a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa e separar as diferentes classes de fosfolípidos recorrendo à cromatografia de camada fina e, também, caracterizar o perfil fosfolipídico de ácidos gordos usando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. Com estas técnicas poderá ser possível verificar se nas crianças com excesso de peso e obesas há diferenças significativas nos níveis plasmáticos das adipocinas e proteínas associadas ao processo inflamatório e das espécies moleculares de fosfolípidos que podem contribuir ou estar associadas no desenvolvimento e progressão da EHNA.



## 2. Materiais e Métodos

---





## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Reagentes

Os padrões de fosfolípidos 1-nonadecanoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (LPC 19:0), 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glicero-3-phosphoethanolamine (PE 16:0/18:1), 1',3'-bis[1,2-dimyristoyl-sn-glicero-3-phospho]-sn-glycerol (CL 18:1/18:2), N-palmitoyl-D-erythro-sphingosylphosphorylcholine (SM d18:1/16:0), foram obtidos da *Avanti® Polar Lipids, Inc* (Alabaster, AI, EUA) e os 1,2-diacyl-sn-glicero-3-phosphocholine (PC 14:0/14:0), 1,2-diacyl-sn-glicero-3-phospho-L-serine (PS 14:0/14:0), 1,2-diacyl-sn-glicero-3-phospho-(1-D-myo-inositol) (PI 14:0/14:0), 1,2-diacyl-sn-glicero-3-phosphate (PA 14:0/14:0) e 1,2-diacyl-sn-glicero-3-phospho-(1-rac-glycerol) (PG 14:0/14:0) foram obtidos da *Sigma-Aldrich* (St. Louis, Missouri, EUA) e usados sem qualquer purificação adicional. O ácido fórmico (AF), o hidróxido de amónia, o acetato de amónia, primulina, Tween 20 e o Ponceau S. foram obtidos da *Sigma-Aldrich Chemical Co* (St. Louis, MO, EUA), a trietilamina foi adquirida pela *Merck* (Darmstadt, Alemanha), o ácido perclórico foi obtido pela *Chem-Lab NV* (Zedelgem, Alemanha) e o molibdato de amónio pela *Panreac* (Barcelona, Espanha). O ácido ascórbico, a acetona e o cloreto de sódio (NaCl) foram adquiridos pela *VWR Chemicals* (Leuven, Bélgica), o di-hidrogenofosfato de sódio di-hidratado foi obtido pela *Riedell-de Haën* (Seelze, Alemanha) e o hidróxido de potássio pela *Ceamed* (Portugal). O tampão Tris foi adquirido da *PlusOne, Pharmacia Biotech* (Uppsala, Suécia). Por fim, o clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>), o metanol (MeOH), o etanol e o hexano foram adquiridos pela *Fisher Scientific* (Leicestershire, UK) e o acetonitrilo (ACN) por *Sharlab, S.L.* (Barcelona, Espanha) com grau de pureza para HPLC foram usados sem qualquer purificação adicional. A água Milli-Q foi utilizada para todas as experiências, filtrada através de um filtro de 0,22 µm e obtida usando o sistema Milli-Q Millipore (Synergy<sup>®</sup>, Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA).

## 2.2 Crianças em estudo e critério de seleção

As crianças com excesso de peso e obesas foram recrutadas da consulta de endocrinologia pediátrica, do Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Nutrição e as crianças sem excesso de peso e não obesas foram recrutadas na Consulta Externa do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, sendo a sua identidade anónima e não havendo qualquer interferência na normal conduta das suas consultas. A seleção das crianças ocorreu durante o período de dezembro de 2016 a março de 2017. Estas crianças foram divididas em dois grupos distintos de IMC, crianças com excesso de peso e crianças com obesidade. Para ambos os grupos de estudo foram selecionadas 2 crianças com excesso de peso e obesas do sexo masculino e 3 crianças com excesso de peso e obesas do sexo feminino tendo como diagnóstico pré-definido de excesso de peso ou obesidade, uma vez que apresentam o percentil do seu IMC maior que 85 e menor que 95 ou maior do que 95, respetivamente. Relativamente às crianças sem excesso de peso e não obesas foram selecionadas para ambos os grupos de estudo 2 crianças sem excesso de peso e obesas do sexo masculino e 3 crianças sem excesso de peso e não obesas do sexo feminino, tendo o percentil do seu IMC inferior a 5, ou seja com baixo peso, ou tendo o percentil do seu IMC entre 5 e 85, ou seja com peso normal. Estas crianças sem excesso de peso e não obesas não apresentavam qualquer patologia hepática e outra doença que poderia interferir com o metabolismo lipídico. A obtenção dos dados como a idade, sexo, peso, altura e IMC foram fornecidos pelo sistema informático SClínico Hospitalar. Foram também avaliados os parâmetros bioquímicos glicose, insulina, aminotransferases AST e ALT, hemoglobina A1c, colesterol total, HDL, LDL, TG e TSH. Os valores dos parâmetros descritos foram facultados pelo *software* Apollo (sistema de informação para o laboratório de análises clínicas). Depois, as amostras de plasma foram armazenadas a -80°C até ao posterior estudo do perfil lipídico e de adipocinas. Este trabalho foi apresentado e aprovado pela comissão de ética do Centro Hospitalar do Baixo Vouga.

## 2.3 Caracterização do perfil de adipocinas e de proteínas associadas ao processo inflamatório

Com o objetivo de quantificar a adiponectina, a leptina, a grelina, a proteína C reativa e a hormona sensível à lipase presentes no plasma de crianças com excesso de peso e com obesidade foi utilizada a técnica Slot Blot. Esta é uma técnica de imunodeteção capaz de

identificar as proteínas presentes no plasma recorrendo ao uso de anticorpos específicos. Primeiramente foi preparado, em duplicado, 50  $\mu$ L de cada amostra de plasma em 950  $\mu$ L de tampão TBS 1x (1:20 v/v) (tampão de 100 mM de Tris, pH de 8,0, com 1,5 mM de NaCl) e foi aplicado, sob vácuo, um volume de 100  $\mu$ L numa membrana de nitrocelulose (Whatman®, Protan®). A eficiência da transferência de proteína para a membrana foi confirmada por coloração da membrana com Ponceau S.

As membranas foram posteriormente incubadas em uma solução de leite magro em pó 5% (m/v), preparada em TBS-T (tampão TBS com 0,5% de Tween 20), durante 1 h, à temperatura ambiente e com agitação, de modo a bloquear os locais de ligação não específicos. As membranas foram então incubadas com o anticorpo primário respetivo para a adiponectina (Abcam; anti-adiponectina, *mouse* monoclonal, ab22554), a leptina (Abcam; anti-leptina, *rabbit* monoclonal, ab16227), a grelina (Abcam; anti-grelina *rabbit* monoclonal, ab64325), a proteína C reativa (PCR) (Abcam; anti-PCR *rabbit* monoclonal, ab65842) e a hormona sensível à lipase (HSL) (Abcam, anti-HSL, *rabbit* policlonal, ab45422), durante 1 h, à temperatura ambiente e com agitação. Os anticorpos foram diluídos 1:1000 numa solução de 5% de leite magro em pó em TBS-T. Após a incubação, as membranas foram lavadas com TBS-T três vezes durante 10 min com o intuito de retirar o anticorpo não ligado covalentemente e posteriormente incubadas com o anticorpo secundário (anti-rabbit ou anti-mouse, NA934 ou NA931; GE Healthcare Life Sciences), diluído 1:1000 numa solução de 5% leite magro em pó em TBS-T, durante 1 h com agitação à temperatura ambiente. Após três lavagens com TBS-T, durante 10 min cada, as membranas foram tratadas com reagentes de quimioluminescência (reagentes ECL-Plus; Grisp), de acordo com as instruções do fabricante, e expostas a um filme de raio X (Kodak Biomax Light Film, Sigma, St. Louis, MO, EUA), que após revelação, foram digitalizados num Molecular Imager Gel Doc XR+ System (BioRad) e analisados com o *software* QuantityOne versão 4.5.2 (BioRad).

#### **2.4 Extração de fosfolípidos do plasma de crianças em risco de desenvolverem esteatose hepática não alcoólica**

Os fosfolípidos foram obtidos a partir do plasma por extração em fase sólida (SPE) de amostras de plasma de crianças sem excesso de peso (n=5), com excesso de peso (n=5), não obesas (n=5) e obesas (n=5). Para tal adicionou-se 5  $\mu$ g de padrão interno PC (14:0/14:0) a 100  $\mu$ L de amostra de plasma. Posteriormente, adicionou-se 900  $\mu$ L de ACN

com AF a 1% a cada amostra, agitando-se num vórtex durante 30 segundos para precipitação das proteínas. De modo a obter a separação das fases, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm durante 5 min e o sobrenadante foi transferido para colunas *Hybrid SPE-PL* (Supelco, Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA). As colunas *Hybrid SPE-PL* estavam acopladas a um *Visiprep SPE Vacuum Manifold* (Supelco, Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA). Após a aplicação do sobrenadante adicionou-se 1 mL de ACN com AF a 1 % e, posteriormente, 1 mL de ACN puro. A eluição dos fosfolípidos retidos nas colunas foi realizada através da adição de duas alíquotas consecutivas de 1 mL de ACN com hidróxido de amónio a 5 %. Esta extração foi apenas realizada uma vez. As amostras foram levadas à secura total através de uma corrente de azoto e armazenadas a -20 °C até posterior análise.

## 2.5 Quantificação de fosfolípidos através do ensaio da quantificação de fósforo

Com o objetivo de determinar a quantidade total de fosfolípidos presentes no extrato lipídico das amostras de plasma (n=20) realizou-se um ensaio de quantificação espectrofotométrica de fósforo tendo como base o método proposto por Barillet e Lewis (109). Este método foi também utilizado para comparar a quantidade existente em cada classe de fosfolípido fracionada por cromatografia de camada fina (TLC). As amostras de plasma previamente secas foram redissolvidas em 300 µL de CHCl<sub>3</sub>. Transferiu-se 10 µL de cada amostra, em duplicado, para tubos de vidro e secou-se em fluxo de azoto. Adicionou-se 125 µL de ácido perclórico a 70 % (m/v) a cada tubo e incubou-se durante 40-60 min a 180 °C num bloco de aquecimento (Stuart Block Heater SBH200D). Os padrões internos com concentração variável entre 0,1 e 2 µg de fósforo foram preparados através de uma solução padrão de di-hidrogenofosfato de sódio di-hidratado com 100 µg/mL de fósforo. Estas soluções padrão foram submetidas ao mesmo tratamento que as amostras, com exceção do aquecimento no bloco. Seguidamente, adicionou-se a cada um dos tubos aproximadamente 825 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q, 125 µL de molibdato de amónio 2,5 % (m/v) e 125 µL de ácido ascórbico 10 % (m/v). Após a adição de cada solução aos tubos incubou-se durante 10 min a 100 °C num banho de água (Precistern P-Selecta). No final do tempo mencionado, os tubos foram colocados em água fria para promover o arrefecimento.

Após a solução ter arrefecido, foram transferidos 200 µL de cada solução para uma microplaca de 96 poços, em duplicado, cuja leitura da absorvência foi realizada a 797 nm

num leitor de microplacas *Multiskan GO* (Thermo Scientific). A quantidade de fósforo presente em cada amostra foi calculada por regressão linear através da representação gráfica da absorvência média dos duplicados de padrão interno (eixo Y) em função da quantidade de fósforo presente em cada padrão (eixo X). Nos extratos lipídicos de plasma, a quantidade de fosfolípidos presente foi diretamente calculada pela multiplicação da quantidade de fósforo por 25.

## 2.6 Separação das classes de fosfolípidos por cromatografia de camada fina (TLC)

A separação das classes de fosfolípidos presentes no extrato lipídico do plasma foi realizada através de cromatografia de camada fina (TLC, do inglês *Thin Layer Chromatography*) utilizando placas de sílica gel 60 (Merck) com zona de concentração 2,5x20 cm. Previamente à separação, as placas de sílica foram lavadas numa câmara (Lamag) contendo uma solução de  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (1:1, v/v), seguida de secagem na *hotte* durante 15 min e colocação da placa numa estufa a 100 °C durante 15 min. Após o arrefecimento da placa, aplicou-se o extrato fosfolipídico de plasma. Aplicaram-se 7,7  $\mu\text{L}$  do extrato fosfolipídico, correspondentes a 7,7  $\mu\text{g}$  de fosfolípido. No grupo do excesso de peso aplicaram-se 4 réplicas biológicas de crianças sem e com excesso de peso e no grupo da obesidade aplicaram-se 3 réplicas biológicas de crianças não obesas e obesas. A fim de identificar as classes de fosfolípidos presentes nas amostras, aplicou-se 10  $\mu\text{L}$  de cada padrão de fosfolípido em 3 *spots* da placa, em particular, fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (PG) e cardioplipina (CL); lisofosfatidilcolina (LPC), esfingomiéline (SM), fosfatidilinositol (PI) e fosfatidiletanolamina (PE); ácido fosfatídico (PA). Secaram-se os *spots* através de uma corrente de azoto e eluíram-se os fosfolípidos e os extratos lipídicos aplicados na placa de sílica numa câmara (Lamag) contendo um eluente composto por uma mistura de solventes de clorofórmio/etanol/ $\text{H}_2\text{O}$  Milli Q/trietilamina em proporção 30:35:7:35 (v/v/v/v). Após a eluição completa, a placa foi deixada na *hotte* até a evaporação completa do eluente. A revelação dos *spots* foi conseguida pela pulverização da placa com uma solução de primulina (50  $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ ), dissolvida numa mistura de acetona/ $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q (80:20, v/v). Seguidamente, os *spots* foram observados recorrendo a uma lâmpada de luz ultravioleta (Lamag,  $\lambda=254\text{ nm}$ ). A identificação das principais classes de fosfolípidos presentes nas crianças sem excesso de peso e não obesas e com excesso de peso e obesas foi realizada por comparação com os *spots* dos padrões de fosfolípidos aplicados na placa.

Para a quantificação das classes de fosfolípidos previamente separadas por TLC, os *spots* obtidos foram raspados da placa para tubos de vidro e quantificados através do ensaio da quantificação de fósforo anteriormente descrito em 2.5. Antes da leitura das absorvências das soluções, as amostras foram transferidas para *ependorfs* (1 mL) e centrifugadas a 1000 rpm durante 5 min usando uma centrífuga Micro Centrifuge 1-14 (Sigma-Aldrich, Reagente 5, Portugal), de modo a depositar a sílica e permitir a quantificação do fosfato. De seguida, calculou-se a percentagem de cada classe de fosfolípido em função da quantidade total de fosfolípido recuperada da placa de TLC, obtendo-se, assim, uma abundância relativa para cada classe de fosfolípido.

## **2.7 Análise e quantificação de ácidos gordos por cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa (GC-MS)**

A análise do perfil de ácidos gordos do extrato lipídico de plasma foi realizada através de GC-MS. Foram analisadas 3 extratos lipídicos de plasma de crianças sem excesso de peso e não obesas e 3 extratos lipídicos de plasma de crianças com excesso de peso e obesas. De modo a permitir esta análise por GC-MS foi necessário derivatizar as amostras, recorrendo à transesterificação de ácidos gordos. Assim, os ácidos gordos metilados são voláteis, sendo desta forma possível a sua análise pela técnica em questão. O processo de transesterificação seguiu as linhas gerais da metodologia (110) proposta pela União Internacional da Química Aplicada (IUPAC). De forma breve, o método baseia-se na adição de hidróxido de potássio em metanol com o objetivo de formar ésteres metílicos de ácidos gordos por transesterificação. Sendo assim, transferiu-se 7,5  $\mu\text{L}$  do extrato lipídico redissolvido em  $\text{CHCl}_3$ , correspondentes a 7,5  $\mu\text{g}$  de fosfolípidos, para um tubo, previamente lavado com *n*-hexano. Os tubos foram secos numa corrente de azoto, de modo a evaporar por completo o  $\text{CHCl}_3$ . Seguiu-se a adição de 1 mL de padrão interno C17:0 (0,41  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Sigma-Aldrich Chemical Co, EUA) em hexano a cada tubo e de 200  $\mu\text{L}$  de hidróxido de potássio (2 M) em metanol. Agitou-se vigorosamente num vortex durante 2 min e adicionaram-se 2 mL de solução cloreto de sódio (1g/100mL). De forma a separar as duas fases, realizou-se a centrifugação durante 5 min a 2000 rpm. Recolheu-se a fase orgânica para um *ependorf*, previamente lavado com hexano, tendo-se o cuidado de não retirar mais de 800  $\mu\text{L}$  de fase orgânica, de modo a não recolher sais, e levou-se à secura numa corrente de azoto. Foram feitas análises em duplicado para cada amostra. Para a análise por GC-MS, as amostras foram dissolvidas em 55  $\mu\text{L}$  de *n*-hexano,

tendo-se injetado 2  $\mu\text{L}$  dessa solução num cromatógrafo gasoso (Agilent Technologies 6890N Network, Santa Clara, CA, EUA) equipado com uma coluna capilar DB-FFAP de 30m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro, e 0,25 $\mu\text{m}$  de espessura (J&W Scientific, Folsom, CA, EUA). A injeção das amostras decorreu em modo *splitless*, com um tempo de *splitless* de 4,4 min e com o injetor a 220°C. O programa de temperaturas utilizado corresponde ao seguinte: uma temperatura inicial de 80 °C durante 3 min, com um aumento linear até aos 160 °C a 25 °C/min, seguindo um novo aumento linear de 2 °C/min até aos 210 °C e depois a 30°C/ min até aos 250 °C, permanecendo nos 250°C durante 10 min. O gás hélio utilizado para o transporte da amostra apresenta uma taxa de fluxo de 1,4 mL/min com a coluna a operar à pressão de 2,66 psi. O cromatógrafo gasoso encontrava-se acoplado a um espectrómetro de massa (Agilent 5973 Network Mass Selective Detector) equipado com uma fonte de impacto eletrónico a qual operava a 70 eV e à temperatura de 250 °C. Os espetros de massa foram adquiridos em modo *full scan* na gama  $m/z$  40-550 em ciclos de 1 s. A identificação dos ácidos gordos metilesterificados de cada amostra foi feita por comparação do tempo de retenção e dos espetros de massa com padrões comerciais de ácidos gordos metilesterificados (Supelco 37 Component FAME Mix) e pela confirmação através de comparação com os espetros de massa da base de dados Wiley e da biblioteca “*The AOCS Lipid Library*” (111). A percentagem relativa de cada ácido gordo foi calculada pelo método de área percentual com normalização adequada, considerando a soma de todas as áreas dos ácidos gordos identificados.

## **2.8 Análise e quantificação das classes de fosfolípidos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (HPLC-MS)**

De modo a analisar o perfil fosfolipídico do plasma de crianças não obesas e obesas, permitindo, assim, identificar as diferenças entre cada uma das condições, recorreu-se à técnica de HPLC-MS. Os fosfolípidos foram separados através da cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC-LC/MS) utilizando um sistema de HPLC *Thermo Accela* com injetor automático acoplado *on-line* ao espectrómetro de massa *Q Exactive Orbitrap* (Thermo, Alemanha). Para a análise, prepararam-se alíquotas de 5  $\mu\text{L}$  de amostra (correspondente a 5  $\mu\text{g}$  de extrato de fosfolípidos) com 4  $\mu\text{L}$  de padrão interno fosfatidiletanolamina (0,02  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ ) e 4  $\mu\text{L}$  de padrão interno de fosfatidilglicerol (0,012  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ ) em 87  $\mu\text{L}$  de eluente B (60 % ACN e 40 % de MeOH com 1 mM de acetato de amónio). Os 5  $\mu\text{L}$  desta mistura foram introduzidos numa coluna *Ascentis Si*

*HPLC Pore* (15 cm x 1,0 mm, 3  $\mu\text{m}$ ; Sigma-Aldrick), mantida a 30 °C. O caudal foi ajustado para 40  $\mu\text{L}/\text{min}^{-1}$  e o gradiente de solvente utilizado foi o programado da seguinte forma: 0% de eluente A (25 % de  $\text{H}_2\text{O}$ , 50 % de ACN e 25 % de MeOH com 1 mM de acetato de amónio (v/v)), durante 8 min; seguiu-se um aumento linear para 60 % de eluente A, durante 7 min, no qual se manteve durante 15 min, até retornar às condições iniciais, em 10 min. A análise dos fosfolípidos foi realizada num espectrómetro de massa do tipo *Q exactive orbitrap* com uma fonte de iões *eletraspray* aquecida (HESI) nos modos positivo e negativo. A fonte de HESI operou a uma voltagem de 3 kV no modo positivo e -2,7 kV no negativo. A taxa de fluxo de gás foi mantida a 15 unidades, a temperatura do capilar foi de 250 °C, o potencial das S-lentes RF foi igual a 50 unidades e a temperatura da sonda aquecida igual a 100 °C. A calibração da massa foi realizada a cada 7 dias para garantir uma precisão da massa inferior a 5 ppm. Para a aquisição dos espectros de massa definiu-se um método dependente dos dados (do inglês, *data dependente*). O método de aquisição foi em *full scan* entre os  $m/z$  200 e 1600, resolução de 70000, controlo automático de ganho de  $1 \times 10^6$  e 2 microscans. Os 10 iões mais intensos foram selecionados para fragmentação na célula de colisões HCD. A energia de colisão variou entre 25, 30 e 35 eV. Os espectros de MS/MS foram adquiridos com uma resolução igual a 17500, ganho automático de controlo  $1 \times 10^5$ , 1 microscan e janela de isolamento de  $m/z$  1. O limite para a seleção de iões foi  $2 \times 10^4$  contagens. O máximo de iões acumulados permitidos foi 100 ms para os espectros de MS e 50 ms para os espectros de MS/MS. A exclusão dinâmica foi definida para os 60 s. A análise dos espectros adquiridos, a fim de identificar o perfil em classes de fosfolípidos de cada condição experimental, foi efetuada por recurso ao programa de análise de dados *Xcalibur v3.0* (Thermo Fisher Scientific, EUA). Os espectros de massa foram processados e integrados no programa *MZmine v2.21* (112).

## 2.9 Análise estatística

Os resultados experimentais são apresentados em termos de média  $\pm$  desvio padrão. As diferenças existentes entre as crianças sem excesso de peso e com excesso de peso e as crianças não obesas e obesas nos parâmetros bioquímicos, quantificação de fosforo e no GC-MS foram estudadas usando a análise de variância com um fator (ANOVA, do inglês *analysis of variance*) combinada com o teste de comparação múltipla de Bonferroni. Na análise da caracterização das adipocinas e proteínas associadas à



inflamação foi usado o *t-test* não emparelhado. Os dados de HPLC-MS e MS/MS foram analisados estatisticamente por análise de componente principais (PCA), *t-test* não emparelhado, Volcano Plot e por Mínimos Quadrados Parciais- Análise Discriminante (PLS-DA). Considerou-se o valor  $p < 0,05$  como um indicador de significância estatística. A análise estatística foi realizada com recurso ao *software* PRISM® GraphPad, Inc. v5.01 para o *Windows*, exceto para os dados do HPLC-MS e MS/MS em que análise estatística foi realizada com recurso ao *software* IBM SPSS versão 24.0 para o *Windows* e ao *software* R versão 3.4.0 para o *Windows*.



**3. Caracterização do perfil de adipocinas, de  
proteínas associadas à inflamação e  
fosfolipídico do plasma de crianças em risco  
de desenvolverem EHNA**

---



### **3. Caraterização do perfil de adipocinas, proteínas associadas à inflamação e fosfolipídico do plasma de crianças em risco de desenvolverem EHNA**

A esteatose hepática não alcoólica (EHNA) é a forma mais prevalente de doença hepática crónica, com uma incidência de 10-20% na população pediátrica (4). Prevê-se que nos próximos 10 anos se torne a principal causa de falência hepática aguda em crianças e adolescentes de países ocidentais, com necessidade de transplantação (72,113,114).

Atualmente, considera-se que a obesidade é o principal fator para o desenvolvimento desta patologia pois interfere com mecanismos moleculares tais como o aumento da hidrólise dos TG pelo tecido adiposo e da lipogénese *de novo* (associada às proteínas SREBP-1c e ChREBP) bem como no processo inflamatório através do aumento da formação de mediadores pró-inflamatórios (72,75,85,87,115,116). Uma vez que a doença é crónica e assintomática, torna-se difícil o diagnóstico em fase inicial e por isso existe um interesse crescente em encontrar novos métodos para um diagnóstico precoce da doença, em especial em crianças com risco de desenvolverem EHNA. Na clínica, os principais métodos de diagnóstico usados quotidianamente são os testes da função hepática, a ultrassonografia e/ou imagem por ressonância magnética e, em último caso, a biopsia hepática (23,24,101). O método de diagnóstico mais específico e que permite a confirmação da doença é a biopsia hepática, mas este é um método muito invasivo e desagradável, especialmente para as crianças (24).

Tendo em conta que a prevalência da EHNA tem vindo a aumentar na idade pediátrica, devido ao aumento da obesidade nesta faixa etária, e que os métodos de diagnóstico existentes atualmente não permitem um diagnóstico precoce da EHNA, neste trabalho pretende-se, recorrendo à técnica de Slot Blot avaliar as alterações no perfil de adipocinas e de proteínas associadas à inflamação, como também à espetrometria de massa analisar o perfil fosfolipídico em crianças com excesso de peso e em crianças obesas, que poderão estar correlacionadas com o desenvolvimento da EHNA.

### 3.1 Caraterização do perfil de adipocinas, de proteínas associadas à inflamação e fosfolipídico de plasma crianças com excesso de peso

#### 3.1.1 Caraterização da amostra

As crianças foram recrutadas do Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Nutrição e da Consulta Externa do Centro Hospitalar do Baixo Vouga onde lhes foi medido o peso, altura e calculado o seu IMC com o intuito de recrutar crianças com e sem excesso de peso, tendo em conta os valores de referência, como representado no Anexo A.

Foram, assim, seleccionadas 10 crianças; 5 com excesso de peso e 5 sem excesso de peso (3 do sexo feminino e 2 do sexo masculino, para cada condição). Foram seleccionadas crianças que apresentavam um IMC entre 14,3 e 22,3 kg/m<sup>2</sup>, com média de 17,5 kg/m<sup>2</sup>, apresentando baixo peso, sendo denominadas nesta dissertação como crianças sem excesso de peso. Este grupo de crianças sem excesso de peso foi usado como controlo. Por outro lado, foram seleccionadas crianças que apresentavam um IMC entre 25,3 e 31,6 kg/m<sup>2</sup>, com média de 27,4 kg/m<sup>2</sup>, apresentando excesso de peso, sendo designadas nesta dissertação como crianças com excesso de peso (Tabela 2). O IMC das crianças com excesso de peso é significativamente elevado comparativamente às crianças sem excesso de peso. As crianças apresentavam idades compreendidas entre os 12 e 15 anos.

**Tabela 2** – Caraterização das crianças com e sem excesso de peso em termos de sexo, idade, IMC, percentil do IMC. Os valores médios de IMC estão apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão. \*\*\* P<0,001 vs. Sem excesso de peso (ANOVA *Bonferroni's Multiple Comparison Test*)

	Sexo	Idade	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Percentil do IMC
<b>Sem excesso de peso</b>	M	12	17,4	< 5
	F	12	14,3	< 5
	F	13	15,1	< 5
	M	12	18,6	5 a 85
	F	14	22,3	5 a 85
Média $\pm$ DP			17,5 $\pm$ 2,84	

<b>Excesso de peso</b>	M	14	26,9	85 a < 95
	F	12	25,3	85 a < 95
	F	15	31,6	>95
	M	14	26,8	85 a < 95
	F	13	26,2	85 a < 95
Média±DP			27,4±2,21***	

IMC – índice de massa corporal

### 3.1.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Após a seleção das crianças com e sem excesso de peso, o plasma foi recolhido pelo Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, onde foram analisados os seguintes parâmetros bioquímicos: glucose, insulina, AST, ALT, hemoglobina A1c, colesterol total, HDL, LDL, TG e a TSH. Estes parâmetros foram analisados tendo em conta os valores de referência apresentados no Anexo B.

As crianças sem excesso de peso apresentavam valores normais dos parâmetros bioquímicos analisados, exceto uma criança do sexo feminino que apresenta os valores de colesterol total e de LDL na gama dos valores aceitáveis. Por outro lado, as crianças com excesso de peso apresentam valores normais de glucose, insulina, AST, ALT, hemoglobina A1c e de TSH. No entanto, algumas crianças os valores de colesterol total (n=2), HDL (n=3) e TG (n=1) encontram-se aceitáveis e duas crianças do sexo feminino apresentavam os valores de LDL elevados. Apenas uma criança do sexo feminino apresenta todos os parâmetros alterados (Tabela 3). No entanto, fazendo as médias dos parâmetros analisados não existem diferenças significativas entre as crianças sem excesso de peso e com excesso de peso.

**Tabela 3** – Parâmetros bioquímicos de crianças com e sem excesso de peso. A **negrito** valores que se encontram nos valores aceitáveis dos valores de referência e a **negrito e sublinhado** valores que se encontram acima dos valores de referência. Os valores médios de cada parâmetro estão apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão.

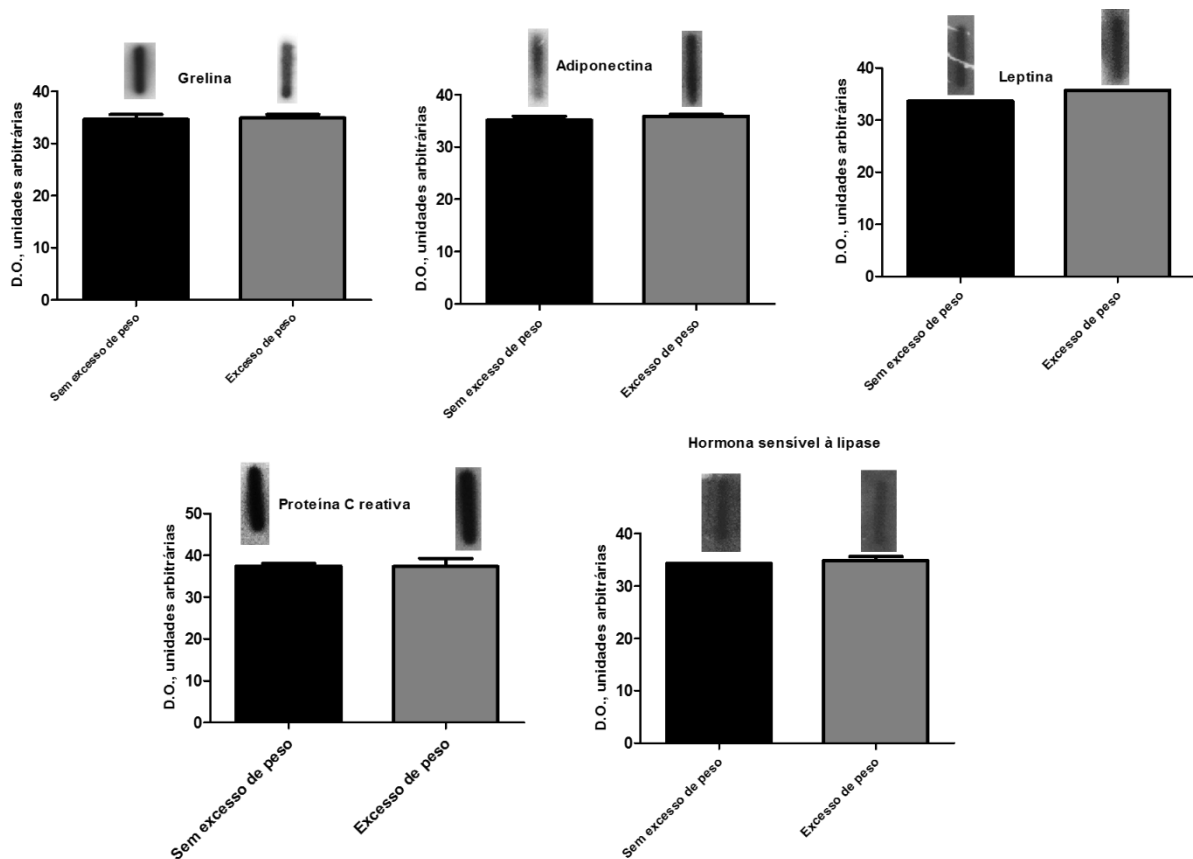
	Sexo	Glucose (mg/dL)	Insulina (mcLU/mL)	AST U/L	ALT U/L	HbA1c %	Colesterol Total (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	TG (mg/dL)	TSH (mLU/L)
<u>Sem excesso de peso</u>	M	82	7,7	31	23	5,1	182	90,4	73	31	1,55
	F	79	2,8	25	17	5,1	157	55,9	86	65	1,51
	F	90	11,5	29	21	5,0	150	72,6	61	61	1,23
	M	98	15,2	29	27	5,0	177	57,4	101	55	2,22
	F	85	12,1	25	30	4,9	<b>201</b>	74,4	<b>116</b>	86	2,49
Média $\pm$ DP		87 $\pm$ 6,7	9,87 $\pm$ 4,26	28 $\pm$ 2,4	24 $\pm$ 4,5	5,0 $\pm$ 0,07	173 $\pm$ 18,2	70,1 $\pm$ 12,7	87,3 $\pm$ 19,5	60 $\pm$ 17,7	1,80 $\pm$ 0,47
<u>Excesso de peso</u>	M	83	16	32	19	5,7	121	<b>40,5</b>	71	37	1,06
	F	91	19,7	21	18	5,0	<b>205</b>	62,8	<b>133</b>	74	3,02
	F	89	24,3	24	24	5,5	155	49,8	99	53	3,01
	M	98	9,8	22	18	5,7	122	<b>40,2</b>	69	52	1,95
	F	77	20,4	17	29	5,2	<b>213</b>	<b>45,5</b>	<b>141</b>	<b>118</b>	1,36
Média $\pm$ DP		88 $\pm$ 7,1	18,0 $\pm$ 4,89	23 $\pm$ 5,0	22 $\pm$ 4,3	5,4 $\pm$ 0,28	163 $\pm$ 39,4	47,8 $\pm$ 8,31	103 $\pm$ 30,1	67 $\pm$ 28,2	2,08 $\pm$ 0,82

AST- aspartato aminotransferase; ALT- alanina aminotransferase; HbA1c- hemoglobina glicada; HDL- lipoproteína de elevada densidade; LDL- lipoproteína de baixa densidade; TG- triglicédeos; TSH- hormona estimuladora da tiroide



### 3.1.3 Caraterização do perfil de adipocinas e de proteínas associadas à inflamação

As adipocinas adiponectina, a leptina, a grelina, a proteína C reativa e a hormona sensível à lipase presentes no plasma de crianças com excesso de peso e nas crianças sem excesso de peso foram analisadas por Slot Blot. Esta é uma técnica de imunodeteção capaz de identificar as proteínas presentes no plasma recorrendo ao uso de anticorpos específicos das proteínas analisadas. Não se verificaram diferenças significativas entre as crianças sem e com excesso de peso de todas as adipocinas e proteínas estudadas (Figura 6). Estes dados podem revelar que o facto das crianças terem excesso de peso não é suficiente para induzir alterações no metabolismo das adipocinas, como também não induz o processo inflamatório.



**Figura 6-** Caraterização do perfil de adipocinas e de proteínas associadas à inflamação presentes no plasma, pela técnica Slot Blot, de crianças sem e com excesso de peso, nomeadamente da grelina, adiponectina leptina, proteína C reativa e hormona sensível à lipase. Os resultados encontram-se representados em termos de médio  $\pm$  desvio-padrão.

### 3.1.4 Quantificação de fósforo no extrato fosfolipídico de plasma

Após a extração de fosfolípidos do plasma através da SPE, a quantificação do fosforo presente nos extratos de plasma de crianças sem excesso de peso (n=5) e com excesso de peso (n=5) foi determinado por método colorimétrico. Não foram identificadas diferenças significativas entre as quantidades de fosfolípidos totais entre as crianças sem e com excesso de peso, sendo possível observar uma tendência para o aumento de fosfolípidos nas crianças sem excesso de peso (Tabela 4).

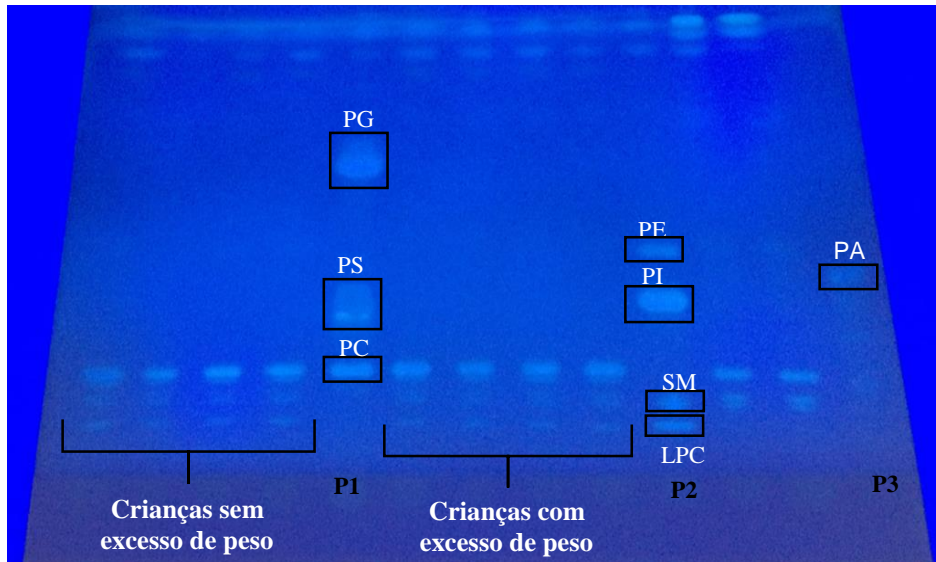
**Tabela 4-** Quantificação de fosfolípidos totais no extrato lipídico de plasma de crianças sem e com excesso de peso. Os resultados encontram-se representados em termos de médio  $\pm$  desvio-padrão de 5 réplicas biológicas.

Amostra	Quantidade de PL (ug)	Média $\pm$ DP
CT <sub>1</sub>	41	
CT <sub>2</sub>	74	
CT <sub>3</sub>	35	45 $\pm$ 17
CT <sub>4</sub>	31	
CT <sub>5</sub>	44	
GE <sub>1</sub>	16	
GE <sub>2</sub>	29	
GE <sub>3</sub>	36	32 $\pm$ 10
GE <sub>4</sub>	33	
GE <sub>5</sub>	45	

PL- fosfolípido; CT- crianças sem excesso; GE- crianças com excesso de peso

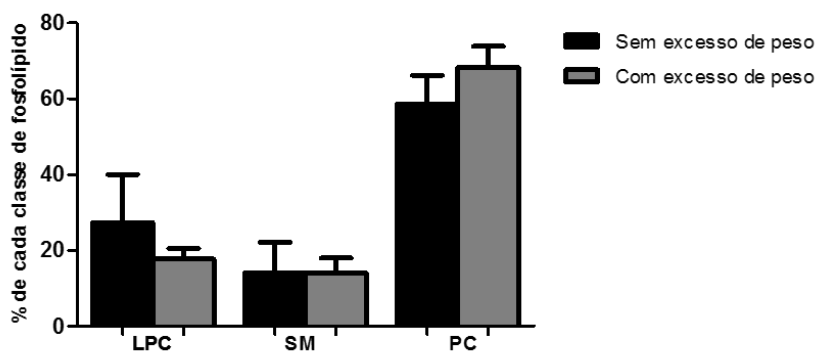
### 3.1.5 Separação e quantificação de cada classe de fosfolípido por TLC

A variação do perfil lipídico, em termos de classes de fosfolípidos, em crianças com e sem excesso de peso foi analisada recorrendo à técnica de TLC. Os extratos fosfolipídicos das amostras plasma de crianças sem excesso de peso (n=4) e com excesso de peso (n=4) foram fracionados por TLC, tendo-se identificado 3 classes de fosfolípidos pela comparação com padrões de fosfolípidos puros aplicados na mesma placa de TLC. Deste modo, foi possível identificar classes de fosfolípidos nas crianças com e sem excesso de peso tais como a lisofosfatidilcolina (LPC), a fosfatidilcolina (PC) e a esfingomiéline (SM) (Figura 7).



**Figura 7-** Separação das diferentes classes de fosfolípidos do extrato lipídico de plasma de crianças com e sem excesso de peso. As classes de fosfolípidos foram identificadas, ou seja a lisofosfatidilcolina (LPC), a esfingomielina (SM) e a fosfatidilcolina (PC), por comparação com padrões de fosfolípidos puros aplicados e devidamente identificados (P1, P2 e P3) na mesma placa de TLC. P1- fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (PG); P2- lisofosfatidilcolina (LPC), esfingomielina (SM), fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PE); P3- ácido fosfático (PA).

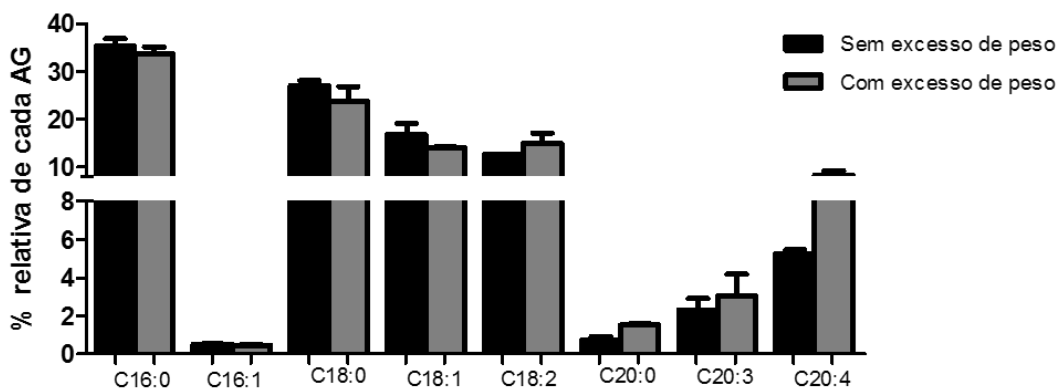
Após a separação das principais classes de fosfolípidos presentes nos extratos fosfolipídicos das amostras, foi realizada a quantificação do conteúdo fosfolipídico de cada classe identificada recorrendo ao ensaio da quantificação espectrofotométrica de fosfato. Esta técnica permitiu determinar a percentagem de cada classe de fosfolípidos presente nas crianças com e sem excesso de peso (Figura 8). Verificou-se que a classe de fosfolípido mais abundante é a PC, seguida da LPC e da SM. Não se observaram diferenças significativas das classes de fosfolípidos nas crianças com excesso de peso e sem excesso de peso, mas observamos uma tendência para a diminuição das LPC e para um aumento das PC nas crianças com excesso de peso comparativamente com as crianças sem excesso de peso



**Figura 8** – Quantificação relativa das 3 classes de fosfolípidos identificadas após separação por TLC em crianças com e sem excesso de peso. Os resultados encontram-se representados em termos de médio  $\pm$  desvio-padrão de 4 réplicas biológicas (n=4). LPC-lisofosfatidilcolina, SM- esfingomiéline e PC- fosfatidilcolina.

### 3.1.4 Análise do perfil de ácidos gordos por GC-MS

De modo a avaliar as alterações no perfil de ácidos gordos de extratos fosfolipídicos de plasma de crianças com e sem excesso de peso, recorreu-se à identificação de ésteres metílicos de ácidos gordos por GC-MS. Através da análise do cromatograma e dos espetros de massa correspondentes foi possível identificar o ácido palmítico (C16:0), o ácido palmitoleico  $\omega$ -7 (C16:1), o ácido esteárico (C18:0), o ácido oleico  $\omega$ -9 (C18:1), o ácido linoleico  $\omega$ -6 (C18:2), o ácido araquídico (C20:0), o ácido homo- $\gamma$ -linolénico  $\omega$ -6 (C20:3) e o ácido araquidónico  $\omega$ -6 (C20:4). A integração dos picos dos cromatogramas de GC-MS permitiu a quantificação dos ácidos gordos identificados e a determinação da percentagem relativa de cada ácido gordo. Nas crianças de ambas as condições os ácidos gordos mais abundantes foram o C16:0, C18:0, C18:1 e C18:2. Não foram observadas diferenças significativas no perfil de ácidos gordos entre crianças com e sem excesso de peso (Figura 9).



**Figura 9** – Composição de ácidos gordos nos extratos fosfolipídicos de amostras de crianças sem e com excesso de peso. O perfil de ácidos gordos foi obtido pela análise dos cromatogramas e espetros de massa recorrendo de GC-MS. Os resultados encontram-se representados em termos de médio  $\pm$  desvio-padrão de 3 réplicas biológicas (n=3).

C16:0 – Ácido palmítico; C16:1 – Ácido palmitoleico ( $\omega$ -7); C18:0 – Ácido esteárico; C18:1 – Ácido oleico ( $\omega$ -9); C18:2 – Ácido linoleico ( $\omega$ -6); C20:0 – Ácido araquídico; C20:3 – Ácido homo- $\gamma$ -linolénico ( $\omega$ -6); C20:4 – Ácido araquidónico ( $\omega$ -6).

## 3.2 Caraterização do perfil de adipocinas, de proteínas associadas à inflamação e fosfolipídico do plasma de crianças com obesidade

### 3.2.1 Caraterização da amostra

Foram, assim, selecionadas 10 crianças; 5 crianças não obesas e 5 crianças obesas (3 do sexo feminino e 2 do sexo masculino, para cada condição). Foram selecionadas crianças que apresentavam um IMC entre 19,0 e 22,5 kg/m<sup>2</sup>, com média de 19,9 kg/m<sup>2</sup>, apresentando peso normal, sendo denominadas nesta dissertação como crianças não obesas. Este grupo de crianças não obesas foi usado como controlo. Por outro lado, foram selecionadas crianças com um IMC entre 30,7 e 34,9 kg/m<sup>2</sup>, com média de 33,3 kg/m<sup>2</sup>, sendo designadas nesta dissertação como crianças obesas (Tabela 5). O IMC das crianças obesas é significativamente elevado comparativamente às crianças não obesas. As crianças apresentavam idades compreendidas entre os 16 e 18 anos.

**Tabela 5-** Caraterização das crianças não obesas e obesas em termos de sexo, idade, IMC e percentil do IMC. Os valores médios de IMC estão apresentados como média ± desvio-padrão. \*\*\* P<0,001 vs. Não obesos (ANOVA Bonferroni's Multiple Comparison Test)

	Sexo	Idade	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Percentil do IMC
<b>Não obesos</b>	F	16	20,8	5 a 85
	F	16	21,4	5 a 85
	F	18	15,6	< 5
	M	16	22,5	5 a 85
	M	17	19,0	5 a 85
Média±DP			19,9±2,42	
<b>Obesos</b>	F	17	32,6	>95
	F	17	30,7	>95
	F	16	33,3	>95
	M	16	34,9	>95
	M	16	34,9	>95
Média±DP			33,3±1,59***	

IMC – índice de massa corporal

### **3.2.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos**

Após a seleção das crianças não obesas e obesas, o plasma foi recolhido pelo Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, onde foram analisados os seguintes parâmetros bioquímicos: glucose, insulina, AST, ALT, hemoglobina A1c, colesterol total, HDL, LDL, TG e a TSH. Estes parâmetros foram avaliados tendo em conta os valores de referência apresentados no Anexo B.

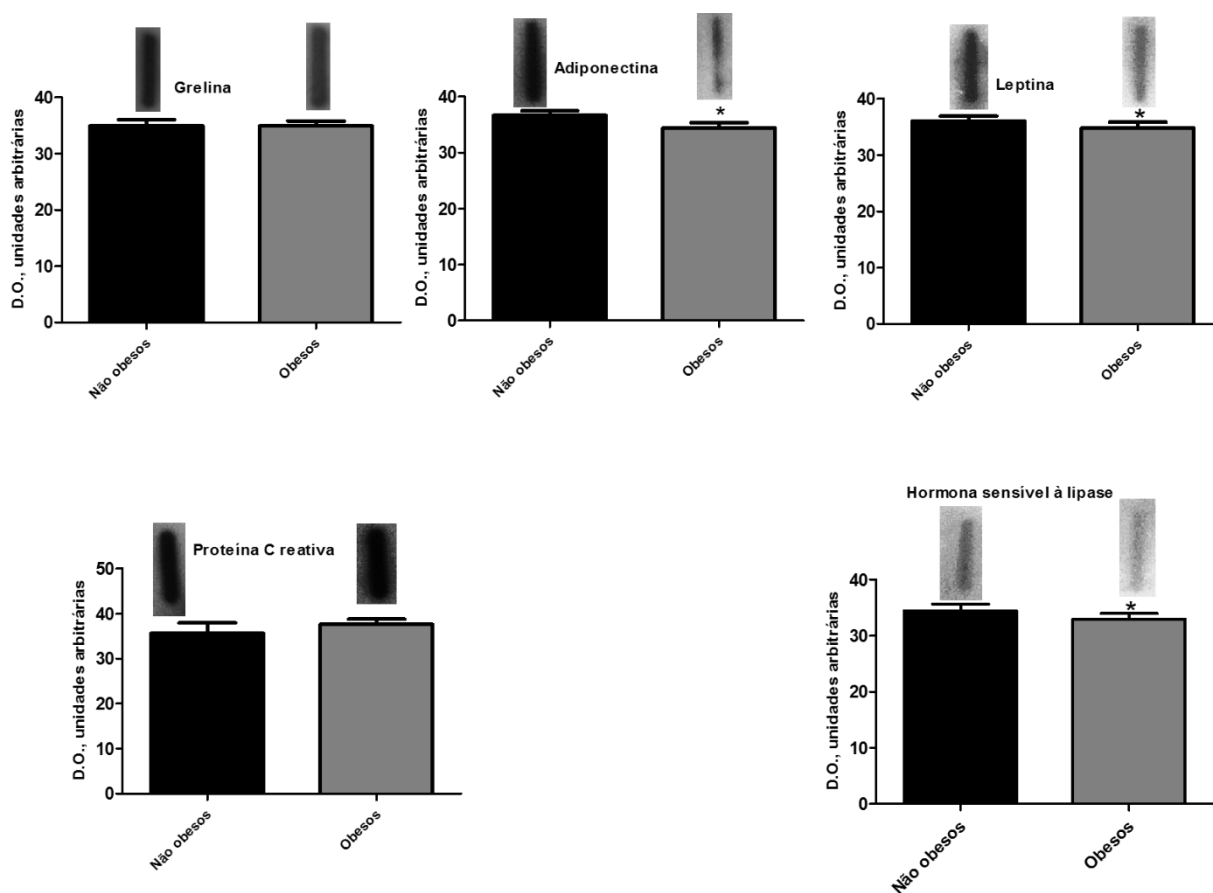
Relativamente às crianças não obesas, estas apresentam valores normais dos parâmetros bioquímicos analisados, exceto uma criança do sexo feminino que apresenta os valores de TG na gama dos valores aceitáveis. Por outro lado, as crianças obesas apresentam valores normais de glucose, AST, ALT, hemoglobina A1c, TG e TSH. Duas crianças obesas apresentam valores de insulina elevados. Uma criança obesa apresenta valor elevado de colesterol total, duas crianças obesas apresentam valores diminuídos de HDL e quatro crianças obesas apresentam os níveis de LDL elevados. Adicionalmente, verificou-se que duas crianças do sexo masculino apresentam alterações nos níveis de insulina, LDL e HDL. (Tabela 6). Com esta caraterização é possível observar que quatro crianças obesas apresentam dislipidémia, devido há presença de níveis elevados de LDL e em duas dessas crianças há também níveis elevados de HDL. Adicionalmente, fazendo os valores médios de cada parâmetro, os níveis de insulina e LDL são significativamente elevados nas crianças obesas comparativamente às crianças não obesas.

**Tabela 6**– Parâmetros bioquímicos de crianças com e sem excesso de peso. A **negrito** valores que se encontram nos valores aceitáveis dos parâmetros de referência e a **negrito e sublinhado** valores que se encontram acima dos valores de referência. Os valores médios de cada parâmetro estão apresentados como média ± desvio-padrão. \*\* P<0,01 vs. Não obesos (ANOVA *Bonferroni's Multiple Comparison Test*)

	Sexo	Glucose (mg/dL)	Insulina (mcLU/mL)	AST U/L	ALT U/L	HbA1c %	Colesterol Total (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	TG (mg/dL)	TSH (mLU/L)
<b>Não obesos</b>	F	83	10,3	23	19	5,1	158	54,9	94	39	2,54
	F	85	13,4	26	17	5,2	181	87,7	79	96	1,01
	F	84	13,3	21	15	4,7	178	68,4	102	<b>137</b>	2,32
	M	78	10,4	28	21	5,0	138	48,5	75	74	1,22
	M	82	3,0	26	12	5,5	168	66,8	101	59	3,70
Média±DP		82±2,4	10,1±3,79	25±2,5	17±3,1	5,1±0,26	165±15,6	65,3±13,5	90±11,2	81±33,6	2,20±0,97
<b>Obesos</b>	F	90	22,8	20	20	5,1	176	60,8	104	56	3,48
	F	79	21,5	21	24	5,0	189	49,7	<b>130</b>	53	1,41
	F	96	16,2	15	11	5,0	<b>209</b>	56,9	<b>133</b>	113	2,01
	M	93	<b>29,2</b>	18	21	5,2	189	<b>33,5</b>	<b>145</b>	101	3,21
	M	102	<b>37,1</b>	23	38	5,5	161	<b>33,7</b>	<b>114</b>	82	2,63
Média±DP		92±7,6	<b>25,4±7,18**</b>	19±2,7	23±8,7	5,2±0,19	185±15,9	46,9±11,4	<b>125±14,5**</b>	81±23,8	2,60±0,76

### 3.2.3 Caraterização do perfil de adipocinas e de proteínas associadas à inflamação

A adiponectina, a leptina, a grelina, a PCR e a HSL presentes no plasma de crianças com obesidade foram quantificadas usando a técnica Slot Blot. Foi possível observar uma diminuição significativa da adiponectina, HSL e da leptina nas crianças obesas comparativamente às crianças não obesas. (Figura 10). Contudo, não se verificou diferenças significativas nos níveis plasmáticos de grelina e PCR entre as crianças não obesas e obesas. Assim, é possível verificar que a obesidade parece induzir alterações no metabolismo das adipocinas, nomeadamente da adiponectina e da leptina, como também promover o processo inflamatório, mas não muito acentuado uma vez que não se verificou diferenças significativas nos níveis plasmáticos de PCR nestas crianças obesas.



**Figura 10-** Caraterização de adipocinas presentes no plasma, pela técnica Slot Blot, de crianças não obesas e obesas, nomeadamente da grelina, adiponectina, leptina, proteína C reativa e hormona sensível à lipase. Os resultados encontram-se representados em termos de médio  $\pm$  desvio-padrão. \*  $P < 0.05$  vs. Não obesos (*t-test* não emparelhado)

### 3.2.4 Quantificação de fósforo no extrato fosfolipídico de plasma

Após a extração de fosfolípidos do plasma através da SPE, a quantificação do fósforo presente nos extratos de plasma de crianças não obesas ( $n=5$ ) e obesas ( $n=5$ ), foi determinado por método colorimétrico. Foi possível verificar um aumento significativo da quantidade de fosfolípidos nas crianças obesas comparativamente às crianças não obesas (Tabela 7).



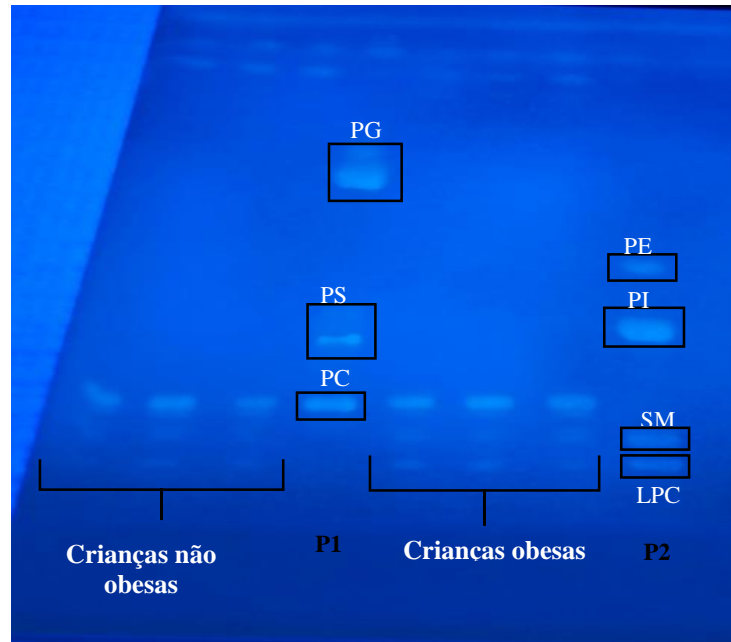
**Tabela 7-** Quantificação de fosfolípidos totais no extrato lipídico de plasma de crianças não obesas e obesas. Os resultados encontram-se representados em termos de médio  $\pm$  desvio-padrão de 5 réplicas biológicas. \*  $P < 0,05$  vs. Não obesos (ANOVA *Bonferroni's Multiple Comparison Test*)

Amostra	Quantidade de PL (ug)	Média $\pm$ DP
CT <sub>6</sub>	27	26 $\pm$ 6
CT <sub>7</sub>	24	
CT <sub>8</sub>	30	
CT <sub>9</sub>	34	
CT <sub>10</sub>	16	
GE <sub>6</sub>	77	51 $\pm$ 17*
GE <sub>7</sub>	42	
GE <sub>8</sub>	64	
GE <sub>9</sub>	39	
GE <sub>10</sub>	34	

PL- fosfolípido; CT- crianças não obesas; GE- crianças obesas

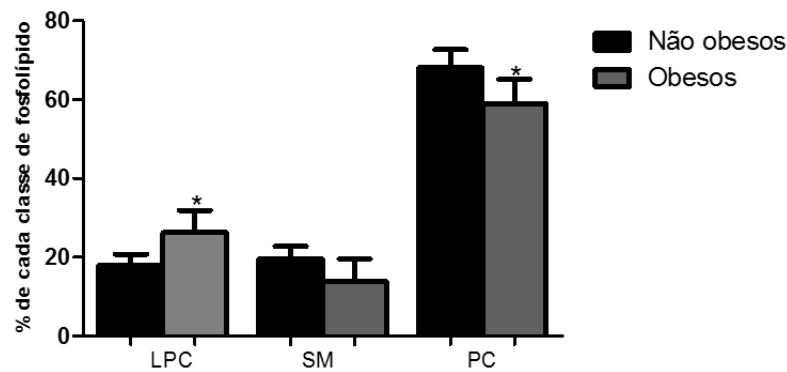
### 3.2.5 Separação e quantificação de cada classe de fosfolípido por TLC

A variação do perfil lipídico, em termos de classes de fosfolípidos, em crianças não obesas e obesas foi analisada recorrendo à técnica de TLC. Os extratos fosfolipídicos das amostras plasma de crianças não obesas (n=3) e obesas (n=3) foram fracionados por TLC, tendo-se identificado 3 classes de fosfolípidos pela comparação com padrões de fosfolípidos puros aplicados na mesma placa de TLC. Deste modo, foi possível identificar classes de fosfolípidos nas crianças não obesas e obesas tais como a lisofosfatidilcolina (LPC), a fosfatidilcolina (PC) e a esfingomielina (SM) (Figura 11).



**Figura 11-** Separação das diferentes classes de fosfolípidos em crianças não obesas e obesas por TLC. As classes de fosfolípidos foram identificadas, ou seja a lisofosfatidilcolina (LPC), a esfingomiéline (SM) e a fosfatidilcolina (PC), por comparação com padrões de fosfolípidos puros aplicados e devidamente identificados (P1, P2 e P3) na mesma placa de TLC. P1- fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (PG); P2- lisofosfatidilcolina (LPC), esfingomiéline (SM), fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PE).

Após a separação das principais classes de fosfolípidos presentes nos extratos fosfolipídicos das amostras, foi realizada a quantificação do conteúdo fosfolipídico de cada classe identificada recorrendo ao ensaio da quantificação espectrofotométrica de fosfato. Esta técnica permitiu determinar a percentagem de cada classe de fosfolípidos presente nas crianças não obesas e obesas (Figura 12). Verificou-se que a classe de fosfolípido mais abundante é a PC, seguida da LPC e da SM. Este facto está de acordo com a literatura pois a PC é a principal classe de fosfolípidos que circula no plasma (117). Observou-se um aumento significativo das LPC e uma diminuição significativa das PC.

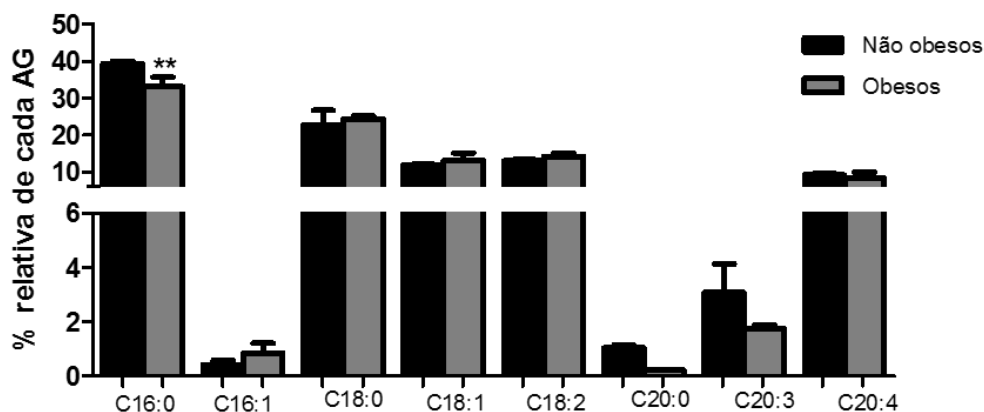


**Figura 12-** Quantificação relativa das 3 classes de fosfolípidos identificadas após separação por TLC em crianças não obesas e obesas. Os resultados encontram-se representados em termos de médio  $\pm$  desvio-padrão de 3 réplicas biológicas (n=3). LPC-lisofosfatidilcolina, SM- esfingomielina e PC-fosfatidilcolina.

\* P<0.05 vs. Não obesos (ANOVA *Bonferroni's Multiple Comparison Test*)

### 3.2.6 Análise do perfil de ácidos gordos por GC-MS

De modo a avaliar as alterações no perfil de ácidos gordos de extratos fosfolipídicos de plasma de crianças não obesas e obesas, recorreu-se à identificação de ésteres metílicos de ácidos gordos por GC-MS. Através da análise do cromatograma e dos espetros de massa correspondentes foi possível identificar o ácido palmítico (C16:0), o ácido palmitoleico  $\omega$ -7 (C16:1), o ácido esteárico (C18:0), o ácido oleico  $\omega$ -9 (C18:1), o ácido linoleico  $\omega$ -6 (C18:2), o ácido araquídico (C20:0), o ácido homo- $\gamma$ -linolénico  $\omega$ -6 (C20:3) e o ácido araquidónico  $\omega$ -6 (C20:4). A integração dos picos dos cromatogramas de GC-MS permitiu a quantificação dos ácidos gordos identificados pela determinação da percentagem de relativa de cada ácido gordo. Nas crianças de ambas as condições os ácidos gordos mais abundantes foram o C16:0, C18:0, C18:1 e C18:2. Foi possível verificar uma diminuição significativa da quantidade do ácido gordo C16:0 nas crianças obesas comparativamente às crianças não obesas. Para além disto, não foram observadas diferenças no perfil de ácidos gordos entre as crianças não obesas e obesas (Figura 13).

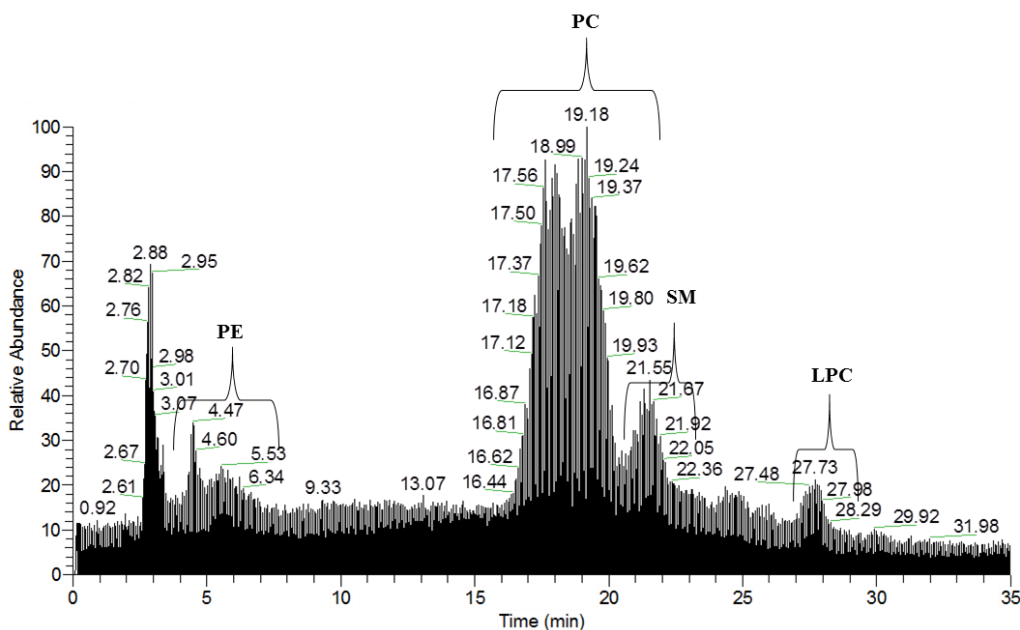


**Figura 13** – Composição de ácidos gordos nos extratos fosfolipídicos de amostras de crianças não obesas e obesas. O perfil de ácidos gordos foi obtido pela análise dos cromatogramas e espetros de massa recorrendo à técnica GC-MS. Os resultados encontram-se representados em termos de médio  $\pm$  desvio-padrão de 3 réplicas biológicas (n=3). \*\*P<0.01 vs. Não obesos (ANOVA *Bonferroni's Multiple Comparison Test*)

C16:0 – Ácido palmítico; C16:1-Ácido palmitoleico ( $\omega$ -7); C18:0-Ácido esteárico; C18:1- Ácido oleico ( $\omega$ -9); C18:2- Ácido linoleico ( $\omega$ -6); C20:0- Ácido araquídico; C20:3- Ácido homo- $\gamma$ -linolénico ( $\omega$ -6); C20:4 – Ácido araquidónico ( $\omega$ -6).

### 3.2.7 Análise do perfil de fosfolípidos por HPLC-MS/MS

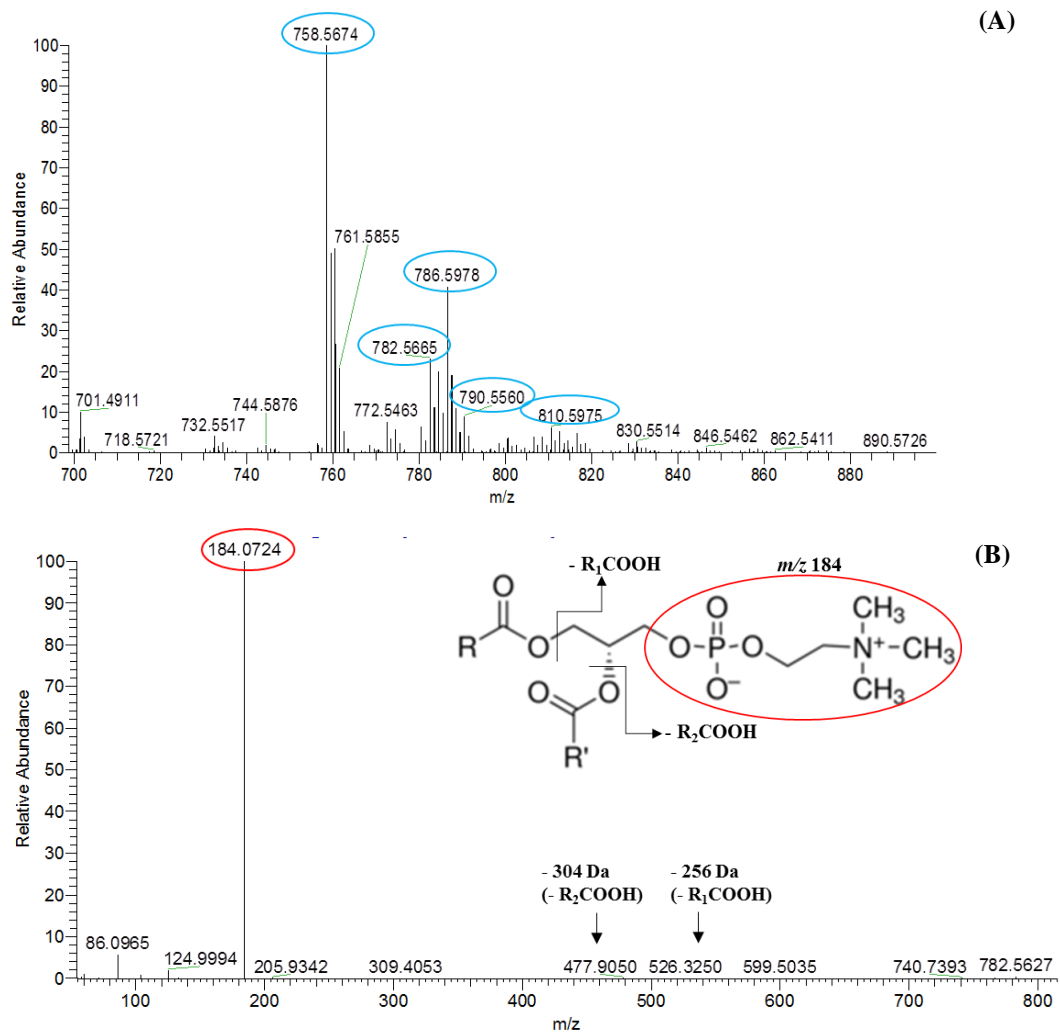
As alterações na composição molecular de cada classe de fosfolípido, bem como as modificações ao nível do perfil molecular, foram avaliadas através da técnica de HPLC-MS e MS/MS. Tendo em conta que nas crianças com obesidade verificou-se uma maior variação no perfil fosfolipídico com as técnicas acima apresentadas a análise por HPLC-MS/MS foi apenas realizada neste grupo de crianças. No modo positivo foram analisadas as classes PC, LPC, SM e PE e no modo negativo para as classes PC. Assim, foi possível identificar as classes de fosfolípidos que já tinham sido detetadas pelo TLC, ou seja a LPC, SM e PC, sendo ainda possível identificar a classe da PE, não detetada no TLC por ser um técnica menos sensível e talvez pela pouca quantidade desta classe de fosfolípido nas amostras. Os dados foram obtidos em triplicados para cada uma das réplicas biológicas de crianças não obesas (n=5) e obesas (n=5). A análise e identificação de cada classe de fosfolípidos recorrendo aos cromatogramas e dos espetros de HPLC-MS e MS/MS foi realizada no *software Xcalibur v3.0* com recurso à base de dados *LIPID MAPS Lipidomics Gateway* (118). De seguida, os dados foram processados e integrados no *software MZmine v2.21*.



**Figura 14** – Cromatograma geral obtido por HPLC-MS e MS/MS com a separação de cada classe de fosfolípidos, em diferentes tempos de retenção, presentes nas amostras de crianças não obesas e obesas. A classe das PE elui entre os 4-6 min, a classe das PC elui entre os 16-20 min, a classe das SM elui entre os 20-22 min e finalmente a classe das LPC elui entre os 25-28 min.

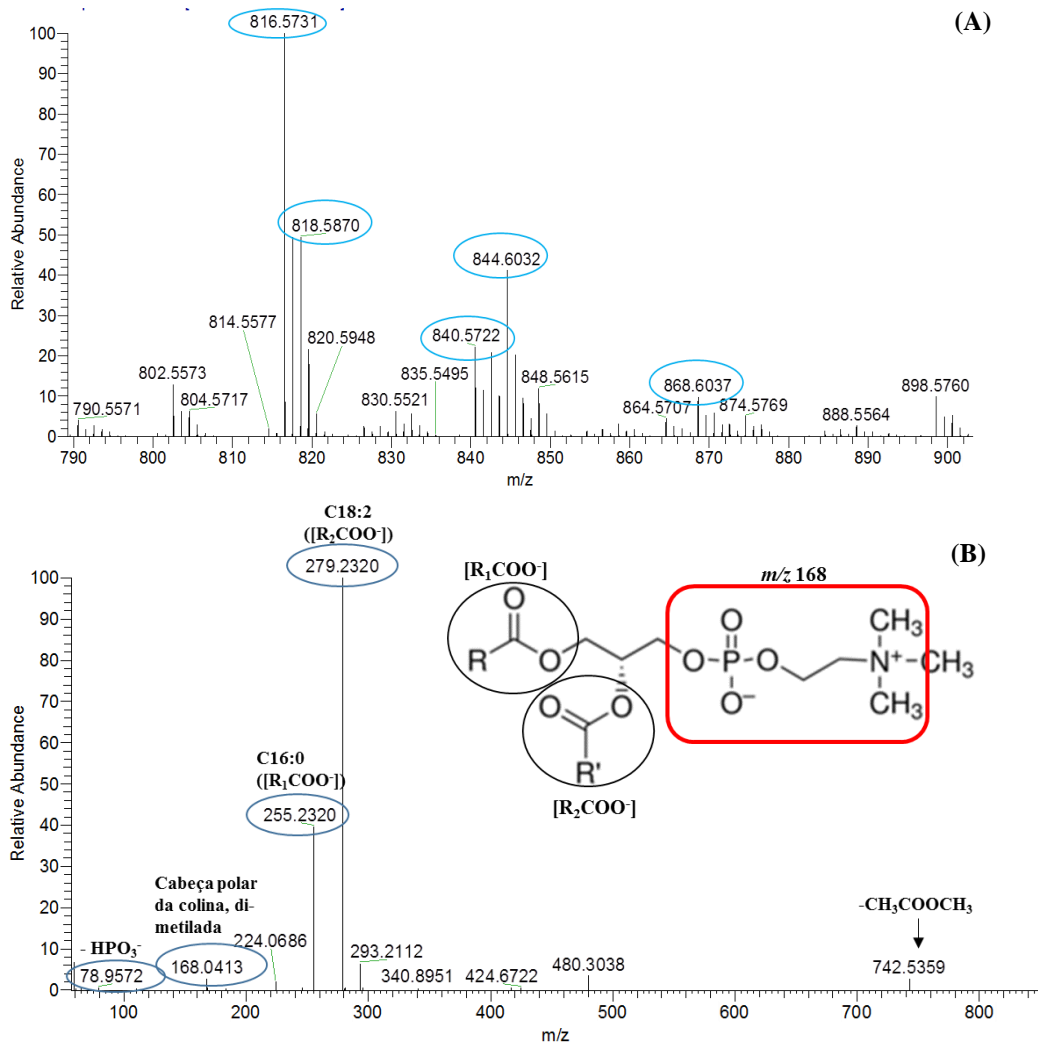
O cromatograma de HPLC-MS apresentado na Figura 14 é um exemplo obtido das amostras das crianças não obesas e obesas. Neste cromatograma é possível observar a separação das diferentes classes de fosfolípidos presentes nas amostras a diferentes tempos de retenção. Assim, a classe das PE elui entre os 4-6 min, a classe das PC elui entre os 16-20 min, a classe das SM elui entre os 20-22 min e, finalmente, a classe das LPC elui entre os 25-28 min. É possível verificar que a espécie das PC é claramente a classe de fosfolípido mais abundante nestas amostras, confirmando o observado no TLC.

A classe das PC foi observada nos espectros de HPLC-MS e identificadas nos espectros MS/MS no modo positivo como iões  $[M+H]^+$  e no modo negativo sob a forma de aductos de acetato  $[M+CH_3COO]^-$ . Relativamente ao modo positivo, tanto nas crianças não obesas e obesas, a PC (34:2, PC 16:0/18:2), de  $m/z$  758,5, (Figura 15 A,B) revelou ser a espécie molecular de PC mais abundante, seguida das espécies moleculares PC (36:4, PC 16:0/20:4) de  $m/z$  782,5, PC (36:2, PC 18:0/18:2) de  $m/z$  786,6, PC (36:0, PC 18:0/18:0) de  $m/z$  790,5 e PC (38:4, PC 18:0/20:4) de  $m/z$  810,6 (Figura 15A). Nos espectros MS/MS no modo positivo é visível o ião característico da cabeça polar correspondente à colina em conjunto com o grupo fosfato, a  $m/z$  184,1, e as perdas neutras dos ácidos gordos de cada espécie molecular, na forma de RCOOH (Figura 15B)



**Figura 15-** (A) Espetro de HPLC-MS, no modo positivo, no tempo de retenção entre os 16-20 min, onde se pode observar as espécies mais abundantes de PC; (B) Exemplo de um espectro de HPLC-MS/MS do íon de  $m/z$  782,5 da espécie molecular PC (36:4) com o íon característico da cabeça polar, colina, de  $m/z$  184,1, bem como as perdas neutras de -256 Da e -304 Da dos ácidos gordos C16:0 e C20:4, respetivamente.

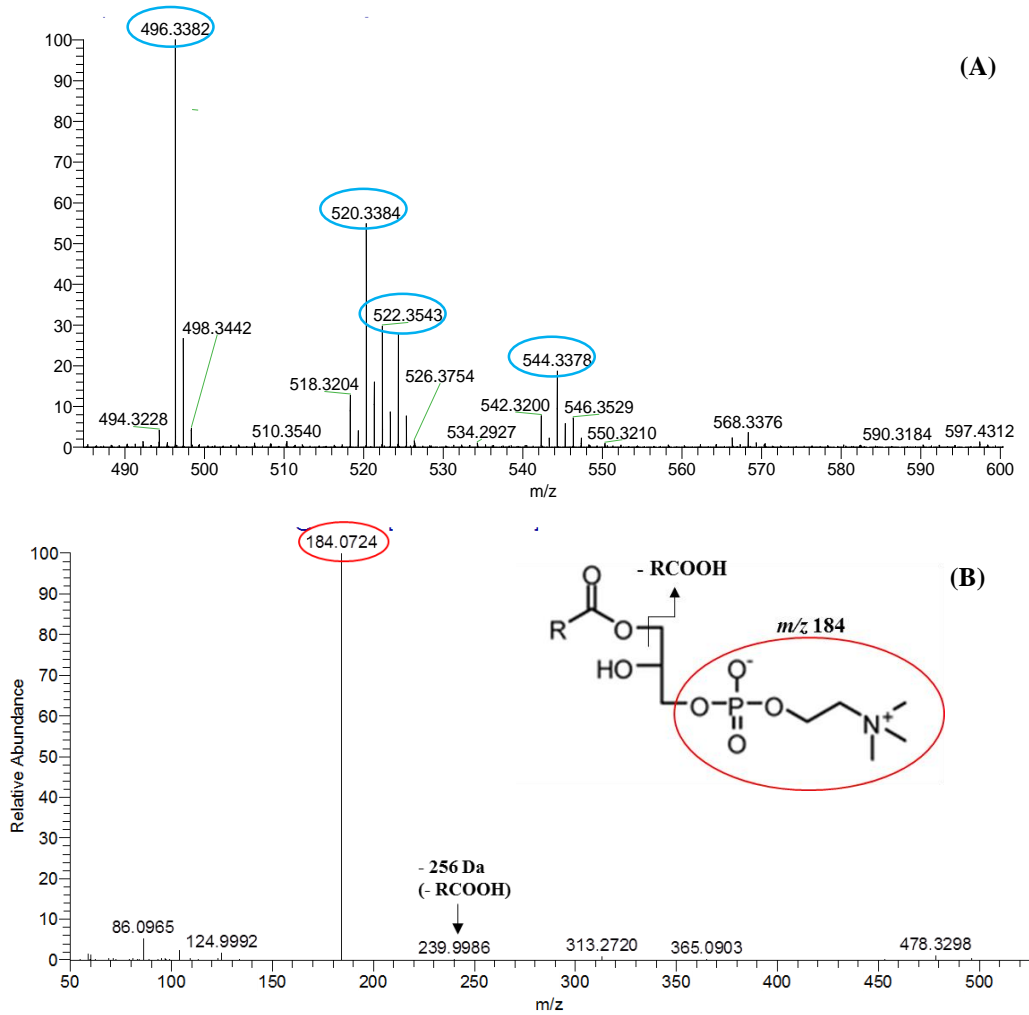
Relativamente ao modo negativo, a PC (34:2, PC 16:0/18:2), de  $m/z$  816,5, (Figura 16 A, B) revelou ser a espécie molecular de PC mais abundante, seguida das espécies moleculares PC (34:1, PC 16:0/18:1) de  $m/z$  818,5, PC (36:4, PC 16:0/20:4) de  $m/z$  840,5, PC (36:2, PC 18:0/18:2)  $m/z$  844,5 e PC (38:4, PC 18:0/20:4)  $m/z$  868,4, corroborando com o que se verificou no modo positivo (Figura 16A). Nos espectros de MS/MS no modo negativo é visível os iões fragmento  $[RCOO]^-$  correspondentes aos ácidos gordos presentes em cada espécie molecular, e perda de 74Da que corresponde à perda de  $-CH_3COOCH_3$ , íon de  $m/z$  168,0 correspondente à cabeça polar da colina di-metilada e do íon  $m/z$  78,9 do  $-HPO_3^-$  na cabeça polar, como exemplificado na Figura 16B.



**Figura 16-** (A) Espetro de HPLC-MS, no modo negativo, no tempo de retenção entre os 16-20 min, onde se pode observar as espécies mais abundantes de PC; (B) Espetro de HPLC-MS/MS do ião de  $m/z$  168,5 da espécie molecular PC (34:2) com os iões [RCOO]<sup>-</sup> de  $m/z$  255,2 e de  $m/z$  279,2 correspondentes aos ácidos gordos C16:0 e C18:2, respetivamente, a perda de -74 Da correspondente à perda característica de -CH<sub>2</sub>COOCH<sub>3</sub>, o ião de  $m/z$  168,0 correspondente à cabeça polar di-metilada e o ião de  $m/z$  78,9 que corresponde à perda do HPO<sub>3</sub><sup>-</sup> na cabeça polar.

A classe das LPC foi observada nos espetros de HPLC-MS e identificadas nos espetros MS/MS no modo positivo como iões [M+H]<sup>+</sup>. Tanto nas crianças não obesas e obesas a LPC (C16:0), de  $m/z$  496,3, (Figura 17 A, B) revelou ser a espécie molecular mais abundante seguida da LPC (C18:2) de  $m/z$  520,3, LPC (C18:1) de  $m/z$  522,3 e LPC (C20:4) de  $m/z$  544,3 (Figura 17A). No espetro de MS/MS observa-se o ião característico da cabeça polar correspondente à colina com o grupo fosfato, de  $m/z$  184,1, e a perda

neutra do ácido gordo na forma  $[M-RCOOH]^+$  de cada espécie molecular de LPC (Figura 17B).

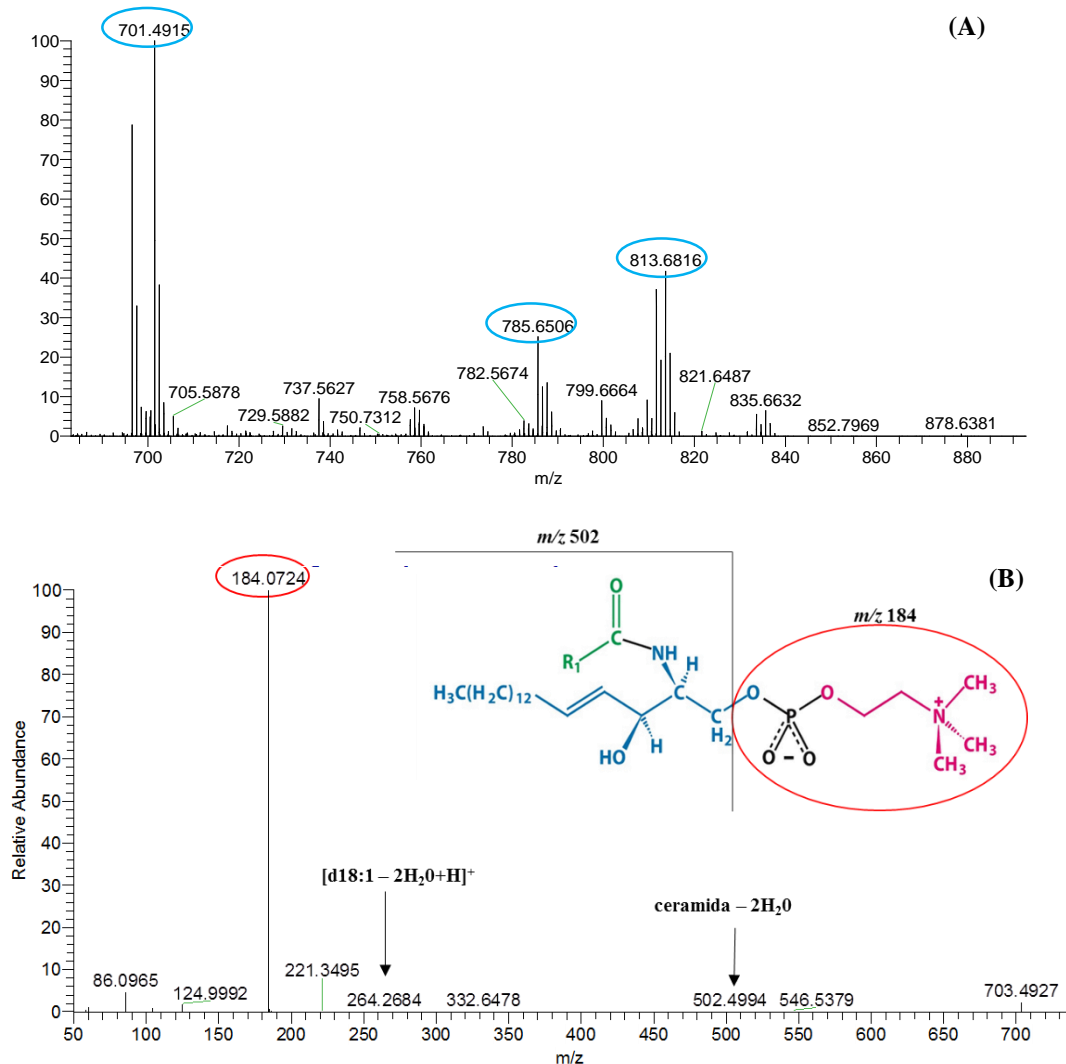


**Figura 17-** (A) Espectro de HPLC-MS, no modo positivo, no tempo de retenção entre os 25-28 min, onde se pode observar das espécies mais abundantes de LPC. (B) Exemplo de um espectro de MS/MS do íon de  $m/z$  496,3 da espécie molecular LPC (C16:0) com o íon característico da cabeça polar, colina+grupo fosfato, de  $m/z$  184,1, bem como a perda neutra de -256 Da do ácido gordo C16:0.

A classe das SM foi observada nos espectros de HPLC-MS e identificadas nos espectros MS/MS no modo positivo como íões  $[M+H]^+$ . Tanto nas crianças não obesas e obesas a SM (d34:2, SM d18:1/16:1), de  $m/z$  701,4 (Figura 18 A,B), revelou ser a espécie molecular mais abundante seguida da SM (d40:2, SM d18:1/22:1) de  $m/z$  785,6 e SM (d42:2, SM d18:1/24:1) de  $m/z$  813,6 (Figura 18A). No espectro de MS/MS é visível o íon característico da cabeça polar, correspondente à colina com o grupo fosfato,  $m/z$  184,1, bem como a sua perda com uma molécula de água, ficando representado no espectro o íon da ceramida-2  $H_2O$ . Para além disso, é possível visualizar o íon que representa a



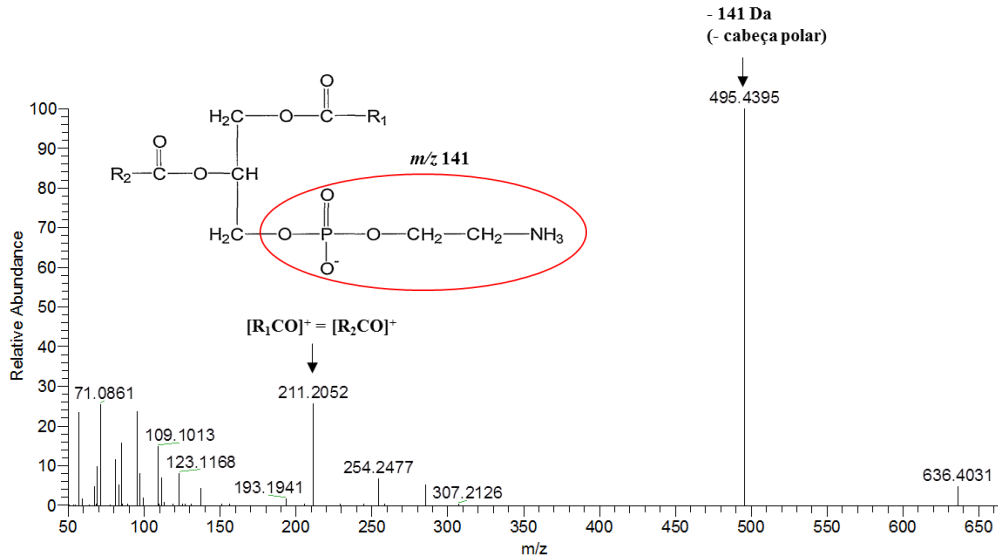
esfosfina de  $m/z$  264,3, na forma  $[d18:1-2H_2O+H]^+$ . A partir destes dois iões é possível determinar o ácido gordo presente em cada espécie molecular (Figura 18B).



**Figura 18-** (A) Espectro de HPLC-MS, no modo positivo, no tempo de retenção entre os 20-22 min, das espécies mais abundantes de SM. (B) Exemplo de um espectro de HPLC-MS/MS do ião de  $m/z$  703,5 da espécie molecular SM (d34:1, SM d18:1/16:0) com o ião característico da cabeça polar, colina+grupo fosfato, de  $m/z$  184,1, bem como a perda neutra de colina- $H_2O$  (183-18 Da), representado pelo ião de  $m/z$  502,5. A azul está representado a esfingosina (d18:1) e a verde o ácido gordo de cada espécie molecular de SM.

A classe das PE foi observada nos espectros de HPLC-MS. De um modo geral, tanto nas crianças não obesas e obesas esta classe de fosfolípidos não demonstrou ter uma elevada abundância, não tendo sido possível identificar as diferentes espécies moleculares. Deste modo, o exemplo apresentado na Figura 19 é um espectro de HPLC-MS/MS que representa a espécie molecular PE (28:0, PE 14:0/14:0) correspondente ao padrão interno adicionado aquando da injeção das amostras. No espectro MS/MS é visível

uma perda característica 141 Da que corresponde à cabeça polar constituída por etanolamina e um grupo fosfato. Para além disso, é possível observar os ácidos gordos correspondentes a cada espécie molecular na forma de ião  $[RCO]^+$  (Figura 19).



**Figura 19** – Exemplo de um espetro de MS/MS do ião de  $m/z$  636,4 da espécie molecular PE (28:0, PE 14:0/14:0) com a perda característica da cabeça polar, de 141 Da, bem como o ião  $[RCO]^+$  dos ácidos gordos de cada espécie molecular que neste caso corresponde aos 2 ácidos gordos C14:0.

De modo a identificar diferenças significativas nas espécies moleculares das classes de fosfolípidos identificadas foi realizada uma análise estatística. Assim, um total de 192 espécies de fosfolípidos (FL) de 4 classes de FL - fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC), lisofosfatidilcolina (LPC) e esfingomielina (SM) - (Tabela 8) foram identificadas por uma abordagem lipidómica baseada em espectrometria de massa para 10 amostras de plasma humano. A classe de FL para a qual foram identificadas mais espécies moleculares foi a PE com um total de 92 espécies moleculares, incluindo as espécies de diacil e plasmalogénios. Também foram identificadas espécies de PC diacil e plasmalogénios compreendendo um total de 60 espécies moleculares de PC presentes nas nossas amostras. A SM e a LPC foram as classes restantes presentes nas amostras de plasma com 21 e 19 espécies moleculares identificadas, respetivamente.

**Tabela 8** – Lista das 192 espécies de fosfolípidos identificadas usando o *software MZ mine* versão 2.21 e usando o *software Xcalibur* versão 3.0. As espécies moleculares foram identificadas através da massa observada com recurso à base de dados *LIPID MAPS Lipidomics Gateway* (118). \* Espécies identificadas usando o *software Xcalibur*; \*\* Sem informação do espectro MS/MS. A classe das LPC, PC, PE e SM foram analisadas no modo positivo na forma de iões  $[M+H]^+$ . A classe das PC também foi analisada no modo negativo sob a forma de aductos de acetato  $[M+CH_3COO]^-$ .

PC - fosfatidilcolina; LPC - lisofosfatidilcolina; PE - fosfatidiletanolamina; SM – esfingomielina.

Fosfolípido (C:N)	Identificação dos ácidos gordos	m/z observado
<b>LPC no modo positivo, <math>[M+H]^+</math></b>		
<b>LPC(14:0)</b>	**	468,3
<b>LPC(16:1)*</b>	<b>16:1</b>	494,3
<b>LPC(16:0)*</b>	<b>16:0</b>	496,3
<b>LPC(17:1)</b>	**	508,3
<b>LPC(18:3)*</b>	<b>18:3</b>	518,3
<b>LPC(18:2)*</b>	<b>18:2</b>	520,3
<b>LPC(18:1)*</b>	<b>18:1</b>	522,3
<b>LPC(18:0)*</b>	<b>18:0</b>	524,3
<b>LPC(20:5)</b>	**	542,3
<b>LPC(20:4)*</b>	<b>20:4</b>	544,3
<b>LPC(20:3)</b>	**	546,3
<b>LPC(20:2)*</b>	<b>20:2</b>	548,3
<b>LPC(20:1)</b>	**	550,3
<b>LPC(20:0)</b>	**	552,4
<b>LPC(22:6)*</b>	<b>22:6</b>	568,3
<b>LPC(22:5)*</b>	<b>22:5</b>	570,3
<b>LPC(22:4)*</b>	<b>22:4</b>	572,3
<b>PC no modo positivo, <math>[M+H]^+</math></b>		
<b>PC(30:0)</b>	**	706,5
<b>PC(30:1)</b>	**	716,5
<b>PCp(32:0)/PCo(32:1)</b>	**	718,5
<b>PCo(32:0)</b>	**	720,5
<b>PC(32:2)*</b>	**	730,5
<b>PC(32:1)*</b>	**	732,5
<b>PC(32:0)*</b>	<b>16:0/16:0</b>	734,5
<b>PCp(34:5)</b>	**	736,5
<b>PCp(34:4)/PCo(34:5)</b>	**	738,5

<b>PCp(34:2)/PCo(34:3)</b>	<b>O-16:1/18:2</b>	742,5
<b>PCp(34:1)/PCo(34:2)</b>	**	744,5
<b>PCp(34:0)/PCo(34:1)</b>	**	746,6
<b>PCo(34:0)</b>	**	748,6
<b>PC(34:4)*</b>	**	754,5
<b>PC(34:3)*</b>	**	756,5
<b>PC(34:2)*</b>	<b>16:0/18:2</b>	758,5
<b>PC(34:1)*</b>	**	760,5
<b>PCp(36:6)</b>	**	762,5
<b>PC(34:0)</b>	**	762,6
<b>PCp(36:4)/PCo(36:5)*</b>	**	766,5
<b>PCp(36:3)/PCo(36:4)</b>	**	768,6
<b>PCp(36:2)/PCo(36:3)</b>	**	770,6
<b>PCp(36:1)/PCo(36:2)</b>	**	772,6
<b>PC(36:6)</b>	**	778,5
<b>PC(36:5)*</b>	<b>18:1/18:4</b>	780,5
<b>PC(36:4)*</b>	<b>16:0/20:4</b>	782,5
<b>PC(36:3)*</b>	**	784,5
<b>PCp(38:8)</b>	**	786,5
<b>PC(36:2)*</b>	<b>18:0/18:2</b>	786,6
<b>PCp(38:7)/PCo(38:8)</b>	**	788,5
<b>PC(36:1)</b>	**	788,6
<b>PCp(38:6)/PCo(38:7)</b>	**	790,5
<b>PC(36:0)</b>	<b>18:0/18:0</b>	790,6
<b>PCp(38:5)/PCo(38:6)</b>	**	792,5
<b>PCp(38:4)/PCo(38:5)</b>	**	794,6
<b>PCp(38:3)/PCo(38:4)</b>	**	796,6
<b>PCp(38:2)/PCo(38:3)</b>	**	798,6
<b>PCp(38:1)/PCo(38:2)</b>	**	800,4
<b>PC(38:7)</b>	**	804,5
<b>PC(38:6)*</b>	<b>18:1/20:5</b>	806,5
<b>PC(38:5)*</b>	**	808,5
<b>PC(38:4)*</b>	<b>18:0/20:4</b>	810,6
<b>PC(38:3)*</b>	**	812,6
<b>PC(38:2)</b>	**	814,6

<b>PCp(40:6)/PCo(40:7)</b>	**	818,6
<b>PC(40:10)</b>	**	826,5
<b>PC(40:9)</b>	**	828,5
<b>PC(40:8)</b>	**	830,5
<b>PC(40:7)</b>	**	832,5
<b>PC(40:6)*</b>	**	834,6
<b>PC(40:5)</b>	**	836,6
<b>PC(40:4)*</b>	**	838,6
<b>PCp(42:9)/PCo(42:10)</b>	**	840,6
<b>PCp(42:8)/PCo(42:9)</b>	**	842,6
<b>PC(40:2)</b>	**	842,7
<b>PCp(44:11)/PCo(44:12)</b>	**	864,6
<b>PCp(44:10)/PCo(44:11)</b>	**	866,6
<b>PCp(44:9)/PCo(44:10)</b>	**	868,6
<b>PCp(46:11)/PCo(46:12)</b>	**	892,6
<b>PC no modo negativo, [M+CH<sub>3</sub>COO]<sup>-</sup></b>		
<b>PC (32:1)*</b>	16:1/16:0	790,5
<b>PC (32:0)*</b>	16:0/16:0	792,5
<b>PC (33:3)*</b>	**	800,5
<b>PC (33:2)*</b>	**	802,5
<b>PC (34:4)*</b>	14:0/20:4	812,5
<b>PC (34:3)*</b>	16:1/18:2	814,5
<b>PC (34:2)*</b>	16:0/18:2	816,5
<b>PC (34:1)*</b>	16:0/18:1	818,6
<b>PC (P-36:4)*</b>	P-16:0/20:4	824,5
<b>PC (35:4)*</b>	15:0/20:4	826,5
<b>PC (35:3)*</b>	15:0/20:3	828,5
<b>PC (35:2)*</b>	**	830,6
<b>PC (35:1)*</b>	**	832,6
<b>PC (36:5)*</b>	16:0/20:5	838,5
<b>PC (36:4)*</b>	16:0/20:4	840,5
<b>PC (36:3)*</b>	16:0/20:3	842,6
<b>PC (36:2)*</b>	18:0/18:2	844,6
<b>PC (37:6)*</b>	17:2/20:4	850,5
<b>PC (37:5)*</b>	**	852,5

<b>PC (37:4)*</b>	17:0/20:4	854,6
<b>PC (38:6)*</b>	16:0/22:6	864,6
<b>PC (38:5)*</b>	**	866,6
<b>PC (38:4)*</b>	18:0/20:4	868,6
<b>PC (38:3)*</b>	18:0/20:3	870,6
<b>PC (39:6)*</b>	17:0/22:6	878,6
<b>PC (40:6)*</b>	18:0/22:6	892,6
<b>PC (40:4)*</b>	**	896,6
<b>PE no modo positivo, [M+H]<sup>+</sup></b>		
<b>PE(30:0)</b>	**	664,5
<b>PEo(32:2)/PEp(32:1)</b>	**	674,5
<b>PE(32:0)</b>	**	690,5
<b>PEp(34:5)</b>	**	692,5
<b>PEo(34:3)/PEp(34:2)</b>	**	694,5
<b>PEo(34:2)/PEp(34:1)</b>	**	702,5
<b>PEo(34:1)/PEp(34:0)</b>	**	704,5
<b>PE(34:1)</b>	**	718,5
<b>PE(34:0)</b>	**	720,5
<b>PEo(36:5)/PEp(36:4)</b>	**	724,5
<b>PEo(36:4)/PEp(36:3)</b>	**	726,5
<b>PEo(36:3)/PEp(36:2)</b>	**	728,5
<b>PEo(36:2)/PEp(36:1)</b>	**	730,5
<b>PE(36:6)</b>	**	736,5
<b>PE(36:5)</b>	**	738,5
<b>PE(36:4)</b>	**	740,5
<b>PE(36:3)</b>	**	742,5
<b>PEp(38:8)</b>	**	744,5
<b>PEo(38:8)/PEp(38:7)</b>	**	746,5
<b>PE(36:1)</b>	**	746,5
<b>PEo(38:7)/PEp(38:6)</b>	**	748,5
<b>PE(36:0)</b>	**	748,6
<b>PEo(38:6)/PEp(38:5)</b>	**	750,5
<b>PEo(38:5)/PEp(38:4)</b>	**	752,5
<b>PEo(38:4)/PEp(38:3)</b>	**	754,6
<b>PE(38:8)</b>	**	760,6

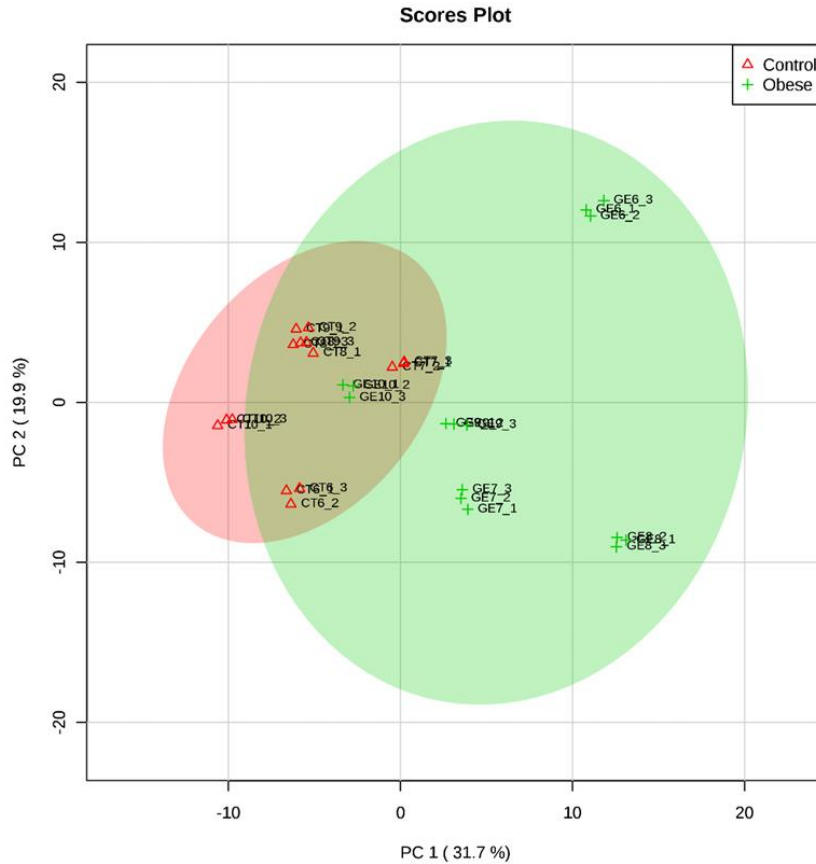
<b>PE(38:6)</b>	<b>**</b>	<b>764,5</b>
<b>PE(38:5)</b>	<b>**</b>	<b>766,5</b>
<b>PE(38:4)</b>	<b>**</b>	<b>768,5</b>
<b>PEo(40:10)/PEp(40:9)</b>	<b>**</b>	<b>770,5</b>
<b>PE(38:3)</b>	<b>**</b>	<b>770,6</b>
<b>PEo(40:9)/PEp(40:8)</b>	<b>**</b>	<b>772,5</b>
<b>PE(38:2)</b>	<b>**</b>	<b>772,6</b>
<b>PEo(40:8)/PEp(40:7)</b>	<b>**</b>	<b>774,5</b>
<b>PE(38:1)</b>	<b>**</b>	<b>774,6</b>
<b>PEo(40:7)/PEp(40:6)</b>	<b>**</b>	<b>776,5</b>
<b>PE(38:0)</b>	<b>**</b>	<b>776,6</b>
<b>PEo(40:6)/PEp(40:5)</b>	<b>**</b>	<b>778,6</b>
<b>PEo(40:5)/PEp(40:4)</b>	<b>**</b>	<b>780,6</b>
<b>PEo(40:4)/PEp(40:3)</b>	<b>**</b>	<b>782,6</b>
<b>PE(40:10)</b>	<b>**</b>	<b>784,5</b>
<b>PE(40:9)</b>	<b>**</b>	<b>786,5</b>
<b>PE(40:8)</b>	<b>**</b>	<b>788,5</b>
<b>PE(40:7)</b>	<b>**</b>	<b>790,5</b>
<b>PE(40:6)</b>	<b>**</b>	<b>792,5</b>
<b>PEp(42:11)</b>	<b>**</b>	<b>794,5</b>
<b>PE(40:5)</b>	<b>**</b>	<b>794,6</b>
<b>PEo(42:11)/PEp(42:10)</b>	<b>**</b>	<b>796,5</b>
<b>PEo(42:10)/PEp(42:9)</b>	<b>**</b>	<b>798,5</b>
<b>PE(40:3)</b>	<b>**</b>	<b>798,6</b>
<b>PEo(42:9)/PEp(42:8)</b>	<b>**</b>	<b>800,5</b>
<b>PE(40:2)</b>	<b>**</b>	<b>800,6</b>
<b>PE(40:1)</b>	<b>**</b>	<b>802,6</b>
<b>PEo(42:7)/PEp(42:6)</b>	<b>**</b>	<b>804,6</b>
<b>PE(42:11)</b>	<b>**</b>	<b>810,5</b>
<b>PEo(42:4)/PEp(42:3)</b>	<b>**</b>	<b>810,6</b>
<b>PE(42:9)</b>	<b>**</b>	<b>814,5</b>
<b>PEo(42:2)/PEp(42:1)</b>	<b>**</b>	<b>814,6</b>
<b>PEo(42:0)</b>	<b>**</b>	<b>818,7</b>
<b>PE(42:6)</b>	<b>**</b>	<b>820,6</b>
<b>PE(42:3)</b>	<b>**</b>	<b>826,6</b>

<b>PEo(44:7)/PEp(44:6)</b>	**	832,6
<b>PE(44:10)</b>	**	840,5
<b>PEo(44:0)</b>	**	846,7
<b>PE(44:6)</b>	**	848,6
<b>PEo(46:7)/PEp(46:6)</b>	**	860,6
<b>PEo(46:1)/PEp(46:0)</b>	**	872,7
<b>PEo(46:0)</b>	**	874,7
<b>PEo(48:12)/PEp(48:11)</b>	**	878,6
<b>PEo(48:11)/PEp(48:10)</b>	**	880,6
<b>PE(46:0)</b>	**	888,7
<b>PE(48:6)</b>	**	904,7
<b>PE(48:3)</b>	**	910,7
<b>PE(48:2)</b>	**	912,7
<b>PE(48:1)</b>	**	914,7
<b>PE(48:0)</b>	**	916,7
<b>SM no modo positivo, [M+H]<sup>+</sup></b>		
<b>SM(d34:2)*</b>	<b>d18:1/16:1</b>	701,5
<b>SM(d34:1)*</b>	<b>d18:1/16:0</b>	703,5
<b>SM(d34:0)*</b>	<b>d18:0/16:0**</b>	705,5
<b>SM(d36:3)*</b>	<b>d18:1/18:2</b>	727,5
<b>SM(d36:2)*</b>	<b>d18:1/18:1</b>	729,5
<b>SM(d36:1)*</b>	<b>d18:1/18:0</b>	731,6
<b>SM(d36:0)</b>	**	733,6
<b>SM(d37:2)</b>	**	743,6
<b>SM(d37:1)</b>	**	745,6
<b>SM(d38:3)</b>	**	755,6
<b>SM(d38:2)</b>	**	757,6
<b>SM(d38:1)*</b>	<b>d18:1/20:0</b>	759,6
<b>SM(d39:2)</b>	**	771,6
<b>SM(d39:1)*</b>	<b>d18:1/21:0**</b>	773,6
<b>SM(d40:2)*</b>	**	785,6
<b>SM(d40:1)*</b>	**	787,6
<b>SM(d40:0)</b>	**	789,6
<b>SM(d41:2)</b>	**	799,6
<b>SM(d42:3)*</b>	**	811,6



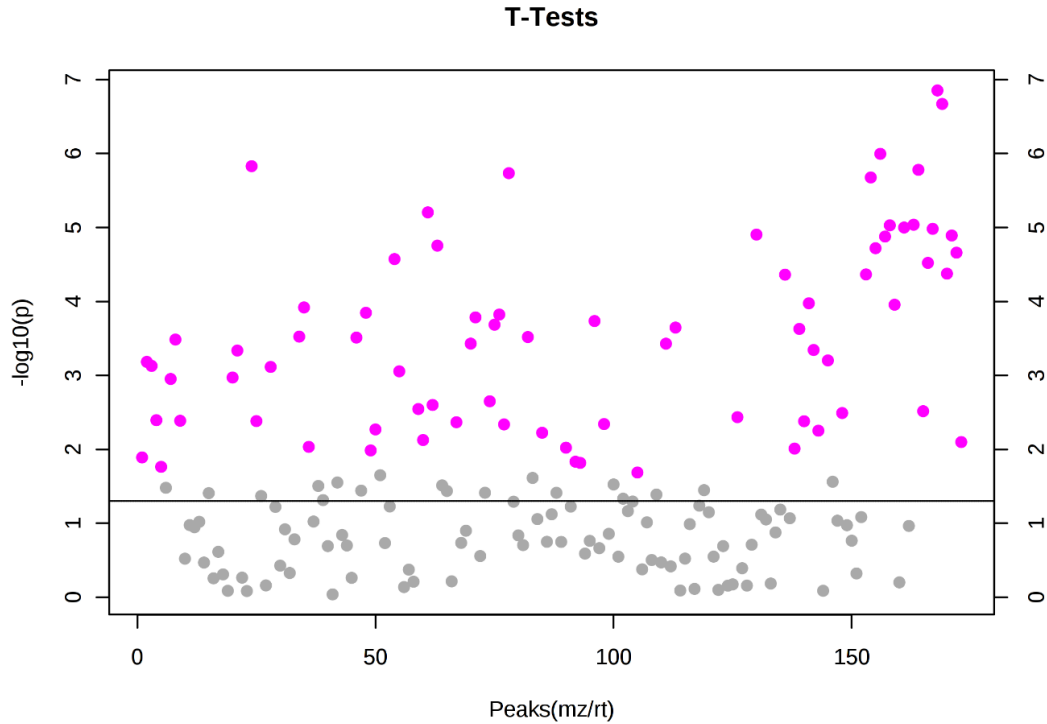
<b>SM(d42:2)*</b>	<b>**</b>	813,6
<b>SM(d43:2)</b>	<b>**</b>	827,7

A análise de componentes principais (PCA, do inglês *principal component analysis*) foi realizada para avaliar a capacidade de separar crianças obesas e de crianças não obesas com base nos perfis lipídicos de todas as 192 espécies moleculares identificadas (Figura 20). A realização de PCA com a área do pico das 192 espécies de fosfolípidos normalizadas para a área de pico do padrão interno correspondente, os grupos de crianças obesas e não obesas foram visualmente separados ao longo do primeiro componente em PCA que representaram 31,7% da variância geral. As posições das crianças não obesas foram espacialmente consideravelmente mais próximas do que as de crianças obesas, sugerindo que as diferenças no perfil molecular de fosfolípidos das crianças não obesas eram muito menores que nas de crianças obesas.



**Figura 20-** Análise de componentes principais (PCA) com 192 espécies moleculares de fosfolípidos identificadas. O primeiro componente em PCA cruzar todas as 192 espécies moleculares detetadas contabiliza 31,7% da variância geral.

Para identificar quais as espécies de fosfolípidos que mais variam entre os grupos de crianças não obesas e obesas, realizou-se um *t-test* não emparelhado usando um p-value (FDR) <0,05 para a área de pico normalizada das 192 espécies de fosfolípidos (Figura 21). Um total de 76 fosfolípidos apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos (Tabela 9). As espécies moleculares de SM estavam entre os FL com maior variação entre as crianças não obesas e as crianças obesas. De facto, SM (d40: 1), SM (d40: 0) e SM (d36: 3) foram, nesta ordem, as espécies de FL que apresentaram mais diferenças entre os dois grupos experimentais. Um diacil-PC e um plasmalogénio-PE, nomeadamente PC (32: 0) e PE (o-32: 2 ou p-32: 1), respetivamente, também estavam entre as espécies moleculares que apresentavam mais diferenças entre ambas as condições, também como a LPC (18:0).



**Figura 21-** *T-test* não emparelhado com um p-value <0,05 com todas as 192 espécies moleculares detetadas. Os pontos roxos e cinza representam as 192 espécies de fosfolípidos identificadas. Os pontos roxos representam as 76 espécies moleculares que apresentaram diferenças significativas entre grupos das crianças obesas e as crianças não obesas. Os pontos cinzentos representam as espécies moleculares cujas diferenças entre crianças obesas e não obesas não diferem significativamente.

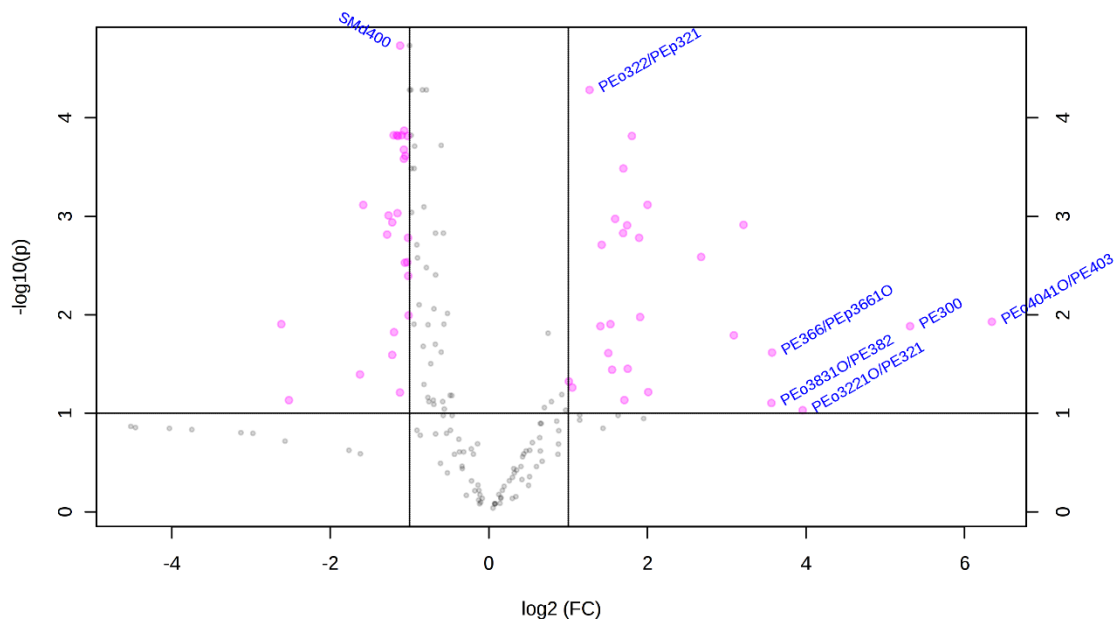
**Tabela 9** – Lista das 40 espécies moleculares de fosfolípidos que variam mais estatisticamente entre crianças obesas e crianças não obesas.

	<b>t.stat</b>	<b>p-value</b>	<b>-log10(p)</b>	<b>FDR</b>
<b>SM(d40:1)</b>	-6.9714	1.40E-07	6.8537	1.84E-05
<b>SM(d40:0)</b>	-6.8099	2.13E-07	6.6711	1.84E-05
<b>SM(d36:3)</b>	-6.2223	1.01E-06	5.9964	5.20E-05
<b>PC(32:0)</b>	-6.0785	1.48E-06	5.8292	5.20E-05
<b>SM(d38:1)</b>	-6.0365	1.66E-06	5.7802	5.20E-05
<b>PEo(32:2)/PEp(32:1)</b>	5.9976	1.84E-06	5.7347	5.20E-05
<b>SM(d34:1)</b>	-5.9481	2.10E-06	5.6768	5.20E-05
<b>PC(38:2)</b>	-5.5468	6.24E-06	5.205	0.000135
<b>SM(d38:2)</b>	-5.4052	9.17E-06	5.0376	0.00015
<b>SM(d36:1)</b>	-5.3984	9.34E-06	5.0296	0.00015
<b>SM(d37:1)</b>	-5.3735	1.00E-05	5.0001	0.00015
<b>SM(d40:2)</b>	-5.3586	1.04E-05	4.9824	0.00015
<b>PEo(42:7)/PEp(42:6)</b>	5.2928	1.25E-05	4.9044	0.000153

<b>SM(d42:3)</b>	-5.2824	1.28E-05	4.8922	0.000153
<b>SM(d36:2)</b>	-5.2705	1.32E-05	4.878	0.000153
<b>PC(40:10)</b>	-5.1667	1.76E-05	4.7549	0.00019
<b>SM(d34:0)</b>	-5.1374	1.90E-05	4.7202	0.000194
<b>SM(d42:2)</b>	-5.0868	2.19E-05	4.6601	0.00021
<b>PCp(38:2)/PCo(38:3)</b>	-5.0139	2.67E-05	4.5736	0.000243
<b>SM(d39:1)</b>	-4.9704	3.01E-05	4.5218	0.00026
<b>SM(d41:2)</b>	-4.8479	4.20E-05	4.3764	0.000326
<b>SM(d34:2)</b>	-4.8392	4.31E-05	4.366	0.000326
<b>PEo4271O/PE(42:6)/PEp4261O</b>	4.8363	4.34E-05	4.3626	0.000326
<b>PEo4471O/PE(44:6)/PEp4461O</b>	4.5095	0.000106	3.9751	0.000763
<b>SM(d36:0)</b>	-4.4934	0.000111	3.9562	0.000766
<b>PCp(36:6)</b>	-4.4624	0.00012	3.9195	0.000801
<b>PC(36:1)</b>	-4.4011	0.000142	3.8471	0.000911
<b>PCp(46:11)/PCo(46:12)</b>	-4.3808	0.00015	3.8232	0.000928
<b>PCp(42:8)/PCo(42:9)</b>	-4.3483	0.000164	3.7848	0.000979
<b>PEo3621O/PE(36:1)</b>	4.3065	0.000184	3.7355	0.00106
<b>PCp(44:9)/PCo(44:10)</b>	-4.2643	0.000206	3.686	0.00115
<b>PE(38:0)</b>	4.2313	0.000225	3.6472	0.001218
<b>PEo44111O/PE(44:10)/PEp44101O</b>	4.2157	0.000235	3.6288	0.001232
<b>PC(34:1)</b>	-4.127	0.000299	3.5248	0.001479
<b>PEo(34:2)/PEp(34:1)</b>	4.1221	0.000303	3.5191	0.001479
<b>PC(36:2)</b>	-4.1158	0.000308	3.5117	0.001479
<b>LPC(18:0)</b>	-4.0931	0.000327	3.4852	0.00153
<b>PCp(42:9)/PCo(42:10)</b>	-4.046	0.000371	3.4301	0.00165
<b>PEo3821O/PE(38:1)</b>	4.0454	0.000372	3.4295	0.00165
<b>PEo(46:7)/PEp(46:6)</b>	3.972	0.000453	3.3439	0.001945
<b>PCo(32:0)</b>	-3.9656	0.000461	3.3365	0.001945

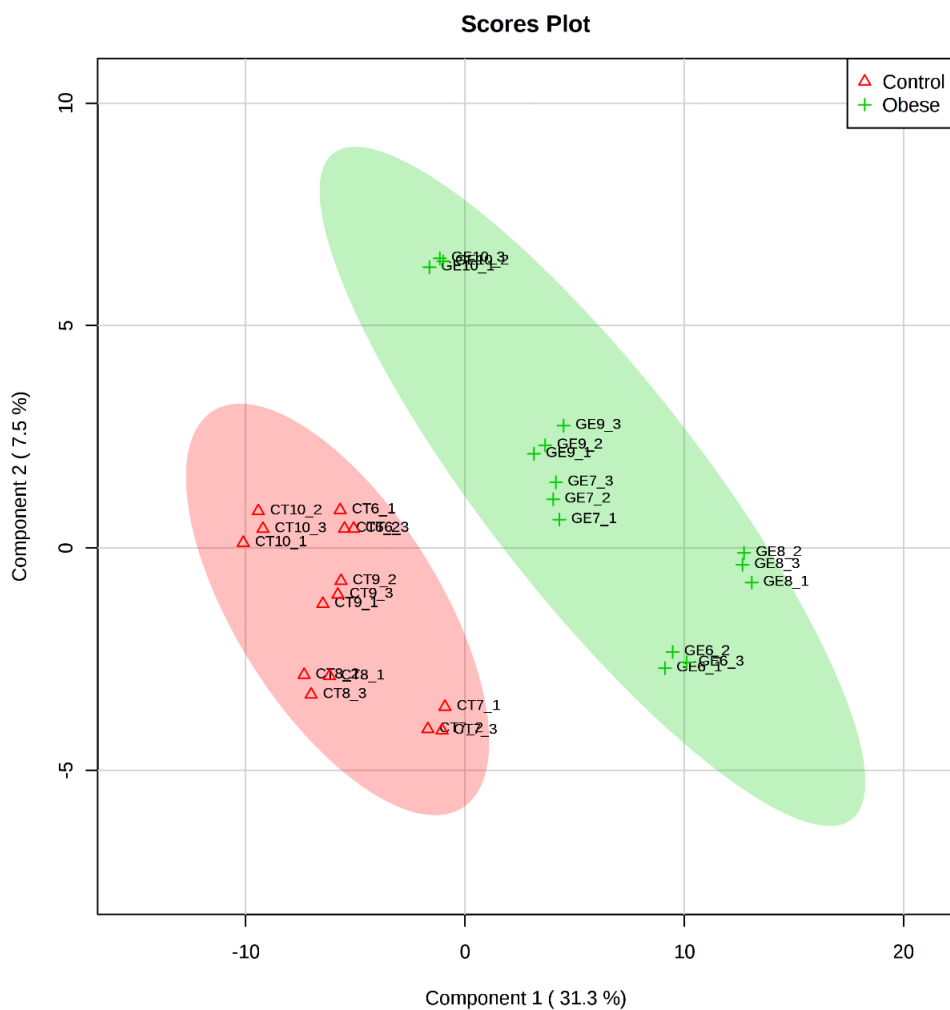
Para determinar os FL mais diferentes entre as crianças não obesas e as crianças obesas, as 76 espécies de fosfolípidos resultantes descritas como estatisticamente significativas no *t-test* não emparelhado foram ainda avaliadas aplicando um algoritmo Volcano Plot com um *p-value* <0,05 e um *fold change* (FC) > 2 (Figura 22). A SM (d40: 0) e PE (o-32: 2 ou p-32: 1) foram as espécies que mais contribuíram para as diferenças observadas entre as crianças não obesas e as crianças obesas. No entanto, essas não eram

as espécies cuja área normalizada alterou mais entre os dois grupos experimentais. De facto, PE (40: 3), PE (30: 0), PE (32: 1), PE (38: 2) e PE (36: 6) foram, nesta ordem, as espécies moleculares cuja área alterou mais entre ambas as condições. No entanto, as espécies de diacil-PE não apresentaram muita variação entre os dois grupos experimentais, sugerindo que diferenças consideráveis na expressão de espécies FL não são o principal fator para diferenciar crianças não obesas e obesas.

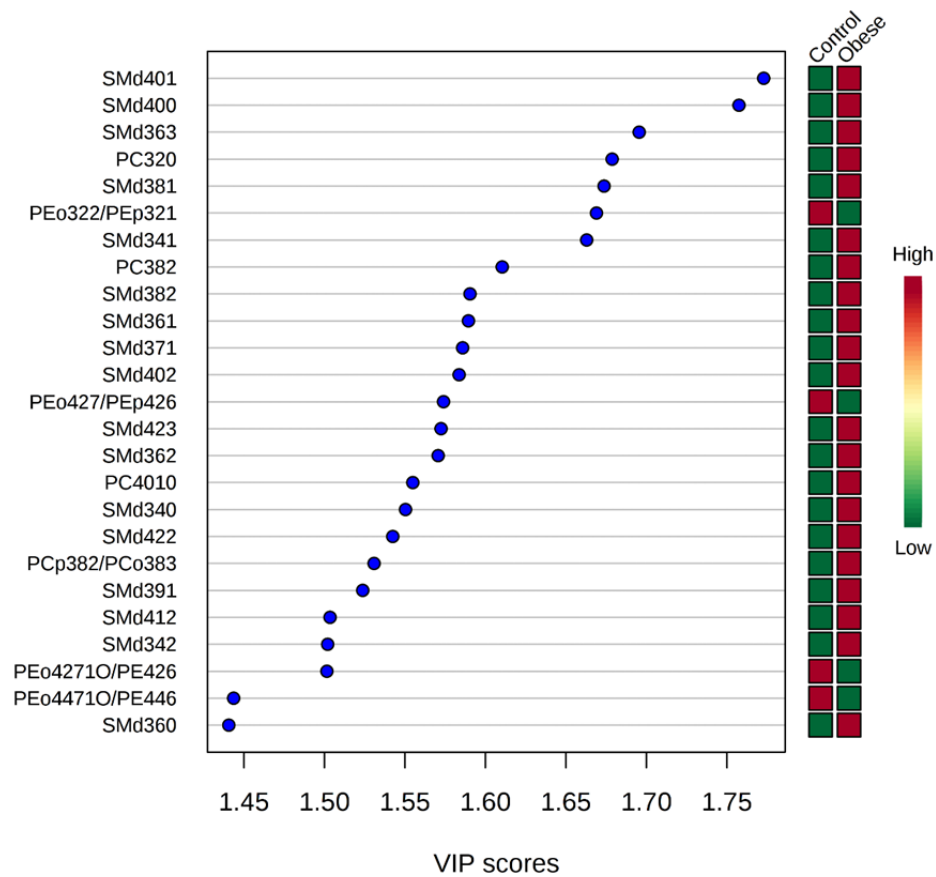


**Figura 22-** Volcano Plot das 76 espécies moleculares estatisticamente significativas. Os pontos roxos e cinzentos representam as 76 espécies de fosfolípidos estatisticamente diferentes. Os pontos roxos representam as espécies moleculares cujas diferenças entre grupos as crianças obesas e não obesas contribuíram mais para a diferença estatística. Os pontos cinzentos representam as espécies moleculares cujas diferenças entre as crianças não obesas e obesas não diferem significativamente nos parâmetros definidos

Finalmente, foi utilizado método de Mínimos Quadrados Parciais- Análise Discriminante (PLS-DA, do inglês *Partial Least Square – Discriminant Analysis*) para identificar as espécies de FL com as abundâncias relativas mais significativas que comparam os dois grupos experimentais (Figura 23) e foi gerada uma Importância Variável na Projeção (VIP, do inglês *Variable Importance in the Projection*) (Figura 24). PLS-DA mostra uma separação espacial total de grupos de crianças obesas e não obesas ao longo do primeiro componente que representou 31,3% da variância geral. As posições das crianças não obesas foram espacialmente consideravelmente mais próximas do que as crianças obesas, que estão mais separadas ao longo do segundo componente de PLS-DA, como já foi observado pelo PCA.



**Figura 23-** Mínimos Quadrados Parciais- Análise Discriminante (PLS-DA) com 192 espécies moleculares de fosfolípidos identificadas. O primeiro componente no PLS-DA intersecta todas as 192 espécies moleculares detetadas representando cerca de 31,3% da variância geral.



**Figura 24-** Lista de Importância Variável na Projeção (VIP, do inglês *Variable Importance in the Projection*).

Como esperado, as espécies que diferem entre as crianças não obesas e obesas são as mesmas que as descritas no *t-test* não emparelhado (Tabela 9). Em geral, as 76 espécies moleculares foram sobre expressas no plasma das crianças obesas, com exceção de PE (o-32: 2 ou p-32: 1), PE (o-42: 7 ou p-42: 6), PE (42: 6) e PE (44: 6) cuja abundância relativa foi maior nas crianças não obesas do que em crianças obesas.





## 4. Discussão

---



#### 4. Discussão

A esteatose hepática não alcoólica (EHNA) é a forma mais prevalente de doença hepática crónica, com um aumento crescente na população pediátrica. A doença é crónica e assintomática, o que dificulta o diagnóstico, sabe-se que existem vários fatores de risco para esta disfunção metabólica, incluindo a obesidade. Nesse sentido, neste trabalho, estudou-se modificações nas espécies moleculares de lípidos e associadas ao processo inflamatório no plasma de crianças com excesso de peso e com obesidade de modo a detetar possíveis biomarcadores que estejam relacionados com desenvolvimento da EHNA. Para este trabalho experimental foram estudados dois grupos distintos com diferentes IMC, ou seja crianças com excesso de peso e crianças obesas com o intuito de verificar se existem diferenças no perfil lipídico, de adipocinas e de proteínas associadas à inflamação. Deste modo, recorreu-se às técnicas TLC, GC-MS, HPLC-MS e MS/MS e Slot Blot. Resumidamente, as crianças obesas apresentaram variações significativas, comparativamente às não obesas, nos níveis de LDL, insulina, adiponectina, leptina e HSL. Adicionalmente, estas crianças também apresentaram um aumento significativo da quantidade de fosfolípidos totais no plasma. Em termos de perfil lipídico, as crianças obesas apresentaram uma diminuição significativa do teor de ácido gordo C16:0 como também na classe de fosfolípidos PC. Contrariamente, verificou-se um aumento significativo da classe de fosfolípidos LPC. A análise multivariada de PCA demonstrou que existem variações significativas no perfil fosfolipídico entre crianças não obesas e obesas, nomeadamente na classe de fosfolípidos das SM, LPC e PE. Estes resultados obtidos irão ser discutidos posteriormente.

Através dos resultados obtidos no nosso trabalho foi possível verificar que o grupo das crianças com excesso de peso não apresentaram diferenças significativas em nenhuma das análises efetuadas neste trabalho, comparativamente com as crianças sem excesso de peso. Por outro lado, nas crianças com obesidade foram encontradas diferenças significativas nas análises efetuadas neste trabalho, comparativamente com as crianças não obesas. Este facto pode indicar que crianças com percentil de IMC superiores a 95, ou seja obesas, parecem ter alterações nos metabolismos dos lípidos, das adipocinas como também parece induzir o processo inflamatório. Foram analisados os parâmetros bioquímicos, tais como glucose, insulina, AST, ALT, hemoglobina A1c, colesterol total,

HDL, LDL, TG e a TSH de cada criança dos grupos em estudo. Os níveis de glucose, insulina e hemoglobina A1c foram avaliados para apurar se estas crianças apresentavam diabetes *mellitus* tipo II pois provoca resistência à insulina. Os níveis de colesterol total, HDL, LDL e TG foram analisados para verificar se existiam alterações no metabolismo lipídico. Por fim, foi analisada a TSH uma vez que a obesidade pode estar correlacionada com o hipotireoidismo. Esta é uma doença em que a hormona TSH é produzida pela hipófise mas a glândula da tiroide não é capaz de produzir as hormonas T3 e T4, importantes para o controlo do metabolismo basal, da termogénese e com um papel importante no metabolismo de lipídios e glucose, ingestão de alimentos e oxidação de ácidos gordos. Assim, é comum os níveis de TSH estarem elevados nos indivíduos obesos devido ao mecanismo de feedback positivo ocorrido nas células da tiroide, caso apresentem hipotireoidismo (119).

Relativamente aos resultados da análise dos parâmetros bioquímicos verificou-se que no geral crianças obesas apresentaram níveis elevados de LDL e uma dessas crianças apresenta níveis elevados de colesterol total. Desta forma, é possível verificar que estas crianças apresentam dislipidémia. A dislipidémia é caracterizada por haver níveis elevados de TG e/ou LDL ou níveis diminuídos de HDL, no plasma. No caso das crianças obesas em estudo, possivelmente, apresentam dislipidémia secundária pois as variações dos níveis plasmáticos de LDL e HDL podem dever-se ao facto de as crianças apresentarem obesidade (64). Assim, os níveis plasmáticos de LDL elevados podem ter que ver com o facto de haver um aumento do metabolismo das lipoproteínas em que há o aumento da secreção da VLDL pelo fígado, sendo esta hidrolisada a IDL que por sua vez é hidrolisada a LDL. Este aumento dos níveis de LDL podem causar também o aumento da lipogénese *de novo* pelo fígado ou pelo consumo exagerado de AG pela dieta (45). O contínuo aumento das LDL está relacionado com o desenvolvimento da síndrome metabólica, onde indiretamente está envolvido o desenvolvimento de EHNA (120). Um dos principais componentes da LDL são os fosfolípidos, constituindo cerca de 22% do seu conteúdo (121), por isso este aumento suporta o aumento significativo da quantidade de fosfolípido presente nas crianças obesas em estudo que apresentam um aumento significativo dos níveis plasmáticos de LDL. Adicionalmente, os níveis de HDL apresentavam-se diminuídos em duas crianças obesas, para além dos níveis aumentados de LDL. A HDL tem um efeito cardioprotetor (122). No caso das crianças obesas com níveis de HDL diminuídos significa que têm um efeito cardioprotetor reduzido, estando mais suscetíveis a desenvolverem doenças cardiovasculares.

A presença de uma dislipidemia prolongada pode aumentar a expressão e atividade do SREBP-1c, devido ao aumento da resistência à insulina, que afeta adversamente a síntese de lipoproteínas no fígado favorecendo o aumento e diminuição dos níveis de LDL e HDL, respectivamente. Por outro lado, a insulina ativa a proteína SREBP-1c. Esta proteína por sua vez ativa a via da lipogênese *de novo* favorecendo, assim, a acumulação de TG no parênquima hepático, promovendo, assim, a formação de esteatose hepática (1,58). Portanto, o contínuo aumento dos níveis plasmáticos de LDL e a diminuição dos níveis plasmáticos de HDL nestas crianças obesas pode favorecer o desenvolvimento da EHNA.

A adiponectina é uma adipocina que tem um papel importante na regulação do metabolismo lipídico e da glicose (92,123). Existem dois receptores para a adiponectina o adipoR1 e adipoR2, apenas o último é que está presente no fígado. Assim, a adiponectina por interação com a APPL1 (proteína adaptadora fosfotirosina que interage com o domínio PH e zíper da leucina 1, do inglês *adaptor protein containing pleckstrin homology domain, phosphotyrosine binding domain and leucine zipper motif*) promove a fosforilação e ativação AMPK (proteína cinase ativada pelo AMP, do inglês *AMP-activated kinase*). Esta ativação da AMPK resulta na fosforilação da acetil coenzima A, inibindo a sua atividade, reduzindo a síntese proteica e aumentando a oxidação dos AG. Por outro lado, a ativação do AMPK diminui a expressão da SREBP-1c, ou seja há menor ativação da lipogênese *de novo*. A interação da adiponectina com a APPL1 também estimula o PPAR $\alpha$ , favorecendo a oxidação dos AG e inibindo a síntese de TG, ou seja formação de esteatose (92,123). Para além disso, a adiponectina tem uma ação anti-inflamatória via ativação adipoR2 e SOD1, com consequente inibição da produção de espécies reativas de oxigénio (123,124). Adicionalmente, este mecanismo inibi a formação de citocinas pró-inflamatórias nas células hepáticas. No nosso estudo, verificou-se que nas crianças obesas a adiponectina está diminuída significativamente comparativamente às crianças não obesas, o que pode promover o processo inflamatório, favorecendo o desenvolvimento de EHNA. Os nossos resultados estão de acordo com o descrito por Musso *et al.*(81), Zou *et al.*(94), Lebensztejn *et al.*(95) e Boyraz *et al.*(96) em crianças com obesidade e EHNA.

A leptina é uma adipocina secretada pelo tecido adiposo e atua no hipotálamo, com consequente impacto no armazenamento de energia corporal e de ingestão de calorias. Assim esta adipocina atua na regulação do apetite dos indivíduos (97). A leptina atua via

recetores específicos JAK/STAT (cinase Janus/ transdutor de sinal e ativador de transcrição, do inglês *janus kinase/ signal transducer and activator of transcription*), os LepR e nos humanos existem quatro isoformas LepRa-LepRd. Nas células hepáticas, a leptina após ligar-se ao recetor LepRb, ativa a auto-fosforilação e ativação do JAK2/STAT3. Este complexo ativa a SOCS (supressores da sinalização de citocinas, do inglês *suppressors of cytokine signaling*) 3 que atua por mecanismos de feedback negativo, atenuando a sobre-ativação da leptina, em condições normais. Por outro lado, com a ativação da SOCS3 ocorre o aumento da resistência à insulina via PI3K no fígado. Na EHNA a leptina tem um efeito duplo, pois por um lado inibe o desenvolvimento de esteatose ao inibir a lipogénese *de novo* e estimulando a oxidação dos FFA. Por outro lado a leptina é pró-inflamatória pois promove o recrutamento de células de ito (ou células perissinusoidais) que produzem mediadores pró-inflamatórios com consequente aumento da fibrose hepática (97,125). No nosso estudo, as crianças obesas apresentaram uma diminuição significativa dos níveis plasmáticos de leptina. Na literatura não há um consenso quanto à variação dos níveis de leptina com a obesidade, pois em alguns estudos é descrito que não há diferenças entre não obesos e obesos (126,127) e outros descrevem um aumento dos níveis de leptina (128–130). O aumento de gordura visceral parece ser acompanhado pelo aumento dos níveis de leptina, tendo sido demonstrado que com a diminuição de peso também há diminuição dos níveis de leptina (97,128). Portanto, a diminuição significativa dos níveis plasmáticos de leptina nestas crianças obesas poderão ser devidos ao *turnover* celular ocorrido no tecido adiposo.

No nosso estudo verificou-se que os níveis plasmáticos de grelina não são significativos nas crianças obesas e nas não obesas. A grelina é uma hormona produzida no estômago e que atua no hipotálamo tendo impacto na regulação do apetite dos indivíduos (131). Esta hormona em indivíduos obesos encontra-se diminuída, uma vez que é influenciada por mudanças crónicas nutricionais, ou seja a grelina está diretamente envolvida na regulação a curto prazo do balanço energético (131). Assim, nas crianças obesas não há diferenças significativas nos níveis plasmáticos de grelina, existindo diferenças significativas nos níveis plasmáticos de leptina, portanto a regulação do apetite destas crianças deve-se à libertação de leptina pelo tecido adiposo.

A hormona sensível à lípase (HSL, do inglês *Hormone-Sensitive Lipase*) é uma proteína citoplasmática que se localiza no tecido adiposo. Esta hormona é fosforilada e ativada via proteína cinase A (PKA, do inglês *protein kinase A*) que hidrolisa os TG armazenados no tecido adiposo com consequente aumento da secreção de FFA para a

corrente sanguínea (132,133). A secreção dos FFA podem ativar os recetores  $\beta$ -adrenérgicos que estão associados com a inflamação crónica (134). Os níveis de HSL presentes no plasma das crianças obesas apresentaram-se diminuídos: a diminuição destes valores pode estar associado a uma dieta rica em AG, foi demonstrado que a eliminação da HSL em dietas ricas em AG está associada a um efeito protetor significativo contra o desenvolvimento da obesidade (135). O resultado descrito, de diminuição dos níveis plasmáticos de HSL em indivíduos obesos, foi inesperado, mas pode ser explicado pela descoberta que os adipócitos na ausência de HSL sofrem uma diminuição compensatória na reesterificação de AG que resulta na nova síntese de TG e o aumento da FFA para a corrente sanguínea (132,135). Desta forma, os níveis diminuídos de HSL no plasma pode ser explicados pelo *turnover* celular ocorrido no tecido adiposo, contudo não existem estudos que revelam os níveis de HSL no plasma. Este resultado corrobora com os níveis diminuídos de leptina nas crianças obesas, devido ao *turnover* celular. Tendo em conta que a obesidade está relacionada com estados de inflamação crónica e que as adipocinas estudadas e a HSL parecem promover o processo inflamatório, seria de esperar que os níveis plasmáticos da proteína C reativa (PCR) nas crianças obesas estivessem significativamente elevados, contudo não houve diferenças significativas. Portanto, as modificações metabólicas associadas ao processo inflamatório induzidas pela obesidade, ou seja produção de mediadores pró-inflamatórios, não são, ainda, suficientes para induzir a produção da PCR pelo fígado.

A análise do perfil de ácidos gordos por GC-MS de crianças obesas permitiu verificar uma diminuição significativa do ácido palmítico (C16:0), contudo na literatura verifica-se o oposto em indivíduos com EHNA. O aumento significativo do C16:0 é associado à progressão de lesão hepática, normalmente este aumento verifica-se no estado de esteato-hepatite (136,137). Puri *et al.* (104) também verificaram um aumento significativo deste ácido gordo em doentes com EHNA. Portanto, neste estudo a diminuição dos níveis de C16:0 nas crianças obesas pode significar que não há lesão hepática, o que corrobora com os níveis normais de ALT presentes nestas crianças.

A PC é a classe de fosfolípidos maioritária nas crianças em estudo. Este fosfolípido para além de ser a principal classe que circula no plasma é o componente integral das lipoproteínas (117). A PC é a única classe de fosfolípido necessária para a formação e secreção das lipoproteínas, fazendo sentido que estas também sejam as principais classes

de fosfolípidos presentes no plasma destas crianças. No nosso estudo verificou-se que as crianças obesas apresentavam níveis significativamente aumentados de LPC por TLC e HPLC-MS e MS/MS. As LPC, no plasma, são primeiramente produzidas a partir das PC pela ação enzima fosfolipase A<sub>2</sub>. Esta enzima é caracterizada por hidrolisar AG na posição sn-2 dos fosfolípidos. Outra fonte de níveis plasmáticos de LPC é através da ação da lecitina colesterol aciltransferase que é excretada pelo fígado e atua nas lipoproteínas HDL e LDL (138,139). Está estabelecido que a LPC é uma molécula pró-inflamatória estando bastante regulada em locais de inflamação. A LPC, devido à atividade da fosfolipase A<sub>2</sub>, liberta ácido araquidónico que é um precursor de mediadores pró-inflamatórios, que se formam pela ação da COX-2 e da 5-LOX como as prostaglandinas e os leucotrienos, respetivamente (85,87,139). Estes mediadores pró-inflamatórios estimulam a produção da proteína C reativa, que neste estudo nas crianças obesas verificou-se uma tendência para o seu aumento o que indica que o processo inflamatório está presente apesar de não significativo. Verificou-se que as crianças obesas apresentavam níveis significativamente aumentados de LPC e níveis significativamente diminuídos de PC o que revela que ocorre a ativação da fosfolipase A<sub>2</sub>. Assim, os níveis significativamente aumentados de LPC nas crianças obesas podem estar associados a processos inflamatórios o que pode propiciar o risco de desenvolvimento de EHNA. Adicionalmente, a LPC induz a lipo apoptose nos hepatócitos, por ativação da via das caspases, que está correlacionado com o desenvolvimento da EHNA pelo aumento da lipotoxicidade hepática (139,140). Este mecanismo foi proposto por Han *et al.* (141).

A análise do perfil fosfolipídico por HPLC-MS e MS/MS permitiu identificar 4 classes de fosfolípidos, nomeadamente as PC, LPC, SM e PE. Este resultado é concordante com o que se verificou por TLC, exceto a classe das PE devido a esta classe ser pouco abundante no plasma das crianças em estudo. A partir da análise estatística aplicada aos resultados obtidos, foi verificado que, essencialmente, as espécies moleculares das SM são aquelas que são significativamente diferentes entre as crianças não obesas e as crianças obesas, nomeadamente as SM (d40: 1), SM (d40: 0) e SM (d36: 3), bem como a PC (32:0), a PE (O-32:2 ou P-32:1) e a LPC (18:0). A espécie molecular LPC (18:0) também foi detetada no plasma de doentes com EHNA por Gorden *et al.* (142). A SM é o mais abundante esfingolípido nas lipoproteínas e constitui cerca de 87% dos esfingolípidos totais no plasma e cerca de 20% do total de fosfolípidos no plasma. A SM está presente cerca de 63-75% nas VLDL/LDL e cerca de 25-35% na HDL (143). A SM



pode ser hidrolisada em ceramida, por ação da esfingomielinase e por outro lado, a ceramida pode ser convertida em SM por ação da esfingomielina sintase, logo o aumento dos níveis de SM podem estar relacionados com o aumento das ceramidas como descrito por Gorden *et al.* (106). Na obesidade há alteração no metabolismo da ceramida, pois devido ao aumento do tecido adiposo há um maior número de adipócitos e macrófagos que libertam elevadas quantidades de citocinas inflamatórias, aumentando desta forma, a nível celular, a formação de ceramida via hidrólise de SM e lipogénese *de novo* (143,144). Os FFA ativam os recetores do tipo Toll (do inglês, *Toll-like receptors*). Esta via de sinalização ativa a esfingomielinase havendo produção de ceramida, via hidrólise da SM. Por outro lado, na presença de EHNA há elevados níveis da HSL, como explicado anteriormente, que faz com que haja maior libertação de FFA pelo tecido adiposo, principalmente do ácido palmítico que é necessário para formação da ceramida. Adicionalmente, níveis diminuídos de adiponectina também parecem promover a produção de ceramida, pelo que a expressão de adiponectina é inversamente correlacionada com a expressão da esfingomielinase. Os elevados níveis de ceramida podem promover vias de sinalização associadas ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e à resistência à insulina (143,144). Recentemente, foi descrito por Gorden *et al.* (142), usando uma abordagem lipidómica, elevados níveis de ceramidas em plasma de doentes com EHNA, relativamente ao controlo. Assim, neste estudo os elevados níveis plasmáticos de SM nas crianças obesas podem estar correlacionados com a formação de ceramidas que podem estar associadas com os níveis plasmáticos diminuídos de HSL, devido ao *turnover celular*, e de adiponectina que estão associados com obesidade e com o possível desenvolvimento de EHNA, sendo ainda necessário mais estudos do metabolismo das SM e das ceramidas na EHNA. Adicionalmente, o principal esfingolípido presente na LDL é a SM e, tendo em conta, que as crianças obesas, neste estudo, apresentaram níveis plasmáticos significativamente elevados desta lipoproteína pode se refletir nos níveis significativamente elevados de SM no plasma.

No nosso estudo, os níveis plasmáticos de PE nas crianças obesas são significativamente diminuídos, tendo-se também verificado que esta classe é a que apresenta um maior número de espécies moleculares nestas crianças. A PE pela ação da PE N-metiltransferase catalisa as 3 reações de metilação, na cabeça polar, que converte a PE em PC no fígado (145). Recentemente, foi descrito em plasma de adultos com EHNA níveis elevados de PE correlacionados com a progressão da doença (146). Adicionalmente, os mesmos autores evidenciaram que valores diminuídos do rácio

PC/PE, em tecido hepático, estão associados ao desenvolvimento de EHNA comparativamente aos controlos. Contudo, em plasma apenas se observou uma tendência para a sua diminuição, apesar de não significativa (146). O rácio PC/PE também foi estudado em tecido hepático por Li *et al.* (147) em modelo animal com EHNA, tendo-se verificado uma diminuição significativa do rácio PC/PE. Para trabalho futuro, seria interessante avaliar o rácio PC/PE em plasma de crianças obesas que poderá ser um biomarcador associado ao desenvolvimento de EHNA.

## **5. Conclusão e Perspetivas Futuras**

---



## 5. Conclusão e Perspetivas Futuras

A esteatose hepática não alcoólica (EHNA) é uma doença crónica com prevalência crescente em idade pediátrica. Esta patologia hepática desenvolve-se essencialmente devido às modificações metabólicas induzidas pela obesidade e que, conseqüentemente, provoca o aumento do processo inflamatório. Para uma melhor compreensão das alterações que podem estar associadas ao desenvolvimento da EHNA, neste trabalho foram avaliadas modificações em espécies moleculares de lípidos, de adipocinas e de proteínas associadas à inflamação em crianças com excesso de peso e obesas. Assim, foi possível verificar que as crianças com excesso de peso não apresentaram diferenças significativas nas espécies moleculares estudadas, contudo alterações significativas foram observadas em crianças obesas. Desta forma, é possível afirmar o aumento da quantidade de adipócitos no tecido adiposo parece contribuir para alterações no metabolismo dos lípidos, como também das adipocinas e no processo inflamatório.

Os resultados obtidos, neste trabalho, permitiram verificar que as modificações nas espécies moleculares de fosfolípidos nas crianças com obesidade podem estar associadas com o aumento da lipogénese *de novo* bem como ao aumento da libertação de mediadores pró-inflamatórios. Adicionalmente, os níveis plasmáticos significativamente diminuídos de HSL, ocorridos pelo *turnover* celular, significa que há uma maior libertação de FFA do tecido adiposo para os tecidos periféricos. Para além disso, os níveis plasmáticos significativamente elevados de SM podem estar correlacionados com o aumento da resistência à insulina. Estes 3 factos, podem estar associados a vias de sinalização que promovem a formação de esteatose hepática. A insulina induz a SREBP-1c que ativa a lipogénese de novo dos FFA intra-hepática e inibe a oxidação dos FFA, sendo os FFA posteriormente esterificados em TG. Por outro lado, os FFA libertados pelo tecido adiposo, pela ação da HSL, podem ser absorvidos pelo fígado onde são esterificados em TG. Os TG podem ficar acumulados nos hepatócitos ou podem ser libertados para a corrente sanguínea na forma de VLDL. Estes mecanismos para além de desenvolverem EHNA também podem estar envolvidos no risco de desenvolverem doenças cardiovasculares.

O aumento do processo inflamatório também parece estar presente nas crianças com obesidade uma vez que, há a diminuição significativa dos níveis plasmáticos de adiponectina, sendo esta adipocina anti-inflamatória e o aumento significativo dos níveis

plasmáticos de LPC, que por ação da fosfolipase A<sub>2</sub>, liberta precursores de mediadores pró-inflamatórios. Contudo, os níveis de proteína C reativa não se encontravam significativamente aumentados nas crianças obesas, havendo uma tendência para o seu aumento, o que indica que as modificações metabólicas associadas ao processo inflamatório induzidas pela obesidade, ou seja produção de mediadores pró-inflamatórios, não são, ainda, suficientes para induzir a produção da PCR pelo fígado. Para além disso, também se observou uma diminuição significativa do ácido palmítico que nos informa que não há presença de hepática.

Em suma, com este trabalho verificou-se que ocorrem alterações em espécies moleculares de lípidos, de adipocinas e de proteínas associadas à inflamação induzidas pela obesidade não são ainda suficientes para provocarem lesões hepáticas. Contudo, estas modificações podem estar associadas a mecanismos lipídicos e a processos inflamatórios que contribuem para o desenvolvimento de EHNA.

Futuramente, será interessante validar estes resultados com diferentes grupos crianças com obesidade de diferentes faixas etárias e comparar crianças obesas de diferentes sexos, uma vez que a adolescência desempenha um papel fundamental no controlo hormonal. Para além disso, a amostragem deveria ser mais representativa de modo a suportar os resultados. Também seria relevante estudar, por uma abordagem lipidómica, a presença de TG e DAG no plasma, uma vez que já foi reportado a sua presença em tecido hepático e seu papel no desenvolvimento de EHNA, bem como avaliar a presença de ceramidas e do rácio PC/PE no plasma.

## **6.Bibliografia**

---





## 6. Bibliografia

1. Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Biochemical, Metabolic, and Clinical Implications. *Hepatology*. 2010;51(2):679–89.
2. Dietrich P, Hellerbrand C. Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2014;28(4):637–53.
3. Reddy JK, Rao MS. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *American Journal Of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*. 2006;290(5):G852–8.
4. Temple JL, Cordero P, Li J, Nguyen V, Oben JA. A guide to non-alcoholic fatty liver disease in childhood and adolescence. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016. 947 p.
5. Kaur J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiology Research and Practice*. Hindawi Publishing Corporation; 2014;2014:943162.
6. Lieber CS. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol*. 2004;34(1):9–19.
7. Rasineni K, Casey CA. Molecular mechanism of alcoholic fatty liver. *Indian Journal of Pharmacology*. 2012;44(3):299–304.
8. Lieber S. Alcoholic liver disease: new insights in pathogenesis lead to new treatments. *Journal of Hepatology*. 2000;32(1 Suppl):113–28.
9. Albano E. Oxidative mechanisms in the pathogenesis of alcoholic liver disease. *Molecular Aspects of Medicine*. 2008;29(1–2):9–16.
10. Louvet A, Mathurin P. Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2015;12(4):231–42.
11. Gruben N, Shiri-Sverdlov R, Koonen DPY, Hofker MH. Nonalcoholic fatty liver disease: A main driver of insulin resistance or a dangerous liaison? *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2014;1842(11):2329–43.
12. Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla D-C, Roudot-Thoraval F. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *Journal of Hepatology*. 2013;58(3):593–608.
13. Herman MA, Kahn BB. Adipose tissue de novo lipogenesis. *ASBMB Today*. 2012;(February):30–2.
14. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights. *Science*. 2011;332(6037):1519–23.
15. Oh DY, Morinaga H, Talukdar S, Bae EJ, Olefsky JM. Increased macrophage migration into adipose tissue in obese mice. *Diabetes*. 2012;61(2):346–54.
16. Wang X, Cao Y, Fu Y, Guo G, Zhang X. Liver fatty acid composition in mice with or without nonalcoholic fatty liver disease. *Lipids in Health and Disease*. 2011;10(1):234.
17. Zhang J, Zhao Y, Xu C, Hong Y, Lu H, Wu J, et al. Association between serum free fatty acid levels and nonalcoholic fatty liver disease: a cross-sectional study. *Scientific Reports*. 2014;4:5832.
18. Gambino R, Bugianesi E, Rosso C, Mezzabotta L, Pinach S, Alemanno N, et al. Different serum free fatty acid profiles in NAFLD subjects and healthy controls after oral fat load. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(4):479.
19. Neuman MG, Cohen LB, Nanau RM. Biomarkers in nonalcoholic fatty liver disease. *Canadian Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 2014;28(11):607–18.
20. Simonen P, Kotronen A, Hallikainen M, Sevastianova K, Makkonen J, Hakkarainen A, et al. Cholesterol synthesis is increased and absorption decreased in non-alcoholic fatty liver disease independent of obesity. *Journal of Hepatology*. 2011;54(1):153–9.
21. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73–84.
22. Moran JR, Ghishan FK, Halter SA, Greene HL. Steatohepatitis in obese children: a cause of chronic liver dysfunction. *The American Journal of Gastroenterology*. 1983;78(6):374–

- 7.
23. Pacifico L, Poggiogalle E, Cantisani V, Menichini G, Ricci P, Ferraro F, et al. Pediatric nonalcoholic fatty liver disease: A clinical and laboratory challenge. *World Journal of Hepatology*. 2010;2(7):275–88.
  24. Mann JP, Goonetilleke R, McKiernan P. Paediatric non-alcoholic fatty liver disease: a practical overview for non-specialists. *Archives of Disease in Childhood*. 2015;100(7):673–7.
  25. Direção Geral de Saúde. Programa Nacional de Combate à Obesidade. Divisão de Doenças Genéticas, Crónicas e Geriátricas, Direção Geral de Saúde. 2005;24.
  26. World Health Organization. Population based approaches to childhood obesity prevention. In: *Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health*. 2012. p. 1–54.
  27. Gomes T, Katzmarzyk P, dos Santos F, Souza M, Pereira S, Maia J. Overweight and Obesity in Portuguese Children: Prevalence and Correlates. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2014;11:398–417.
  28. Alexandra Bordalo et al. A Saúde dos Portugueses. Perspetiva 2015. Direção-Geral da Saúde. 2015;1–136.
  29. Olson J, Aldrich H, Callahan TJ, Matthews EE, Gance-cleveland B. Characterization of Childhood Obesity and Behavioral Factors. *Journal of Pediatric Health Care*. 2014;30(5):444–52.
  30. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(5):1343–51.
  31. Mittendorfer B, Magkos F, Fabbrini E, Mohammed BS, Klein S. Relationship between body fat mass and free fatty acid kinetics in men and women. *Obesity*. 2009;17(10):1872–7.
  32. Greco D, Kotronen A, Westerbacka J, Puig O, Arkkila P, Kiviluoto T, et al. Gene expression in human NAFLD. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2008;294(5):1281–7.
  33. Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Progress in Lipid Research*. 2009;48(1):1–26.
  34. Mitsuyoshi H, Yasui K, Harano Y, Endo M, Tsuji K, Minami M, et al. Analysis of hepatic genes involved in the metabolism of fatty acids and iron in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology Research: The Official Journal of the Japan Society of Hepatology*. 2009;39(4):366–73.
  35. Kohjima M, Enjoji M, Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Yoshimoto T, et al. Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *International Journal of Molecular Medicine*. 2007;20(3):351–8.
  36. Diraison F, Moulin P, Beylot M. Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes & Metabolism*. 2003;29(5):478–85.
  37. McGarry JD, Foster DW. Regulation of Hepatic Fatty Acid Oxidation and Ketone Body Production. *Annual Review of Biochemistry*. 1980;49(1):395–420.
  38. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocrine Reviews*. 1999;20(5):649–88.
  39. Wei Y, Rector RS, Thyfault JP, Ibdah JA. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World Journal of Gastroenterology*. 2008;14(2):193–9.
  40. Ibdah JA, Perlegas P, Zhao Y, Angdisen J, Borgerink H, Shadoan MK, et al. Mice heterozygous for a defect in mitochondrial trifunctional protein develop hepatic steatosis and insulin resistance. *Gastroenterology*. 2005;128(5):1381–90.
  41. Caldwell SH, Swerdlow RH, Khan EM, Iezzoni JC, Hespeneide EE, Parks JK, et al. Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Hepatology*. 1999;31(3):430–4.
  42. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*. 2001;120(5):1183–92.

43. Fon Tacer K, Rozman D. Nonalcoholic Fatty liver disease: focus on lipoprotein and lipid deregulation. *Journal of Lipids*. 2011;2011:783976.
44. Jiang ZG, Robson SC, Yao Z. Lipoprotein metabolism in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Biomedical Research*. 2013;27(1):1–13.
45. Lewis GF. Fatty acid regulation of very low density lipoprotein production. *Current Opinion in Lipidology*. 1997;8(3):146–53.
46. Adiels M, Taskinen M-R, Packard C, Caslake MJ, Soro-Paavonen A, Westerbacka J, et al. Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. *Diabetologia*. 2006;49(4):755–65.
47. Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F, Korenblat KM, Patterson BW, Klein S. Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2008;134(2):424–31.
48. Nandi A, Kitamura Y, Kahn CR, Accili D. Mouse models of insulin resistance. *Physiological Reviews*. 2004;84(2):623–47.
49. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414(6865):799–806.
50. Bak JF, Møller N, Schmitz O, Saaek A, Pedersen O. In vivo insulin action and muscle glycogen synthase activity in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: effects of diet treatment. *Diabetologia*. 1992;35(8):777–84.
51. Freidenberg GR, Reichart D, Olefsky JM, Henry RR. Reversibility of defective adipocyte insulin receptor kinase activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Effect of weight loss. *The Journal of Clinical Investigation*. 1988;82(4):1398–406.
52. Qatanani M, Mitchell A. Mechanism of Obesity Associated Insulin Resistance: Many Choices on the Menu. *Genes and Development*. 2007;21(215):1443–55.
53. Alkhoury N, Carter-Kent C, Elias M, Feldstein AE. Atherogenic dyslipidemia and cardiovascular risk in children with nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical Lipidology*. 2011;6(3):305–14.
54. Utzschneider KM, Kahn SE. The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2006;91(12):4753–61.
55. Trasher T, Abelmalek M. Non-alcoholic fatty liver disease . *North Carolina Medical Journal*. 2016;77(3):216–9.
56. Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, Gambino R, Cassader M, Baldi S, et al. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: Sites and mechanisms. *Diabetologia*. 2005;48(4):634–42.
57. Klover PJ, Mooney RA. Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004;36(5):753–8.
58. Könnert AC, Brüning JC. Selective Insulin and Leptin Resistance in Metabolic Disorders. *Cell Metabolism*. 2012;16(2):144–52.
59. Dentin R, Benhamed F, Hainault I, Fauveau V, Fofelle F, Dyck JRB, et al. Liver-Specific Inhibition of ChREBP Improves Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in ob/ob Mice. *Diabetes*. 2006;55(8):2159–70.
60. Koonen DPY, Jacobs RL, Febbraio M, Young ME, Soltys C-LM, Ong H, et al. Increased Hepatic CD36 Expression Contributes to Dyslipidemia Associated With Diet-Induced Obesity. *Diabetes*. 2007;56(12):2863–71.
61. Grefhorst A, van Dijk TH, Hammer A, van der Sluijs FH, Havinga R, Havekes LM, et al. Differential effects of pharmacological liver X receptor activation on hepatic and peripheral insulin sensitivity in lean and ob/ob mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 2005;289(5):E829-38.
62. Ibdah JA, Perlegas P, Zhao Y, Angdisen J, Borgerink H, Shadoan MK, et al. Mice Heterozygous for a Defect in Mitochondrial Trifunctional Protein Develop Hepatic Steatosis and Insulin Resistance. *Gastroenterology*. 2005;128(5):1381–90.
63. Shindo N, Fujisawa T, Sugimoto K, Nojima K, Oze-Fukai A, Yoshikawa Y, et al. Involvement of microsomal triglyceride transfer protein in nonalcoholic steatohepatitis in novel spontaneous mouse model. *Journal of Hepatology*. 2010;52(6):903–12.
64. Zhang Q, Lu L. Nonalcoholic Fatty Liver Disease : Dyslipidemia , Risk for Cardiovascular

- Complications, and Treatment Strategy. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. 2015;3(1):78–84.
65. Katsiki N, Mikhailidis DP, Mantzoros CS. Non-alcoholic fatty liver disease and dyslipidemia: An update. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 2016;65(8):1109–23.
  66. Cortez-dias N, Martins SR, Belo A, Fiúza M. Caracterização do perfil lipídico nos utentes dos cuidados de saúde primários em Portugal. *Revista Portuguesa de Cardiologia*. 2013;32(12):987–96.
  67. Souza MR de A, Diniz M de FF de M, Medeiros-Filho JEM de, Araújo MST de. Metabolic syndrome and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease. *Arquivos de Gastroenterologia*. 2012;49(1):89–96.
  68. Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nagata C, Takeda J, Sarui H, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is a novel predictor of cardiovascular disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2007;13(10):1579–84.
  69. Brea A, Mosquera D, Martín E, Arizti A, Cordero JL, Ros E. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with carotid atherosclerosis: A case-control study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005;25(5):1045–50.
  70. Bril F, Sninsky JJ, Baca AM, Superko HR, Sanchez PP, Biernacki Di, et al. Hepatic steatosis and insulin resistance, but not steatohepatitis, promote atherogenic dyslipidemia in NAFLD. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2016;101(2):644–52.
  71. Pacifico L, Cantisani V, Ricci P, Osborn JF, Schiavo E, Anania C, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and carotid atherosclerosis in children. *Pediatric Research*. 2008;63(4):423–7.
  72. Schwimmer JB, Deutsch R, Kahen T, Lavine JE, Stanley C, Behling C. Prevalence of fatty liver in children and adolescents. *Pediatrics*. 2006;118(4):1388–93.
  73. Cali AMG, Zern TL, Taksali SE, de Oliveira AM, Dufour S, Otvos JD, et al. Intrahepatic Fat Accumulation and Alterations in Lipoprotein Composition in Obese Adolescents: A perfect proatherogenic state. *Diabetes Care*. 2007;30(12):3093–8.
  74. Gökçe S, Atbinici Z, Ayçan Z, Çınar HG, Zorlu P. The Relationship Between Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Cardiovascular Risk Factors and Increased Risk of Atherosclerosis in Obese Children. *Pediatric Cardiology*. 2013;34(2):308–15.
  75. Barshop NJ, Francis CS, Schwimmer JB, Lavine JE. Nonalcoholic fatty liver disease as a comorbidity of childhood obesity. *Pediatric Health*. 2009;3(3):271–81.
  76. Ahmed MH, Abu EO, Byrne CD. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): New challenge for general practitioners and important burden for health authorities? *Primary Care Diabetes*. 2010;4(3):129–37.
  77. Gawrieh S, Baye TM, Carless M, Wallace J, Komorowski R, Kleiner DE, et al. Hepatic gene networks in morbidly obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Obesity Surgery*. 2010;20(12):1698–709.
  78. Kitsios K, Papadopoulou M, Kosta K, Kadoglou N, Papagianni M, Tsiroukidou K. High-sensitivity C-reactive protein levels and metabolic disorders in obese and overweight children and adolescents. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*. 2013;5(1):44–9.
  79. Chalasani N, Deeg MA, Crabb DW. Systemic Levels of Lipid Peroxidation and Its Metabolic and Dietary Correlates in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *The American Journal of Gastroenterology*. 2004;99(8):1497–502.
  80. Jin R, Krasinskas A, Le N-A, Konomi J V., Holzberg J, Romero R, et al. Association between plasminogen activator inhibitor-1 and severity of liver injury and cardiovascular risk in children with non-alcoholic fatty liver disease. *Pediatric Obesity*. 2016;
  81. Musso G, Gambino R, Biroli G, Carello M, Faga E, Pacini G, et al. Hypoadiponectinemia Predicts the Severity of Hepatic Fibrosis and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Nondiabetic Nonobese Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *The American Journal of Gastroenterology*. 2005;100(11):2438–46.
  82. Pacifico L, Anania C, Martino F, Cantisani V, Pascone R, Marcantonio A, et al. Functional and morphological vascular changes in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010;52(5):1643–51.

83. Greaves DR, Gordon S. Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease. *Trends in Immunology*. 2001;22(4):180–1.
84. Zheng J-S, Xu A, Huang T, Yu X, Li D. Low Docosahexaenoic Acid Content in Plasma Phospholipids is Associated with Increased Non-alcoholic Fatty Liver Disease in China. *Lipids*. 2012;47(6):549–56.
85. Scorletti E, Byrne CD. Omega-3 fatty acids, hepatic lipid metabolism, and nonalcoholic fatty liver disease. *Annual Review of Nutrition*. 2013;33:231–48.
86. Hanke D, Zahradka P, Mohankumar SK, Clark JL, Taylor CG. A diet high in alpha-linolenic acid and monounsaturated fatty acids attenuates hepatic steatosis and alters hepatic phospholipid fatty acid profile in diet-induced obese rats. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2013;89(6):391–401.
87. Monteiro J, Leslie M, Moghadasian MH, Arendt BM, Allard JP, Ma DWL. The role of n - 6 and n - 3 polyunsaturated fatty acids in the manifestation of the metabolic syndrome in cardiovascular disease and non-alcoholic fatty liver disease. *Food & Function*. 2014;5(3):426–35.
88. Nobili V, Alisi A, Musso G, Scorletti E, Calder PC, Byrne CD. Omega-3 fatty acids: Mechanisms of benefit and therapeutic effects in pediatric and adult NAFLD. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2016;53(2):106–20.
89. Mager DR, Patterson C, So S, Rogenstein CD, Wykes LJ, Roberts E a. Dietary and physical activity patterns in children with fatty liver. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2010;64(6):628–35.
90. Janczyk W, Socha P, Lebensztejn D, Wierzbicka A, Mazur A, Neuhoff-Murawska J, et al. Omega-3 fatty acids for treatment of non-alcoholic fatty liver disease: design and rationale of randomized controlled trial. *BMC Pediatrics*. 2013;13(1):85.
91. Boyraz M, Pirgon O, Dundar B, Cekmez F, Hatipoglu N. Long-Term Treatment with n-3 Polyunsaturated Fatty Acids as a Monotherapy in Children with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*. 2015;7(2):121–7.
92. Polyzos S a, Kountouras J, Zavos C, Tsiaousi E. The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes, Obesity & Metabolism*. 2010;12(5):365–83.
93. Finelli C, Tarantino G. What is the role of adiponectin in obesity related non-alcoholic fatty liver disease? *World Journal of Gastroenterology*. 2013;19(6):802–12.
94. Zou CC, Liang L, Hong F, Fu JF, Zhao ZY. Serum adiponectin, resistin levels and non-alcoholic fatty liver disease in obese children. *Endocrine Journal*. 2005;52(5):519–24.
95. Lebensztejn D, Wojtkowska M, Skiba E, Werpachowska I, Tobolczyk J, Kaczmarek M. Serum concentration of adiponectin, leptin and resistin in obese children with non-alcoholic fatty liver disease. *Advances in Medical Sciences*. 2009;54(2):177–82.
96. Boyraz M, Cekmez F, Karaoglu A, Cinaz P, Durak M, Bideci A. Serum adiponectin, leptin, resistin and RBP4 levels in obese and metabolic syndrome children with nonalcoholic fatty liver disease. *Biomarkers in Medicine*. 2013;7(5):737–45.
97. Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Leptin in nonalcoholic fatty liver disease: A narrative review. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 2015;64(1):60–78.
98. Balducci, Stefano, Sacchetti, Massimo, Haxhi, Jonida, Orlando, Giorgio, D'Errico, Valeria, Fallucca, Sara, Menini, Stefano, Pugliese G. Alanine aminotransferase as a marker of non-alcoholic fatty liver disease in relation to type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2006;22:437–43.
99. Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: A guide for clinicians. *Canadian Medical Association Journal*. 2005;172(3):367–79.
100. Kwon KA, Chun P, Park JH. Clinical significance of serum alanine amino - transferase and lifestyle intervention in children with nonalcoholic fatty liver disease. *Korean Journal of Pediatrics*. 2016;59(9):362–7.
101. Marzuillo P, Grandone A, Perrone L, Miraglia Del Giudice E. Controversy in the diagnosis of pediatric non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2015;21(21):6444–50.
102. Donovan EL, Pettine SM, Hickey MS, Hamilton KL, Miller BF. Lipidomic analysis of

- human plasma reveals ether-linked lipids that are elevated in morbidly obese humans compared to lean. *Diabetology & metabolic syndrome*. 2013;5(1):24.
103. Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2007;46(4):1081–90.
  104. Puri P, Wiest MM, Cheung O, Mirshahi F, Sargeant C, Min HK, et al. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2009;50(6):1827–38.
  105. Loomba R, Quehenberger O, Armando A, Dennis EA. Polyunsaturated fatty acid metabolites as novel lipidomic biomarkers for noninvasive diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of Lipid Research*. 2015;56(1):185–92.
  106. Gordon DL, Ivanova PT, Myers DS, McIntyre JO, VanSaun MN, Wright JK, et al. Increased diacylglycerols characterize hepatic lipid changes in progression of human nonalcoholic fatty liver disease; comparison to a murine model. *PLoS ONE*. 2011;6(8):e22775.
  107. Serviddio G, Bellanti F, Villani R, Tamborra R, Zerbinati C, Blonda M, et al. Effects of dietary fatty acids and cholesterol excess on liver injury: A lipidomic approach. *Redox Biology*. Elsevier; 2016;9:296–305.
  108. Serviddio G, Blonda M, Bellanti F, Villani R, Iuliano L, Vendemiale G. Oxysterols and redox signaling in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Free Radical Research*. 2013;47(11):881–93.
  109. Bartlett E., Lewis DH. Spectrophotometric in the Presence Determination and Absence of Phosphate of Orthophosphate Esters. *Analytical biochemistry*. 1970;36:159–67.
  110. Chemistry IU of P and A, Chemistry A, Commission on Oils F and D. *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives*. 7th ed. Dieffenbacher A, Pocklington WD, editors. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1987.
  111. The American Society Oil Chemists'. Methyl Esters of Fatty Acids Archive of Mass Spectra. <http://lipidlibrary.aocs.org/Analysis/content.cfm?ItemNumber=39469> - Consultado em Abril de 2017
  112. Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Orešič M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics*. 2010;11(1):395.
  113. Monteiro PA, Antunes B de MM, Silveira LS, Christofaro DGD, Fernandes RA, Freitas Junior IF. Body composition variables as predictors of NAFLD by ultrasound in obese children and adolescents. *BMC Pediatrics*. 2014;14:25.
  114. Berardis S, Sokal E. Pediatric non-alcoholic fatty liver disease : an increasing public health issue. *European Journal of Pediatrics*. 2014;173(2):131–9.
  115. Loomba R, Sirlin CB, Schwimmer JB, Lavine JE. Advances in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2009;50(4):1282–93.
  116. Schwimmer JB, Pardee PE, Lavine JE, Blumkin AK, Cook S. Cardiovascular risk factors and the metabolic syndrome in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Circulation*. 2008;118(3):277–83.
  117. The American Oil Chemists' Society. Phosphatidylcholine. *AOCS Lipid Library*. 2014. p. 1.
  118. Trust W. LIPID MAPS Lipidomics Gateway. 2003. [http://www.lipidmaps.org/tools/ms/lm\\_mass\\_form.php](http://www.lipidmaps.org/tools/ms/lm_mass_form.php) - Consultado em Abril e Maio de 2017
  119. Sanyal D, Raychaudhuri M. Hypothyroidism and obesity: An intriguing link. *Indian journal of endocrinology and metabolism*. Medknow Publications; 2016;20(4):554–7.
  120. Sun D-Q, Liu W-Y, Wu S-J, Zhu G-Q, Braddock M, Zhang D-C, et al. Increased levels of low-density lipoprotein cholesterol within the normal range as a risk factor for nonalcoholic fatty liver disease. *Oncotarget*. Impact Journals, LLC; 2016;7(5):5728–37.
  121. Nelson DL, Cox MM. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 6ª. Artmed; 2014. 860-865 p.
  122. Rashid S, Genest J. Effect of Obesity on High-density Lipoprotein Metabolism. *Obesity*. 2007;15(12):2875–88.
  123. Wang Y, Zhou M, Lam KSL, Xu A. Protective roles of adiponectin in obesity-related fatty

- liver diseases: mechanisms and therapeutic implications. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2009;53(2):201–12.
124. Ouchi N, Walsh K. Adiponectin as an anti-inflammatory factor. *Clinica Chimica Acta*. 2007;380(1–2):24–30.
  125. Iikuni N, Lam QLK, Lu L, Matarese G, La Cava A. Leptin and Inflammation. *Current Immunology Reviews*. 2008;4(2):70–9.
  126. Musso G, Gambino R, Durazzo M, Biroli G, Carello M, Fag, E, et al. Adipokines in NASH: Postprandial lipid metabolism as a link between adiponectin and liver disease. *Hepatology*. 2005;42(5):1175–83.
  127. Giannini E, Botta F, Cataldi A, Tenconi GL, Ceppa P, Barreca T, et al. Leptin levels in nonalcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Hepato-gastroenterology*. 46(28):2422–5.
  128. Pilcová R, Sulcová J, Hill M, Bláha P, Lisá L. Leptin levels in obese children: effects of gender, weight reduction and androgens. *Physiological research*. 2003;52(1):53–60.
  129. Yalniz M, Bahcecioglu IH, Ataseven H, Ustundag B, Ilhan F, Poyrazoglu OK, et al. Serum Adipokine and Ghrelin Levels in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Mediators of Inflammation*. 2006;2006(6):1–5.
  130. Chitturi S, Farrell G, Frost L, Kriketos A, Lin R, Fung C, et al. Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: A manifestation of lipotoxicity? *Hepatology*. 2002;36(2):403–9.
  131. Sato T, Ida T, Nakamura Y, Shiimura Y, Kangawa K, Kojima M. Physiological roles of ghrelin on obesity. *Obesity Research & Clinical Practice*. 2014;8(5):e405–13.
  132. Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. Regulation of Lipolysis in Adipocytes. *Annual Review of Nutrition*. 2007;27(1):79–101.
  133. Kraemer FB. Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *The Journal of Lipid Research*. 2002;43(10):1585–94.
  134. Mottillo EP, Shen XJ, Granneman JG. beta 3-adrenergic receptor induction of adipocyte inflammation requires lipolytic activation of stress kinases p38 and JNK. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2010;1801(9):1048–55.
  135. Harada K, Shen W-J, Patel S, Natu V, Wang J, Osuga J, et al. Resistance to high-fat diet-induced obesity and altered expression of adipose-specific genes in HSL-deficient mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*. 2003;285(6):E1182–95.
  136. Tavares de Almeida I, Cortez-Pinto H, Fidalgo G, Rodrigues D, Camilo ME. Plasma total and free fatty acids composition in human non-alcoholic steatohepatitis. *Clinical Nutrition*. 2002;21(3):219–23.
  137. Takamatsu H, Noguchi H, Tahara H, Kaji T, Shimono R, Ikee T, et al. Plasma fatty acids concentrations in postoperative patients with biliary atresia. *Nutrition*. 1999;15(10):755–9.
  138. Lehmann R, Franken H, Dammeier S, Rosenbaum L, Kantartzis K, Peter A, et al. Circulating lysophosphatidylcholines are markers of a metabolically benign nonalcoholic fatty liver. *Diabetes Care*. 2013;36(8):2331–8.
  139. Sevastou I, Kaffe E, Mouratis MA, Aidinis V. Lysoglycerophospholipids in chronic inflammatory disorders: The PLA 2/LPC and ATX/LPA axes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2013;1831(1):42–60.
  140. Kakisaka K, Cazanave SC, Fingas CD, Guicciardi ME, Bronk SF, Werneburg NW, et al. Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced hepatocyte lipoapoptosis. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2012;302(1):G77–84.
  141. Han MS, Park SY, Shinzawa K, Kim S, Chung KW, Lee J-H, et al. Lysophosphatidylcholine as a death effector in the lipoapoptosis of hepatocytes. *The Journal of Lipid Research*. 2008;49(1):84–97.
  142. Gorden DL, Myers DS, Ivanova PT, Fahy E, Maurya MR, Gupta S, et al. Biomarkers of NAFLD progression: a lipidomics approach to an epidemic. *Journal of Lipid Research*. 2015;56(3):722–36.
  143. Iqbal J, Walsh MT, Hammad SM, Hussain MM. Sphingolipids and Lipoproteins in Health

- and Metabolic Disorders. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2017;28(7):506–8.
144. Pagadala M, Kasumov T, McCullough AJ, Zein NN, Kirwan JP. Role of ceramides in nonalcoholic fatty liver disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2012;23(8):365–71.
  145. Vance DE, Li Z, Jacobs RL. Hepatic phosphatidylethanolamine N-methyltransferase, unexpected roles in animal biochemistry and physiology. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(46):33237–41.
  146. Ma DWL, Arendt BM, Hillyer LM, Fung SK, Mcgilvray I, Guindi M, et al. Plasma phospholipids and fatty acid composition differ between liver biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease and healthy subjects. 2016;6(7):e220.
  147. Li Z, Agellon LB, Allen TM, Umeda M, Jewell L, Mason A, et al. The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis. *Cell Metabolism*. 2006;3(5):321–31.
  148. Rito A, Breda J, Carmo I. Guia de Avaliação do Estado Nutricional Infantil e Juvenil. Dgs-Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. 2010. 60 p.
  149. Mayo Foundation for Medical Education and Research. Pediatric Test Reference Values. 2017.<http://www.mayomedicallaboratories.com/test-info/pediatric/refvalues/reference.php> - Consultado em Março 2017



## **7. Anexos**

---



## 7. Anexos

**Anexo A:** Valores de referência pediátricos de IMC, percentil do IMC e sua respectiva interpretação.

**Tabela 1.A** - Valores de referência pediátricos de IMC, percentil do IMC e sua interpretação. Adaptado de (148).

IMC	Percentil do IMC	Interpretação
< 18.5	< 5	Baixo peso
18.5 a 24.9	5 a 85	Normal
25 a 29.9	85 a < 95	Excesso de peso
> 30	> 95	Obesidade

**Anexo B:** Valores de referência pediátricos dos parâmetros bioquímicos, tais como a Glucose, Insulina, AST, ALT, Colesterol total, HDL, LDL, TG e TSH, avaliados nas crianças com excesso de peso e nas crianças com obesidade.

**Tabela 1.B** – Valores de referência pediátricos para cada parâmetro avaliado nas crianças em estudo (149).

Parâmetro	Valores de referência	
	Masculino	Feminino
<b>Glucose</b>	70-140 mg/dL ( $\geq$ 1 ano)	
<b>Insulina</b>	2,6-24,9 mcLU/mL	
<b>AST</b>	8-60 U/L (1-13 anos)	8-50 U/L (1-13 anos)
	8-48 U/L ( $\geq$ 14 anos)	8-43 U/L ( $\geq$ 14 anos)
<b>ALT</b>	7-55 U/L ( $\geq$ 1 ano)	7-45 U/L ( $\geq$ 1 ano)
<b>HbA1c</b>	<8% (6-12 anos) <7,5% (13-19 anos)	
<b>Colesterol Total</b>	(2-17 anos) Desejável: <200 mg/dL Aceitável: 200-239 Alto: $\geq$ 240	

<b>HDL</b>	<u>(2-17 anos)</u> Baixo: $\leq 40$ mg/dL Aceitável: 40-45 Desejável: $> 45$
<b>LDL</b>	<u>(2-17 anos)</u> Desejável: $\leq 110$ mg/dL Aceitável: 100-129 Alto: $\geq 130$
<b>TG</b>	<u>(2-9 anos)</u> Desejável $< 75$ Alto $\geq 100$ <u>(10-17 anos)</u> Desejável $< 90$ Alto $\geq 130$
<b>TSH</b>	(1-5 anos) 0,7-6,0 mLU/L (6-10 anos) 0,6-4,8 mLU/L (11-19 anos) 0,5-4,3 mLU/L

AST- aspartato aminotransferase; ALT- alanina aminotransferase; HbA1c- hemoglobina glicada; HDL- lipoproteína de elevada densidade; LDL- lipoproteína de baixa densidade; TG- triglicérides; TSH- hormona estimuladora da tiroide