

José Manuel Bértolo Furtado

**Prevalência de biomarcadores de doença cardiovascular numa
população infantil com excesso de peso**

Tese de Candidatura ao grau de Doutor em Ciências
Biomédicas submetida ao Instituto de Ciências
Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto

Orientador: Professor Doutor Fernando Ferraz

Categoria - Professor Associado

Afiliação - Instituto Universitário Egas Moniz

Coorientador: Professor Doutor Manuel Vilanova

Categoria - Professor Associado

Afiliação - Instituto de Ciências Biomédicas de Abel
Salazar da Universidade do Porto

A presente Tese foi realizada no que diz respeito à parte clínica nos Agrupamentos de Escolas que colaboraram neste estudo e as técnicas laboratoriais no Centro de Genética Médica e Nutrição Pediátrica Egas Moniz – CGMNP

...Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.

Isaac Newton

1643-1727

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Eduardo Rocha, Digníssimo Professor Catedrático do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto, Diretor do Programa Doutoral em Ciências Biomédicas, que muito me honrou não só por ter aceitado esta minha Tese como também, apesar da multiplicidade de funções que exerce, de presidir ao seu julgamento. Queira aceitar a minha admiração e o meu Agradecimento.

Ao Professor Doutor Fernando Ferraz, Professor Associado do Instituto Universitário Egas Moniz e Diretor do Centro de Genética Médica e Nutrição Pediátrica Egas Moniz (CGMNP), pelo entusiasmo, incentivo e oportunidade de integrar este Projeto. O meu reconhecimento em especial, para além da Amizade de muitos anos, pela demonstração permanente de empenho abnegado na melhoria da Saúde (em especial a infantil), assim como pela demonstração de rigor científico e ensinamentos clínicos tão fundamentais para o desenvolvimento deste tema. Agradeço reconhecido ainda, por ter aceitado ser meu Orientador e Mestre. Muito obrigado.

Ao Professor Doutor Manuel Vilanova, Professor Associado do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto, docente e regente de várias Unidades Curriculares e Coordenador do grupo de Investigação em Imunobiologia do Instituto de Investigação e Inovação em Saúde da Universidade do Porto, não só por ter aceitado ser meu Coorientador, mas também pelo incentivo, pelos conselhos, pela ajuda e pela demonstração de Amizade que este tempo proporcionou. Receba com estas palavras o meu sincero reconhecimento.

À Doutora Sílvia Almeida, Professora do Instituto Universitário Egas Moniz e membro do grupo de Investigação do CGMNP, companheira de todos os dias e à qual estou ligado por uma Amizade de muitos anos. Obrigado pelos dias de trabalho em conjunto, pelo incentivo, determinação e entusiasmo que me transmitiu e que me permitiram alcançar a realização desta Tese.

À Dr.^a Maria Elisa Ferraz, Assistente Graduada de Patologia Clínica da Seção de Bioquímica do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Curry Cabral - HCL, minha querida Mestre, que ao longo de tantos anos me demonstrou a sua Amizade tão profunda. Pelos seus ensinamentos e pelos seus ponderados conselhos, queira nestas palavras sentir a retribuição da minha Amizade e o meu sincero reconhecimento.

Ao Dr. Luís Ribeiro da Silva, Assistente Graduado de Pediatria Médica e Chefe de Equipa de Urgência do Hospital Pediátrico D. Estefânia, que efetuou uma parte das medidas antropométricas e de bio impedância, o meu reconhecimento e sincero agradecimento.

Ao Mestre Paulo Mascarenhas, companheiro e colega da equipa de Investigação do CGMNP, cujos vastos conhecimentos em Bioestatística foram fundamentais para a realização desta Tese, que encontre aqui o meu mais profundo reconhecimento e agradecimento.

À Mestre Susana Adam que efetuou as medições das pregas cutâneas, o meu agradecimento.

À Dr.^a Mónia Pedrosa da Enzifarma, o meu reconhecimento não só pela competência técnica demonstrada no que diz respeito à tecnologia inerente à citometria de fluxo, mas e principalmente, por toda a ajuda e disponibilidade sempre demonstradas. Muito obrigado.

Ao Mestre Ricardo Martins, pela ajuda no tratamento dos dados da citometria de fluxo, que me facilitou a interpretação dos resultados, agradeço reconhecidamente.

Agradeço ao Professor Doutor José Martins dos Santos do Instituto Universitário Egas Moniz, que me referenciou ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto. Aqui manifesto para além do meu agradecimento, a minha sentida saudade. Agracio também o Professor Doutor José João Mendes, Presidente da Egas Moniz - Cooperativa de Ensino Superior, que sempre encorajou o nosso trabalho no CGMNP, a minha mais profunda admiração e reconhecimento.

Ao Senhor Comendador Rui Nabeiro, Presidente Executivo da Delta Saúde, que financiou as duas Plataformas Informáticas, bem como pela amizade de muitos anos, a minha admiração, agradecimento e reconhecimento.

A todo o pessoal docente e não docente do Instituto Universitário Egas Moniz e Escola Superior de Saúde Egas Moniz, pela simpatia e incentivo demonstrados ao longo deste período, os meus agradecimentos.

Agradeço de forma especial à D. Solange Campos da Egas Moniz - Cooperativa de Ensino Superior que foi a ponte fundamental entre a Direção-Geral da Saúde e o CGMNP. O meu reconhecimento e a minha gratidão.

Aos vários amigos do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, mas em especial a Carla, a Tânia, a Inês e a Marisa, por sempre terem acreditado em mim e me incentivarem. Obrigado.

À minha esposa Rosália e aos meus filhos Miguel e Rui, pelas ausências, pela paciência e pelo encorajamento permanente, que este trabalho seja uma recompensa da vossa dedicação.

Ao meu Pai, a quem tudo devo e que sem o qual nada sou ou seria possível. O meu abraço de reconhecimento e gratidão. E também àquela estrela mais brilhante do firmamento, minha querida Mãe. Como esta vitória teria sido melhor se pudesses estar presente...

Por fim, não me posso esquecer de agradecer às crianças que participaram no estudo e aos pais/encarregados de educação que autorizaram a sua participação, sem os quais este trabalho não teria sido possível.

PUBLICAÇÕES

PUBLICAÇÕES

Alguns dos resultados foram obtidos no âmbito do Projeto intitulado “**Estudo Nutricional, Bioquímico e Genético de uma População Infantil Pré-obesa e Obesa da Região Sul**”. Outros, foram obtidos durante o trabalho desenvolvido no decurso do **Programa de Doutoramento**.

Aqueles, foram alvo das seguintes publicações:

1. Almeida, S.M., **Furtado, J.M.**, Mascarenhas, P., Ferraz, M.E., Silva, L.R., Ferreira, J.C., Monteiro, M.P., Vilanova, M., Ferraz, F.P. (2016) *Anthropometric predictors of body fat in a large population of 9-year-old school-aged children*. **Obes. Sci. & Pract.**, 2(3):272-281.
2. **Furtado, J.M.**, Almeida, S.M., Mascarenhas, P., Ferraz, M.E., Ferreira, J.C., Monteiro, M. P., Vilanova, M., Ferraz, F.P. (2018) *Anthropometric features as predictors of atherogenic dyslipidemia and cardiovascular risk in a large population of school-aged children*. **PLoS One**, 13(6): e0197922.
3. Almeida, S.M., **Furtado, J.M.**, Mascarenhas, P., Ferraz, M.E., Ferreira, J.C., Monteiro, M. P., Vilanova, M., Ferraz, F.P. (2018) *Association between LEPR, FTO, MC4R and PPARG-2 polymorphisms with obesity*. **Endocrine**, 60(3):466-478.

A minha contribuição original em cada uma das publicações foi:

1. Planeamento do estudo e escrita do manuscrito;
2. Investigação e escrita do manuscrito;
3. Planeamento do estudo e escrita do manuscrito.

Estas três publicações foram também referenciadas na Dissertação “Obesidade e Doença Periodontal” da Doutora Sílvia Almeida, apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto, em maio de 2019.

Declaração de Honra

Declaro que a presente tese é de minha autoria e não foi utilizada previamente noutro curso ou unidade curricular, desta ou de outra instituição. As referências a outros autores (afirmações, ideias, pensamentos) respeitam escrupulosamente as regras da atribuição, e encontram-se devidamente indicadas no texto e nas referências bibliográficas, de acordo com as normas de referenciação. Tenho consciência de que a prática de plágio e auto-plágio constitui um ilícito académico.

José Manuel Bértolo Furtado

RESUMO

Resumo

Introdução

As alterações do estilo de vida, que incluem modificações nutricionais e de atividade física, vêm desencadeando nas últimas décadas por todo o Mundo, um incremento drástico da obesidade nos adultos e mais preocupantemente da obesidade infantil. Num estudo efetuado na região de Lisboa e Vale do Tejo, numa população infantil de aproximadamente 9 anos, demonstrámos que, de acordo com a definição de obesidade estabelecida pela *International Obesity Task Force* (IOTF), 6,2% das crianças apresentavam "baixo peso" (graus de magreza 1, 2 ou 3), 66,1% "peso normal" e 27,6% "excesso de peso", - incluindo 6,9% de obesos. Como corolário, existe evidência do aumento do risco de desenvolvimento de Doenças Cardiovasculares (DCV) em Portugal e no Mundo. Esta preocupação é relevante por estas patologias constituírem a primeira causa de morte a nível mundial.

Numa publicação prévia, constatou-se uma prevalência elevada de alterações dos lípidos plasmáticos e o mais preocupante, uma taxa elevada de crianças com Índice de Massa Corporal (IMC) "normal", mas que apresentavam já, tão precocemente, dislipidémia.

A presença de dislipidémia é um dos fatores de risco que favorecem o aparecimento de DCV onde, **a aterosclerose** desempenha um papel predeterminante na patogénese das duas mais comuns DCV's: isquemia cardíaca e patologia cerebrovascular. Para além da dislipidémia, a inflamação crónica subjacente não só às alterações metabólicas como à obesidade, concorre também para a patogénese da aterosclerose.

Constatando estas alterações metabólicas até nas crianças com Índice de Massa Corporal (IMC) normal, haveria que investigar se, sabendo que a aterosclerose se inicia muito precocemente, já era possível nesta população encontrar sinais da inflamação e da resposta celular características da aterosclerose.

Objetivo

O estudo teve como objetivo a tentativa de encontrar correlação entre as variações do IMC com os outros fatores analisados: dislipidémia, expressão de algumas citocinas inflamatórias/não inflamatórias e a expressão da polarização de monócitos associada à aterosclerose.

Método

Descritivo, transversal quanto ao método e observacional analítico de caso-controlo quanto à natureza.

Os ensaios foram realizados em 87 Escolas da Região de Lisboa e Vale do Tejo numa população infantil pré-pubertária de 9 anos de idade. Os estudos realizados englobaram a colheita e interpretação de dados clínicos (antropometria, bio impedância) e laboratoriais [bioquímicos, doseamento das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10, e análise de expressão de marcadores de monócitos (CD14, CD16, CD36, CD80, CD86, CD163 e CD206)].

Para a caracterização da corpulência utilizou-se, o IMC e o respetivo zScore seguindo os critérios da IOTF.

Resultados

Em simultâneo com uma alta taxa de sobrepeso/obesidade (28,9%) nesta população infantil, verificaram-se valores igualmente elevados do *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance* (HOMA-IR), e de crianças com alterações do perfil lipídico, ainda que apresentem valores normais de IMC. Parece poder provar-se a existência da prevalência de um *estadio* inflamatório crónico de fraca expressão, pelos valores comprovadamente aumentados da citocina pro-inflamatória IFN- γ ($p < 0,05$), nas crianças com sobrepeso/obesidade e paradoxalmente, pela diminuição do TNF- α ($p < 0,05$). Também se confirmam as alterações da resposta imunológica a nível celular, pelo aumento de monócitos clássicos (CD14⁺⁺/CD16⁻), assim como a presença, ainda, de um perfil macrofágico do tipo M2 nas crianças com sobrepeso/obesidade. Também se verifica uma correlação da expressão de monócitos M1 bem como do rácio M1/M2 com a citocina IFN- γ , que julgamos poder indicar uma resposta inflamatória, para mais tendo em conta, a associação desta citocina com o excesso de peso/obesidade.

Conclusões

Para além da taxa elevada de excesso de peso/obesidade da amostra em estudo, constatou-se também uma proporção muito elevada, preocupante, de alterações do perfil lipídico e do HOMA-IR. Existe evidência de um processo inflamatório e de alterações da resposta celular imune associados ao excesso de peso/obesidade, bem como de alterações da resposta celular imune evidenciando uma possível resposta à inflamação e/ou alterações dos lípidos circulantes.

Palavras-chave

Obesidade; Obesidade-infantil; Metabolismo lipoproteínas; Resposta Imunitária; Inflamação; Doenças Cardiovasculares; Aterosclerose; Citoquinas; Monócitos.

ABSTRACT

Abstract

Introduction

Lifestyle changes, which include nutritional and physical activity changes, have triggered in the last decades around the world, a drastic increase of adult obesity and, more worryingly, of childhood obesity. In a study carried out in the region of *Lisboa e Vale do Tejo*, of a 9-year-old pre-pubertal child population, we demonstrated that, according to the definition of obesity established by the International Obesity Task Force (IOTF), 6.2% of children were underweight (degrees of thinness 1, 2 or 3), 66.1% normal weight and 27.6% overweight - including 6.9% obese. As a corollary, there is evidence of an increased risk of developing Cardiovascular Diseases (CVD) in Portugal and worldwide. This concern is relevant because these pathologies are the leading cause of death worldwide.

In a previous publication, there was a high prevalence of changes in plasma lipids and the most worrying, a high rate of children with “normal” Body Mass Index (BMI), but who already had dyslipidemia so early.

The presence of dyslipidemia is one of the risk factors that favor the onset of CVD, where atherosclerosis plays a predetermining role in the pathogenesis of the two most common CVDs: cardiac ischemia and cerebrovascular pathology. In addition to dyslipidemia, the chronic inflammation underlying not only metabolic changes but also obesity also contributes to the pathogenesis of atherosclerosis.

Noting that these metabolic changes even in children with healthy Body Mass Index (BMI), it would be necessary to investigate whether, knowing that atherosclerosis starts very early, it was already possible to find signs of inflammation and cellular response characteristic of atherosclerosis in this population.

Objective

The study aimed to find a correlation between BMI variations with the other factors analyzed: dyslipidemia, expression of some inflammatory/non-inflammatory cytokines and the expression of monocyte polarization associated with atherosclerosis.

Method

Descriptive, transversal in terms of method and analytical observational of case-control as to nature.

The tests were carried out in 87 Schools in the Lisboa e Vale do Tejo Region of a 9-year-old pre-pubertal child population. The studies carried out included the collection and interpretation of clinical data (anthropometry, bioimpedance) and laboratory data (biochemical, dosage of

cytokines IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6 and IL-10 and analysis of monocyte surface markers (CD14, CD16, CD36, CD80, CD86, CD163, and CD206)].

For the characterization of the corpulence, BMI and respective zScore were used following the criteria of the IOTF.

Results

Simultaneously with a high rate of overweight/obesity (28.9%) in this child population, there were equally high values of Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance (HOMA-IR) and children with alterations in the lipid profile, even though they present typical values of BMI. It seems to be possible to prove the existence of the prevalence of a chronic inflammatory stage of weak expression, by the provenly increased values of the inflammatory cytokine IFN- γ ($p < 0.05$), in overweight/obese children and paradoxically, by the decrease in TNF- α ($p < 0.05$). Changes in the immune response at the cellular level are confirmed by the increased expression of classic monocytes (CD14⁺⁺/ CD16⁻), as well as the presence of an anti-inflammatory response of M2 in overweight/obese children. Also, there is a correlation between the expression of M1 monocytes as well as the M1/M2 ratio with the inflammatory cytokine IFN- γ , which we believe may indicate an inflammatory response, especially considering the association of this cytokine with overweight/obesity.

Conclusions

In addition to the high rate of overweight/obesity in the study sample, there was also a very high, worrying proportion of changes in the lipid profile and the HOMA-IR. There is evidence of an inflammatory process and changes in the immune cell response associated with overweight/obesity, as well as changes in the immune cell response showing a possible response to inflammation and, or, changes in circulating lipids.

Keywords

Obesity; Child obesity; Lipoprotein metabolism; Immune response; Inflammation; Cardiovascular diseases; Atherosclerosis; Cytokines; Monocytes.

ÍNDICE DE FIGURAS

Índice de Figuras

Figura Nº:

1: Evolução da gestação	50
2: Formação do disco embrionário	50
3: Disco embrionário tridérmico.....	50
4: "Vénus de Willendorf" ⁸	55
5- Estrutura dos Quilomicrons.....	64
6 - Metabolismo das Lipoproteínas	69
7 - Órgãos do sistema imunológico.....	76
8 - Tipo de polarização dos macrófagos	84
9 - Efeitos biológicos das citoquinas	88
10 - O colesterol e a aterosclerose	89
11 - Evolução da lesão aterosclerótica	100
12 - Curvas de corpulência com z-score (feminina e masculina).	111
14 - Parâmetros analíticos efetuados.....	115
15 – FMO - FITC	126
16 - FMO - PE	127
17 – FMO - PE-Cy5	128
18 – Monócitos "clássicos" CD80+ e CD86+	130
19 - Monócitos "não clássicos" CD80+ e CD86+	131
20 - Monócitos "clássicos" CD36+, CD163+ e CD206+.....	132
21 - Monócitos "não clássicos" CD36+, CD163+ e CD206+.....	133
22 – Posição de cada analito no citómetro	136
23 – Curva de calibração do TNF- α	136
25 – Curva de calibração IL-4	137
26 – Curva de calibração IL-2	137
27 – Curva de calibração IL- 6	138
28 – Curva de calibração IL-10	138

ÍNDICE DE TABELAS

Índice de Tabelas

Tabela Nº:

1 - Critérios de avaliação do Score de Apgar	52
2 - Tipos de Lípidos	63
3 – Componentes da Imunidade Inata.....	74
4 – Principais tipos de Células do Sistema Imunitário	75
5 - Características e funções das células imunes ^{54,55}	77
6 - Principais características dos CD 14 e 16 (Christian Weber, 2016) ⁵⁹	81
7 - Outros marcadores fenotípicos da polarização dos macrófagos ⁵⁶	81
8 - Classificação das citocinas	89
9 - Principais características das citocinas utilizadas no estudo ^{54 56}	90
10: Fatores de risco das DCV.....	94
11 - Tamanho, características e funções das artérias	97
12 – Alterações sucessivas da íntima no processo aterosclerótico	101
13 - Métodos utilizados nos parâmetros bioquímicos	117
14 - Experiência 1 FMO.....	125
15 - Experiência 2 FMO.....	125
16 - Descrição das características antropométricas e de bio impedância da população em estudo.	145
17 - Descrição das características bioquímicas da população em estudo	147
18 - Características bioquímicas entre grupos corpulência IOTF e por grupos com e sem dislipidemia.	149
19 - Características bioquímicas entre grupos com e sem dislipidemia e por grupos corpulência IOTF.....	151
20 - Quantificação citocinas da população em estudo	152
21 - Correlações de Citocinas com os grupos de corpulência que apresentam ou não dislipidemia	153
22 - Correlações entre grupos com e sem dislipidemia por grupos IOTF com Citocinas	154
23 – Proporções das populações de monócitos Mon 1, 2 e 3, , no total de células CD14+	155
24 - Proporções das populações de monócitos Mon 1, 2 e 3, como indicado, no total de células CD14+	156
25 - Monócitos Mon 1, Mon 2 e Mon 3, por grupos com e sem dislipidemia e grupos IOTF	157
26 - Monócitos M1 e M2 por grupos com e sem dislipidemia e grupos IOTF	157
27 - Correlações entre antropometria e bio impedância com citocinas inflamatórias e não inflamatórias.....	158
28 - Correlações entre Bioquímica e citocinas inflamatórias e não inflamatórias.....	159
29 - Correlações das diferentes expressões de monócitos com os parâmetros bioquímicos	160
30 - Correlação entre tipo de ativação de monócitos e tipo de citocina	161

SIGLAS E ABREVIATURAS

Siglas

µg	micrograma
µl	microlitro
µU/ml	microunidades/mililitro
m ²	metro quadrado
mg/dl	miligramas/decilitro
mU/L	miliunidades/litro
ng/dl	nanagramas/decilitro
nm	nanómetros
O ₂	Oxigénio
pg/ml	Picogramas/mililitro
s.	semanas
α	alfa
β	beta
γ	gama

Abreviaturas

ABCA ₁	Transportador 1 da casete de ligação ao ATP
AG	Ácidos Gordos
AGNE	Ácidos gordos não esterificados
APC's	Células apresentadoras de antigénio
Apo	Apolipoproteína
ATP	Trifosfato de adenosina
BCE	Before the common or current era
CCR2	Recetor de quimiocina C- tipo 2
CD	<i>Cluster</i> ou grupo de diferenciação
CETP	Proteína de transferência de colesterol esterificado
CGMNP	Centro de Genética Médica e Nutrição Pediátrica
CRD	Domínio de reconhecimento de carboidratos
CSF	Fator estimulante de colónia
CX ₃ CR ₁	Recetor 1 da fractalquina
DALYs	Anos de vida ajustados por incapacidade
DCs	Células dendríticas
DC-SIGN	CD209 - Molécula de adesão intercelular específica de célula dendrítica
DCV	Doenças cardiovasculares
DNO	Doenças de declaração não obrigatória
FCGR	Recetor gama Fc
GM-CSF	Fator estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos
GPI	Recetor de reconhecimento de padrões vinculado a glicosilfosfatidilinositol
HDL	Lipoproteína de elevada densidade
HF	hipercolesterolemia familiar
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HNF	hipercolesterolemia não familiar
HO-1	Heme oxigenase – 1
HOMA-IR	<i>Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance</i>

IA	Índice aterogénico
IDL	lipoproteínas de densidade intermédia
IL	Interleuquina
IMC	Índice de Massa Corporal, ou índice de Quetelet
Kcal	Quilocalorias
LCAT	Lecitina-colesterol-acil-transferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLox	Fração oxidada da LDL
LDLR	Recetor da LDL
LIF	Fator inibidor de leucemia
LIMP-2	Proteína 2 de Membrana Integral do Lisossoma
linfócito T CD4+	Célula T auxiliadora
linfócito T CD8+	Célula T citotóxica
LP	Lipase pancreática
LPL	Lipoproteína Lipase
LPS	Antigénio Lipopolissacarídeo
LPSR	Recetor de lipopolissacarídeo
LXR	Recetor X do fígado
MALT	Linfoma de tecido linfoide associado à mucosa
MCP-1	Proteína 1 quimioatraente de monócitos
MHC	Complexo <i>Major</i> de Histocompatibilidade
M _φ	Monócito não ativado
NK	Células <i>Natural Killer</i>
OMS	World Health Organization/Organização Mundial de Saúde
PaO ₂	Pressão arterial parcial de O ₂
PDAY	Estudo de Determinantes Patobiológicos da Aterosclerose na Juventude
PPAR	Recetor do ativador do peroxissoma
ROS	Espécies de oxigénio reativas
RN	Recém-nascido
SI	Sistema imunológico
SR-B1	Recetor de eliminação do tipo B1
SRCR	Recetor sequestrador rico em cisteína
TAB	Tecido Adiposo branco
TAC	Tecido adiposo castanho
TG	Triglicéridos
TGF	Fator de crescimento transformante
TNF	Fator de necrose tumoral
TRC	Transporte reverso do colesterol
UCP1	Proteína desacopladora-1
UE	União Europeia
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion protein 1</i>
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	45
1. NOÇÃO DE NORMALIDADE.....	49
1.1 A criança “normal”	49
1.3 Desenvolvimento intrauterino	49
1.3.1. Período Pré-embriónico.....	49
1.3.1. Período embriónico	50
1.3.2. Período fetal.....	50
1.4. Classificação da gravidez	50
1.5. Parto.....	51
1.6. Adaptação do RN ao Meio Ambiente	51
1.7. Períodos da Infância.....	52
2. OBESIDADE	55
2.1. Definição	55
2.2. Obesidade ao longo dos tempos	55
2.3. Epidemiologia.....	56
2.4. Etiologia.....	56
2.5. Fisiopatologia	57
2.5.1. Tecido Adiposo	57
2.5.1.1. Tecido Adiposo branco (TAB)	57
2.5.1.2. Tecido Adiposo Castanho (TAC).....	57
2.5.2. Desenvolvimento “normal”	58
2.5.3. Desenvolvimento patológico	58
2.6. Obesidade E Aterosclerose.....	59
2.7. Diagnóstico.....	59
2.8. Tratamento da obesidade.....	60
3. METABOLISMO DAS LÍPOPROTEÍNAS	63
3.1. Aspectos gerais.....	63
3.2. Estrutura Geral	64
3.2.1. Composição das lipoproteínas circulantes.....	64
3.2.1.1. Quilomicrons	64
3.2.1.2. Very-low-density lipoprotein (VLDL).....	65
3.2.1.3. Low-density lipoprotein (LDL).....	65
3.2.1.4. High-density lipoproteins (HDL).....	65
3.2.1.5. Outras classes.....	65
3.3. Biossíntese e Secreção.....	65
3.3.1. Nas células da mucosa intestinal.....	65
3.3.2. No fígado	66
3.4. Metabolismo intravascular dos Quilomicrons e das VLDL.....	66
3.4.1. As enzimas envolvidas	66
3.4.1.1. Lipoproteína – Lipase (LPL)	66

3.4.1.2.	Lecitina-colesterol-acil-transferase (LCAT)	66
3.4.2.	Papel das HDL.....	66
3.4.3.	Destino dos quilomicrons.....	67
3.4.4.	Destino das VLDL.....	67
3.4.5.	Destino das LDL.....	67
3.4.6.	Destino das HDL.....	68
4.	SISTEMA IMUNITÁRIO	73
4.1.	A Resposta Imunitária	73
4.1.1.	Células do Sistema Imunitário	73
4.1.2.	Monócitos E Macrófagos.....	78
4.1.2.1.	Crescimento e Diferenciação	79
4.1.2.2.	Heterogeneidade dos monócitos humanos	79
4.1.2.3.	Grupos de Diferenciação.....	79
4.1.2.4.	Monócitos CD14 ⁺ /CD16 ⁻	82
4.1.2.5.	Monócitos CD14 ⁺ /CD16 ⁺	82
4.1.2.6.	Monócitos CD14 ^{low} /CD16 ⁺⁺	82
4.1.2.7.	Recrutamento de monócitos	83
4.1.2.8.	Tipo de polarização.....	83
4.1.3.	Aterosclerose e Polarização de Macrófagos.....	85
4.2.	Resposta Inflamatória versus anti-inflamatória.....	87
4.2.1.	Generalidades.....	87
4.2.2.	Citoquinas	87
4.2.3.	Famílias de citoquinas	88
4.2.4.	Aterosclerose e Citoquinas	89
5.	DOENÇAS CARDIOVASCULARES (DCV)	93
5.1.	Definição	93
5.2.	Epidemiologia.....	93
5.3.	Fatores de risco.....	94
5.4.	Aterosclerose	95
5.4.1.	Estrutura e função dos vários tipos de vasos.....	96
5.4.2.	Fisiopatologia.....	98
5.4.3.	Sucessão de eventos na aterosclerose	99
6.	OBJETIVO	105
7.	MATERIAIS E MÉTODOS	109
7.1.	Tipo de Estudo	109
7.2.	População-alvo.....	109
7.2.1.	Critérios de inclusão	109
7.2.2.	Critérios de Exclusão	109
7.3.	Parâmetros clínicos	110
7.3.1.	<i>Avaliação da Composição Corporal</i>	110
7.3.1.1.	Análise Antropométrica	110
7.3.2.	Bio impedância	113

7.3.3.	Hábitos Alimentares e Atividade Física.....	114
7.4.	Parâmetros analíticos.....	115
7.4.1.	Condições de colheita.....	115
7.4.2.	Processamento das Amostras	116
7.4.3.	Doseamentos Bioquímicos Gerais.....	116
7.4.3.1.	Bioquímica	116
7.4.3.2.	Doseamentos de Insulina, Leptina e LDLox.....	117
7.4.3.2.1.	Insulina.....	117
7.4.3.2.2.	Leptina	119
7.4.3.2.3.	LDL oxidada.....	120
7.4.3.3.	Valores normais	121
7.4.3.4.	Dislipidemia.....	122
7.4.3.5.	Determinação do índice HOMA-IR	122
7.4.3.6.	Índice aterogénico (IA)	122
7.4.3.7.	Marcação Monócitos	122
7.4.3.7.1.	Generalidades.....	122
7.4.3.7.2.	Experiência FMO	123
7.4.3.7.3.	Interpretação dos resultados.....	125
7.4.3.7.4.	Software de análise.....	125
7.4.3.7.5.	Análise de subpopulações de monócitos (amostras).....	129
7.4.3.7.6.	Interpretação dos resultados.....	129
7.4.3.8.	Quantificação das citocinas	134
7.4.3.8.1.	Generalidades.....	134
7.4.3.8.2.	Interpretação dos resultados.....	136
7.5.	Análise estatística.....	139
7.6.	ÉTICA E DEONTOLOGIA	139
8.	RESULTADOS.....	143
8.1.	Preâmbulo	143
8.2.	Caracterização Geral.....	143
8.2.1.	Resultados Clínicos	143
8.2.2.	Resultados bioquímicos.....	146
8.2.2.1.	Bioquímica	146
8.2.2.2.	Corpulência Normal e Dislipidemia	148
8.2.2.3.	Diferenças bioquímicas entre os grupos com e sem dislipidemia	150
8.2.2.4.	Antropometria e quantificação de citocinas.....	152
8.2.2.5.	Comparação da expressão de citocinas com os grupos de corpulência... 153	
8.2.2.6.	Comparação da expressão de citocinas dos grupos da amostra que apresentam ou não dislipidemia e por grupos de corpulência	154
8.2.2.7.	Antropometria e Monócitos Mon 1, 2 e 3.....	155
8.2.2.8.	Antropometria e Monócitos M1 – M2.....	156
8.2.2.9.	Comparação das populações de monócitos Mon 1, 2 e 3 e M1 - M2 com os grupos de corpulência e por dislipidemia.....	157
8.2.2.10.	Correlações entre antropometria e níveis de citocinas	158
8.2.2.11.	Correlações entre expressão de citocinas e parâmetros bioquímicos	159

8.2.2.12. Correlações das diferentes expressões de monócitos com os parâmetros bioquímicos	160
8.2.2.13. Correlação das subpopulações de monócitos com a expressão de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias.....	160
9. DISCUSSÃO.....	165
9.1. Doenças Cardiovasculares.....	165
9.2. Obesidade	165
9.3. Doença cardiovascular e obesidade.....	166
9.3.1. Aterosclerose.....	166
9.3.1.1. Modelos animais	167
9.3.1.2. Modelos de análise de lesões ateroscleróticas em artérias	168
9.3.1.3. Modelos clínicos.....	171
9.3.1.3.1. Doença Cardiovascular e Dislipidémia.....	171
9.3.1.3.2. Obesidade e Inflamação	176
9.3.1.3.3. Obesidade e marcadores de monócitos.....	177
9.3.1.3.4. Correlação Obesidade – Marcadores de inflamação	179
9.3.1.3.5. Correlações entre expressão de citocinas e parâmetros bioquímicos .	179
9.3.1.3.6. Correlação expressão de monócitos – citocinas.....	180
9.4. Doença Cardiovascular, obesidade e nutrição	180
9.5. Limitações	181
10. CONCLUSÕES.....	185
BIBLIOGRAFIA.....	189
ANEXOS	215

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A Ideia para o tema desta Tese, “**Prevalência de biomarcadores de doença cardiovascular numa população infantil com excesso de peso**”, iniciou-se em 1995, aquando da minha colaboração com o Serviço de Genética e de Diagnóstico Pré-natal do Hospital de D. Estefânia - grupo Hospitais Cívicos de Lisboa. Foi nesse Serviço que contactei clinicamente pela primeira vez com situações de obesidade infantil, em geral como consequência de Síndromes Genéticas.

Seguidamente, em 2004/5 por convite, comecei a colaborar com o Serviço de Genética da Egas Moniz, Cooperativa de Ensino Superior. Esta colaboração incidiu na execução do “**Índex de Nutrição Pediátrica**”, obra essa que foi financiada em grande parte pelo Programa Operacional Saúde XXI.

Em 2008, já na vigência do Centro de Genética Médica e Nutrição Pediátrica Egas Moniz (CGMNPEM), fiz parte da equipa que se candidatou a um financiamento da Direção Geral da Saúde com um projeto plurianual intitulado “*Estudo Nutricional, Bioquímico e Genético de uma População Infantil Pré-obesa e Obesa da Região Sul*” (Projeto 27/2008).

Este estudo, foi executado em 89 escolas do ensino Básico de Lisboa e Vale do Tejo e também de Campo Maior. Foram estudadas aproximadamente 6000 crianças pré-púberes de 9 anos. Contudo, porque se queria analisar estatisticamente uma amostra homogénea quanto à idade, excluíram-se do estudo as crianças cujas idades durante o ano letivo em curso se afastavam do valor médio de 9 anos. O número elevado de crianças juntamente com o elevado número de parâmetros a analisar, implicou a elaboração de uma **Plataforma Informática** especialmente concebida para este efeito.

Uma das primeiras constatações deste estudo, foi a prevalência elevada de crianças com excesso de peso/obesidade. Refira-se que a Organização Mundial de Saúde (OMS), em diversos documentos já tinha considerado esta situação como uma verdadeira epidemia. Contudo, não tinha sido a única patologia a preocupar a OMS pois refere igualmente outras, também de declaração não obrigatória (DNO), como as Doenças Cardiovasculares (DCV), a Diabetes Mellitus, certos Cancros entre outras, todas elas de transmissão multifatorial.

No que diz respeito à obesidade, os dados conhecidos situam o nosso País como um dos que apresentam uma prevalência das mais elevadas, problemática esta ainda mais preocupante se se tiver em conta que está já presente na criança em idades muito precoces.

O excesso de peso/obesidade é fator de risco para as DCV e conseqüentemente para a aterosclerose, sendo igualmente conhecido que esta última tem a sua génese muito precocemente na infância ou mesmo antes, muito embora em geral só se manifeste na segunda ou terceira década de vida.

Sendo a obesidade e igualmente a aterosclerose processos inflamatórios crônicos o âmago desta Tese incidiu na procura de possíveis correlações positivas entre um certo número de parâmetros antropométricos/bioquímicos e de alguns biomarcadores implicados na aterosclerose.

NOÇÃO DE NORMALIDADE

1. NOÇÃO DE NORMALIDADE

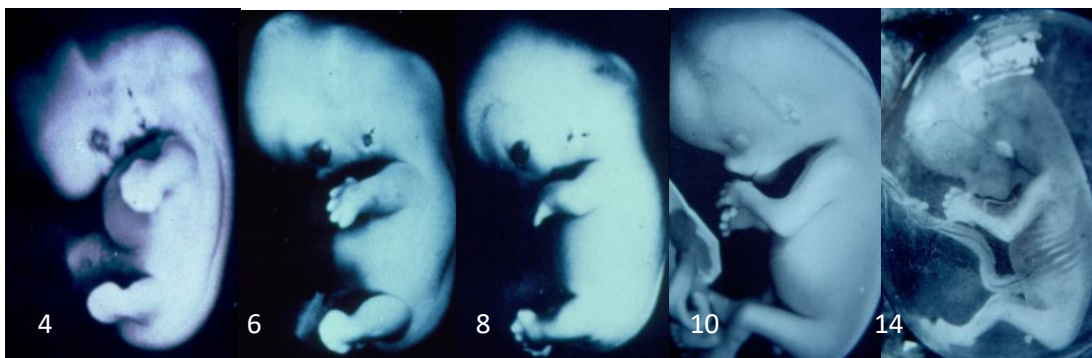
De forma a que melhor se possa compreender o tema “**obesidade**”, nomeadamente a infantil, é necessário que se discrimine as etapas que compreendem o desenvolvimento estaturponderal e psico-motor adequado à idade e ao género da criança dita “normal”.

1.1 A CRIANÇA “NORMAL

Se considerarmos a “normalidade” sob o ponto de vista do **Boletim de Saúde Infantil**, o tempo de gestação, o tipo de parto, as biometrias à nascença bem como a avaliação clínica periódica, são relevantes para apreciação do desenvolvimento normal da criança. Tal será assim, a expressão do resultado do ocorrido desde a conceção e da conjugação entre fatores genéticos e ambientais ¹. A gestação, pela definição da OMS, tem uma duração de 280 a 286 dias ou 10 meses lunares de 28 dias, a contar a partir do 1º dia da última menstruação. De referir que se trata da duração da amenorreia e não do desenvolvimento pós-concepcional ².

Figura 1: Evolução da gestação (em semanas aproximadamente).

Adaptado de *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology* ³



1.3 DESENVOLVIMENTO INTRAUTERINO

1.3.1. PERÍODO PRÉ-EMBRIONÁRIO

Na 1ª semana de gestação, período que ocorre entre a ovulação no final da 2ª divisão meiótica e a fecundação, atinge-se a fase de “mórula” e a formação do blastocisto. Na 2ª semana ocorre a nidação do blastocisto no endométrio e a diferenciação do sincitotrofoblasto e do citotrofoblasto. Aparecem as primeiras vilosidades placentárias e a diferenciação do embrioblasto em dois folhetos: ectoderme e endoderme ³. Durante a 3ª semana, prossegue o desenvolvimento da árvore vilositária, a formação do futuro cordão umbilical e aparecimento da mesoderme ³.

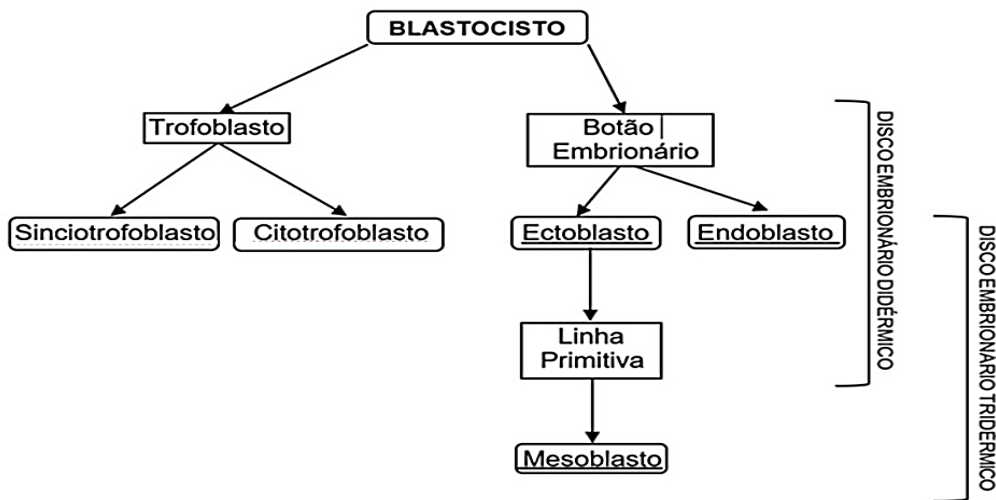
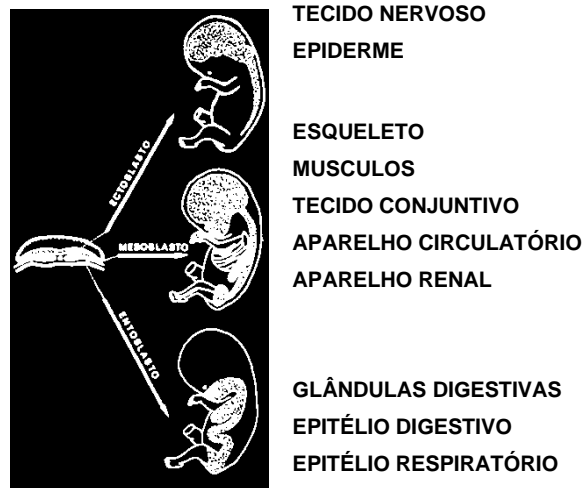


Figura 2: Formação do disco embrionário

1.3.1. PERÍODO EMBRIONÁRIO

Da 4ª à 12ª semana (s.) de gestação ocorre a formação dos órgãos a partir dos três folhetos (Fig. 3) e o feto adota a forma exterior humana. A organogênese termina no final da 12ª s. ⁴

Figura 3: Disco embrionário tridérmico



1.3.2. PERÍODO FETAL

Este período será designado como precoce (das 12 às 20 s. amenorreia), intermédio (das 20 às 27 s.), e tardio (das 28 às 40 s.).

1.4. CLASSIFICAÇÃO DA GRAVIDEZ

Uma gestação de termo, tem o seu desfecho das 37 s. completas até às 41 s. completas de amenorreia e dão origem a recém-nascidos (RN) **de termo**, ao passo que a de pré-termo, é

a que não completa 37 s. de gestação, originando um RN de **pré-termo** ou **prematureo**. A gestação pós-termo, cujo parto ocorre após as 42 s. de amenorreia dá origem a RN pós-termo ou pós-maduro.

1.5. PARTO

Parto eutócico ou normal, é o que requer assistência mínima ou não precisou de assistência, com ou sem episiotomia, sem manipulação fetal (como rotação por versão) ou instrumentação (fórceps), que foi espontâneo, de apresentação cefálica, vaginal, e que teve como produto uma criança viva, única e de termo.

Parto anormal, difícil ou lento, qualquer que seja a causa. Se o feto estiver numa posição anómala ou se for de tamanho grande, pode exigir rotação por versão (intervenção manual), utilização de instrumentos (fórceps) ou mesmo uma cesariana.

1.6. ADAPTAÇÃO DO RN AO MEIO AMBIENTE

No respeitante ao sistema nervoso central, implica a exposição deste sistema aos estímulos cutâneos, térmicos, mecânicos e sensoriais, enquanto que para o sistema respiratório, envolve a evacuação do líquido existente na árvore traqueobrônquica (aspiração) e do líquido interalveolar (absorção linfática e sanguínea). Ocorre ainda a mobilização dos fosfolípidos (surfactantes) e a diminuição das resistências vasculares pulmonares.

Também a rápida exposição à temperatura ambiente (20-25°C), muito diferente dos 37°C intrauterinos, provoca importantes perdas de calor nos primeiros minutos pós-natais (± 200 Kcal/m²/minuto).

Ocorrerá a ativação da termogénese química (gordura castanha) se houver aporte suficiente em glucose e oxigénio (O₂).

No que diz respeito ao sistema cardiovascular, ocorre o fecho dos “shunts” fetais direito-esquerdo a nível do canal arterial – medida da pressão arterial parcial de O₂ (PaO₂) - e do *buraco de Botal* (comunicação interauricular), assim como o fecho do Canal Venoso - comunicação da veia umbilical esquerda que alimenta o fígado a partir da placenta com a veia cava inferior (eliminação do curto-circuito do fígado).

Os sinais vitais do RN são avaliados utilizando os critérios do *Score de Apgar*, ao 1', ao 5' e aos 10' após o nascimento e corresponde a uma graduação de 0 a 2 para cada elemento do score. Considera-se normal se este valor for maior que 8.

Tabela 1 - Critérios de avaliação do *Score de Apgar*

SINAIS CLÍNICOS	Gradação		
	0	1	2
Respiração	Ausente	Difícil	Irregular
Frequência cardíaca	0	<100/min	>100/min
Coloração	Branca, cinzenta ou azulada	Tronco rosado e extremidades azuladas	“Avermelhado”
Tónus muscular	Ausente	Flexão das extremidades	Movimentos ativos
Reação (a uma estimulação)	0	“Caretas “	Defesa vigorosa, choro
Estimulação da cavidade bucal			

1.7. PERÍODOS DA INFÂNCIA

Podemos considerar diferentes subperíodos:

Período Perinatal: Considera-se desde o período fetal tardio incluindo o período neonatal precoce (desde as 28 s. de amenorreia) ao 7^o dia de vida. A OMS considera desde a 22^a s. amenorreia ao 7^o dia de vida. De referir que, no fim do 2^o trimestre o feto terá 70% do tamanho e 20% do peso que o recém-nascido irá ter à nascença.

Período Neonatal (RN): pode ser precoce (dos 0 ao 7^o dia de vida) ou tardio (do 8^o ao 28^o dia de vida).

1^a Infância (lactente): A criança é um lactente de 1^o período até aos 4/6 meses e de 2^o período desde esta idade até aos 2 anos.

2^a Infância: Ou idade pré-escolar ocorre dos 3 aos 5 anos e a escolar entre esta idade e os 11/12 anos (esta última denominada também grande infância).

Puberdade: Nos rapazes acontece um pouco mais tardiamente (12 aos 16 anos) que nas raparigas (10/11 aos 14 anos).

Adolescência: Da mesma forma, é um período mais precoce para as raparigas (14 aos 18 anos) do que para os rapazes (16 aos 20 anos).

OBESIDADE

2. OBESIDADE

2.1. DEFINIÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define excesso de peso/obesidade como a acumulação excessiva de matéria gorda com implicações para a Saúde ⁵.

2.2. OBESIDADE AO LONGO DOS TEMPOS

Na história da evolução da Humanidade desde o período pré-histórico, a obesidade pode ter desempenhado um papel importante pois pode ter conferido a possibilidade de armazenar reservas provenientes do excesso de alimentos aquando dos períodos de “fartura”. Nos tempos pré-históricos, esta capacidade de armazenar gordura a partir da menor quantidade possível da ingestão de alimentos, poderá ter feito a diferença entre a vida e a morte, não apenas para o indivíduo mas principalmente para a espécie. Aqueles que conseguissem armazenar gordura facilmente, apresentariam óbvia **vantagem evolutiva** e a **seleção natural** terá desempenhado o seu papel, no ambiente hostil para os primeiros caçadores e coletores ⁶.

As primeiras representações da significância cultural e do valor estético da obesidade talvez sejam as misteriosas figuras femininas na Europa da Idade da Pedra, datadas do Paleolítico Europeu Superior, 25 000 BCE (*before the common or current era*). As “Vénus de Willendorf” são achados arqueológicos encontrados no território europeu e terão representado ícones matriarcais ou da Deusa-Mãe ⁷.



Figura 4: “Vénus de Willendorf” ⁸

O fogo talvez tenha constituído o principal paradigma implicado na alteração da alimentação em toda a evolução humana, por ter sido responsável pelo aumento do valor calórico dos alimentos (agora cozinhados em vez de crus), conferindo um padrão de digestão que é único ⁹. Posteriormente, a agricultura e a domesticação de animais (aproximadamente 10 000 BCE), vieram permitir uma utilização contínua dos alimentos, ao invés da oferta sazonal e precária. A Humanidade podia desta forma combater o fome. O modo como os alimentos eram produzidos foi sendo continuamente melhorado, o que deu a oportunidade do aparecimento

de Cidades-Estado e Impérios. No entanto e durante muitos anos, a distribuição de alimentos continuou a acontecer de forma errática e sujeita aos caprichos da Natureza persistindo ainda assim desnutrição, até às primeiras décadas do século XX. Em qualquer caso, o aumento gradual da quantidade, qualidade e variedade de alimentos disponíveis em simultâneo com uma época em que estavam a ser adotadas importantes medidas de saúde pública, permitiu o aumento da longevidade e da estatura média. O crescimento económico que ocorreu na segunda metade do sec. XX, permitiu o aumento do tempo de lazer com a consequente redução da atividade física o que, aliada à abundância de alimentos, é responsável pelo aumento do número de pessoas com sobrepeso/obesidade desde a Segunda Guerra Mundial¹⁰.

Obviamente, a patogénese da obesidade é mais complexa do que o simples paradigma de alimentos disponíveis/esforço gasto para os obter. Aparentemente, a atual epidemia de obesidade parece resultar de fatores genéticos e fisiopatológicos inerentes a cada indivíduo, em conjugação com o desequilíbrio entre a ingestão e o gasto energético. Estes últimos fatores serão com certeza agravados pela fácil disponibilidade de alimentos altamente calóricos e uma atividade física reduzida¹¹.

2.3. EPIDEMIOLOGIA

A OMS estimou que em 2016 tivessem existido 1,9 biliões de adultos com excesso de peso e que desses, pelo menos 650 milhões seriam obesos¹².

A obesidade Infantil é considerada atualmente uma epidemia mundial^{13,14} e a OMS também estimava para 2016, 340 milhões de crianças obesas; ainda na Europa, 20% das crianças apresentariam excesso de peso e 1/3 delas seriam obesas¹³.

Portugal tem uma das prevalências mais elevadas dos países europeus com 31,5% das crianças da faixa etária 7-9 anos a apresentarem excesso de peso/obesidade¹⁵.

Os resultados obtidos pelo Centro de Genética Médica e Nutrição Pediátrica Egas Moniz, no “Estudo Nutricional, Bioquímico e Genético de uma População Infantil Pré-obesa e Obesa da Região Sul”, onde foram estudadas cerca de 6000 crianças de aproximadamente 9 anos, demonstraram uma prevalência de excesso de peso de 27,6%, sendo que, 6,9% destas eram já obesas¹⁶.

2.4. ETIOLOGIA

O excesso de peso/obesidade é uma patologia genética de transmissão multifatorial, onde 60 a 80% da variância observada no peso corporal, pode ser explicada por fatores de predisposição genética herdados. Mas de uma forma óbvia, é um distúrbio sob influência ambiental que afeta o balanço energético (ingestão de alimentos/dispêndio)^{17,18}.

Existem contudo formas raras, monogénicas, que são responsáveis por casos ditos de “obesidade genética” e parecem representar cerca de 5% dos casos¹⁹.

2.5. FISIOPATOLOGIA

2.5.1. TECIDO ADIPOSE

O tecido adiposo é composto por uma grande variedade de células, nomeadamente precursores de adipócitos, adipócitos maduros, células endoteliais, fibroblastos, e ainda leucócitos. Estas células trabalham em conjunto para promover o armazenamento de nutrientes nos depósitos do tecido adiposo e as suas proporções relativas variam consoante a localização. Além disso, o excesso de peso/obesidade provocam mudanças significativas na arquitetura do tecido adiposo que estão fortemente associadas a uma disfunção metabólica²⁰.

O principal papel do tecido adiposo é o controlo da **homeostasia energética** ao constituir o recetáculo para o armazenamento de gordura (essencialmente sob a forma de triglicéridos), constituindo assim a reserva energética^{21,23}.

Desempenha ainda um papel extraordinariamente dinâmico numa ampla gama de processos fisiológicos, incluindo reprodução, apoptose, inflamação, angiogénese, regulação da pressão arterial, aterogénese, coagulação, fibrinólise, imunidade e homeostasia vascular direta ou indireta e outras implicações na regulação da proliferação celular. O pleiotropismo funcional deste tecido depende da sua capacidade de sintetizar e em alguns casos, secretar um grande número de enzimas, hormonas, fatores de crescimento, citoquinas, fatores do complemento e proteínas de matriz e de membrana, chamadas coletivamente como **adipoquinas**. Ao mesmo tempo, expressa os recetores para a maioria destes fatores, garantindo uma ampla sinalização cruzada em ambos os níveis, local e sistémico, como resposta a alterações metabólicas ou outros estímulos externos^{22,24}.

2.5.1.1. **Tecido Adiposo branco (TAB)**

É um tecido heterogéneo composto por adipócitos preenchidos com lípidos e várias populações de células não-adipócitos, incluindo endoteliais, sangue, estroma não caracterizado e células precursoras de adipócitos. Embora os adipócitos cheios de lípidos representem a maior parte do volume e da massa do TAB, as populações de células que não adipócitos têm papéis críticos na manutenção, crescimento e função deste tecido.

Como os adipócitos maduros são células pós-mitóticas terminalmente diferenciadas, é também necessário para o crescimento hipertrófico do Tecido Adiposo Castanho (TAC) a diferenciação dos seus precursores durante o desenvolvimento normal e na obesidade²⁵.

2.5.1.2. **Tecido Adiposo Castanho (TAC)**

A função do TAC é transformar energia dos alimentos em calor. Quer a atividade aguda do tecido, isto é, a produção de calor, como o processo de recrutamento no tecido (que resulta numa maior capacidade termogénica) estão sob o controlo da **norepinefrina** libertada pelo

sistema nervoso simpático. Na termogênese reguladora, o TAC é essencial para a **termogênese clássica** sem tremores (este fenômeno não existe na ausência de TAC funcional), bem como para a **termogênese induzida** pela norepinefrina, que é recrutada a frio. A produção de calor é ativada sempre que o organismo necessita de um aumento de temperatura, como no período pós-natal, durante um estado febril ou aquando da excitação, sendo a taxa de termogênese controlada centralmente no **hipotálamo**. A alimentação como tal também resulta na ativação deste tecido; assim uma série de dietas, aparentemente todas caracterizadas por baixo teor em proteína, a termogênese ocorre à custa de um recrutamento da **leptina** tecidual; esta termogênese com regulação metabólica, também está sob controle hipotalâmico. Quando o tecido está ativo, grandes quantidades de lípidos e glicose são metabolizados localmente. O desenvolvimento do TAC com a sua proteína característica, **proteína desacopladora-1 (UCP1)**, foi provavelmente determinante para o sucesso evolutivo dos mamíferos, à medida que sua termogênese aumentava ²⁶.

2.5.2. DESENVOLVIMENTO “NORMAL”

Ocorre entre o segundo e o terceiro trimestre de vida fetal. Acontece por etapas com o aparecimento dos **lóbulos adiposos** concomitantemente com a **neovascularização tecidual**, conduzindo à formação de adipócitos suscetíveis à ação das hormonas lipolíticas ²⁵. Os pré-adipócitos são unipotenciais e o seu processo final de diferenciação exige a presença das **hormonas somatotrópica, tri-iodotironina e insulina**.

2.5.3. DESENVOLVIMENTO PATOLÓGICO

A obesidade tem origem na hipertrofia dos adipócitos, com os produtos de secreção destas células a serem responsáveis pelas alterações patogénicas que resultam das complicações associadas à obesidade ²⁷.

Estudos genómicos do TAB dos indivíduos obesos revelaram uma significativa regulação positiva de genes e outras alterações biológicas relacionadas com os constituintes da matriz extracelular, incluindo membros da família das integrinas. Tais estudos sugeriram ainda que aqueles elementos poderiam desempenhar um papel mediador importante numa cadeia de interações que interligam fenómenos inflamatórios locais com a alteração das funções metabólicas do TAB em obesos. Investigações em tecidos utilizando a análise das interações transcricionais, revelaram também um aumento da fibrose intersticial deste tecido, associada a uma infiltração de diferentes tipos de células inflamatórias. Tal sugere que, alterações fenotípicas dos pré-adipócitos humanos induzidas por um pro-inflamatório, pode levar a uma síntese excessiva de componentes da matriz extracelular. A forte relação que existe entre a remodelação da matriz extracelular e a dinâmica de fibrose do TAB nos diferentes estadios da obesidade, contribui para a perturbação da biologia dos pré-adipócitos e adipócitos, o que parece estar na génese da resistência à perda de peso dos indivíduos obesos ²⁸.

2.6. OBESIDADE E ATEROSCLEROSE

A prevalência elevada de obesidade e de aterosclerose são motivo de preocupação a nível mundial. Ambas se caracterizam por um processo inflamatório crónico subjacente e apresentam inter correlações. Uma das mais significativas diz respeito às alterações do metabolismo das lipoproteínas, razão por que, parece fundamental do ponto de vista clínico e não só, adquirir uma melhor compreensão desse mecanismo ^{29,30}.

Contudo, em relação à aterosclerose, será igualmente necessário expor os componentes essenciais respeitantes à componente imunológica, focando essencialmente as alterações relacionadas com a patologia atrás referida.

2.7. DIAGNÓSTICO

Os **métodos de avaliação diretos** efetuados em autópsias foram os primeiros a ser utilizados e comparam após disseção os diferentes componentes do corpo, estabelecendo diretamente a sua relação com o peso total do mesmo. São muito importantes na validação de métodos indiretos e obviamente não podem ser usados em estudos epidemiológicos ³¹.

Nos **indiretos**, utilizam-se diferentes metodologias tais como a **Densitometria**, a **determinação do Potássio radioativo**, a **diluição do óxido de deutério**, a **Ressonância Magnética Nuclear**, a **Tomografia Computorizada**, entre outros e a avaliação é efetuada extrapolando valores de análise de parâmetros químicos e físicos ^{31,32}. Estes métodos apresentam grande precisão e fiabilidade, mas também as desvantagens de serem onerosos e/ou exigirem equipamento sofisticado e mesmo em alguns deles exposição a radiações, o que também inviabiliza a sua utilização quer na prática clínica de rotina, quer na utilização em estudos epidemiológicos ^{32,33}.

Assim, recorre-se a métodos mais acessíveis de utilizar e simultaneamente mais económicos como a antropometria, que inclui não só a determinação do Índice de Massa Corporal (IMC), como também a medição de alguns perímetros (braço, abdominal, anca e perna). Recorre-se ainda à medição das pregas cutâneas ^{34,35}.

A OMS utiliza o Índice de Massa Corporal (IMC, ou índice de *Quetelet*) como método para a avaliação da corpulência (quociente entre peso em quilogramas e quadrado da altura em metros). Nos adultos se este valor for ≥ 25 considera-se que o indivíduo tem excesso de peso e obesidade se for ≥ 30 ³⁶. Contudo, porque as crianças estão em crescimento este valor deve ser percentilado e comparado com curvas populacionais de referência ^{13,37,38}. Se as curvas utilizadas forem as francesas e se o valor do IMC for superior ao percentil 97, representará excesso de peso/obesidade e corresponderá portanto a um $25 \geq \text{IMC} < 30$. O diagnóstico efetivo de obesidade corresponde a um $\text{IMC} \geq 30$, valor ajustado ao sexo e à idade do indivíduo ³⁹.

A bio impedância é um método também usado na determinação da composição corporal. É necessário ter conhecimento prévio da altura para a determinação do IMC e existem aparelhos que permitem determinar **a massa gorda**, a **massa magra**, a massa **músculo-esquelético**, **água intra, inter e extracelular** bem como **determinar as calorias em repouso**. Para tal, para além de ter de poderem fazer medições em várias frequências, também devem possuir múltiplos elétrodos, distribuídos pelas extremidades, de forma a que se possa avaliar de forma mais correta o corpo no seu todo ^{11,32,40}.

2.8. TRATAMENTO DA OBESIDADE

Para o tratamento da obesidade cujo sucesso é relativo em especial na idade adulta, existem vários tratamentos disponíveis, desde os mais simples como os que dizem respeito à modificação do padrão comportamental (dieta e exercício físico), até ao tratamento farmacológico e/ou cirúrgico ^{41,42}.

Não sendo do âmbito desta Tese, este capítulo não será desenvolvido.

METABOLISMO DAS LIPOPROTEÍNAS

3. METABOLISMO DAS LÍPOPROTEÍNAS

3.1. ASPETOS GERAIS

O Homem como todo o organismo vivo tem necessidade de “energia” que vai obter essencialmente à custa de trifosfato de adenosina (ATP), produzido em resultado do catabolismo de glúcidos, lípidos e prótidos e que existem sob três formas de reserva:

- **Proteínas musculares** (não constituem verdadeiramente uma reserva);
- **Glicogénio hepático e muscular** (cujas concentrações são limitadas);
- **Triglicéridos** (TG) (cujas reservas são variáveis a nível dos adipócitos).

Estes triglicéridos podem ser interconvertidos, sendo necessário recordar que a passagem dos glúcidos a lípidos é fácil, mas estes últimos são hidrófobos, não podendo assim circular no sangue sob a forma livre. Daí que, para ultrapassar esta dificuldade, existam duas principais formas de transporte dos ácidos gordos:

- **Seroalbumina**, que transporta ácidos gordos não esterificados (AGNE) aos tecidos utilizadores. Aqueles provêm da hidrólise dos triglicéridos existentes a nível do tecido adiposo;
- **Lipoproteínas**, as quais asseguram uma reserva dos ácidos gordos que provêm seja dos lípidos da alimentação durante a digestão intestinal, seja da síntese hepática de glúcidos ou AGNE.

Nem todas as gorduras são utilizadas durante o jejum. A denominada gordura estrutural, por exemplo, existe a nível dos nervos ou em redor dos órgãos. Há também uma camada dita gordura subcutânea, cujo papel é preservar o corpo, mantendo a temperatura (papel termorregulador).

No homem, a concentração normal de lípidos totais varia em geral entre 5,5 e 7,5 g/l ⁴³⁻⁴⁴.

Apresenta-se uma tabela com a classificação esquemática dos diferentes tipos de lípidos existentes (Tabela 2).

Tabela 2 - Tipos de Lípidos

COMPLEXIDADE	TIPO DE LÍPIDOS
LÍPIDOS SIMPLES	Ácidos Gordos
	Gorduras Neutras
	Ésteres do colesterol
LÍPIDOS COMPOSTOS	Fosfolípidos (glicerofosfolípidos e glico-esfingolípidos)
	Glicolípidos
	Glicoproteínas
LÍPIDOS MISTOS	Esteroides
	Vitaminas (A, E e K)

Os lípidos atrás referidos encontram-se em proporções variáveis nos diferentes tipos de lipoproteínas ⁴⁵.

- **Fosfolípidos** (1,5 – 2,6 g/l) e são constituídos em cerca de 69% de lecitina, 19% de esfingomielina, 7% de liso-lectina e 5% de cefalina;
- **Colesterol** (1,5 – 2,7g/l) em que a maior parte (75%) se encontra sob a forma de ácidos gordos esterificados;
- **Acilgliceróis** (0,7 – 1,6 g/l) essencialmente (85%) sob a forma de triglicéridos;
- **Ácidos Gordos Não Esterificados** (0,1 a 0,23 g/l) de notar que embora em concentração fraca, representam uma forma muito importante para o transporte de energia e isto é consequência da sua permanência em circulação ser de poucos minutos.

3.2. ESTRUTURA GERAL

As lipoproteínas são moléculas de forma esférica, onde existe um núcleo **hidrófobo** (TG e colesterol), que se apresenta solubilizado e estabilizado no soro graças à existência de uma fina camada composta por proteínas e fosfolípidos. Contudo estas ligações são fracas, o que vai permitir a possibilidade de trocas entre as diferentes lipoproteínas, ou mesmo entre estas últimas e as membrana celulares ⁴³.

Existem várias classes de lipoproteínas - Apolipoproteína **A** (Apo A) (A, A2....); Apo **B** (B₄₈); Apo **C** (C, C2, C3, C5,...), Apo **D** e Apo **E**. As suas diferenças consistem, ou numa diferente repartição do tipo de lípidos nelas existente ou numa diferente composição das “proteínas de revestimento” externo.

3.2.1. COMPOSIÇÃO DAS LIPOPROTEÍNAS CIRCULANTES

3.2.1.1. Quilomicrons

Grandes moléculas (100 -1000 nm) que no indivíduo em jejum estão normalmente ausentes, mas que após uma refeição estão na base do aspeto “turvo” do soro. A relação lípidos/proteína é de 98/2, e transportam TG (88%), colesterol (3%) contendo uma apo estrutural (apo B) (Figura 5) ⁴³.

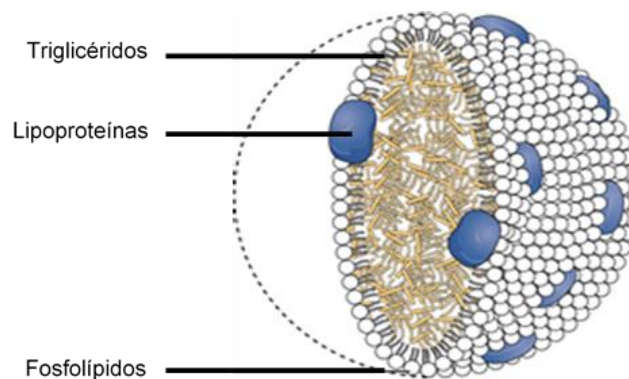


Figura 5- Estrutura dos Quilomicrons.

(Adaptado sob licença de BC Open Textbooks)

(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deep.pt>)

3.2.1.2. Very-low-density lipoprotein (VLDL)

As VLDL, lipoproteínas de muito baixa densidade, são moléculas igualmente volumosas embora menores (30 – 70 nm) que quando em grande percentagem dão um aspeto “opalescente” ao soro. A relação lípidos/proteína é de 90/10 e transportam TG (56%), colesterol (17%) e contêm uma apo estrutural (apo B), contendo também apo C e apo E ⁴³.

3.2.1.3. Low-density lipoprotein (LDL)

Em relação às lipoproteínas atrás referidas estas são muito menores (15 a 25 nm) e seja qual for a sua concentração nunca dão origem à turvação do soro. A relação lípidos/proteína é de 76/24, transportam essencialmente colesterol (59%) e não contêm praticamente apo B. Podemos classificá-las sob o ponto de vista da densidade em dois grupos: LDL₁ e LDL₂ com composição diferente e contrariamente às VLDL apresentam-se numa fraca concentração (0,6%), mas com uma maior flutuação em ultracentrifugação ⁴³.

3.2.1.4. High-density lipoproteins (HDL)

As lipoproteínas de alta densidade, são pequenas moléculas (4 – 14 nm) que se apresentam inicialmente sob a forma de um disco e só posteriormente assumem a forma esférica à medida que se enriquecem em colesterol. A relação lípidos/proteína é de 47/53, contendo essencialmente colesterol (40%) e fosfolípidos (41%). Caracterizam-se por apresentar como apo estrutural a A₂ e a A₁, sendo esta última três vezes mais abundante.

São importantes por constituírem um reservatório a nível plasmático de apo C e E. São estáveis e podemos igualmente classificá-las em HDL₁ (em fraca proporção) e principalmente em HDL₂ e HDL₃ na concentração média de 2,9 g/l ^{43,45}.

3.2.1.5. Outras classes

De referir essencialmente a Lp(a), cuja densidade é intermédia entre a LDL e HDL, sendo rica em colesterol. Existe uma forma de Lp(a) específica associada à apo B e à seroalbumina ⁴³.

3.3. BIOSÍNTESE E SECREÇÃO

3.3.1. NAS CÉLULAS DA MUCOSA INTESTINAL

Os enterócitos sintetizam VLDL após as refeições a partir dos seus constituintes de base os Quilomicrons:

- **Apoproteínas** sintetizadas *in situ* – em particular apo B e A.
- **Fosfolípidos** também sintetizados *in situ*.
- **TG** que após as refeições são formados por **AG de cadeia longa (C>12)** e de dois **mono-acil-gliceróis** provenientes da ação sobre os TG alimentares da **lipase pancreática** no lúmen intestinal.

- **Colesterol** proveniente da alimentação (0,3 g/dia) e sobretudo duma síntese muito ativa de novo.

3.3.2. No FÍGADO

Este órgão segrega em permanência VLDL a um ritmo variável, dependendo da quantidade de TG a transportar ⁴⁶. Os constituintes de base são:

- **Apoproteínas** sintetizadas *in situ*, em particular a C (HDL e VLDL) a B (VLDL) e A (fornecida pelos quilomicrons).
- **TG**, cujo esqueleto carbonado pode ter proveniência na totalidade da utilização dos glúcidos alimentares. O fígado capta 1/3 dos AGNE circulantes a partir da hidrólise dos TG do tecido adiposo (em período de jejum, os TG podem ser sintetizados a partir destes AGNE e do glicerol).
- **Colesterol livre**, ativamente sintetizado no fígado, mas proveniente igualmente da mucosa intestinal. No homem, as LDL nativas não contêm praticamente senão colesterol não esterificado.

3.4. METABOLISMO INTRAVASCULAR DOS QUILOMICRONS E DAS VLDL

3.4.1. AS ENZIMAS ENVOLVIDAS

3.4.1.1. Lipoproteína – Lipase (LPL)

É sintetizada pelos tecidos extra-hepáticos utilizadores de ácidos gordos (AG) (tecido adiposo, miocárdio, músculo esquelético, pulmão...) e distribuída à superfície do endotélio dos capilares destes tecidos hidrolisando os TG circulantes em AG e glicerol. Uma parte destes AG libertados penetram nos tecidos e a outra junta-se ao “pool” de AGNE circulantes enquanto que o glicerol retorna ao fígado ⁴⁷.

3.4.1.2. Lecitina-colesterol-acil-transferase (LCAT)

Sintetizada no fígado mas cuja ação se exerce no sangue, essencialmente na esterificação do colesterol das HDL (com um AG em posição interna). O colesterol esterificado pode de seguida trocar com outras lipoproteínas. O LCAT é, então, a base essencial do colesterol esterificado nos lípidos plasmáticos ⁴⁸.

3.4.2. PAPEL DAS HDL

Estas lipoproteínas fornecem as apo indispensáveis à ação das enzimas presentes:

- A1, como ativadora da LCAT
- C, fornecida complementarmente ao sangue, aos quilomicrons, e às VLDL nativas. Refira-se que, a apo C2 é indispensável à ação da LPL.

3.4.3. DESTINO DOS QUILOMICRONS

Após as refeições, a LPL do tecido adiposo está particularmente ativa em consequência da insulinemia desencadeada. Os quilomicrons cuja semivida média é de 20 minutos, perdem progressivamente TG, diminuindo de tamanho e vão sendo enriquecidos com colesterol e fosfolípidos. As partículas residuais (contêm ainda 10 a 20% dos TG iniciais) assim como o colesterol e fosfolípidos de origem intestinal, são então depuradas pelo fígado. Assim, diariamente cerca de 70 a 120 gramas de gorduras provenientes da alimentação são transformadas.

3.4.4. DESTINO DAS VLDL

São sintetizados 15 a 50 g de TG no organismo (sobretudo a nível hepático) e incluídos nas VLDL plasmáticas que diariamente são purificadas de forma análoga (semivida algumas horas). Sob a ação combinada da **LPL** e da **LCAT** as VLDL perdem, progressivamente TG, enriquecendo-se de colesterol esterificado. As apo C excedentárias abandonam igualmente as VLDL para as HDL e as restantes VLDL passam a lipoproteínas intermédias ditas **IDL**, já ricas em colesterol, mas contendo ainda uma proporção elevada de TG. Aquelas continuam progressiva e lentamente a perder TG não à custa já das LPL, mas sim a nível hepático devido à ação de uma **TG-lipase diferente**.

No homem, o estadio final do **catabolismo intravascular das VLDL** está representado pelas LDL, que contêm a totalidade das apo B iniciais ricas em colesterol.

No período de jejum, os TG das VLDL são sintetizados essencialmente no fígado a partir dos AGNE do tecido adiposo (lipólise adipocitária muito ativa não reprimida no período de insulinemia baixa). Em contrapartida, a atividade da LPL do tecido adiposo é fraca, enquanto que noutros tecidos é elevada como por exemplo no miocárdio, cuja finalidade é fornecer a energia necessária aos tecidos que dela necessitam, seja diretamente sob a forma de AGNE do tecido adiposo, ou indiretamente sob a forma de TG (VLDL), sintetizados no fígado a partir desses mesmos AGNE.

3.4.5. DESTINO DAS LDL

O plasma contém normalmente pouca quantidade de VLDL e IDL exatamente porque a concentração em LDL é elevada visto esta última representar o estágio final do catabolismo intravascular das VLDL. De notar que as VLDL têm uma semivida de algumas horas, enquanto que as LDL podem persistir três a quatro dias e são retomadas pelo fígado onde sofrem catabolismo com excreção do colesterol, seja sob a forma livre seja após esterificação em sais biliares. Contudo, atualmente sabe-se que este catabolismo é essencialmente efetuado a nível dos tecidos extra-hepáticos em consequência de existirem a este nível recetores membranares que as captam. Após fixação, as LDL estão na base de uma

proteólise da apo B e de uma hidrólise da ligação éster do colesterol esterificado, fenómeno este na base do fornecimento do colesterol livre aos tecidos utilizadores.

3.4.6. DESTINO DAS HDL

As **HDL** constituem a reserva plasmática de apoproteínas necessárias ao metabolismo intravascular das VLDL e dos quilomicrons, mas, por outro lado, têm um papel importante no retorno do colesterol dos tecidos ao fígado, único órgão capaz de o catabolizar e excretar.

A síntese começa no fígado que gera uma lipoproteína de baixa densidade (VLDL) rica em triglicéridos e seguidamente liberta-a na circulação. A VLDL é progressivamente modificada e forma lipoproteínas intermediárias e posteriormente de baixa densidade (IDL, LDL). A LDL, é o principal elemento transportador do colesterol para os tecidos periféricos através do seu recetor (LDLR). Para remover o excesso de colesterol acumulado nos tecidos periféricos, o colesterol é transportado através dos linfáticos e posteriormente no sangue venoso e finalmente volta ao fígado para excreção, um processo chamado **transporte reverso do colesterol** (TRC) ⁴⁹. A lipoproteína de alta densidade (HDL) desempenha um papel importante na remoção do colesterol através de TRC. A ApoA₁, isenta de lípidos recolhe o colesterol livre das células periféricas através do **transportador da cassete de ligação ao ATP** (ABCA₁) e forma as **pré-HDL**. Esta circula através dos vasos linfáticos até às veias, onde pode ser ainda modificada para se tornar α -HDL e removida através da captação direta pelo recetor de HDL, **recetor de eliminação do tipo B₁** (SR-B1). Assim, estas HDL ao retornarem ao fígado asseguraram o essencial do transporte do colesterol de origem tecidular. Apresenta-se na figura 6 um esquema que resume o essencial do metabolismo geral das lipoproteínas.

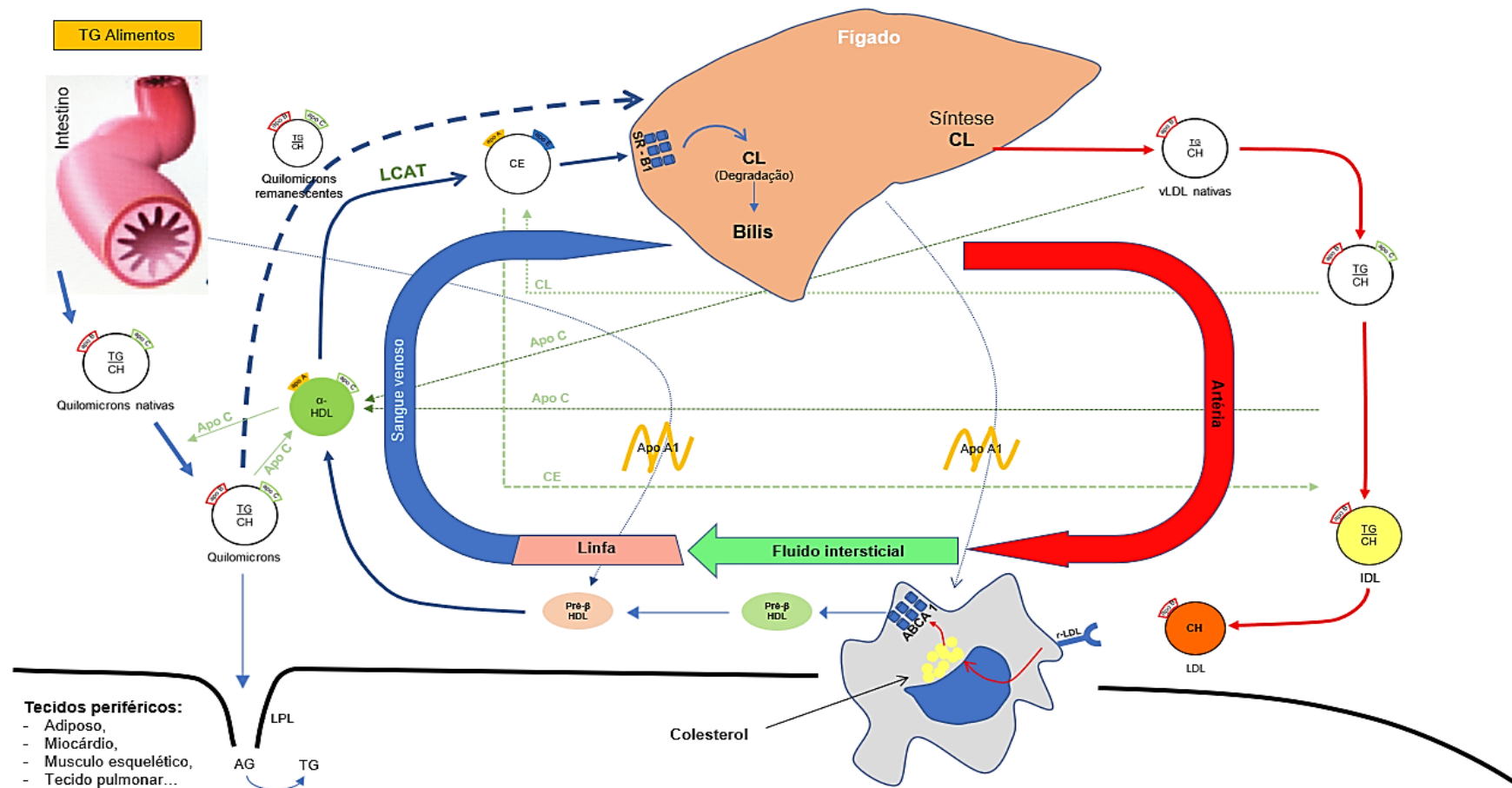


Figura 6 - Metabolismo das Lipoproteínas

ABCA1: Transportador cassete de ligação ao ATP
AG: Ácidos Gordos
Apo A: Apolipoproteína A
Apo B: Apolipoproteína B
Apo C: Apolipoproteína C

CE: Colesterol Esterificado
CH: Colesterol
CL: Colesterol Livre
HDL: Lipoproteína de Alta Densidade
IDL: Lipoproteína de Densidade Intermédia
LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade

LCAT: Lecitina Colesterol acil-transferase
LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade
LPL: Lipoproteína Lipase
TG: Triglicéridos
SR-B1: recetor de eliminação do tipo B1
VLDL: Lipoproteína de muito Baixa Densidade

SISTEMA IMUNITÁRIO

4. SISTEMA IMUNITÁRIO

O principal papel do sistema imunológico (SI) é reconhecer moléculas estranhas e dirigir um ataque concertado contra elas. É, pois, um processo que assegura mecanismos de proteção com respostas rápidas e específicas contra uma vastíssima gama de moléculas, desempenhando também um papel muito importante na rejeição de tumores. Quando desregulado, pode dar origem a um conjunto de patologias de cariz inflamatório ou autoimune, como aterosclerose, diabetes insulino-dependente, lúpus eritematoso sistémico, entre outras⁵⁰.

4.1. A RESPOSTA IMUNITÁRIA

A defesa contra os agentes antigénicos é mediada primeiramente pelas reações iniciais da **imunidade inata** e posteriormente pelas respostas tardias da **imunidade adaptativa**⁵⁰.

A imunidade inata, também conhecida como **imunidade natural ou nativa**, fornece a primeira linha de defesa contra os agentes invasores. Consiste em variados mecanismos de defesa celulares e bioquímicos (Tabela 3), que estão presentes antes da exposição aos agentes patogénicos (pré-preparados). Dentro das células constituintes do SI inato, as células dendríticas (DCs) e os macrófagos são importantes na ativação de linfócitos T, através da apresentação de antígenos, no contexto das moléculas do complexo de histocompatibilidade. As células T ativadas auxiliam por sua vez a resposta mediada por células B, que não necessitam de apresentação antigénica, reconhecendo diretamente antígenos não processados através das imunoglobulinas que expressam na sua superfície. A ativação dos linfócitos induz a sua proliferação e conseqüente expansão clonal. Os linfócitos B ativados produzem moléculas de anticorpo específicas para o antígeno, enquanto que os linfócitos T auxiliares exercem maioritariamente a sua ação através da produção de citocinas, que vão condicionar ou direcionar o tipo da resposta induzida⁵¹. Os linfócitos T podem também diferenciar-se em células T citotóxicas, capazes de lisar células infetadas ou tumorais⁵². Geralmente, a combinação da resposta inata com a resposta primária adaptativa, é suficiente para erradicar ou controlar os agentes patogénicos.

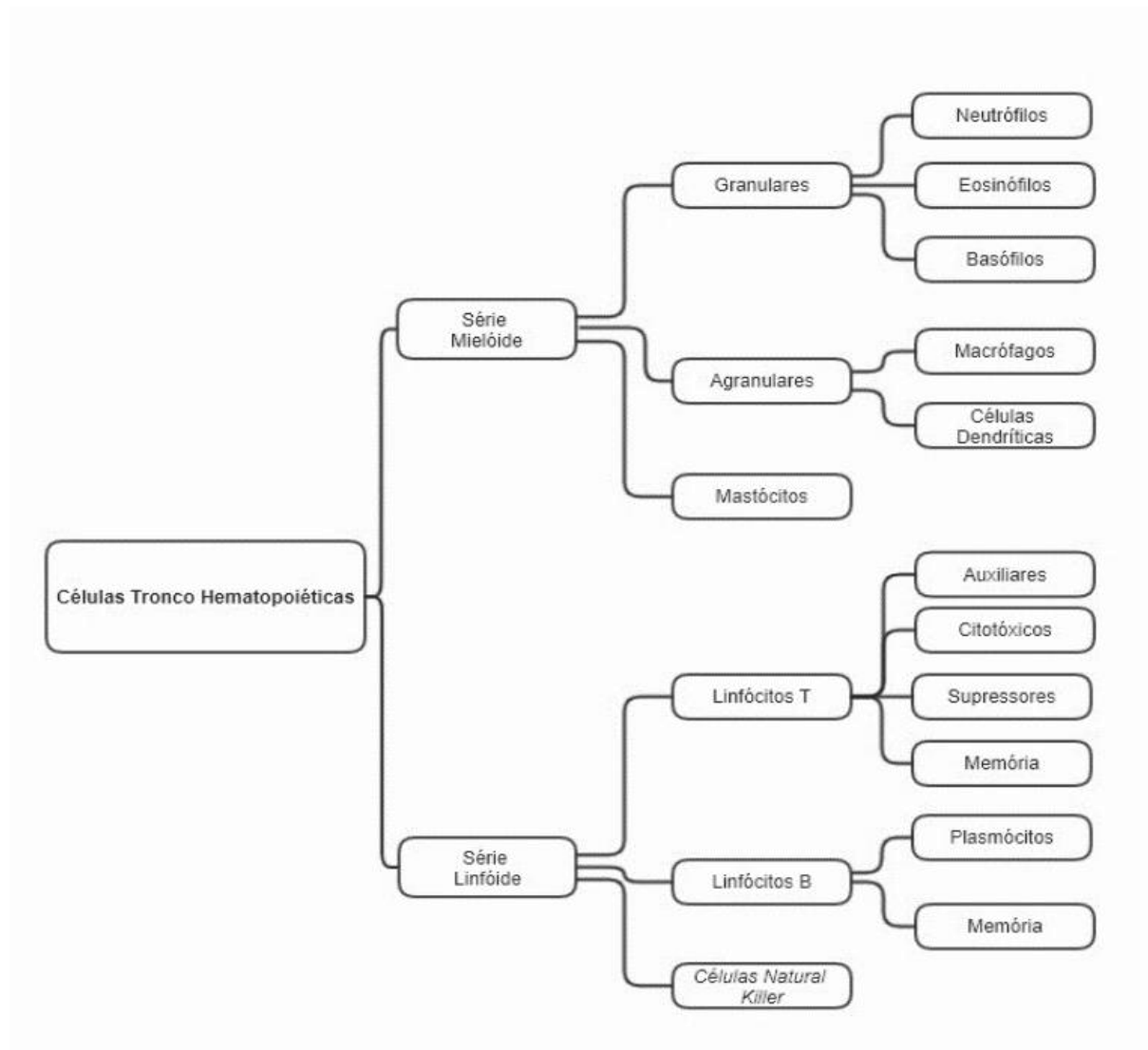
4.1.1. CÉLULAS DO SISTEMA IMUNITÁRIO

Do SI fazem parte diferentes tipos celulares, desempenhando cada um deles um papel importante. Na tabela 3, identificam-se os componentes da imunidade inata e na tabela 4 apresentam-se de forma muito sucinta as células constitutivas do SI inato.

Tabela 3 – Componentes da Imunidade Inata

IMUNIDADE INATA		
Tipo de Barreiras	Mecanismos	
Anatômicas	Pele	Defesa mecânica e química (ambiente ácido)
	Muco	Captura de microrganismos estranhos
	Cílios do epitélio pulmonar	Expulsão dos microrganismos retidos no muco
Fisiológicas	Temperatura	Pirexia – inibe o crescimento de alguns agentes patogênicos
	pH	Ambiente ácido
	Lisozimas	Rompe a parede celular bacteriana
	Interferões do tipo I	Indução de um estado antiviral em células não infectadas
	Péptidos antimicrobianos	Potentes antibióticos de largo espectro sintetizados pelas células
	Complemento	Ação citolítica e indução da quimiotaxia de PMNs para a região
Componentes celulares		Neutrófilos – Fagocitose e Endocitose
	Células fagocíticas	Macrófagos- Fagocitose e Endocitose Células dendríticas – Fagocitose e apresentação antigénica
	Células <i>Natural Killer</i>	Células linfoides com capacidade citotóxica e produtoras de citocinas
	Outras células linfoides	Dois tipos celulares derivados dos monócitos: os macrófagos e as células dendríticas
Inflamatória		Proteína C-reativa
	Proteínas de fase aguda	Proteína sérica amiloide
		Lectina de ligação à manose

Tabela 4 – Principais tipos de Células do Sistema Imunitário



Os linfócitos B e T ocupam um papel de destaque por serem as células que determinam a especificidade da imunidade e é a sua resposta que orchestra os membros efetores do sistema. Para além destas, uma série de células especializadas do epitélio e do estroma, providenciam o ambiente anatómico no qual ocorre a imunidade, muitas vezes secretando fatores críticos que regulam a migração, o crescimento, a homeostasia e a ativação de genes em células do SI ⁵³. As células do SI encontram-se em tecidos periféricos organizados como o baço, os nódulos linfáticos, as placas de *Peyer* e amígdalas, onde ocorre a resposta imunológica primária (figura 7).

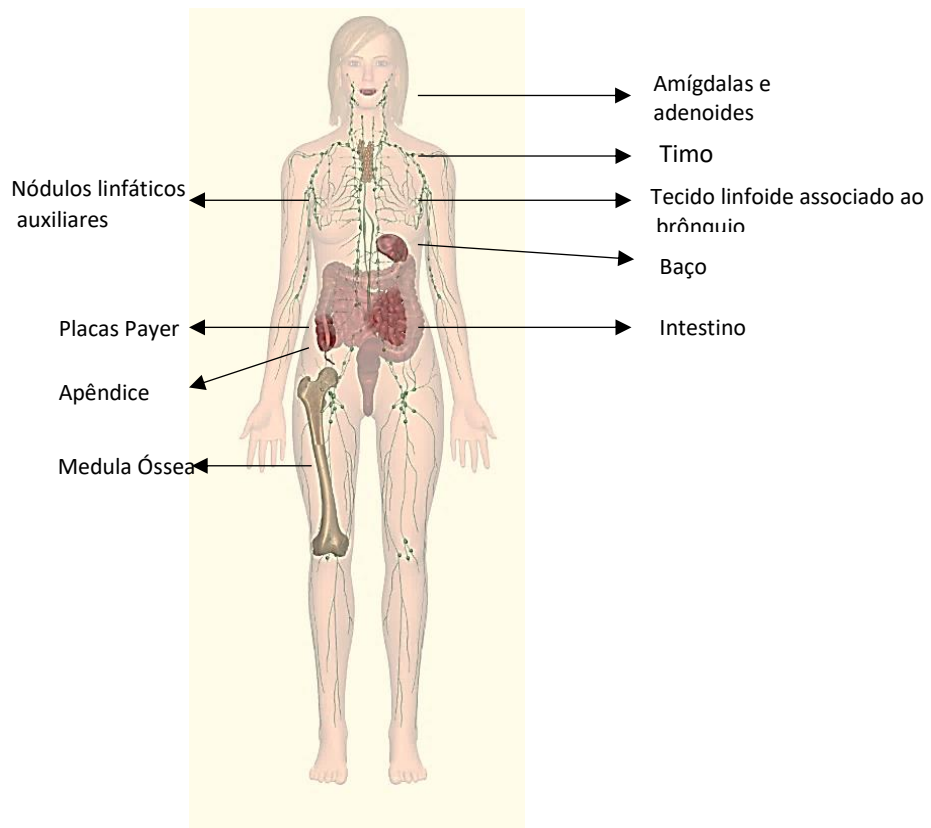










Figura 7 - Órgãos do sistema imunológico
(Adaptado sob autorização de <https://www.innerbody.com/>)

Na tabela 5 resumem-se as características e as funções das células do SI.

Tabela 5 - Características e funções das células imunes ^{54,55}

Tipo de Célula		Características	Função
Granulócitos	Neutrófilos 	<ul style="list-style-type: none"> - Polimorfonucleares, - 50-70% dos leucócitos circulantes 	<ul style="list-style-type: none"> • Capacidade fagocítica • Grânulos contêm enzimas líticas e substâncias bactericidas • Produção de intermediários reativos de O₂ e azoto com potente atividade antimicrobianas
	Eosinófilos 	<ul style="list-style-type: none"> - Núcleo bilobulado - 1-3% dos leucócitos circulantes 	<ul style="list-style-type: none"> • Fagocitose • Combater parasitas multicelulares • Controlar (juntamente com os mastócitos) o mecanismo associado a situações alérgicas e a asma • Resposta imunológica a parasitas
	Basófilos 	<ul style="list-style-type: none"> - Forma esférica; núcleo em trevo - <1% leucócitos circulantes 	<ul style="list-style-type: none"> • Granulócitos não-fagocíticos envolvidos na resposta alérgica • Contém grânulos que libertam histamina, serotonina e prostaglandinas • Importante na resposta Th2
Agranulócitos	Linfócitos <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> <div style="margin-bottom: 10px;"> T  </div> <div style="margin-bottom: 10px;"> B  </div> <div> NK  </div> </div>	<ul style="list-style-type: none"> - cromatina condensada e citoplasma escasso pouco basófilo - 20-40% dos leucócitos circulantes - 99% das células em circulação na linfa 	<ul style="list-style-type: none"> • T auxiliares (Th) : <ul style="list-style-type: none"> - coordenar a defesa imunológica através da secreção de citocinas e estimulação da resposta imune humoral • T citotóxicos (Tc): <ul style="list-style-type: none"> - citotoxicidade, secreção de citocinas • T supressores: <ul style="list-style-type: none"> - supressão da ativação do sistema imunitário • Memória: <ul style="list-style-type: none"> - memória imunológica
			<ul style="list-style-type: none"> • Plasmócitos: <ul style="list-style-type: none"> - secreção de anticorpos, apresentação de antígenos e secreção de citocinas • Memória: memória imunológica
			<ul style="list-style-type: none"> • Identificam e eliminam células infetadas c/ vírus e tumorais; reconhecem molécula HLA
	Monócitos/Macrófagos 	<ul style="list-style-type: none"> - Citoplasma abundante (levemente basófilo), núcleo irregular com incisões - 2-10% dos leucócitos circulantes 	<ul style="list-style-type: none"> • Precusores dos macrófagos tecidulares • Quando macrófagos: expressam recetores de reconhecimento de constituintes dos patógenos, capacidade de ligação aos patógenos estranhos e de os fagocitar
Mastócitos 	<ul style="list-style-type: none"> - Células com núcleos ovais ou redondos - Grânulos menores e mais numerosos (que os basófilos) 	<ul style="list-style-type: none"> • Provocar vasodilatação (libertação de histamina) com conseqüente extravasamento de plasma e formação de edema na região 	

4.1.2. MONÓCITOS E MACRÓFAGOS

Estas células desempenham um papel central na imunidade. Um dos objetivos principais da imunidade celular é ajudar os macrófagos na eliminação de organismos que estabelecem infecções intracelulares. Contudo, podem também ter efeitos deletérios no hospedeiro como por exemplo na gênese da aterosclerose. Os monócitos (M ϕ) representam uma família de leucócitos mononucleares que estão amplamente distribuídos por todo o corpo, dentro e fora dos órgãos linfo-hematopoiéticos. Variam consideravelmente no tempo de vida e no seu fenótipo, dependendo de sua origem e do microambiente local. Quando maduras, são células ativamente fagocíticas, de vida relativamente longa, que são adaptáveis nas suas respostas bio sintéticas a antígenos. As suas funções dentro dos tecidos podem ser homeostáticas, regulando o meio local e o sistêmico através de diversos recetores de membrana plasmática e variados produtos secretórios. Reagem e geram sinais que influenciam o crescimento, a diferenciação e a morte de outras células, reconhecendo e englobando células senescentes e anormais. Essas atividades contribuem substancialmente para as funções de reconhecimento e defesa contra partículas estranhas e outros imunogénios. As funções imunitárias inatas da célula M ϕ , complementam as suas contribuições para a imunidade humoral e celular adquirida, podendo regular a ativação dos linfócitos, uma função que é também exercida pelas DCs de origem mieloide ^{50,55}.

As células M ϕ , como as DCs:

- Processam e apresentam antígenos.
- Produzem quimioquinas e citocinas, como interleucina (IL) -1, IL-6, IL-12, IL-18, IL-23, fator de necrose tumoral (TNF)- α , IL-10 e fator de crescimento transformante (TGF)- β ;
- Fagocitam células apoptóticas e necróticas.

Agindo diretamente ou sob a influência de outras células imunológicas, as células M ϕ capturam substâncias patogénicas extra e intracelulares e eliminam agentes invasores. Como reguladores da resposta imune específica e também da imune natural, as células M ϕ aumentam, assim como limitam, a indução de mecanismos efetores da resposta imune específica, por feedback positivo e negativo ⁵³.

Embora os macrófagos funcionem como células apresentadoras de antígeno (APCs), ativando as células T, não parecem ser particularmente eficazes na ativação de células T CD4 nativas. As DCs são as principais APCs que ativam células T CD4+ nativas. Essas células T ativadas estarão então disponíveis para especializar a resposta imunitária.

4.1.2.1. Crescimento e Diferenciação

Os monócitos dão origem a uma célula M ϕ terminalmente diferenciada que não pode recircular ou reiniciar a replicação do DNA, exceto de uma forma limitada ⁵³. Ao contrário de outras células granulocíticas, aquela célula pode ser de longa duração e manter a capacidade de sintetizar RNA e proteínas de forma acentuada e mesmo quando num estado relativamente inativo como células “residentes”. São distribuídas pelos tecidos do corpo, constituindo um possível sistema de resposta ao alarme, mas também mediando as funções tróficas e homeostáticas, ainda pouco compreendidas. Após estímulos inflamatórios e imunes, mais monócitos podem ser recrutados para os locais, dando origem a células “imunologicamente ativadas” com a superfície alterada, sob o ponto de vista das respostas secretora e citotóxica. Estes monócitos têm origem no saco vitelino migrando de seguida para o fígado fetal e posteriormente para baço e medula óssea, tanto no período fetal como no neonatal ⁵⁶.

As células precursoras existentes a nível do saco vitelino podem contribuir igualmente para a formação de células de *Langerhans* ⁵³.

No feto, a célula M ϕ madura prolifera ativamente durante a organogénese. No adulto normal, a célula M ϕ tecidual não se autorrenova, exceto em microambientes especializados, tais como epiderme, tecido nervoso ou o pulmão. O crescimento e diferenciação são fortemente regulados por **fatores de crescimento específicos** e seus **recetores** (por exemplo, IL-3, CSF-1, GM-CSF/ IL-34, IL-4, IL-13) bem como **inibidores** (ex. IFN α/β , TGF- β , e fator inibidor de leucemia [LIF]), que variam consideravelmente na sua potência e seletividade ⁵⁴.

4.1.2.2. Heterogeneidade dos monócitos humanos

A heterogeneidade morfológica dos monócitos torna-os extremamente difíceis de distinguir de outros leucócitos circulantes, como os **linfócitos** e as células **natural killer (NK)** ⁵⁵. Embora certas características, como a irregularidade de forma (núcleos ovais, ou com formato “em rim”), vesículas citoplasmáticas, bem como a relação citoplasma-núcleo, permitam identificar o tipo de célula, a existência de marcadores típicos de superfície celular é sem dúvida mais eficiente. Assim reconhecem-se a existência de vários subgrupos de monócitos distintos.

4.1.2.3. Grupos de Diferenciação

A designação grupo ou *cluster* de diferenciação (CD) é usada para definir moléculas que se constituem como antigénios, expressas à superfície de células específicas do SI. Permitem, pela sua especificidade, identificar as células que as possuem. Podem agir de diferentes modos, geralmente como recetoras ou como ligantes e algumas delas desempenham outras funções, como a adesão celular ⁵⁶.

A nomenclatura padrão internacionalmente aceite, baseia-se na designação numérica do CD usado para restringir proteínas de superfície que definem um tipo de célula ou estadio de

diferenciação específico e que são reconhecidas por um cluster ou grupo de anticorpos. De notar que atualmente estão identificadas mais de 300 moléculas categorizadas dentro da nomenclatura CD ⁵⁷.

O processo de ativação de macrófagos pode levar à sua polarização em, pelo menos, dois fenótipos distintos; o M1 ou classicamente ativado e o M2 ou alternativamente ativado ⁶⁰. A expressão dos marcadores CD14 e/ou CD16 tem sido usada para identificar monócitos, mas também para caracterizar as suas diferentes subpopulações ⁶¹. Existem outros marcadores que poderão ser igualmente utilizados dependendo a sua escolha do subconjunto de macrófagos a caracterizar e das condições do seu ambiente local. Contudo, existem muito poucos marcadores de macrófagos que sejam exclusivos e muitas vezes é necessário recorrer a vários para classificar de forma específica o seu tipo celular.

Existe um variadíssimo número de moléculas que caracterizam os monócitos. Nas tabelas 6 e 7, referimos os diferentes marcadores (CD) utilizados, referenciando algumas características estruturais e funcionais, como principais alvos celulares e efeitos biológicos.

Tabela 6 - Principais características dos CD 14 e 16 (Christian Weber;, 2016) ⁵⁹

CD	MON 1	MON 2	MON 3	ESTRUTURA MOLECULAR	PRINCIPAL EXPRESSÃO CELULAR	FUNÇÃO CONHECIDA OU PROPOSTA
14	++	++	+	53-55 kDa. Recetor LPS (LPS-R).	Monócitos, macrófagos, granulócitos (expressão fraca), células de <i>Langerhans</i> .	Liga o complexo LPS e a proteína de ligação a LPS; necessário para ativação de macrófagos induzida por LPS
16	-	+	++	50–65 kDa (recetores Fcγ-III)	Células NK, macrófagos, subpopulação de células T, timócitos imaturos e trofoblastos da placenta	Liga à região Fc da IgG; fagocitose e citotoxicidade celular dependente de anticorpos

Tabela 7 - Outros marcadores fenotípicos da polarização dos macrófagos ⁵⁶

TIPO DE ATIVAÇÃO	CD	ESTRUTURA MOLECULAR	PRINCIPAL EXPRESSÃO CELULAR	FUNÇÃO CONHECIDA OU PROPOSTA
Inflamatória	36	85-90 kDa (<i>scavenger receptor class B member 3</i>)	Plaquetas, monócitos, macrófagos, células endoteliais	Recetor eliminador de lipoproteínas de baixa densidade oxidadas; adesão plaquetária; fagocitose de células apoptóticas
	80	60 kDa; Superfamília Ig (proteína de membrana B7 tipo1)	Células dendríticas, células B ativadas e macrófagos	Liga CD28 e CD152; co estimulação da ativação de células T com CD86 quando ligado a CD28; inibe a ativação de células T quando ligado a CD152 (CTLA-4)
	86	80 kDa; Superfamília Ig (proteína de membrana B7 tipo2)	Células B, monócitos; células dendríticas; algumas células T	Co estimulador para ativação de linfócitos T; ligante para CD28 e CD152 (CTLA-4)
Anti-Inflamatória	163	130 kDa; glicoproteínas de cadeia única tipo I (recetor eliminador do complexo hemoglobina-haptoglobina)	Monócitos, macrófagos, células mieloides; alguns linfócitos; células estromais da medula óssea	Interação célula progenitor hematopoiética / célula-estromal; endocitose e depuração de complexos de hemoglobina / haptoglobina.
	206	162-175 kDa. MMR (recetor de manose de macrófagos), MRC1 (recetor de manose, lectina do tipo C);	Subconjunto de células mononucleares fagocíticas; células dendríticas imaturas; células endoteliais do fígado e da linfa.	Liga-se a glicoproteínas contendo manose; medeia a endocitose de macrófagos de glicoproteínas e a fagocitose de diversos antígenos

4.1.2.4. Monócitos CD14⁺/CD16⁻

População homogênea caracterizada pela expressão elevada do recetor de lipopolissacarídeo (LPSR), também conhecido como CD14⁶⁰; são frequentemente chamados como **monócitos “clássicos”**, dizem respeito a 80 - 90% dos monócitos circulantes e expressam níveis elevados do recetor de quimiocina C- tipo 2 (CCR2), da proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1), baixos níveis do recetor da fractalquina CX₃CR₁⁶¹ e classe II do Complexo Major de Histocompatibilidade (MHC)⁶². A estimulação *in vitro* com o antígeno Lipopolissacarídeo (LPS) produz IL - 10, que foi originalmente conhecida como um fator inibidor da síntese de citocinas e explica o seu papel predominante na supressão de citocinas pró - inflamatórias, como o TNF-α e a IL-1⁶³.

4.1.2.5. Monócitos CD14⁺/CD16⁺

Este subconjunto expressa simultaneamente os recetores CD14 e o CD16, (recetor que liga a região Fc das imunoglobulinas G, também conhecidos como recetores Fcγ-III)⁶⁴ e constitui apenas 10-20% dos monócitos circulantes, sendo referido como monócitos “não clássicos”. Em contraste com os monócitos CD14⁺/CD16⁻, expressam níveis elevados de **CX3CR1** e baixos de **CCR2**⁶⁵. O recetor CX3CR1 liga a molécula CX3CL1, ou fractalquina, que, além da sua forma solúvel, é expressa na superfície de células endoteliais ativadas e tem sido implicada na patogénese de doenças inflamatórias crónicas, como a aterosclerose, artrite reumatoide, e também na síndrome de imunodeficiência adquirida, devida à infecção por HIV⁶⁸. Quando estimulados *in vitro* com LPS, os monócitos CD14⁺/CD16⁺ produzem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 e TNF-α^{67,69} e muito pouca IL-10. Esses monócitos também expressam níveis muito mais elevados de proteínas MHC de classe II e, como tal, pode-se supor que têm um papel muito mais proeminente na apresentação de antígenos⁶⁶. Assim estes monócitos, passaram a ser conhecidos como monócitos “pró-inflamatórios” embora vários estudos demonstrarem que em pacientes com sepsis que apresentam infeções teciduais localizadas (ex. leishmaniose) ou mesmo noutras respostas inflamatórias agudas, esta subpopulação de monócitos possa apresentar proporções mais elevadas^{64,70,71}.

4.1.2.6. Monócitos CD14^{low}/CD16⁺⁺

Finalmente, existe uma subpopulação de monócitos CD14⁺/CD16⁺ que apresenta um perfil diferente. Devido a uma expressão caracteristicamente fraca de CD14, são denominados CD14^{low}/CD16⁺^{64,65}. São funcionalmente diferentes das outras células CD16⁺, uma vez que apresentam capacidade fagocítica reduzida e quando estimuladas *in vitro* com LPS, não produzem TNF-α nem IL-10. Esta subpopulação foi encontrada de forma significativa em pacientes com sepsis ou no seguimento dum cirurgia cardiovascular⁶⁶.

4.1.2.7. Recrutamento de monócitos

Conhece-se há muito que os macrófagos podem ser recrutados para áreas de inflamação a partir do *pool* de monócitos circulantes. Da mesma forma sabe-se, a partir do estudo das condições inflamatórias crônicas, como a aterosclerose ou a artrite reumatoide que existe mais do que um conjunto funcional de macrófagos ⁵⁵. A **fase inicial** caracteriza-se por citotoxicidade e uma cascata pró-inflamatória. Por outro lado, nos **estádios posteriores**, há uma ênfase na reparação e regeneração tecidual ⁶⁷. Embora se tenha tentado definir subconjuntos funcionais específicos de macrófagos, ainda não é claro que plasticidade existe entre eles. Resta também esclarecer se os macrófagos têm um destino final distinto ao apresentarem os seus sinais de citoquinas, ou se, por outro lado, exibem a capacidade de mudar de fenótipo caso haja alteração dos estímulos. No entanto, aceita-se que, em resposta a **citoquinas específicas** os macrófagos expressam propriedades funcionais especializadas e polarizadas e, conseqüentemente iremos apresentar a nomenclatura habitualmente mais usada para os descrever:

- **Macrófagos M1**, classicamente ativados que apresentam propriedades funcionais pró-inflamatórias;
- **Macrófagos M2**, ativados de forma alternativa e que estão associados a uma ação anti-inflamatória (Figura 8) ⁶⁸.
- Embora a nomenclatura dos macrófagos **M1/M2** possa ser útil, é claramente uma simplificação excessiva, pois representam apenas uma versão simplificada do que é certamente um espectro de fenótipos e de funções celulares ⁶⁹.

4.1.2.8. Tipo de polarização

Após a ligação ao endotélio e subsequente transmigração para a íntima, os monócitos diferenciam-se em macrófagos. A estimulação diferenciada de citoquinas polariza os macrófagos em direção a um fenótipo classicamente ativado designado por M1, ou alternativamente ativado designado por M2. Estes dois subconjuntos de macrófagos diferem na expressão do recetor da superfície celular e também exibem ações biológicas divergentes. Os macrófagos **M1** são chamados de inflamatórios, enquanto os macrófagos **M2** parecem desempenhar um papel na reparação/cicatrização tecidual ^{70,71}.

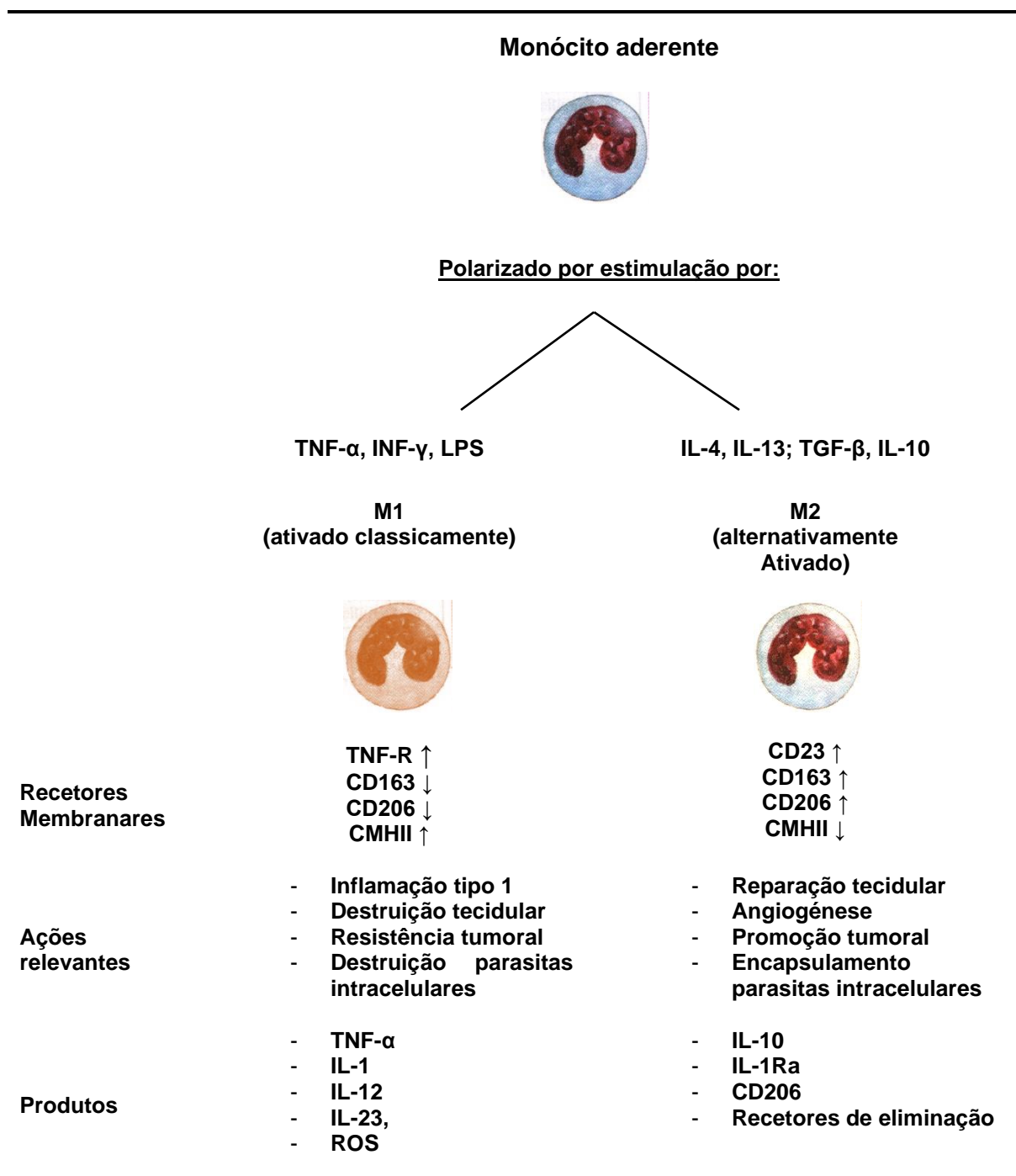


Figura 8 - Tipo de polarização dos macrófagos

A classificação fenotípica dos macrófagos em M1 e M2 é baseada em estudos *in vitro* com relevância ainda desconhecida para o que efetivamente ocorre *in vivo*⁷². Os macrófagos M1 e M2 “puros” quase certamente não ocorrem em lesões ateroscleróticas, onde os macrófagos são expostos a uma infinidade de estímulos que resultarão em diferentes expressões de marcadores de superfície celular⁷³. O ambiente lesional aterosclerótico foi caracterizado como sendo predominantemente pró-inflamatório do tipo Th1 com base em estudos de lesões

avançadas de endarteriectomia humana, em que o IFN- γ é mais abundante que a IL-4⁷⁴. No entanto, o paradigma M1/M2 continua ainda em reavaliação.

4.1.3. ATEROSCLEROSE E POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS

As lesões ateroscleróticas em humanos, bem como as desenvolvidas nos modelos animais, são entidades heterogêneas que contêm diversos tipos de células e um ambiente complexo de citocinas.^{75,76}

Wintergerst e colaboradores⁷⁷ demonstraram que a cultura de monócitos humanos em sacos revestidos com teflon contendo plasma autólogo e linfócitos T durante 14 dias, induzia a diferenciação de monócitos em macrófagos, dando origem a três subpopulações distintas baseadas na expressão dos recetores CD14, CD36 e LDL. Posteriormente, *Poston e Hussain*⁷⁸ realizaram um estudo em que demonstraram a heterogeneidade imuno-histoquímica dos macrófagos em lesões ateroscleróticas em humanos, concluindo que as suas propriedades poderiam estar ligadas a estádios de diferenciação e posicionamento na parede arterial, em relação ao local anatómico e ao fenótipo da lesão. Ao comparar estas descobertas com as observadas nos tecidos linfoides, observa-se que os **monócitos circulantes**, recentemente recrutados, podem ser diferenciados das células ditas **residentes**.

Cabe também referir que o recetor de hemoglobina CD163, é uma molécula associada a um fenótipo anti-inflamatório de macrófagos⁷⁹, em parte devido à sua indução pela IL-10 e heme oxigenase 1 (HO-1)⁸⁰.

Nas lesões ateroscleróticas, os **macrófagos CD163⁺** com pouca ou nenhuma acumulação de lípidos são observados nas extremidades da placa, enquanto os **esponjosos**, ricos em lípidos associados ao núcleo da placa, que aparecem nas lesões avançadas, são negativos ou fracamente positivos⁷⁹. Estes achados sugerem que, macrófagos recrutados recentemente apresentam um fenótipo **anti-inflamatório "M2"**, enquanto a transformação em esponjosos induz diferenciação para um **fenótipo "M1" pró-inflamatório**. Assim, células CD163^{High}/HLA-DR^{low} (antigénio leucocitário humano – Isotipo DR), são a subpopulação de macrófagos que preside em placas ateroscleróticas como resposta à **hemorragia intraplaca**⁸¹. Além disso, está implícito que o subconjunto CD163^{High} é de natureza anti-inflamatória e antioxidante, devido à sua reduzida produção de H₂O₂ e ao aumento da secreção de IL-10, definindo-se assim como ateroprotetor. Refira-se que, o antigénio CD16 foi proposto como um marcador de um subgrupo funcional de macrófagos⁸², capazes de participar em respostas imunitárias⁸³, mas também, nas lesões ateroscleróticas humanas estando correlacionados com a expressão de CD40/CD40L. Também se sabe que, os macrófagos da lesão aterosclerótica são heterogêneos e contêm subgrupos ativos em diferentes tarefas, por exemplo, endocitose, fagocitose, secreção de citocinas e respostas inflamatórias. Sendo o CD14 e o CD16 expressos diferencialmente entre duas populações referidas, estão dependentes de fatores

divergentes ⁸⁴. Assim, a citocina GM-CSF dá origem a um fenótipo anti-inflamatório que medeia o **transporte reverso de colesterol** e a migração a nível da parede do vaso. Por outro lado, o M-CSF (ou CSF-1) estimula os macrófagos que não possuem os genes ateroprotetores, mas expressam os pró-inflamatórios. Além disso, foi demonstrado que os macrófagos CD14⁺, semelhantes aos macrófagos M-CSF, predominam nas placas ateroscleróticas humanas; enquanto que os macrófagos CD14⁻, semelhantes aos macrófagos tratados com GM-CSF, são abundantes em áreas desprovidas de doença. Assim, a **hipercolesterolemia** e a incidência de **doença arterial coronária** estão associadas a um aumento no número de monócitos expressando CD14 e CD16 ^{82,84,85}. Além disso, os reguladores da hemostasia do colesterol, como o recetor do ativador do peroxissoma - γ (PPAR γ) e o recetor X do fígado- α (LXR- α) foram diferencialmente expressos entre as duas populações e ambos aumentaram com a diferenciação de GM-CSF. Curiosamente, *Bouhelle* e colaboradores ⁸⁶ relataram que o PPAR- γ estimula os monócitos humanos a diferenciarem-se em direção a um fenótipo anti-inflamatório (M2). Também é claro que, os macrófagos anti-inflamatórios M2 que residem em lesões ateroscleróticas humanas se correlacionam com a expressão do PPAR γ . *Chinetti et al* ⁸⁷, demonstraram que os macrófagos M2 induzidos pelo PPAR podem exercer efeitos anti-inflamatórios nos macrófagos pró-inflamatórios M1. A deficiência de GM-CSF aumenta também o tamanho da lesão e a acumulação de macrófagos em **murganhos hiperlipêmicos induzidos por dieta**, em parte devido à redução na expressão de PPAR γ ⁸⁸. Por outro lado, a deficiência de M-CSF resulta em aterosclerose diminuída ⁸⁸ e a expressão de M-CSF em macrófagos pode ser subregulada pelo PPAR γ ⁸⁹. Assim, é plausível que, fenótipos de macrófagos divergentes em lesões ateroscleróticas sejam dependentes do fator de crescimento e regulados via PPAR γ . De referir que os macrófagos diferenciados (anti-inflamatórios/GM-CSF) apresentam uma expressão muito aumentada do inibidor tecidual da matriz da metaloproteinase-3 (TIMP-3) em comparação com os macrófagos pró-inflamatórios tratados com M-CSF ⁸⁴. O TIMP-3 é capaz de inibir a atividade proteolítica de uma ampla gama de MMPs e está presente em placas ateroscleróticas humanas ⁹⁰. Embora muitas MMPs sejam amplamente expressas nas placas ateroscleróticas de todos os estádios, a MMP-11 é detetada exclusivamente em lesões avançadas ⁹¹. Tanto a MMP-7 como MMP-12 estão localizadas de modo justaposto entre o núcleo necrótico e os locais propensos a rupturas ⁹². O TIMP-3 é negativamente regulado e a MMP-14 positivamente, numa subpopulação de macrófagos esponjosos (coelhos e humanos) ⁹³. Este fenótipo apresenta propriedades pró-inflamatórias, incluindo aumento da degradação e invasão através da matriz extracelular e taxas proliferativas aumentadas, condicionando uma suscetibilidade à apoptose, sendo todos fatores potencializadores do desenvolvimento e instabilidade da placa, estrutura esta localizada na periferia do núcleo necrótico, onde a expressão da arginase-1, (marcador fenotípico pró-inflamatório M1), é concomitantemente

reduzida ⁹⁴. Como a expressão de TIMP-3 está associada aos diferenciados por GM-CSF, também classificados como M2 anti-inflamatórios e que estão inversamente relacionados com a gravidade da lesão aterosclerótica ⁸⁵, parece ser possível concluir que o subconjunto TIMP-3^{Low}/MMP-14^{high}, são do fenótipo M1.

4.2. RESPOSTA INFLAMATÓRIA VERSUS ANTI-INFLAMATÓRIA

4.2.1. GENERALIDADES

Quando as barreiras externas da imunidade inata são danificadas, as respostas resultantes duma infecção ou lesão tecidual podem induzir uma cascata complexa de eventos conhecida como **resposta inflamatória**. Esta pode ser **aguda** (efeitos a curto prazo, combatendo a lesão, e facilitando a cicatrização dos tecidos locais) - ou **crônica** (não resolvida, a longo prazo), contribuindo assim para situações como **aterosclerose**, artrite, doença inflamatória intestinal e diabetes tipo 2.

A resposta inflamatória tem como principal objetivo conter, e se possível eliminar o agente causal, bem como iniciar uma cascata de eventos com a finalidade da reparação da lesão tecidual ⁵⁶. Na fisiopatologia da resposta inflamatória, os principais mediadores são as **citoquinas**, proteínas libertadas pelas células do sistema imune que atuam como mensageiros químicos.

Existem citoquinas indutoras de inflamação (**pró-inflamatórias**), enquanto que outras atuam na contra regulação (**anti-inflamatórias**). Quando ocorre desequilíbrio entre os dois processos, ocorre uma sequência de eventos que têm por objetivo fazer com que essas citoquinas retornem aos seus valores normais, mantendo assim a homeostasia.

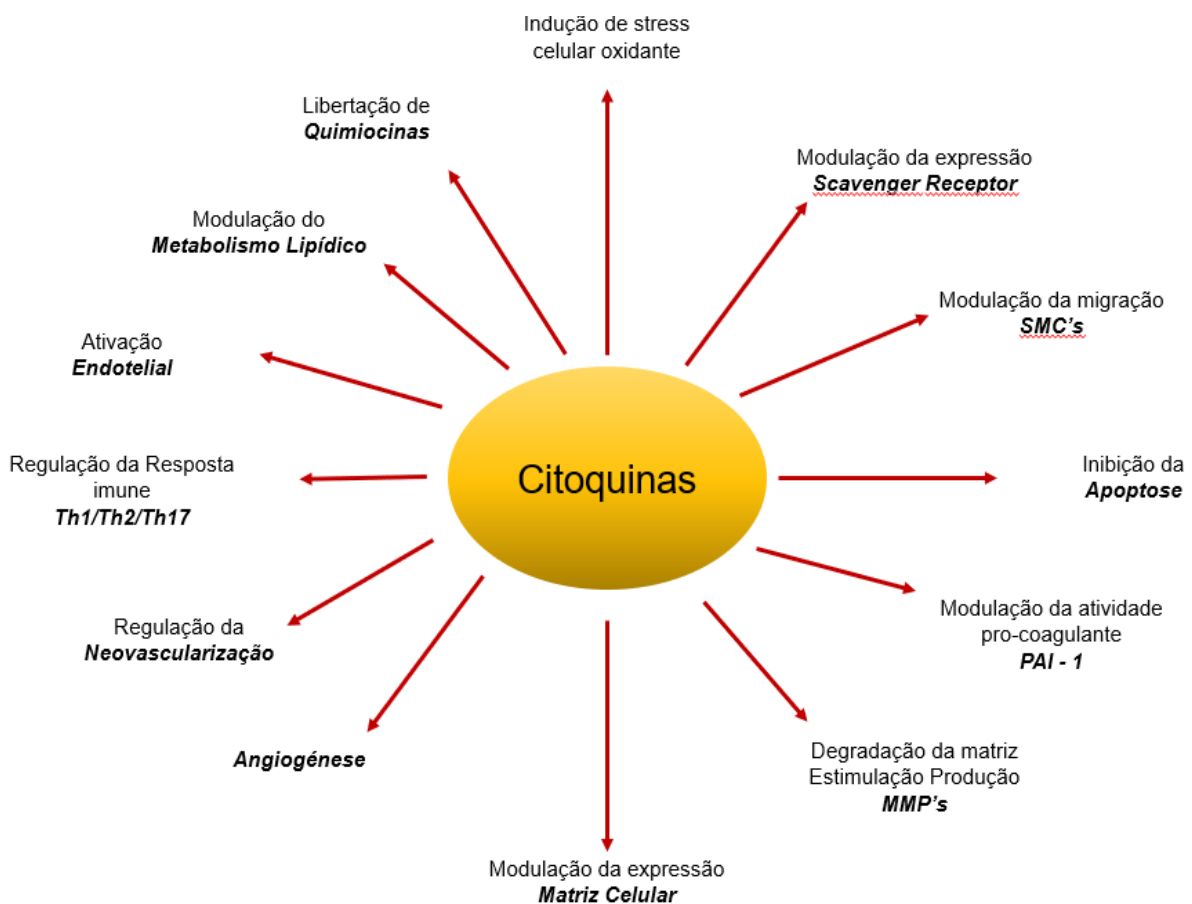
4.2.2. CITOQUINAS

As citoquinas desempenham um papel extremamente importante na imunologia clínica. Ativam e regulam uma grande variedade de células e tecidos envolvidos em respostas inatas, adaptativas e inflamatórias. Funcionam como hormonas proteicas do sistema imunológico, produzidas em resposta a estímulos e atuando numa grande variedade de alvos celulares ⁹⁵ e apresentam as seguintes características:

- Produzidas por células das diversas populações celulares leucocitárias, embora outros tipos de células possam produzi-los, como células endoteliais e epiteliais.
- A maioria das citoquinas atua nas células próximas à sua célula de origem (ação parácrina). Em algumas infecções graves, ou em outras condições inflamatórias, quantidades significativas de citoquinas podem entrar na circulação e atuar à distância, numa ação endócrina. Algumas citocinas têm também ação autócrina, atuando na célula que as produz.

- Citoquinas diferentes podem ter ações semelhantes, complementares ou funcionalmente únicas. Uma citocina pode estimular a produção de outras, criando cascatas que amplificam a reação ou induzem outras.
- As citocinas têm vários papéis: induzir a inflamação, promover as respostas das células leucocitárias em geral, ou limitar as respostas imunitárias, inatas ou adquiridas
- Muitas citocinas produzidas por células imunes inatas, como TNF, IL-17, IL-5 e IFN- γ , também são produzidas por linfócitos T em respostas imunes adaptativas ⁵⁰.

Figura 9 - Funções biológicas das citocinas



4.2.3. FAMÍLIAS DE CITOQUINAS

As citocinas podem ser agrupadas com base no fato de agirem nas células da resposta imune adaptativa, ou de promover/ inibir a inflamação ou ainda de acordo com a homologia estrutural dos seus recetores como de classe I ou classe II.

Apresenta-se na tabela 8, uma das possíveis classificações ⁹⁶.

Tabela 8 - Classificação das citocinas

	Família	Membros
Imunidade Adaptativa	Ligantes comuns da família do recetor da cadeia γ Ligantes comuns do recetor da cadeia β (CD131) Recetor compartilhado da cadeia IL-2 β (CD122)	IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21 IL-3, IL-5, GM-CSF- IL-2, IL-15 IL-13 (complexo IL-13R – IL-4R) TSLP (complexo TSLPR – IL-7R)
Sinalização pró-inflamatória	IL-1, IL-6, TNF α , IL-17 IFN tipo I, IFN tipo II, IFN tipo III,	IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , IL 36Ra, IL-37 e IL-1Hy2, IL-6, IL-11, IL-31, CNTF, CT-1, LIF, OPN, OSM, TNF α , TNF β , BAFF, APRIL, IL-17A-F, IL-25 (IL-17E), IFN α , IFN β , IFN ω , IFN κ , Limitina IFN γ IFN λ 1 (IL-29), IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B) TGF- β
Sinalização anti-inflamatória/reguladora	IL-12 IL-10	IL-12, IL-23, IL-27, IL-35 IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, IL-29

Abreviaturas:

APRIL, um ligante indutor de proliferação; **CNTF**, fator neurotrófico ciliar; **CT-1**, cardiotrofina-1; **GM-CSF**, fator estimulador de colônias de granulócitos; **IFN**, interferão; **LIF**, fator inibidor da leucemia; **OPN**, osteopontina; **OSM**, oncostatina M; **TNF α** , fator de necrose tumoral α ; **TGF- β** , factor de crescimento transformante beta; **TSLP**, linfopoiatina estromal do Timo

4.2.4. ATEROSCLEROSE E CITOQUINAS

A visão atual sobre os mecanismos da doença é que se inicia em resposta à acumulação de colesterol subendotelial e a fenómenos oxidativos, que estimulam respostas imunes inatas e adaptativas, levando à inflamação crônica a nível da parede arterial (Fig. 10).

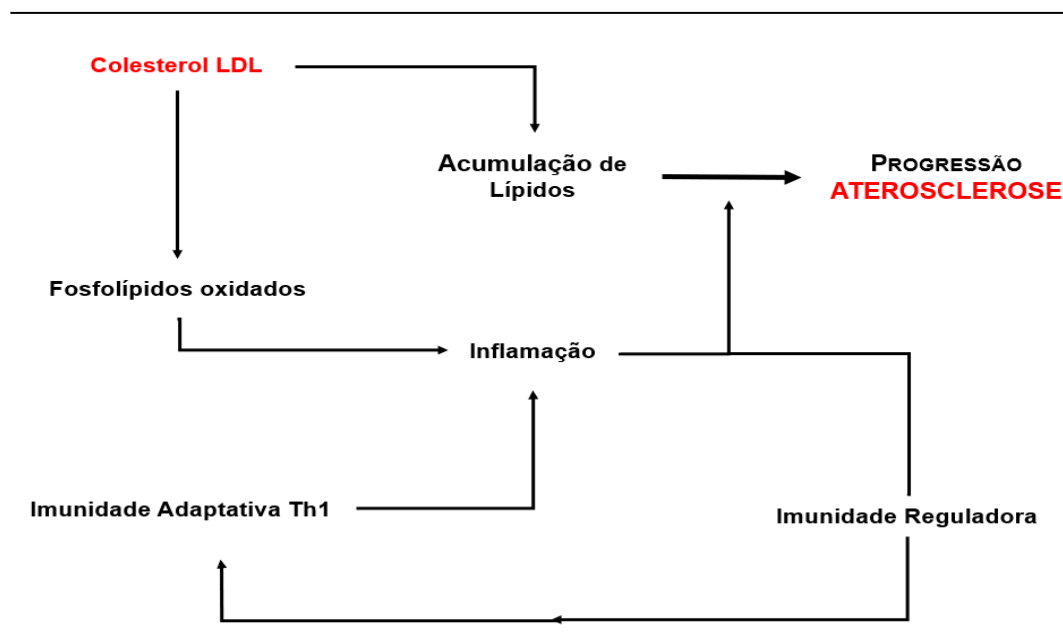


Figura 10 - O colesterol e a aterosclerose

As **placas ateroscleróticas** contêm pequenas populações de células B ativadas, mastócitos e células dendríticas, juntamente com células T ativadas e macrófagos, que estabelecem comunicação entre o sangue, a lesão aterosclerótica e os gânglios linfáticos regionais. Aceita-se que as células vasculares, as células endoteliais (ECs) e as células musculares lisas (SMCs) estão envolvidas no desenvolvimento da doença, mediando o recrutamento de leucócitos e a destruição da matriz extracelular, através da libertação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias.

As citocinas desempenham um duplo papel na aterosclerose: as pró-inflamatórias relacionadas com Th1, promovem o desenvolvimento e a progressão da doença, enquanto que as anti-inflamatórias e “reguladoras” estão relacionadas com as células T e exercem atividades anti aterogénica evidentes (Fig. 10) ⁹⁷. Na tabela 9 são apresentadas as citocinas que focamos mais detalhadamente no nosso estudo, referindo sucintamente não só a localização da sua síntese bem como os principais alvos celulares

Tabela 9 - Principais características das citocinas utilizadas no estudo ^{54 56}.

	Citoquina	Secreção	Principais alvos celulares e efeitos biológicos
Inflamatórias	IL-2	Células T ativadas	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Células T: Proliferação e diferenciação em células efetoras e de memória; promove o desenvolvimento, a sobrevivência e a função das células T reguladoras ➤ Células NK: - Proliferação, ativação
	IL-6	Macrófagos, células endoteliais, Células T	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Fígado: síntese de proteínas de fase aguda ➤ Células B: proliferação de células produtoras de anticorpos ➤ Células T: diferenciação Th17
	TNF-α	Macrófagos	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Ativação de células fagocitárias, choque endotóxico
	IFN-γ	Células T	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Ativação antiviral de macrófagos, aumenta a função de neutrófilos e monócitos, expressão de MHC-I e - II nas células
Anti-Inflamatórias	IL-4	Células T CD4+ (Th2), mastócitos	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Células B: Mudança de isotipo para células T IgE: diferenciação Th2, proliferação ➤ Macrófagos: Ativação alternativa e inibição da ativação clássica mediada por IFN-γ
	IL-10	Macrófagos, células T (principalmente células T reguladoras)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Macrófagos, células dendríticas: ➤ Inibição da expressão de IL-12, co estimuladores e MHC classe II

DOENÇAS CARDIOVASCULARES

5. DOENÇAS CARDIOVASCULARES (DCV)

5.1. DEFINIÇÃO

As doenças cardiovasculares são um grupo de patologias do coração e dos vasos sanguíneos e incluem:

- **Doença coronária cardíaca**
- **Doença cerebrovascular**
- **Doença arterial periférica**
- **Doença cardíaca reumática**
- **Malformações da estrutura cardíaca ao nascer;**
- **Trombose venosa profunda e embolia pulmonar** (coágulos sanguíneos nas veias das pernas, que podem desalojar e mover-se para o coração e os pulmões).

Iremos focar-nos essencialmente na vertente patológica respeitantes aos “ataques cardíacos” que são geralmente eventos agudos, causados principalmente por um bloqueio que impede que o sangue flua para o coração ou cérebro. A razão mais comum é a acumulação de depósitos de gordura na **íntima dos vasos sanguíneos que irrigam o coração**. Na génese dos ataques cardíacos estão geralmente presentes uma combinação de fatores de risco, como tabaco, excesso de álcool, dieta e/ou obesidade, inatividade física e, hipertensão, diabetes e hiperlipidemia ⁹⁸.

5.2. EPIDEMIOLOGIA

As Doenças Cardiovasculares mais frequentes são a Doença Coronária Cardíaca (DCC) e o Acidente Vascular Cerebral (AVC), sendo a principal causa de morte prematura nos países industrializados. Em 2010 estimou-se que tenham sido responsáveis por 15.6 milhões de mortes em todo o Mundo, representando cerca de duas vezes a mortalidade de causa oncológica e mais do que todas as doenças infecciosas, maternas, neonatais e nutricionais combinadas ⁹⁹. A estatística também demonstra que as DCV também são a principal causa de morte entre os europeus e que, apesar das reduções constantes nas taxas de mortalidade por DCV em todo o continente, cerca de 4 milhões de europeus ainda morrem destas patologias a cada ano (1.9 milhões na União Europeia).

Existe uma ampla variação geográfica nas taxas de mortalidade das DCV - a Europa Oriental e Central apresentam as taxas mais elevadas. sendo a principal causa de morte do sexo masculino em todos os países da Europa, com exceção de 12, e a principal causa de morte no sexo feminino em todos os países, excetuando dois ¹⁰⁰.

5.3. FATORES DE RISCO

Em termos globais, os fatores de risco dizem respeito às características pessoais, estilos de vida, mas também a fatores bioquímicas e fisiológicos. Alguns destes fatores são modificáveis, enquanto outros o não são de todo.

Na tabela 10, apresentam-se os principais fatores que são comumente aceites nas DCV.

Tabela 10: Fatores de risco das DCV

Estilos de vida	Tabagismo
	Excesso de consumo de álcool
	Dieta rica em gorduras saturadas e calorias, pobre em fruta e vegetais, rica em açúcar
	Inatividade Física
	Stress
	Obesidade
Características bioquímicas ou fisiológicas	Hipercolesterolemia
	Hipertrigliceridemia
	Valor do Colesterol HDL baixo
	Hipertensão
	Fatores trombóticos
Diabetes <i>mellitus</i>	
Fatores pessoais/familiares	Idade
	Género
	História pessoal
	História familiar

Fumar aumenta o risco de DCV. Um estudo efetuado no Reino Unido que decorreu num período de 50 anos, revelou que a mortalidade por DCV nestes indivíduos era 60% superior em relação aos não fumadores e que, cerca de metade de todos os fumadores habituais viriam eventualmente a sofrer um enfarte do miocárdio fatal ¹⁰¹.

Enquanto que o **consumo moderado de álcool reduz o risco**, a **ingestão exagerada aumenta-o**. A OMS estimava já em 2002 que, 2% das doenças coronárias e quase 5% dos AVC nos homens nos países desenvolvidos estariam relacionados com o álcool ¹⁰².

Hoje, é universalmente reconhecido que uma dieta nutricionalmente pobre (ingestão desequilibrada em relação aos diferentes grupos alimentares) aumenta o risco de doenças crónicas, particularmente DCV e cancro. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou em 2002 que, 30% das doenças coronárias e quase 20% dos acidentes vasculares cerebrais nos países desenvolvidos estavam relacionados com níveis de consumo de frutas e hortaliças

abaixo das 600 g/dia (World Health Organization, 2002). Contudo não está completamente esclarecida qual a taxa das DCV que são provocadas por outros fatores dietéticos, tais como a elevada ingestão de sódio ou de gorduras saturadas.

As pessoas que são fisicamente ativas - atividade aeróbica - têm um risco menor de DCV. Estima-se que mais de 20% das doenças coronárias e que 10% dos acidentes vasculares cerebrais (AVC) nos países desenvolvidos, estejam relacionados com a inatividade física ¹⁰². Igualmente, o sobrepeso e a obesidade aumentam o risco de DCV. Contudo a obesidade, para além de ser um fator de risco independente, também é igualmente fator de risco para hipertensão, hipercolesterolemia, diabetes e a intolerância à glicose ^{102,103}. Os efeitos adversos do excesso de peso são mais pronunciados quando a gordura está concentrada a nível abdominal. Cerca de um terço das DC e AVC isquémico, em países desenvolvidos, estão relacionados com o índice de massa corporal (IMC) acima de 21 kg/m² ¹⁰². Igualmente, o risco de DAC também está diretamente relacionado aos níveis de colesterol no sangue. A OMS estima que mais de 60% das DAC e cerca de 40% dos AVC isquémicos nos países desenvolvidos sejam devidos a níveis de colesterol total superiores 3,8 Mmol/l (\pm 150 mg/dl)

¹⁰².

5.4. ATEROSCLEROSE

A **aterosclerose** é a patologia subjacente à DCV e define-se, como uma resposta inflamatória proliferativa a múltiplas formas de lesão endotelial, tendo sido esta hipótese proposta por *Russell Ross* em 1977 ¹⁰⁴ e aperfeiçoada e desenvolvida desde então.

Esta patologia é complexa e caracteriza-se pela participação ativa de inúmeros componentes fisiológicos, desde células da parede do vaso e do sistema imunitário até inúmeros outros fatores moduladores. Como referido, é consequência de alterações das lipoproteínas plasmáticas e de outros fatores, desde genéticos até alterações da hemodinâmica do fluxo sanguíneo a nível dos vasos arteriais.

Têm sido vários os modelos usados no estudo da aterosclerose:

- Os **modelos animais** são os mais frequentemente utilizados por poderem mimetizar as condições fisiopatológicas. Não existe um modelo que seja ideal. Nestes modelos utilizam-se principalmente primatas não humanos, porcos, coelhos e murinos. Pela facilidade relativa de manipulação e pelo prazo relativamente curto para o desenvolvimento da lesão, os murinos são muito utilizados. A facilidade de transgénese (*knockout* ou *knockin* de genes) assim como a expressão condicional de genes, também torna útil a sua utilização ¹⁰⁵.
- Os **modelos que analisam alterações ateroscleróticas em vasos** que foram removidos por cirurgia reparadora a partir de vasos lesionados (endarterectomia), permitem a recolha e até a cultura das células, mas estas são fenotipicamente e

funcionalmente não idênticas às primárias. Assim os estudos *in vitro* são importantes para a caracterização do estadio inicial da aterosclerose embora não analisem a interação celular e a influência das cascatas inflamatórias das lesões ateroscleróticas ¹⁰⁶.

- Finalmente os **modelos clínicos**, que permitem constatar alguns determinantes do perfil bioquímico e/ou inflamatório e/ou de marcação de células do sistema do SI, Contudo, apresentam a desvantagem óbvia de se tratar de um sistema sistêmico enquanto que na prática se trata de um fenómeno que é iminente local e também porque a incidência e a natureza da aterosclerose em humanos são afetadas, em geral, pela coexistência de outras doenças inflamatórias, tais como obesidade, diabetes e a doença renal crónica assim como doenças autoimunes (lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide) ¹⁰⁵.

5.4.1. ESTRUTURA E FUNÇÃO DOS VÁRIOS TIPOS DE VASOS

Os **vasos sanguíneos** apresentam calibres variados, constituindo um sistema, através do qual o sangue libertado do coração para os tecidos, volta de novo ao coração. Assim o oxigénio dos pulmões, os nutrientes captados a nível intestinal e do fígado bem como substâncias reguladoras, (hormonas), são distribuídos a todos os órgãos e tecidos. Os produtos do catabolismo também são recolhidos pela circulação e transportados para órgãos como pulmões e rins para eliminação.

Embora os vasos sanguíneos difiram em **tamanho, distribuição, e função**, estruturalmente apresentam um determinado número de características em comum.

Iremos focalizar neste estudo essencialmente o tipo de vasos que no contexto das DCC representam uma influência primordial na génese da aterosclerose.

As **artérias** são vasos em que à medida que se afastam do coração, sofrem sucessivas divisões em vários ramos diminuindo de calibre.

Distinguem-se três principais tipos de artérias (Tabela 9):

- **Elásticas** ou grandes condutoras;
- **Musculares** ou distribuidoras de tamanho médio;
- **Arteriolas** de pequeno calibre.

Os **capilares** por sua vez, são as mais pequenas unidades funcionais do sistema vascular e inserem-se na transição entre os sistemas arterial e venoso ¹⁰⁷.

As **paredes dos vasos** sanguíneos em geral, são constituídas por **três túnicas principais** que variam na aparência e funções nas várias partes do sistema circulatório e resultam de alterações dessas túnicas por redução e/ou omissão. Assim a sua parede, considerado de dentro para fora, consiste numa **túnica íntima**, seguida da **túnica média** e finalmente da **adventícia**.

A **íntima** é contínua com o endocárdio e consiste num endotélio de células achatadas escamosas que repousa sobre uma lâmina basal e é suportado por um tecido conjuntivo subendotelial.

A túnica **média** é a camada mais variável em tamanho e estrutura e dependendo da sua função pode conter quantidades variáveis de músculo liso e tecido elástico.

A **adventícia** também varia em espessura nas diferentes partes do sistema vascular, consistindo principalmente em tecido conjuntivo colagénico, carecendo contudo de células mesoteliais ¹⁰⁸.

Apresentam-se na tabela 11 as mais relevantes características dos vasos relacionados com o processo aterosclerótico ¹⁰⁹.

Tabela 11 - Tamanho, características e funções das artérias

Tipo de artéria	Ø aproximado	Íntima	Média	Adventícia	Função
Elásticas	> 10 mm	Endotélio; tecido conjuntivo com músculo liso	Muitas lamelas elásticas alternando com músculo liso	Tecido conjuntivo, mais fino que a média, com <i>vasa vasorum</i>	Conduzir o sangue a partir do Coração sob pressão constante
Musculares	10 – 1 mm	Endotélio; tecido conjuntivo com músculo liso, lâmina elástica interna proeminente	Muitas camadas de músculos liso com muito menos material elástico	Tecido conjuntivo, mais fino que a média; <i>vasa vasorum</i> talvez presente	Distribuir sangue a todos os órgãos e manter firme pressão sanguínea e fluir com vasodilatação e constrição
Pequenas artérias	1 -0.1 mm	Endotélio; tecido conjuntivo e menos músculo liso	3-10 camadas de liso músculo	Tecido conjuntivo, mais fino que a média; sem <i>vasa vasorum</i>	Distribuir sangue para as arteríolas, ajustando fluxo com vasodilatação e constrição
Arteríolas	100 – 10 µm	Endotélio; sem tecido conjuntivo ou músculo liso	1 - 3 camadas de liso músculo	Camada muito fina de tecido conjuntivo	Resistir e controlar fluxo sanguíneo para capilares; principal determinante da pressão sangue sistêmica
Capilares	10 – 4 µm	Só endotélio	Apenas alguns pericitos	Nenhum	Troca de metabolitos por difusão de e para as células

5.4.2. FISIOPATOLOGIA

A **hipercolesterolemia** é considerada um dos principais fatores desencadeantes da aterosclerose ¹¹⁰. O aumento dos níveis de colesterol plasmático resulta em alterações da **permeabilidade arterial endotelial** que permitem a migração de lípidos, especialmente partículas de **LDL-c**, para a parede arterial ¹¹¹. Os monócitos em circulação aderem às células endoteliais que expressam moléculas de adesão, como *Vascular cell adhesion protein 1* (VCAM-1), *selectinas* e, conseqüentemente, migram via diapedese no espaço subendotelial ¹¹²⁻¹¹³. Uma vez no espaço subendotelial, os monócitos adquirem características de **macrófagos** e convertem-se em **macrófagos esponjosos** ^{114,115}. As partículas de LDL no espaço subendotelial oxidadas têm propriedades quimio atragentes ¹¹⁶. Estes processos apenas aumentam a acumulação de colesterol intracelular através da expressão de recetores sequestradores por macrófagos (SR-A, SR-B1, CD36, CD68, fosfatidil-serina e LDL oxidada), que ligam lipoproteínas nativas, modificadas e fosfolipídios aniônicos ¹¹⁷. O resultado é uma cascata de alterações vasculares (Fig. 11). As sequelas clínicas da aterosclerose são vasos estreitados com aparecimento de sintomas (angina de peito) e síndromes coronárias agudas, devido à instabilidade da placa. A maioria dos trombos coronários é causada por rutura (55-65%), seguida por erosões (30-35%) e, menos frequentemente, por nódulos calcificados (2-7%) ^{112,118}. As placas propensas a rotura, contêm geralmente uma camada grande, macia e rica em lípidos. Outras características comuns incluem remodelação expansiva, núcleo necrótico com placa fibrosa fina, hemorragia da dita, neovascularização, inflamação da adventícia e calcificações "irregulares". Placas vulneráveis contêm monócitos, macrófagos e células T, sendo estas últimas que promovem a sua através de seus efeitos nos macrófagos ¹¹⁹.

As lipoproteínas LDL-c, TG e HDL-c emergiram como preditores independentes de doença aterosclerótica após a análise dos dados do *estudo Framingham* ^{120,121}. Enquanto o papel de outros parâmetros está sendo investigado, o TC, o LDL-C e o HDL-C permanecem até hoje a pedra angular na estimativa do risco para futuros eventos ateroscleróticos. O HDL-C baixo (<40 mg/dl), bem como o elevado (>90 mg/dl) demonstraram ser fortes preditores independentes de aterosclerose precoce ^{122, 123} e estão incluídos na maioria dos índices de estimativa do risco.

A hipertrigliceridemia demonstrou ser um fator de risco independente para doença cardiovascular. Além disso, altos níveis de TG são frequentemente associados a níveis baixos de HDL-C e elevados de pequenas partículas densas de LDL (passíveis de sofrerem modificações oxidativas) ¹²³.

5.4.3. SUCESSÃO DE EVENTOS NA ATEROSCLEROSE

O processo aterosclerótico tem início precoce e compreende uma sucessão de eventos que incrementam a gravidade da lesão até ao momento final da formação do trombo e oclusão do vaso (figura 11). As **lesões precoces** da aterosclerose consistem na acumulação subendotelial de macrófagos esponjosos. Essas lesões chamadas **estrias amarelas** geralmente podem ser encontradas na **aorta na primeira década de vida**, nas **artérias coronárias na segunda década** e nas **artérias cerebrais na terceira ou quarta décadas**. Devido às diferenças na dinâmica do fluxo sanguíneo, existem locais preferidos para a formação de lesões nas artérias. Por si só, não são clinicamente significativas, mas são precursoras de lesões mais avançadas, caracterizadas pela acumulação de detritos necróticos ricos em lipídios e células musculares lisas (SMCs). Tais lesões fibrosas normalmente têm uma 'capa fibrosa' consistindo em SMCs e uma matriz extracelular que encerra um 'núcleo necrótico' rico em lipídios. As placas podem-se tornar cada vez mais complexas, com calcificação, ulceração na superfície luminal e hemorragia dos neovasos que crescem na lesão a partir do meio da parede dos vasos sanguíneos. Embora lesões avançadas possam bloquear o fluxo sanguíneo, a complicação clínica mais importante é uma oclusão aguda devido à formação de um trombo ou coágulo sanguíneo, resultando em **infarto do miocárdio** ou **acidente vascular cerebral** que ocorre num vaso de menor dimensão. Geralmente, a trombose está associada à rutura ou erosão da lesão ¹²⁴. Resumem-se na figura 11 e na tabela 12, a evolução do processo aterosclerótico, as características de cada fase assim como os elementos envolvidos.

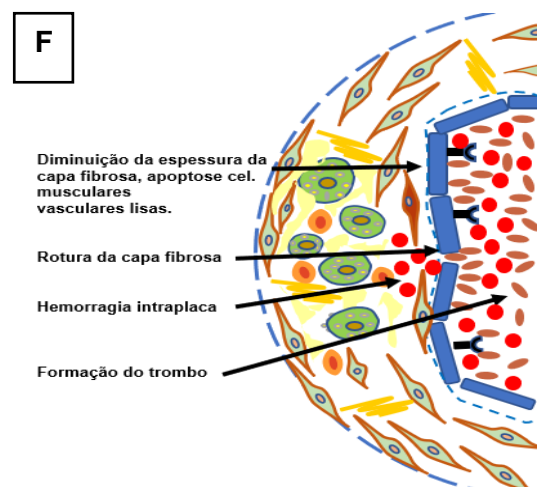
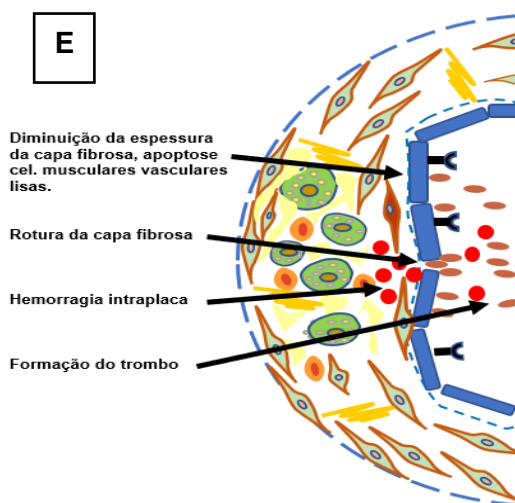
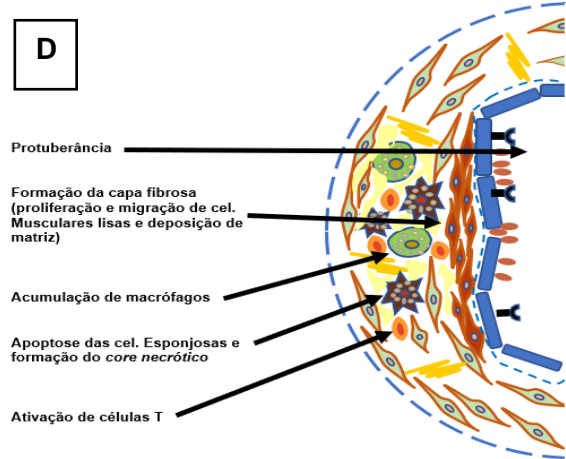
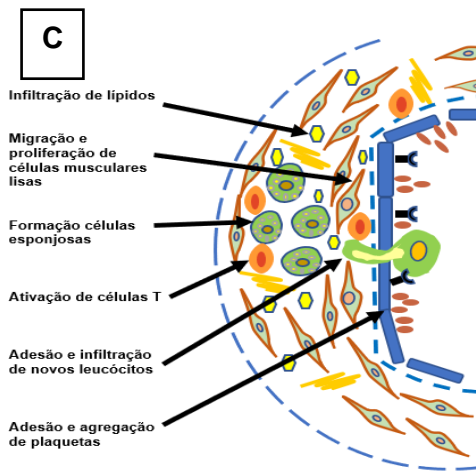
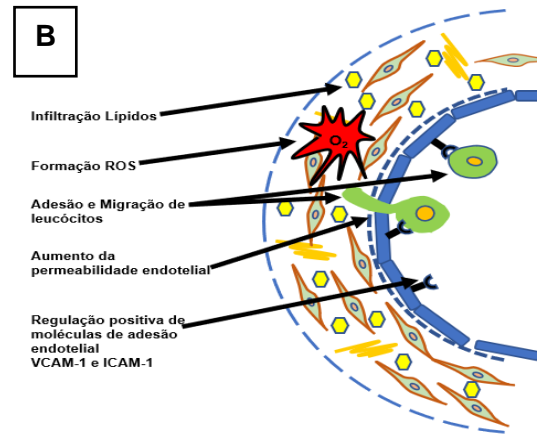
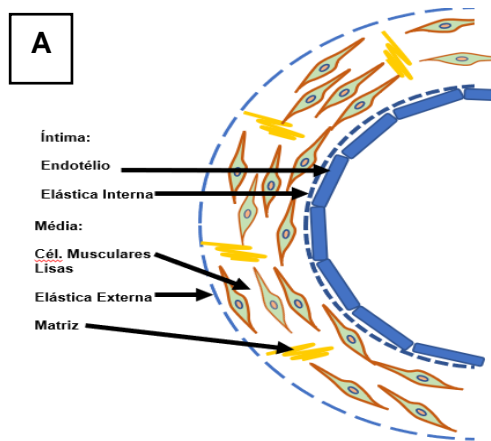


Figura 11 - Evolução da lesão aterosclerótica

A - Início da disfunção endotelial; **B** - Infiltração de Lípidos; **C** - Placa estável; **D** - Placa instável; **E** - Hemorragia intraplaca; **F** - Ruptura da placa e formação do trombo.

Tabela 12 – Alterações sucessivas da íntima no processo aterosclerótico

MODIFICAÇÕES VASCULARES	CARACTERÍSTICAS	MECANISMO	ALTERAÇÕES MOLECULARES SUBJACENTES
Disfunção endotelial	Diminuição da espessura camada SMCs Artérias: coronária, carótida, aorta abdominal e descendente e ilíaca	Níveis elevados de LDLox => infiltração lípidos adesão e migração de leucócitos, aumento da permeabilidade endotelial	Regulação positiva de VCAM-1 e ICAM-1, ROS, quebra de produção de NO (< BH4), deficiência em HO-1
Inflamação. Formação de estrias amarelas. Placa estável	Início da protuberância luminal;	Continuação infiltração de lípidos, migração e proliferação de SMCs, formação de células esponjosas, adesão e migração de novos leucócitos, ativação células T e adesão e agregação plaquetária.	Ação dos TCRs no reconhecimento LDLox; Expressão de P-selectina e integrinas (VCAM-1 e ICAM-1); MCP-1 (CCL-2), CXCL9, CXCL10 e CXCL11 (monócitos e linfócitos) Produção de citocinas: TNF- α ; IFN- γ , IL-1, IL-2 e IL -18. Síntese de MMP's (macrófagos).
Placa instável	Protuberância luminal consolidada	Formação da capa fibrosa (proliferação e migração SMCs) com deposição de matriz; ativação de células T; continuação da adesão e agregação plaquetária e formação de macrófagos esponjosos e apoptose => <i>core necrótico</i> .	Produção de M-CSF; continuação da síntese de MMP's (macrófagos).
Rotura da placa	Início da hemorragia	Diminuição da espessura e início da rotura da capa fibrosa; Hemorragia intraplaca e formação do trombo.	Produção pelos macrófagos de proteases extracelulares como serinas e catepsinas; Síntese de plasmína (degradação da fibrina) e continuação da síntese de MMP's.
Formação do trombo (infarto)	Trombo intraluminal	Rotura definitiva da capa fibrosa, hemorragia e trombo intraluminal	Síntese de proteína quinase C e proteases de mastócitos

Abreviaturas:

SMC'S: células musculares lisas; **LDLox:** Lipoproteína de baixa densidade oxidada; **VCAM-1:** molécula de adesão celular vascular 1; **ICAM-1:** Molécula de Adesão Intercelular 1; **ROS:** espécies reativas de oxigênio; **NO:** óxido nítrico; **BH4:** tetra-hidro-biopterina; **HO-1:** heme oxigenase-1; **TCR'S** recetores tipo *Toll*; **MCP-1:** Proteína-1 quimioatractante de monócitos; **CCL-...:** ligante...de citocina; **MMP'S:** metaloproteinases; **M-CSF:** Fator estimulador de colónias de macrófagos.

OBJETIVO

6. OBJETIVO

O objetivo do estudo consistiu em determinar uma possível relação entre excesso de peso/obesidade como situação clínica comportando uma componente inflamatória crônica numa população infantil, utilizando como fatores de comparação clínicos (antropometria e bio impedância) e bioquímicos (essencialmente quantificação de citoquinas e Macrófagos M1 e M2), comparativamente com os indivíduos considerados como “normais”.

HIPÓTESE NULA

Não é possível evidenciar qualquer diferença nos fatores enunciados entre os dois grupos da população em estudo.

MATERIAIS E MÉTODOS

7. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1. TIPO DE ESTUDO

Descritivo transversal quanto ao método e observacional analítico de caso-controlo quanto à natureza.

7.2. POPULAÇÃO-ALVO

Este estudo faz parte de um projeto mais abrangente realizado entre 2009 e 2013 em que participei, sendo que o mesmo consistiu na avaliação sobre o ponto de vista clínico (antropometria e bio impedância), bioquímico e genético de uma população infantil pré-pubertária, segundo os critérios definidos por *Tanner e Whitehouse*¹²⁵ de 9 anos de idade à data do período escolar (Setembro a Junho). De notar que, a idade cronológica exata foi calculada em dias subtraindo a data de nascimento à data de examinação^{16 126 127}.

No decurso deste trabalho, constatou-se que para muitas crianças que apresentavam valores de antropometria perfeitamente normais, a grande maioria apresentava pelo menos uma variável do perfil lipídico alterada, o que pode consubstanciar a presença de dislipidemia precoce. Tal levou a questionar se, sendo a aterosclerose um processo que se inicia na infância e que tem um percurso que se agrava com a idade, já teria nesta faixa etária alguma alteração que fosse detetável ao nível das transformações que ocorrem na formação da placa aterosclerótica.

O presente trabalho foi iniciado no ano civil de 2012/2013. Do total de 89 escolas da região de Lisboa e Vale do Tejo selecionadas foram selecionadas 200 crianças para se efetuar simultaneamente os parâmetros clínicos e bioquímicos previstos no projeto, ao que se acrescentou a análise de alguns marcadores de macrófagos e a quantificação de algumas citoquinas no soro (inflamação/anti-inflamação).

7.2.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Casos:
 - Crianças com IMC > P97
- Controlos
 - Crianças com IMC \geq P3 e \leq P97

7.2.2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Casos e Controlos

- Crianças que apresentem patologias que influenciem o seu estado nutricional ou metabólico;
- Crianças obesas de causa genética, metabólica ou iatrogénica;

- Crianças com doença sistémica e/ou com diagnóstico molecular de hipercolesterolemia familiar.

7.3. PARÂMETROS CLÍNICOS

7.3.1. AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CORPORAL

As crianças foram medidas descalças, apenas com roupa interior e principalmente no período da manhã. O modelo de registo utilizado para avaliação da composição corporal é apresentado no Anexo 7.

7.3.1.1. Análise Antropométrica

➤ Índice de Massa Corporal (IMC)

IMC = Peso [quilogramas (kg)] /altura [metros (m)]²

Na avaliação da corpulência foram utilizadas as curvas francesas pela vasta experiência na sua utilização. De notar que estas na utilização em clínica integram também as da *World Obesity Policy and Prevention* (anteriormente denominada de *International Obesity Task Force – IOTF*) (figura 12) ³⁸.

A categorização das crianças foi efetuada em dois grupos de corpulência: normal e com excesso de peso/obesidade a partir do cálculo do z-score do IMC (z-IMC) ³⁹.

➤ **Peso** ¹²⁸

Utilizou-se uma balança digital com display separado (Seca 899, Hamburgo, Alemanha), com uma capacidade até 250 kg e uma precisão de ± 50 gramas (g). A balança era colocada em superfície plana, dura e a nível, e os valores das pesagens anotados em kg, com um rigor de ± 100g.

➤ **Estatura** ¹²⁸

Utilizou-se um estadiómetro portátil com base separada (Seca 217, Hamburgo, Alemanha). O aparelho era colocado numa superfície plana e fazendo um ângulo de 90° em relação ao plano do chão. A criança era posicionada de pé, com os calcanhares juntos e fazendo um ângulo de 45°; as nádegas, omoplatas e cabeça em contacto com a haste do aparelho; membros superiores pendentes, palmas das mãos olhando para dentro e dedos verticais. Posicionamento da cabeça segundo o plano de Frankfurt. Observador com os olhos a nível da zona de medida. A medição era realizada no final de uma inspiração profunda, expressa em centímetros (cm) e com rigor até ± 1 milímetro (mm). A medição foi realizada em duplicado tendo sido registado o maior valor.

➤ Perímetros

Utilizou-se uma fita métrica apropriada, flexível e não elástica (Seca 203, Hamburgo, Alemanha) e o valor da medida era expresso em cm com rigor até ± 1 mm. Todas as medições foram realizadas em duplicado tendo sido utilizado o valor médio.

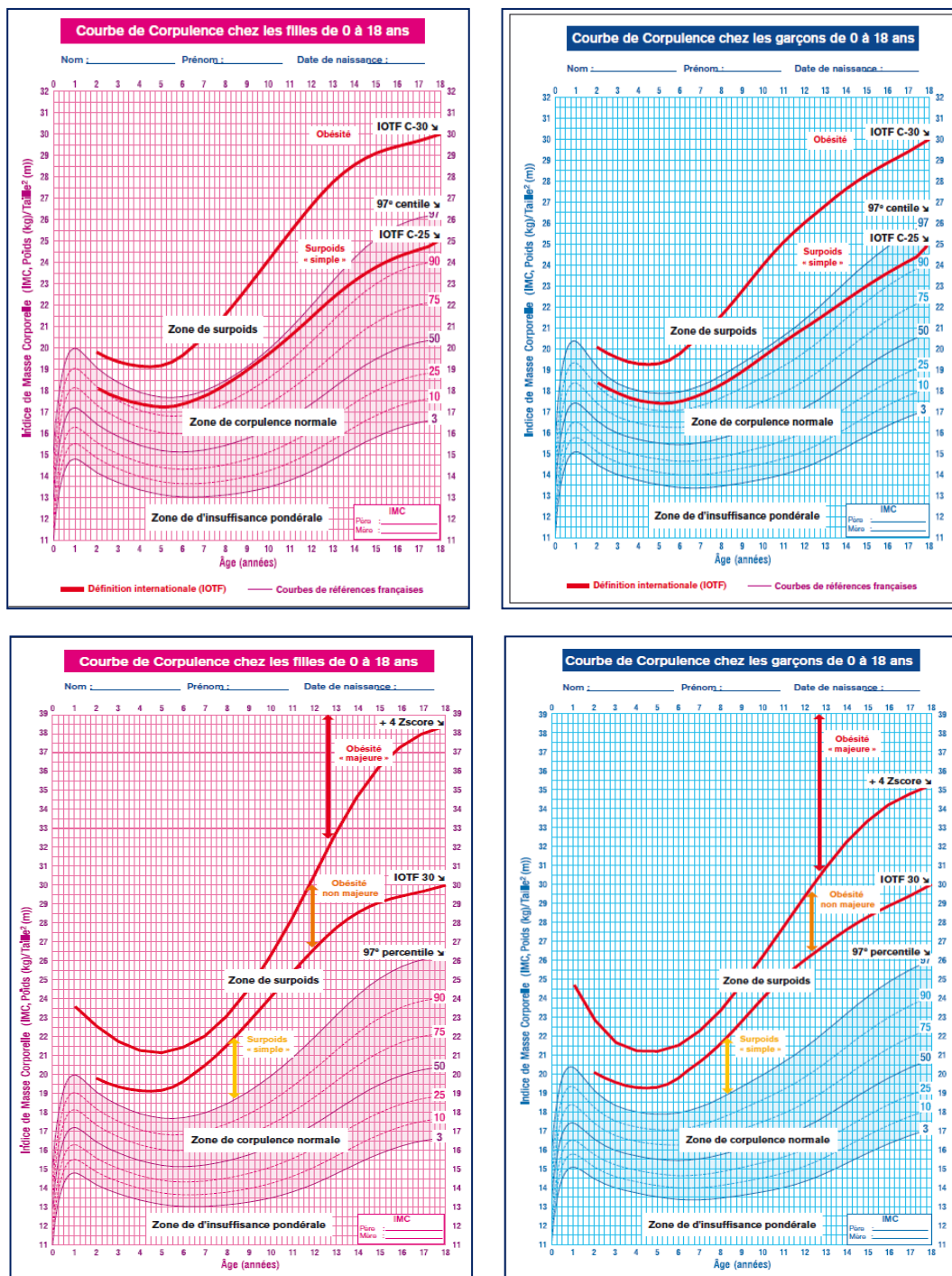


Figura 12 - Curvas de corpulência com z-score (feminina e masculina).

- **Braço**¹²⁸

A medição por convenção foi efetuada à esquerda. A criança era posicionada sentada, com antebraço fletido em ângulo reto e repousando nas coxas. A Fita métrica aplicada a meia distância entre o acrómio e o olecrânio (a fita de medida apoia-se, mas não esmaga os tecidos).

- **Abdominal**¹²⁹

A medida era efetuada com a criança de pé, com os membros superiores pendentes, palma da mão olhando para dentro e dedos verticais. A fita métrica era aplicada a nível do umbigo. A medição era realizada no final de uma expiração normal.

- **Anca**¹²⁸

Criança de pé com membros superiores pendentes, palmas das mãos olhando para dentro, dedos verticais. A fita métrica era aplicada a nível da anca no ponto do seu maior diâmetro e horizontalmente. Ao contrário das outras medições, neste perímetro foi registado o de maior valor.

- **Perna**¹²⁸

Criança sentada com as pernas na vertical e pés na horizontal sem tensão muscular. Medição à esquerda, nas região dos gémeos no ponto de maior diâmetro.

- **Relação Perímetro Abdominal / Estatura**
- **Relação Perímetro Abdominal / Perímetro da Anca**
- **Pregas Subcutâneas**¹³⁰

As pregas foram medidas utilizando *Harpender Skinfold Caliper* – 0120 (West Sussex, Reino Unido) com a precisão de $\pm 0,5$ mm. A leitura que registada correspondeu à primeira paragem da agulha (1-2 segundos do início da compressão da prega). A medição foi feita em duplicado tendo sido utilizado o valor médio obtido. Todas as pregas foram medidas por um único observador.

- **Prega Tricipital**¹³⁰

Criança sentada com braço esquerdo fletido a 90°. Medição a meia distância entre o acrómio e o olecrânio. Segurar o *Caliper* perpendicularmente à prega a realizar com a mão direita e realizar essa prega entre polegar e indicador da mão esquerda (pele mais tecido subcutâneo adiposo) a cerca de 2 cm acima da zona marcada para aplicar as pinças do aparelho. A pressão exercida não deve variar mais de 2 g/mm².

- **Prega Subescapular**¹³⁰

Técnica idêntica à anterior. Medição num ponto situado imediatamente por baixo e para fora da extremidade inferior da omoplata. A direção da prega a realizar deve apresentar uma inclinação aproximada de 45° em relação à coluna vertebral.

7.3.2. BIO IMPEDÂNCIA

O método utilizado para medir a composição corporal foi o da bio impedância. O aparelho utilizado foi validado em crianças de um grupo etário semelhante utilizando a ressonância magnética ¹³¹.

Monitor Omron BF 511 (Omron HelaThcare, CO, Quioto, Japão) Monofrequência (50 kilohertz e 500 miliamperes), tetrapolar (8 sensores) ¹³¹.

De notar que existem outros aparelhos multifrequência (50-200 Kilohertz), mas como apenas se pretendia efetuar a determinação da % de gordura, esta será sempre efetuada através da medição da água extracelular e seja qual for o aparelho que se utilize, esta medição será sempre efetuada empregando esta intensidade de corrente. Para se obter o valor da % de gordura, os aparelhos mediante a introdução de alguns parâmetros recorrem à **Equação de Schofield** para a sua determinação.

Possibilidade de se determinar o peso, a percentagem (%) de massa gorda, a % músculo-esquelético (nas duas medições o erro padrão foi de aproximadamente 3.5%), o IMC e as calorias em repouso [quilocaloria (kcal)/dia] (erro padrão: 120 kcal).

➤ **Técnica:**

Tendo em conta os constrangimentos existentes na observação das crianças, que obrigatoriamente teriam de ser efetuadas durante o horário escolar, optou-se por se realizarem antes da hora do almoço e sempre com o intervalo mínimo de 2-3 horas após o pequeno-almoço. Para se otimizarem os resultados, utilizaram-se compressas embebidas em álcool a 70%, para se estabelecer um melhor contacto entre as palmas das mãos e as plantas dos pés e os sensores. Sendo fundamental um correto posicionamento, cada pé da criança era assente no devido sensor. Antes de efetuar a medição comprovava-se que a criança se encontrava na vertical, com os joelhos em extensão, o dorso vertical, a cabeça e braços na horizontal com os cotovelos a realizarem um ângulo de 90° com o corpo. As pegadas dos sensores da unidade do visor deveriam ser seguras com as mãos tendo o cuidado das palmas pressionarem firmemente esses sensores e de modo a que o polegar e o indicador se localizassem do lado interno do visor e o anelar e mínimo no lado exterior (figura 13), após o que se procedia à medição.

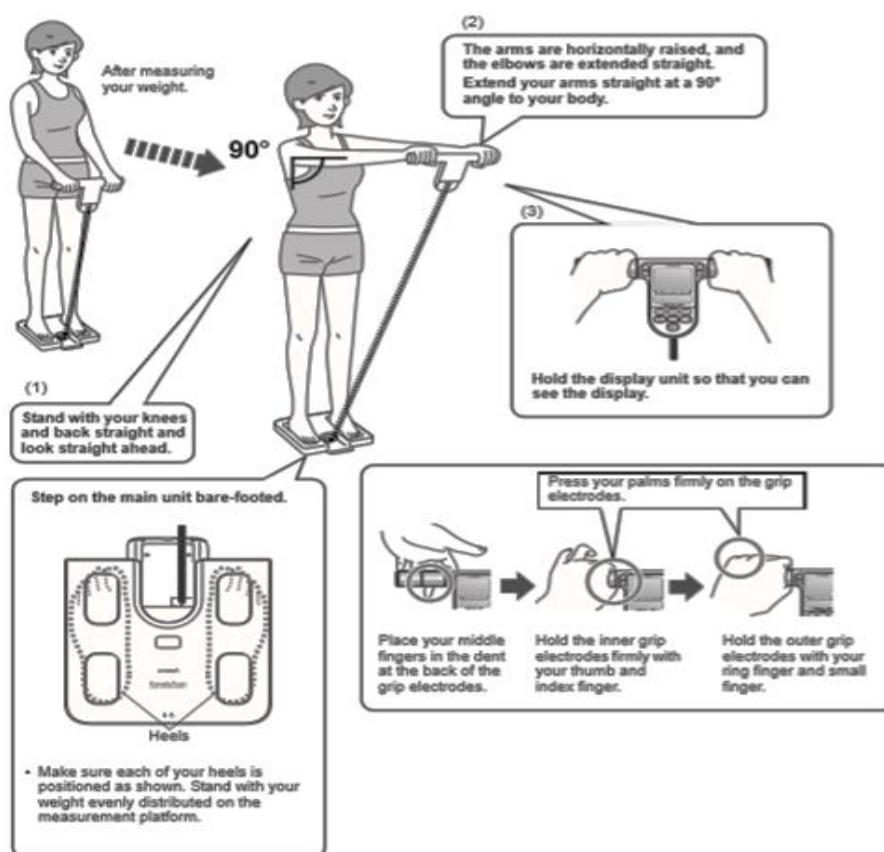


Figura 13 – Correta utilização da balança de bioimpedância

7.3.3. HÁBITOS ALIMENTARES E ATIVIDADE FÍSICA

Assim como todas as crianças do estudo global, também as 200 que fazem parte deste estudo participaram nos inquéritos sobre os seus hábitos alimentares e de atividade física. Os dados que foram recolhidos estão em fase de análise estatística e serão objeto de publicação posteriormente.

Embora ciente que a Nutrição (Infantil, Juvenil e mesmo a Materna durante a gravidez) e a Atividade Física são iminentes fatores de risco para o excesso de peso / obesidade, não foram consideradas neste trabalho.

Apresentam-se, contudo, os suportes utilizados para a recolha destes dados (Anexos 8 e 9).

7.4. PARÂMETROS ANALÍTICOS

Para a determinação dos vários parâmetros analíticos foi utilizado sangue, que foi recolhido para tubos de gel (soro) e tubos com anticoagulante K₃EDTA (sangue total - marcação de monócitos).

Apresenta-se na Figura 14 o esquema analítico utilizado no estudo.

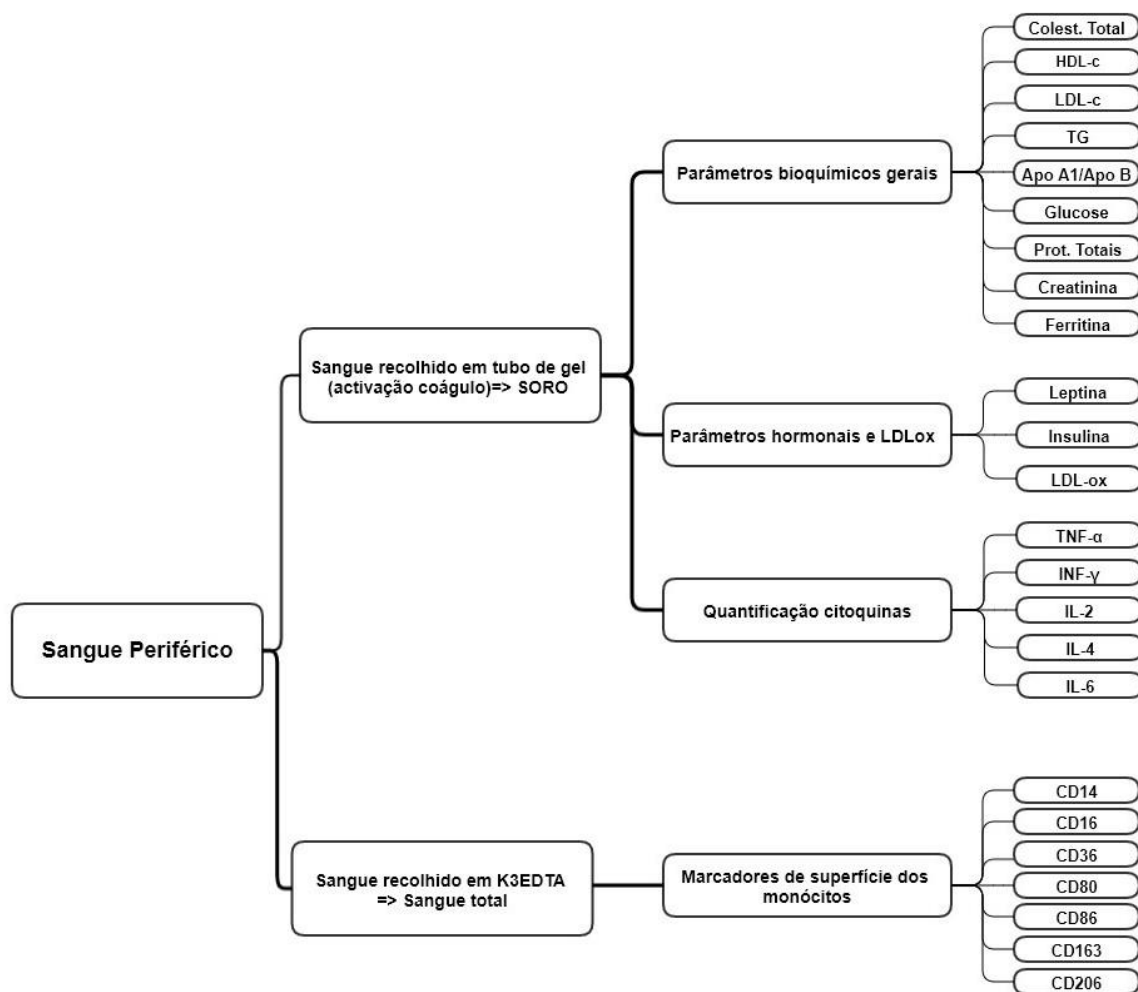


Figura 14 - Parâmetros analíticos efetuados

7.4.1. CONDIÇÕES DE COLHEITA

Todas as colheitas de sangue periférico foram efetuadas nas Escolas cerca das 8h30 da manhã, sendo que:

- A data da recolha foi programada de acordo com o Professor Coordenador e os Encarregados de Educação;
- Foi sempre programado que cada escola fornecesse um pequeno-almoço a todas as crianças a quem tinha sido feito a colheita;

- Foi antecipadamente recomendado que as crianças cumprissem um jejum aproximado de 12 horas (entre a última refeição e o momento da colheita).

O transporte era refrigerado e efetuado de imediato até ao Laboratório do CGMNPEM.

7.4.2. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

- **EQUIPAMENTO**

Centrífuga refrigerada (*Megafuge 1.0R Heraeus, Thermo Scientific, Langenselbold, Alemanha*).

- **PROCEDIMENTO**

- Centrifugar a 3000g durante 30 minutos a 5°C.
- Separação imediata do soro com fracionamento em função das diferentes técnicas utilizadas de modo a não ter de se congelar/descongelar as amostras.
- Congelar a -80°C até análise após fracionamento nas aliquotas necessárias, devidamente identificadas.
- De notar que o procedimento respeitante à **identificação das sub populações de monócitos, foi sempre efetuado no próprio dia.**

7.4.3. DOSEAMENTOS BIOQUÍMICOS GERAIS

Todas as determinações foram realizadas em duplicado a partir de amostras de soro, tendo sido considerado como valor analítico a média aritmética obtida. Foram sempre assegurados todos os procedimentos de calibração interna exigidos, e em cada dia de processamento analítico foi efetuada pelo menos uma análise com um soro controlo de concentração normal e outro de valor patológico (controlo da precisão e exatidão). Foi igualmente efetuada diariamente, uma análise dum soro padrão de referência para controlo da variabilidade intra e inter-ensaios. Os coeficientes de variação intra e inter-ensaio foram sempre inferiores a 3%.

7.4.3.1. Bioquímica

- **EQUIPAMENTO**

- *HORIBA. Pentra C400* (Montpellier, França);
- Agitador (*Thermo-Shaker PHMT, Grant-bio, ShepreTh, Cambridgeshire, Reino Unido*).

- **REAGENTES**

Kits, controlos e padrões do fabricante *Horiba*, apropriados para o equipamento *ABX Prenta 400* (*Horiba, Montpellier, França*).

- **TÉCNICAS ANALÍTICAS**

Tabela 13 - Métodos utilizados nos parâmetros bioquímicos

Parâmetros	Métodos
Glucose	
Colesterol total	
HDL-c	Colorimetria
LDL-c	
Triglicéridos	
Apo A1 e Apo B	Imuno-turbidimétrico
Proteínas totais	Biureto
Creatinina	<i>Jaffé</i> modificado
Ferritina	Imuno-turbidimétrico

Apo, apolipoproteína; HDL-c, High density lipoprotein cholesterol; LDL-c, Low density lipoprotein cholesterol

- **PROCEDIMENTO**

- Descongelar as amostras no agitador rotativo (850rpm) durante 10 minutos a 25°C
- Seguindo o procedimento do aparelho, efetuar as determinações em duplicado, a partir da alíquota descongelada.

7.4.3.2. Doseamentos de Insulina, Leptina e LDLox

- **EQUIPAMENTO**

- Dynex DS2 – Elisa Processing System (Megallan Biosciences, Chantilly, EUA).
- Vórtex (*Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Nova Iorque, EUA*).

7.4.3.2.1. Insulina

Imunoensaio enzimático (ELISA).

Técnica de *sandwich* direta de dois anticorpos monoclonais específicos contra determinantes antigénicos diferentes da molécula de insulina. O conjugado formado é detetado por uma reação com 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), sendo que a mesma é interrompida pela adição de um ácido, o que origina um ponto colorimétrico (450 nanómetros). De notar, que a intensidade da cor é proporcional à quantidade de insulina.

- **Kit Mercodia®** 10-1113-01 (Uppsala, Suécia)

- ❖ **Reagentes**

- Placa revestida (96 poços).

- Calibradores: 0, 1, 2, 3, 4 e 5 (1000µl).
- Controlos: Baixo (9.17-12.4 mU/L) e alto (48.1-65.1 mU/L).
- Conjugado enzimático 11x (*peroxidase conjugated mouse monoclonal anti-insulin*) (1.2 ml).
- Tampão do Conjugado Enzimático (12 ml).
- Tampão de lavagem 21x.
- TMB (22 ml).
- Solução de paragem (0.5M de ácido sulfúrico) (7 ml).
- Água tridestilada.

❖ **Técnica**

Preparação dos Reagentes

Preparação dos Controlos (1 e 2)

- Reconstituição com 500µl de água tridestilada.
- Deixar repousar durante 5 minutos à temperatura ambiente.
- Homogeneizar manualmente.

Preparação do Conjugado Enzimático 11x

- Pipetar 12 ml de Tampão do Conjugado Enzimático para um tubo de 15ml.
- Adicionar 1.2 ml de Conjugado Enzimático.
- Homogeneizar manualmente.

Preparação do Tampão de Lavagem

- Pipetar 50ml de tampão para um balão de 1L.
- Completar o volume restante com água tridestilada.
- Homogeneizar com agitação manual.
- Deitar o tampão no reservatório adequado.

➤ **Procedimento**

- Descongelar as amostras no agitador rotativo (850rpm) durante 10 minutos a 25°C.
- Transferir os Calibradores, os Controlos, a solução de paragem e o TMB para tubos cilíndricos de 2, 2, 15 e 30 ml, respetivamente.
- Ligar o aparelho e o computador associado.
- Seguir as instruções do procedimento, que foi previamente introduzido no aparelho.
- No final do procedimento a placa é lida, os resultados são calculados e impressos automaticamente.

7.4.3.2.2. Leptina

Imunoensaio enzimático (ELISA).

Técnica de *sandwich* com a utilização de dois anticorpos monoclonais específicos. A leptina presente na amostra liga-se ao primeiro anticorpo que reveste a placa de microtitulação. O anticorpo secundário utilizado está conjugado com biotina e é incubado com um conjugado *streptavidina-peroxidase*. A reação provoca cor, que é lida a 450 nm, sendo que a intensidade é proporcional à quantidade de leptina presente.

- **Kit Teco® Human Leptin ELISA Kit TE1015** (TECO Medical Group, Gewerbestrasse, Suíça).

➤ **Reagentes**

- Placa revestida (96 poços).
- Padrões (1, 10, 25, 50 e 100 ng/ml).
- Controlos 1 e 2 .
- Anticorpo Conjugado - HRP (12 ml).
- Tampão de diluição (25 ml).
- Tampão de Lavagem.
- TMB (12 ml).
- Solução de paragem (0.2M de ácido sulfúrico) (12 ml).
- Água tridestilada.

➤ **Técnica**

Preparação dos Reagentes

Preparação dos Calibradores (1 a 5)

- Pipetar 750µl do tampão diluição para cada frasco.
- Deixar repousar durante 15 minutos à temperatura ambiente.
- Homogeneizar gentilmente no vórtex.
- Pipetar o conteúdo de cada frasco para um tubo de 2ml (numerar os tubos de 1 a 5).

Preparação dos Controlos (1 e 2)

- Reconstituir cada um com 500µl do tampão de diluição.
- Deixar repousar durante 15 minutos à temperatura ambiente.
- Homogeneizar gentilmente no Vórtex.

Preparação do Tampão de Lavagem

- Pipetar 50 ml de tampão para um balão de 1L.
- Completar o volume restante com água tridestilada.
- Homogeneizar com agitação manual.

- Verter o tampão no reservatório adequado.

➤ **Procedimento**

- Descongelar as alíquotas no agitador rotativo (850rpm) durante 10 minutos a 25°C
- Transferir Controlos, Anticorpo Conjugado - HRP, TMB e Tampão de diluição para tubos cilíndricos de 2, 15, 15, 15 e 30 ml, respetivamente
- Seguir as instruções do procedimento que foi previamente introduzido no aparelho.
- No final do procedimento a placa é lida, os resultados são calculados automaticamente e impressos.

7.4.3.2.3. LDL oxidada

Imunoensaio enzimático (ELISA).

Técnica de *sandwich* com a utilização de dois anticorpos monoclonais específicos que são direcionados contra determinantes antigénicos na molécula de apolipoproteína B oxidada. Durante a incubação, a LDL oxidada na amostra reage com os anticorpos anti LDL oxidada ligados ao poço de microtitulação. Após a lavagem que remove componentes plasmáticos não reativos e um anticorpo anti apolipoproteína B conjugado com peroxidase, reconhece a LDL oxidada ligada à fase sólida. Após uma segunda incubação e uma lavagem que remove o anticorpo marcado com enzima não ligado, o conjugado ligado é detetado pela reação com 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). A reação é interrompida pela adição de ácido para dar um ponto final colorimétrico, cuja intensidade é proporcional à quantidade de LDLox presente, sendo lida espectrofotometricamente.

- **Kit Mercodia Oxidized LDL ELISA** 10-1143-01 (Uppsala, Suécia)

➤ **Reagentes**

- Placa revestida (96 poços)
- Padrões (0, 1, 2, 3, 4 e 5) (1000 µl)
- Controlos (Alto e baixo) (1000 µl)
- Conjugado enzimático (Peroxidase conjugated mouse monoclonal anti-apo B) (11x) (1200 µl)
- Tampão Conjugado Enzimático (12 ml)
- Tampão de ensaio (12 ml)
- Tampão das amostras 4X (50 ml)
- Tampão de Lavagem 21X (50 ml)
- Substrato TMB (22 ml)
- Solução de paragem (0.5 M de ácido sulfúrico) (7 ml)

- Água tridestilada

➤ **Técnica**

Preparação dos Reagentes

Preparação Padrões (1, 2, 3, 4 e 5)

- Juntar 1000 µl água tridestilada aos standards 1, 2, 3, 4 e 5.

Preparação Controlos (Alto e baixo)

- Juntar 1000 µl água tridestilada a cada vial de controlo.

Preparação Tampão amostras 4X

- Diluir os 50 ml do frasco em 150 ml água tridestilada.

Preparação tampão de lavagem 21X

- Diluir os 50 ml do frasco em 950 ml água tridestilada.
- Transferir conteúdo para o reservatório próprio do aparelho.

Restantes reagentes prontos a usar

- Padrão 0
- Tampão do Conjugado enzimático
- Tampão de ensaio
- Substrato TMB
- Solução de paragem

Preparação das Amostras (diluição a 1/6561)

- Efetuar duas diluições sucessivas a 1/81 em sample buffer (25 µl em 2000 µl de tampão das amostras).
- Diluição efetuada automaticamente no aparelho.

➤ **Procedimento**

- Descongelar as alíquotas no agitador rotativo (850rpm) durante 10 minutos a 25°C
- Transferir todos os reagentes para tubos apropriados
- Seguir as instruções do procedimento que foi previamente introduzido no aparelho.
- No final do procedimento a placa é lida, os resultados são calculados automaticamente.

7.4.3.3. Valores normais

Os parâmetros bioquímicos efetuados no sangue, foram definidos como sendo anormais pelos valores de *cut-off* estabelecidos da seguinte forma: CT > 170 mg/dl, LDL-c > 110 mg/dl,

glicose < 100 mg/dl, creatinina 0,4-1,0 mg/dl, proteínas totais 6 - 8,3 mg/dl e ferritina 7 - 140 ng/ml conforme definido pela **Academia Americana de Pediatria**,¹³² e HDL-c < 40 mg/dl, TG > 75 mg/dl, apo A1 < 1,2 g/L e apo B > 0,9 g/L, conforme definido pelos **Laboratórios da Clínica Mayo**¹³³.

Para os parâmetros insulina, HOMA-IR, leptina e LDLox, para os quais não existem valores de referência para a idade pediátrica em causa, foram estabelecidos valores de *cut-off* internos e que correspondem aos valores mais elevados determinados do parâmetro em causa, dos indivíduos da amostra que apresentam todas as determinações (clínicas e bioquímicas) normais. Assim, insulina < 16.3µU/ml, Homa- IR < 0.69, leptina < 6.32 ng/ml, and LDLox < 1.38mU/L.

7.4.3.4. Dislipidemia

A dislipidemia foi definida como a presença de um ou mais parâmetros do perfil lipídico sérico fora dos valores considerados como normais.

7.4.3.5. Determinação do índice homeostatic model assessment for insulin resistance (HOMA-IR)¹³⁴

HOMA-IR = [insulina (µU/ml) × glucose (mg/dl)] / 405

Aplica-se este índice para quantificar a resistência à insulina e a função das células beta do pâncreas.

Nota: Todas as determinações constaram de um relatório (Anexo 10) que era visto e assinado por um patologista clínico, sendo que o mesmo foi enviado por correio a todas as crianças.

7.4.3.6. Índice aterogénico (IA)

IA=[(TC-HDL-c) x apo B] / (HDL-c x apo A)

O **risco cardiovascular** foi determinado pela fórmula apresentada e reflete o equilíbrio entre a fração aterogénica do LDL-c e a fração anti-aterogénica¹³⁵.

7.4.3.7. Marcação Monócitos

7.4.3.7.1. Generalidades

As marcações de monócitos foram efetuadas sempre num intervalo de tempo que não ultrapassou nunca as 6 horas após a colheita de sangue.

O citómetro utilizado tem quatro lasers e a experiência utilizou anticorpos diferentes marcados com a mesma fluorescência, o que obrigou para cada amostra, a realizar duas experiências em paralelo. Num primeiro tubo efetuou-se uma marcação com os anticorpos específicos para CD14 (APC), CD 16 (FITC), CD 80 (PE) e CD 86 (PE Cy5); no segundo tubo efetuou-se marcação com CD14 (APC), CD 36 (FITC), CD 163 (PE) e CD 206 (PE Cy5).

Para a garantia de reprodutibilidade dos resultados de citometria de fluxo está implícito efetuar controlos **fluorescência menos um** (FMO) de forma a verificar os níveis de fluorescência não específica e para estabelecer o valor positivo de forma correta.

❖ **Equipamento**

- *BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer (BD Life Sciences, San Jose, CA, 95131, USA).*
- *Centrífuga refrigerada (Megafuge 1.0R Heraeus, Thermo Scientific, Langenselbold, Alemanha).*

❖ **Reagentes**

- APC Mouse Anti-Human CD14, Clone M5E2, Refª BD 561383.
- FITC Mouse Anti-Human CD16, Clone 3G8; Refª BD 555406.
- FITC Mouse Anti-Human CD36, Clone CB38, Refª BD 555454.
- PE Mouse Anti-Human CD80, Clone, L307.4, Refª BD 340294.
- PE-Cy™5 Mouse Anti-Human CD86, Clone IT2.2, Refª BD 555666.
- PE Mouse Anti-Human CD163, Clone GHI/6, Refª BD 556018.
- PE-Cy™5 Mouse Anti-Human CD206, Clone 19.2, Refª BD 551136.
- BD Pharm Lyse™ Lysing Buffer, Refª BD 555899.

7.4.3.7.2. Experiência FMO

Os controlos de **fluorescência menos um** (FMO) são importantes na construção de painéis de citometria de fluxo com diferentes fluorocromos, permitindo determinar onde os *gates* devem ser definidos isto é determinar o valor de *cut-off* a partir do qual consideramos um valor positivo, permitindo ainda eliminar os valores de fluorescência não específica. Os controlos de FMO são preconizados utilizando as células experimentais coradas com todos os fluorocromos menos um.

❖ **Técnica**

Preparação dos Reagentes

Preparação da solução de lise 1X:

- Diluir a solução concentrada 10X (-) a 1:10 com água tridestilada.
- Ajustar o pH da solução 1x, se necessário, para valor entre 7.1 e 7.4.-
- Utilizar à temperatura ambiente (TA).
- Solução PBS-FBS (1% de soro bovino fetal inativado pelo calor e 0,1% de azida de sódio em tampão de fosfatos).

Preparação da experiência

- Apresenta-se seguidamente o esquema delineado, tendo em conta que estavam em estudo vários anticorpos marcados com os mesmos fluorocromos.
- Identificar os 18 tubos referidos no esquema.
- Seguindo o protocolo estabelecido, pipetar 5µl de cada anticorpo que seja necessário seguindo o esquema apresentado.
- Agitar suavemente os tubos dos anticorpos (os que tiverem mais que um anticorpo).
- Pipetar 100 µl de sangue total para todos os tubos.
- Agitar convenientemente no Vórtex e incubar no escuro por um período não inferior a 15 minutos.
- Efetuar a lise, adicionando 2,0 ml de solução de lise 1X a cada tubo.
- Agitar suavemente cada tubo.
- Incubar à temperatura ambiente, protegido da luz, por 15 minutos.
- Centrifugar a 200 x g por 5 minutos.
- Cuidadosamente aspirar o sobrenadante, sem perturbar o pellet.
- Adicionar 2,0 ml de PBS-FBS.
- Centrifugar a 200 x g por 5 minutos.
- Cuidadosamente aspirar o sobrenadante, sem perturbar o pellet.
- Ressuspender o pellet em 0,5 ml de PBS-FBS.
- Adquirir no citómetro de Fluxo (mínimo 4000 eventos).

❖ Experiência FMO

- **Marcação Única:**
 - **Tubo 1:** sem qualquer marcação
 - **Tubo 2:** CD14, APC
 - **Tubo 3:** CD16, FITC
 - **Tubo 4:** CD36 FITC
 - **Tubo 5:** CD80 PE
 - **Tubo 6:** CD86 PE-Cy™5
 - **Tubo 7:** CD163 PE
 - **Tubo 8:** CD206 PE-Cy™5

- **Várias marcações:**

Tabela 14 - Experiência 1 FMO

		APC	FITC	PE	PE-Cy™5
Tubo 9	CD14	-	CD36	CD163	CD206
Tubo 10	CD 36	CD14	-	CD163	CD206
Tubo 11	CD163	CD14	CD36	-	CD206
Tubo 12	CD206	CD14	CD36	CD163	-

Tabela 15 - Experiência 2 FMO

		APC	FITC	PE	PE-Cy™5
Tubo 13	CD14	-	CD16	CD80	CD86
Tubo 14	CD 16	CD14	-	CD80	CD86
Tubo 15	CD80	CD14	CD16	-	CD86
Tubo 16	CD86	CD14	CD16	CD80	-

- **Verificação condições experiência:**

- **Tubo 17:** CD14, CD36, CD163, CD206
- **Tubo 18:** CD14, CD16, CD80, CD86

7.4.3.7.3. Interpretação dos resultados

A análise do parâmetro negativo ou deixado de fora num controle FMO, permite estabelecer o limite negativo e assim discriminar com precisão sinais positivos versus negativos, níveis de expressão de antigénio alto *versus* baixo (ou variável). Na nossa experiência FMO e para o CD36 FITC, por exemplo, verificamos que a marcação será positiva sensivelmente depois do canal 103, a partir de onde serão delimitadas as regiões de análise (gates).

De notar que para os outros fluorocromos, o valor de *gate* é semelhante.

7.4.3.7.4. Software de análise

Os dados recolhidos foram analisados utilizando o software **FlowJo** versão 10 (Tree Star inc., Ashland, OR, USA). As estratégias de seleção estão demonstradas nas figuras 15 a 17 e 18 a 21.

FMO FITC (todos exceto FITC)

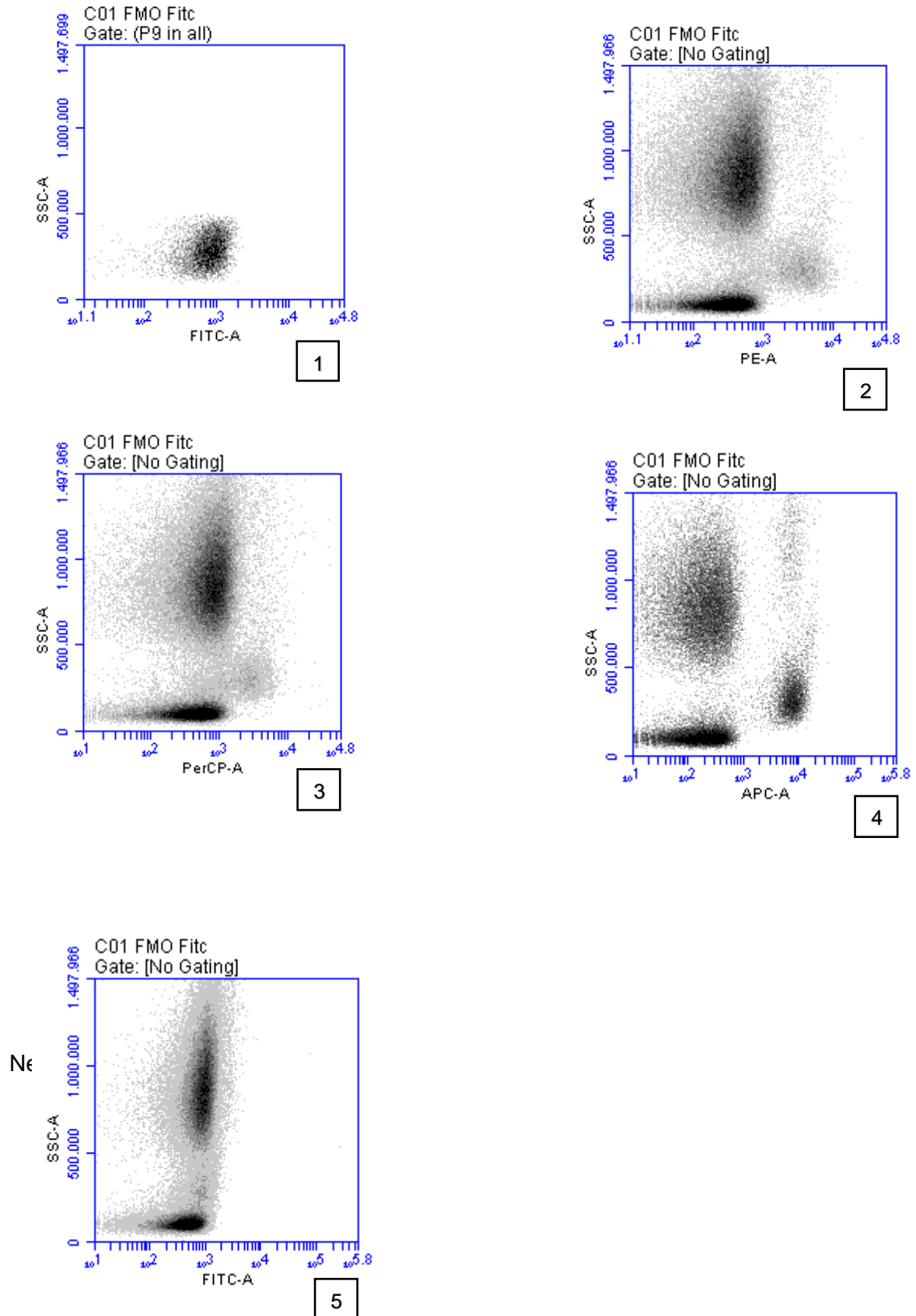


Figura 15 – FMO - FITC

1 - Gate em monócitos, 2 – PE, 3 – PECy5, 4 – APC, 5 - FITC

FMO PE (todos exceto PE)

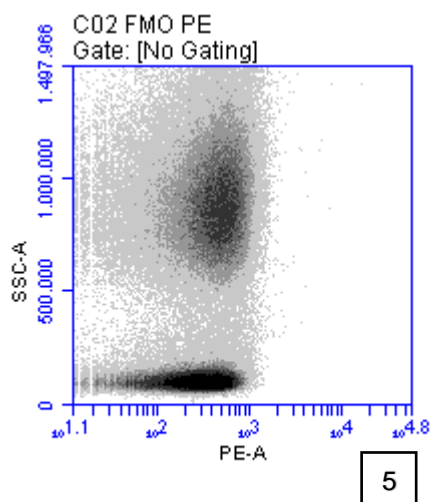
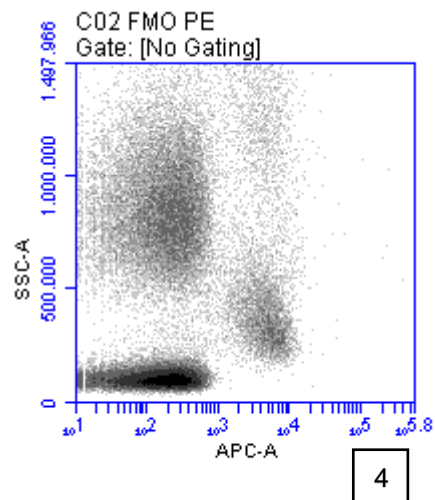
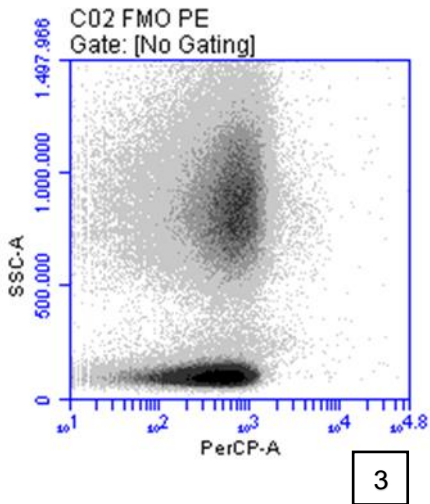
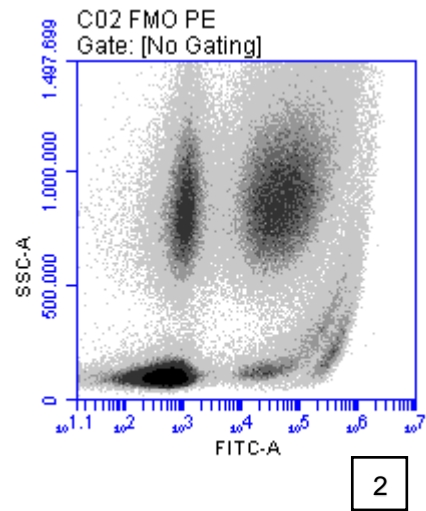
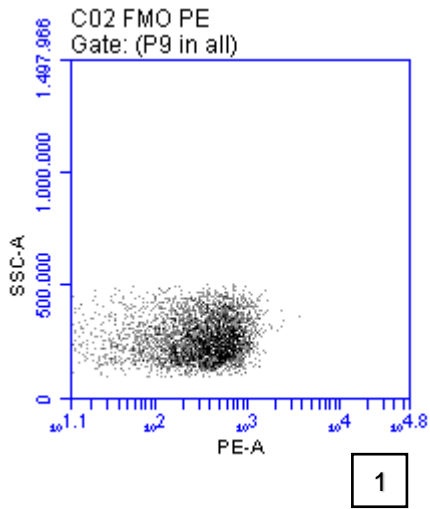


Figura 16 - FMO - PE

1 - Gate em monócitos, 2 - FITC, 3 - Pe-Cy5, 4 - APC, 5 - PE

FMO PE-Cy5 (todos exceto PE-Cy5)

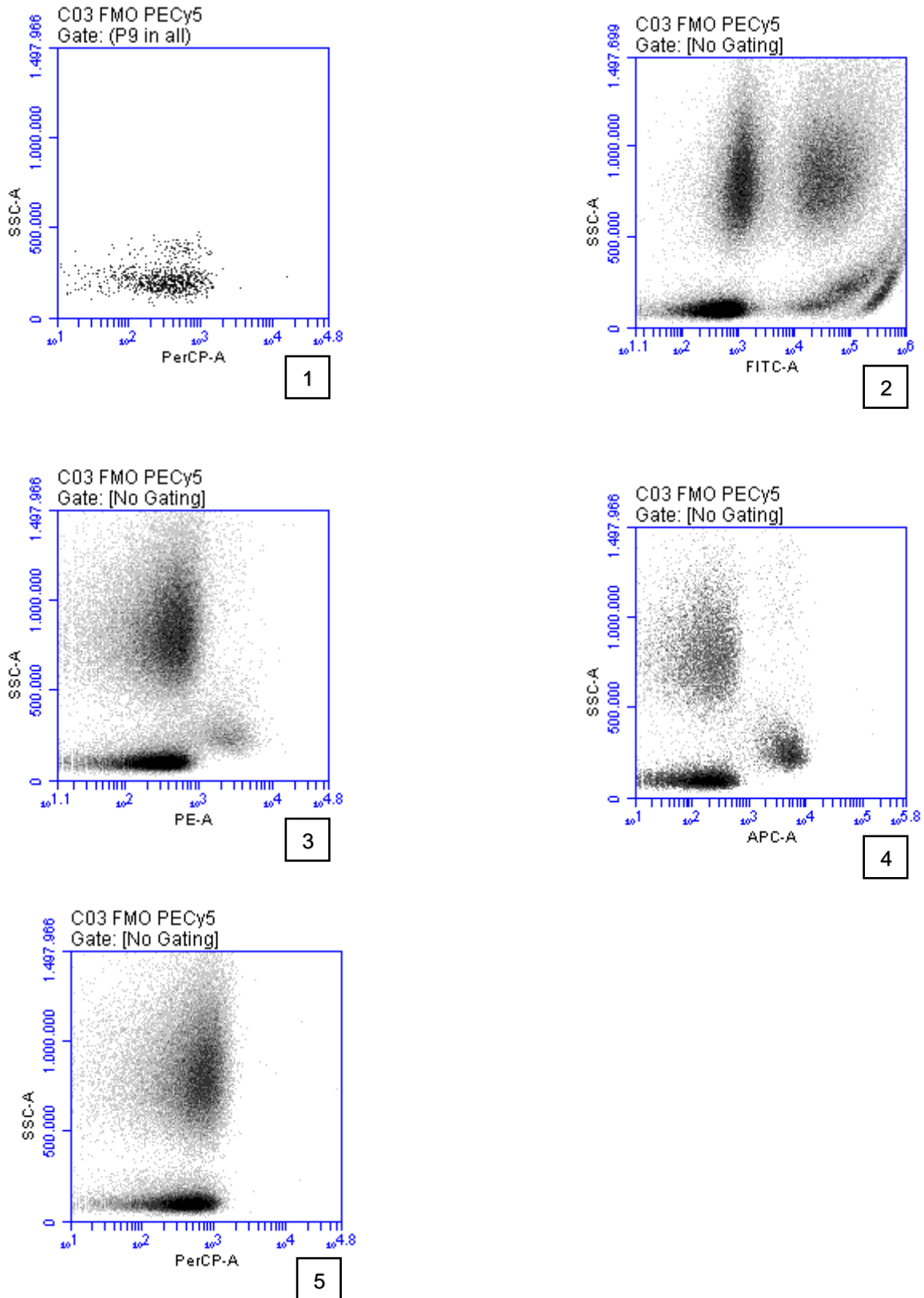


Figura 17 – FMO - PE-Cy5

1 -Gate em monócitos, 2 – FITC, 3 – PE, 4 – APC, 5 Pe-Cy5

7.4.3.7.5. Análise de subpopulações de monócitos (amostras)

❖ Técnica

Preparação dos Reagentes

▪ Preparação da solução de lise 1X:

- Diluir a solução concentrada 10X (-) a 1:10 com água tridestilada.
- Ajustar o pH da solução 1x, se necessário, para valor entre 7.1 e 7.4.
- Utilizar à temperatura ambiente (TA)

▪ Preparação das amostras

- Para cada amostra identificar tubo A e tubo B.
- Em dois tubos separados, efetuar as misturas de anticorpos necessários para efetuar a experiência, (nº de amostras x 5µl de cada anticorpo). No primeiro tubo efetuar a mistura CD 14, CD16, CD 80 e CD 86; no segundo efetuar a mistura CD 14; CD 36; CD 163 e CD 206.
- Agitar suavemente os tubos dos anticorpos.
- Aos tubos das amostras marcados com A e B, adicionar 20 µl respectivamente da 1ª e da 2ª mistura de anticorpos.
- Pipetar 100 µl de sangue para estes tubos
- Agitar convenientemente no Vórtex e incubar no escuro por um período > 15 minutos.
- Efetuar a lise das amostras, adicionando 2,0 ml de solução de lise 1X a cada tubo que contém a mistura de sangue total e anticorpos.
- Agitar suavemente cada tubo, imediatamente.
- Incubar à temperatura ambiente, protegido da luz, por 15 minutos.
- Centrifugar a 200 x g por 5 minutos.
- Cuidadosamente aspirar o sobrenadante, sem perturbar o pellet.
- Adicionar 2,0 ml de PBS-FBS.
- Centrifugar a 200 x g por 5 minutos.
- Cuidadosamente aspirar o sobrenadante, sem perturbar o *pellet*.
- Ressuspender o *pellet* em 0,5 ml de PBS-FBS ou um fixador como formaldeído a 2% para análise por citometria de fluxo.
- Adquirir no Citómetro de Fluxo (mínimo 4000 eventos).

7.4.3.7.6. Interpretação dos resultados

A análise foi efetuada nos macrófagos positivos (fluorescência considerada positiva pelo FMO >10³) para os diferentes marcadores, analisando monócitos clássicos, intermédios e não clássicos ou se foram ativados de forma clássica ou alternativamente (figuras 17 a 20).

Análise dos resultados – Exp^a A

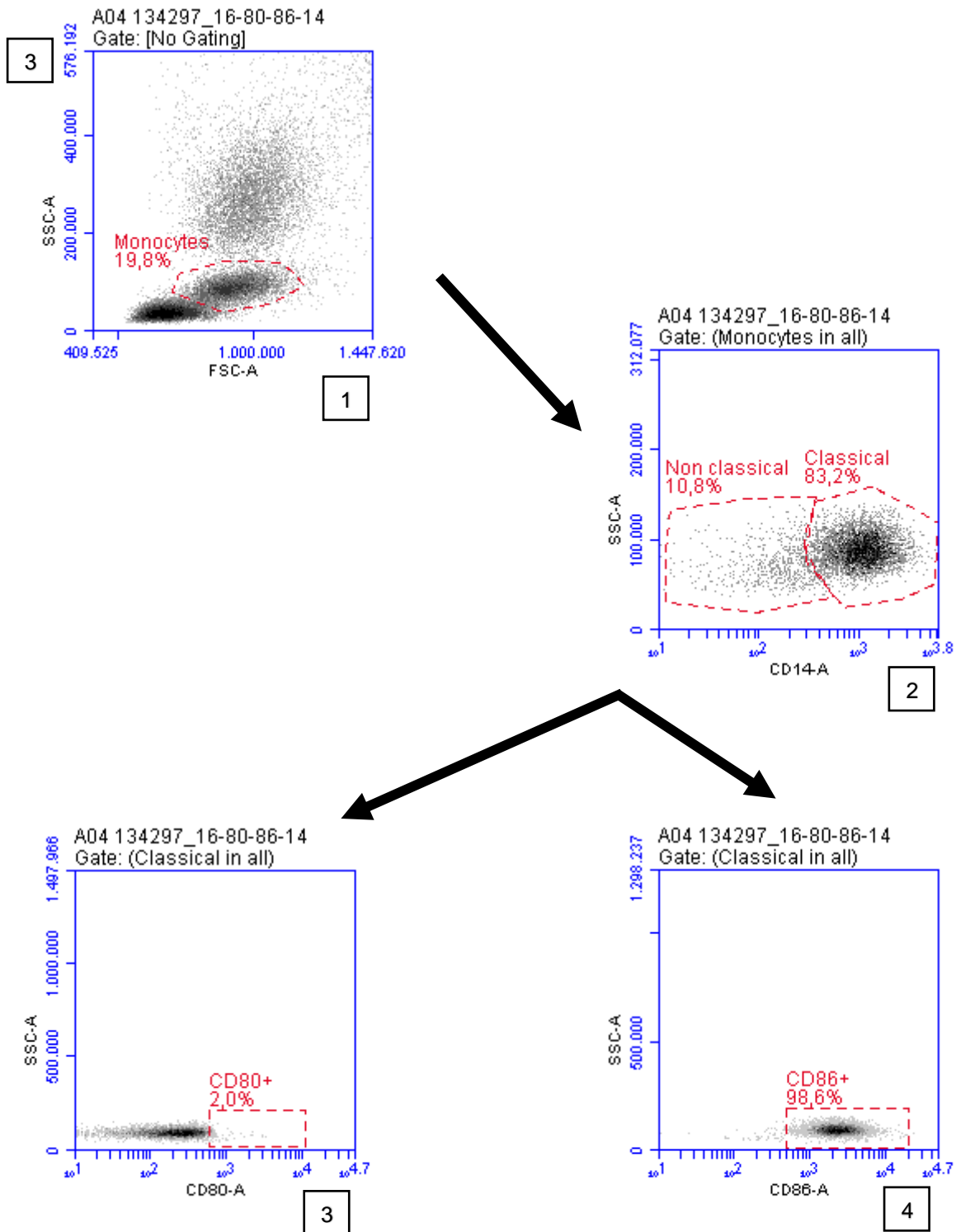


Figura 18 – Monócitos “clássicos” CD80+ e CD86+

- 1 – Identificação monócitos
- 2 – Monócitos CD14+ (clássicos)/CD14- (não clássicos)
- 3 – Monócitos clássicos CD80+ (gate em CD14+)
- 4 - Monócitos clássicos CD86+ (gate em CD14+)

Análise dos resultados – Exp^a A (cont.)

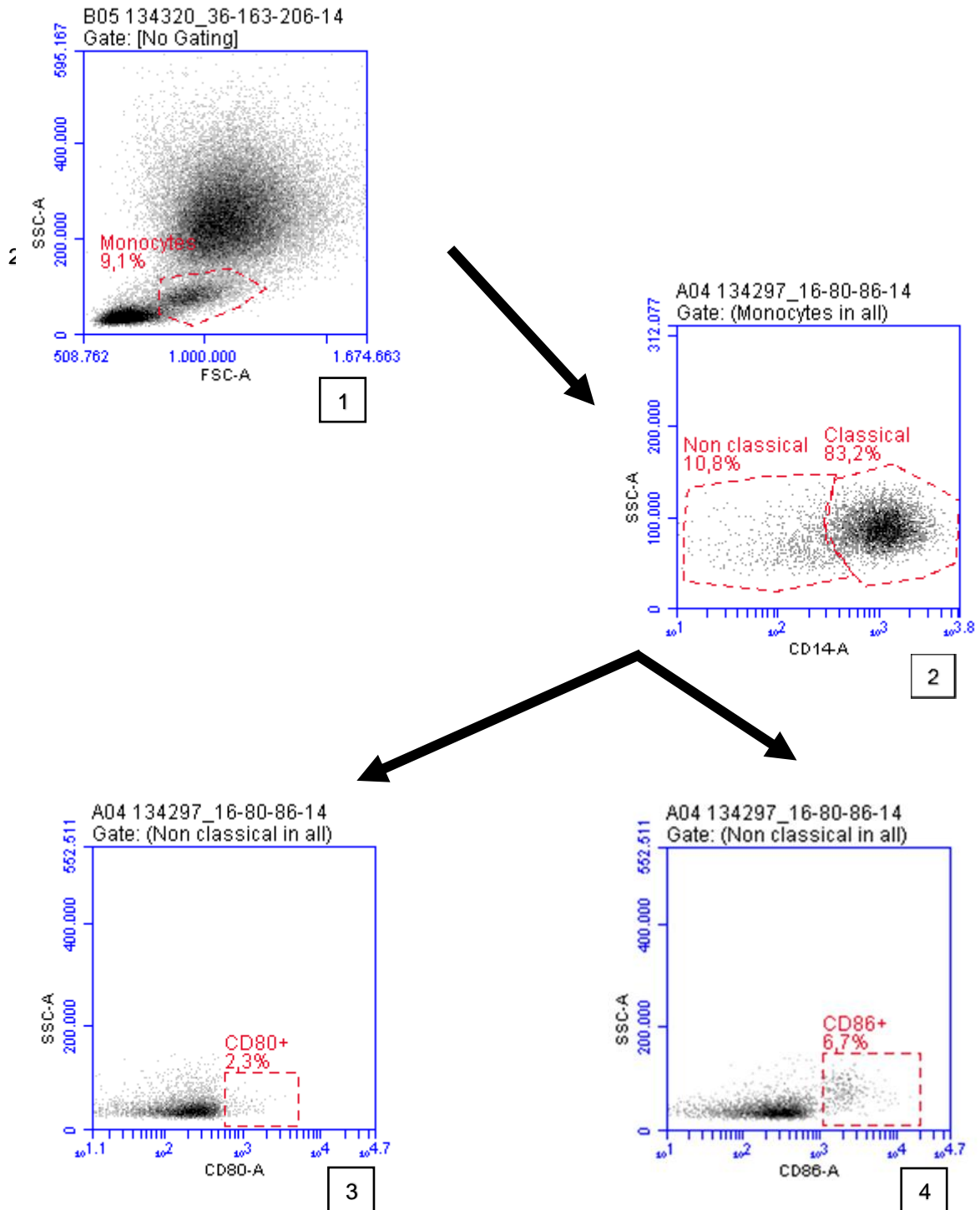


Figura 19 - Monócitos "não clássicos" CD80+ e CD86+
1 – Identificação monócitos
2 – Monócitos CD14+ (clássicos)/CD14- (não clássicos)
3 – Monócitos não clássicos CD80+ (gate em CD14-)
4 - Monócitos não clássicos CD86+ (gate em CD14-)

/Análise dos resultados – Exp^a B

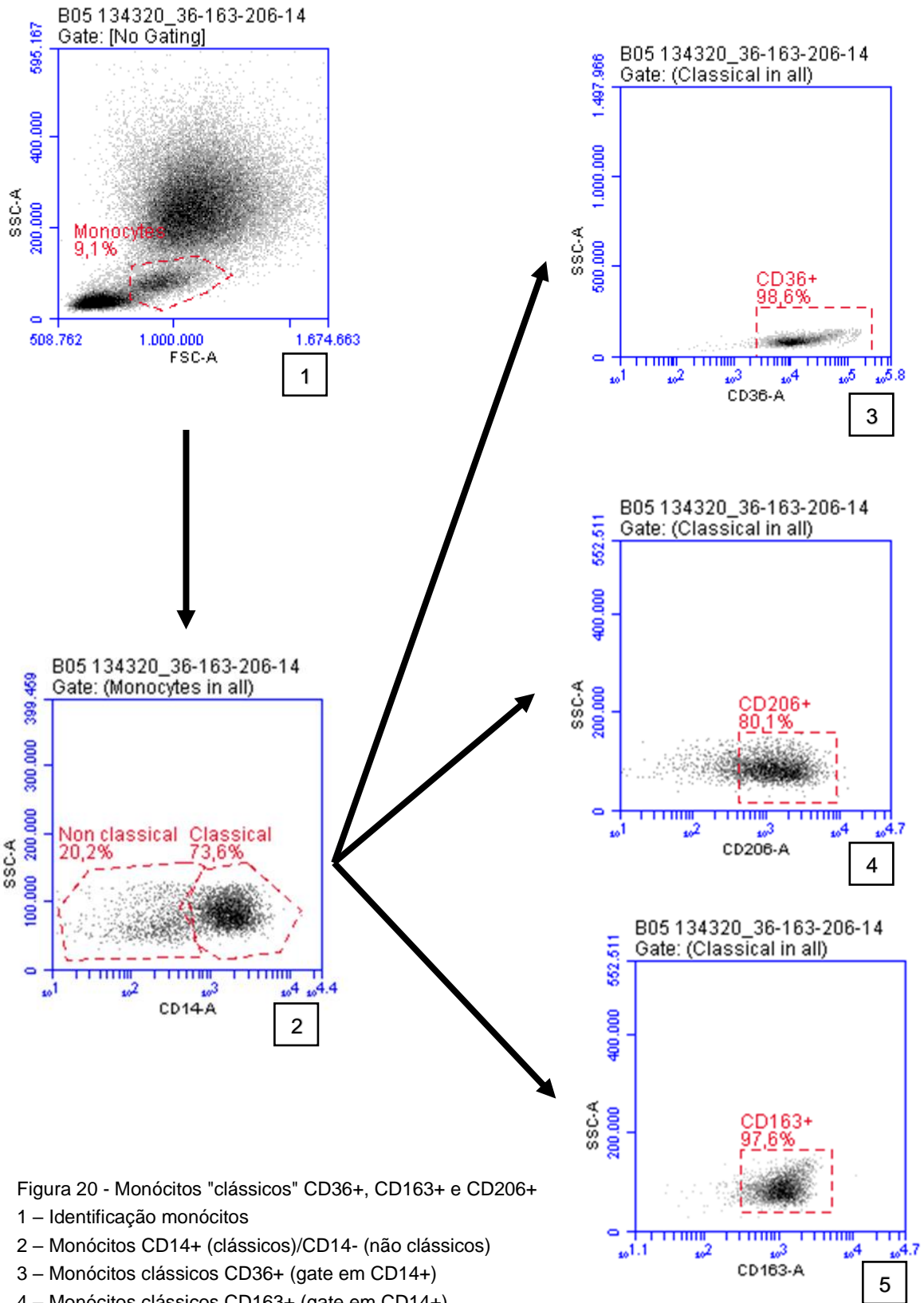


Figura 20 - Monócitos "clássicos" CD36+, CD163+ e CD206+

1 – Identificação monócitos

2 – Monócitos CD14+ (clássicos)/CD14- (não clássicos)

3 – Monócitos clássicos CD36+ (gate em CD14+)

4 – Monócitos clássicos CD163+ (gate em CD14+)

5 - Monócitos clássicos CD206+ (gate em CD14+)

Análise dos resultados – Exp^a B (cont.)

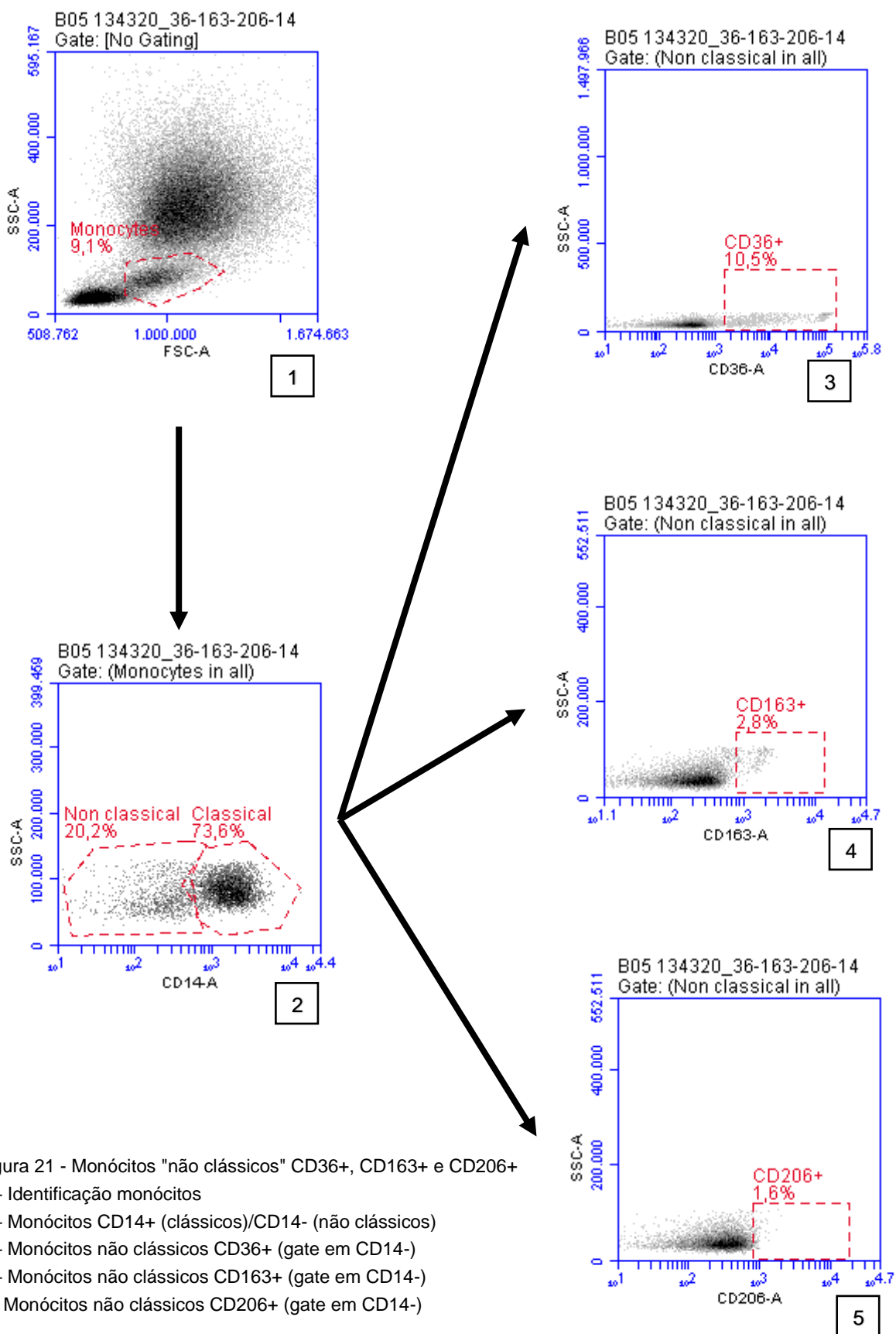


Figura 21 - Monócitos "não clássicos" CD36+, CD163+ e CD206+
 1 – Identificação monócitos
 2 – Monócitos CD14+ (clássicos)/CD14- (não clássicos)
 3 – Monócitos não clássicos CD36+ (gate em CD14-)
 4 – Monócitos não clássicos CD163+ (gate em CD14-)
 5 - Monócitos não clássicos CD206+ (gate em CD14-)

7.4.3.8. Quantificação das citocinas

7.4.3.8.1. Generalidades

As citocinas envolvidas no processo aterosclerótico são inúmeras, tanto as envolvidas na vertente inflamatória como na anti-inflamatória. Por outro lado e a nosso conhecimento, são poucos os estudos em citocinas nesta idade pediátrica pelo que, resolvemos estudar as seguintes: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ

❖ Equipamento

- *BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer (BD Life Sciences, San Jose, CA, 95131, USA).*

❖ Reagentes

- *BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine Kit II, Refª BD 551809.*

➤ Técnica

Procedimento segundo as instruções do fabricante. Esta técnica, permite a determinação quantitativa da IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ num ensaio único. O método baseia-se na captura de um ou mais analitos solúveis por microesferas de tamanho e fluorescência conhecidas, possibilitando a quantificação ao usar um citómetro de fluxo.

Cada microesfera é conjugada com um ou mais anticorpos específicos (consoante os analitos a quantificar). O kit fornece também um reagente especial que contém uma mistura de ficoeritrina (PE) conjugada com um anticorpo. Esta mistura emite um sinal fluorescente que é proporcional à conjugação específica com um analito. Quando as microesferas são incubadas com uma amostra contendo analitos reconhecíveis, formam-se complexos fluorescentes.

(microesferas + analito-reagente de deteção). Estes complexos podem ser medidos usando citometria de fluxo, ao identificar as características fluorescentes da microesfera e do detetor.

Preparação dos Reagentes

Preparação do tampão para amostras de soro

- Centrifugar o *Mixed Capture Beads*;
- Aspirar e descartar o sobrenadante;
- Adicionar o mesmo volume que se aspirou no passo anterior de *Serum Enhancement Buffer* ao pellet *Mixed Capture Beads* e agitar no vórtex;
- Incubar o *Mixed Capture Beads* 30 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz.

Preparação dos Padrões

- Transferir as esferas Human Th1/Th2 Standards para um tubo de 15ml com o nome Top standards;
- Adicionar 2ml de Assay Diluent aos standards e deixar 15 minutos à temperatura ambiente e homogeneizar cuidadosamente;
- Etiquetar 9 tubos (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256);
- Pipetar 300µL de Assay Diluent para cada um dos tubos;
- Diluição em série: transferir e homogeneizar 300µL do "Top Standard" para o tubo 1:2, transferir 300µL do tubo 1:2 para o tubo 1:4 e assim sucessivamente até ao tubo 1:256, inclusive;
- Preparar um tubo apenas com Assay Diluent para controlo negativo

Preparação das amostras

- Preparação das esferas magnéticas (Human Th1/Th2 Cytokine Capture Beads)
- Descongelar as amostras a 25°C em banho seco com agitação (conservadas -80°C desde a colheita do sangue e separação do soro)
- Determinar o número de ensaios (incluindo padrões e controlos);
- Agitar no "Vórtex" cada Capture Bead;
- Adicionar 10µL de cada Capture Bead por cada ensaio a ser analisado para o tubo Mixed Capture Beads;
- Agitar no "Vórtex", vigorosamente.

Ensaio

- Etiquetar os tubos para as amostras, para os padrões e controlos;
- Agitar no vórtex o Mixed Capture Beads e adicionar 50µL em todos os tubos de ensaio;
- Adicionar 50µL de Human Th1/Th2 Cytokine Standard dilutions aos tubos dos padrões e dos controlos (etiquetados no ponto 1);
- Adicionar 50µL de cada amostra desconhecida aos restantes tubos;
- Adicionar 50µL de Human Th1/Th2 PE Detection Reagent aos tubos de ensaio;
- Incubar os tubos 3 horas, à temperatura ambiente e protegidos da luz;
- Adicionar 1µL de Wash Buffer a cada tubo e centrifugar durante 5 minutos a 200g;
- Aspirar e descartar o sobrenadante de cada tubo;
- Adicionar 300µL de Wash Buffer a cada tubo.

7.4.3.8.2. Interpretação dos resultados

A aquisição nas amostras e quantificação de cada citocina é efetuada após comprovação do correto posicionamento de cada analito (Figura 22) e ainda depois de traçada a respetiva curva de calibração (Figuras 23 a 28).

- Carregar o *template* CBA no equipamento
- adquirir as amostras (iniciar com o tubo controlo até ao *Top Standard*, passar um tubo com água destilada e de seguida adquirir as amostras)

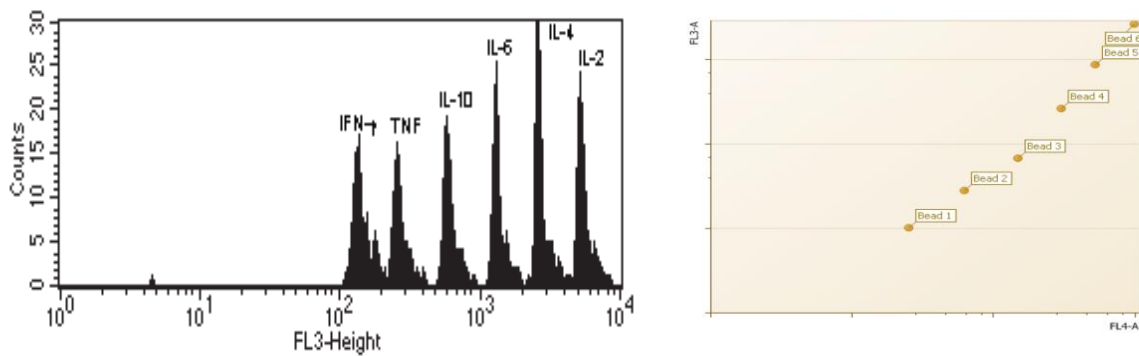


Figura 22 – Posição de cada analito no citómetro

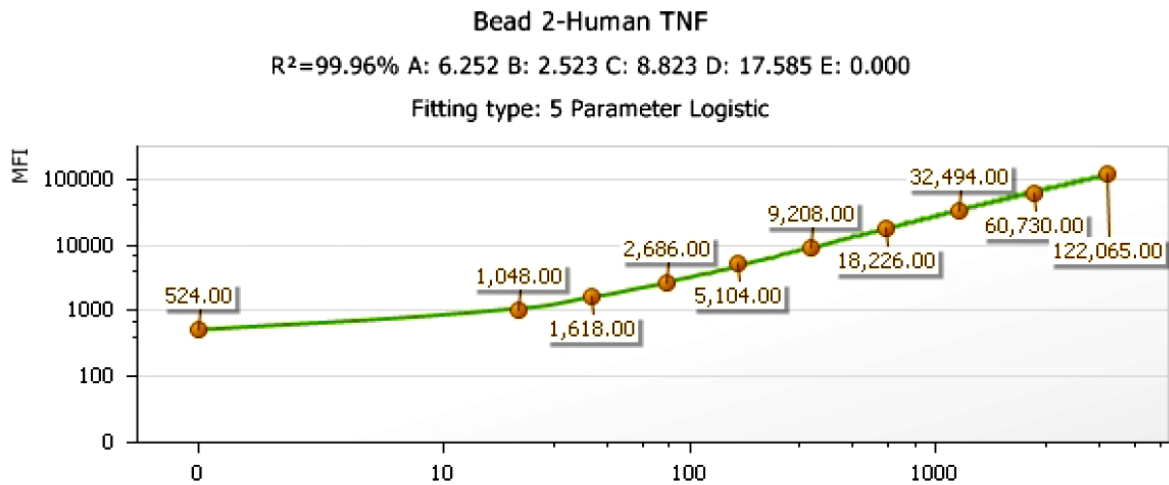


Figura 23 – Curva de calibração do TNF-α

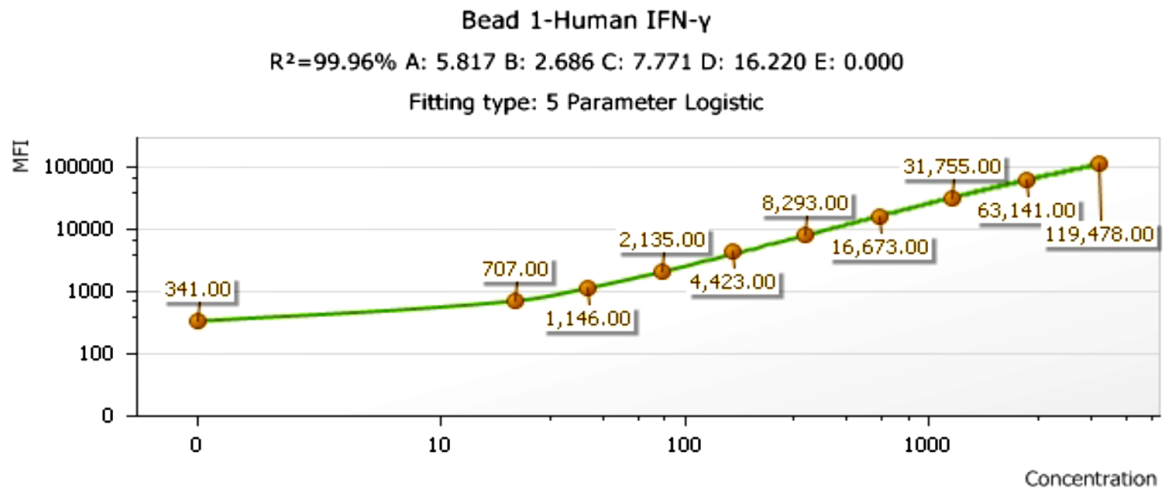


Figura 24 – Curva de calibração de IFN-γ

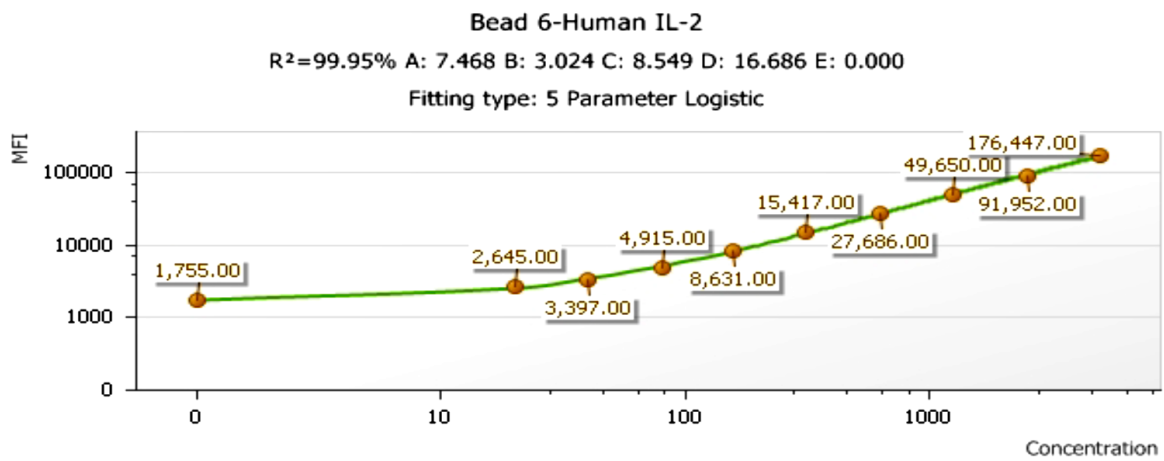


Figura 26 – Curva de calibração IL-2

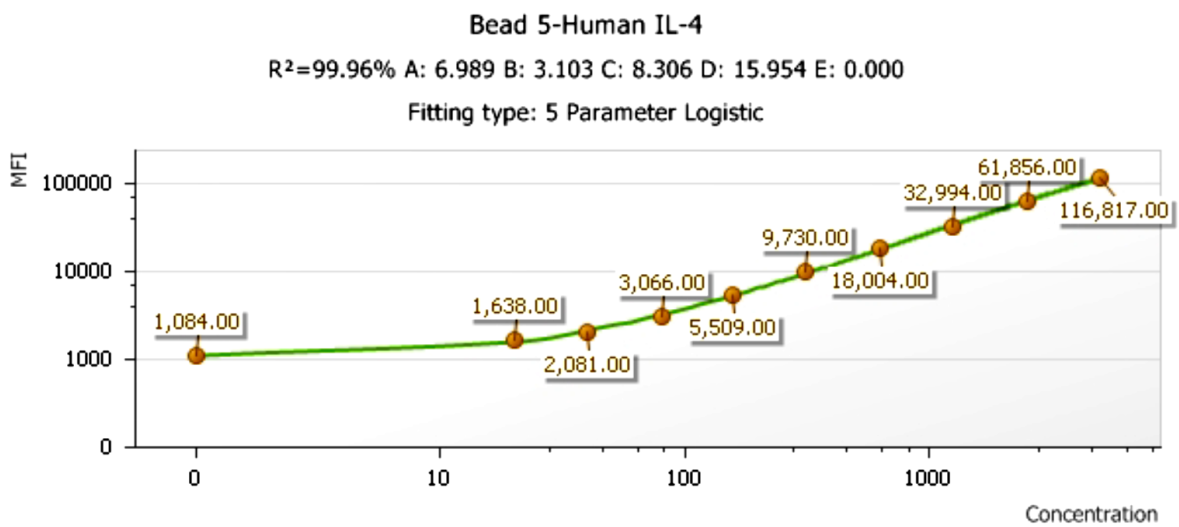


Figura 25 – Curva de calibração IL-4

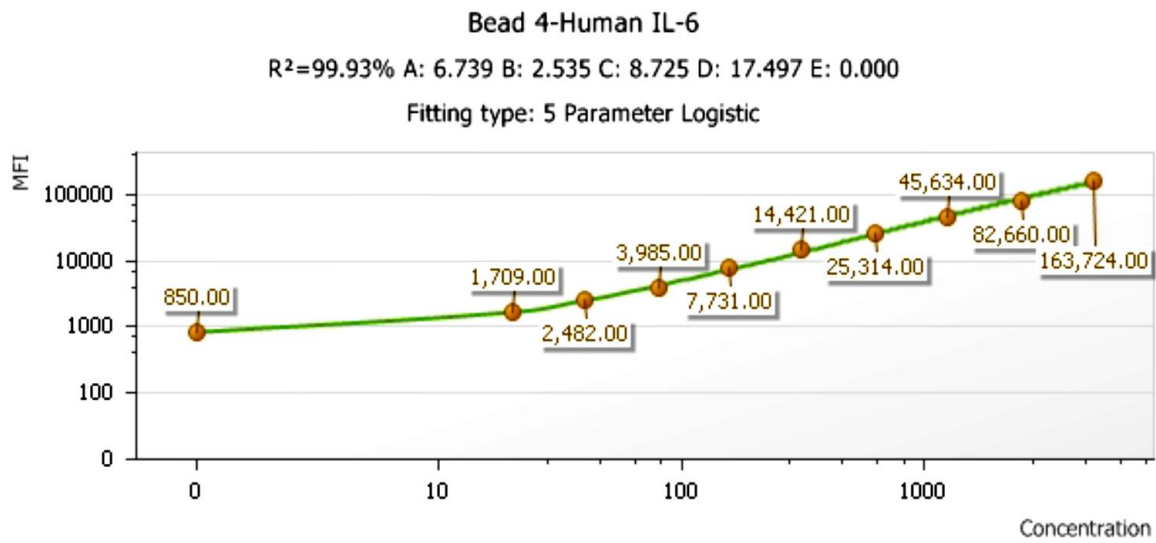


Figura 27 – Curva de calibração IL- 6

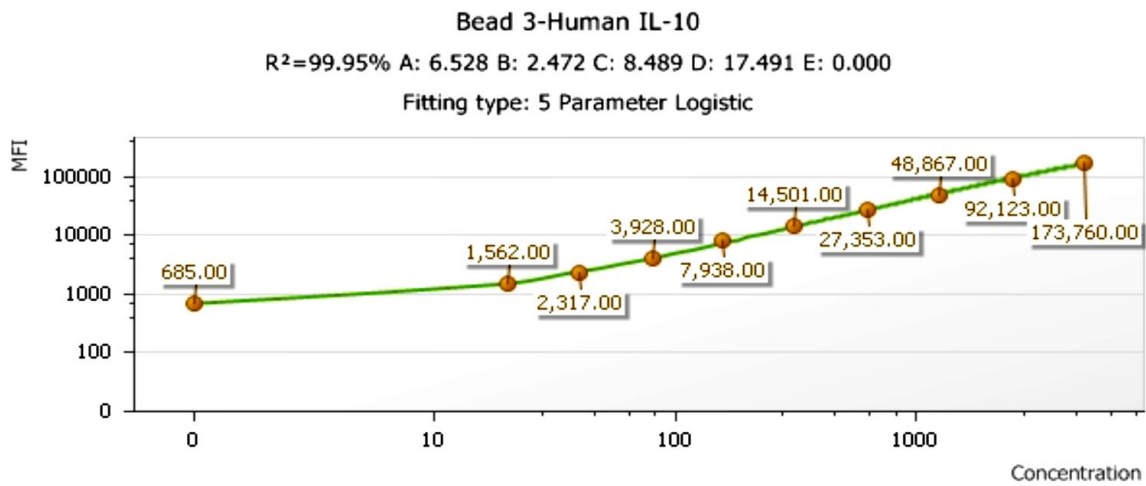


Figura 28 – Curva de calibração IL-10

7.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com o software estatístico **SPSS for Windows (SPSS Inc., Chicago, versão 24)**. Os dados omissos foram ignorados por *pairwise* e os *outliers* foram incluídos nas estatísticas.

As estatísticas descritivas para as variáveis antropométricas, bioquímicas/clínicas e de citometria foram calculadas para as categorias de corpulência definidas pelos critérios da IOTF, e para as classes de % massa gorda (por bio impedância) de acordo com McCarthy et al. 2006^{129,136}. Sempre que as médias em comparação eram proporções ou percentagens independentes, a significância estatística das diferenças foi avaliada através do teste do **qui-quadrado de Pearson**. Para dados contínuos e cumpridos os pressupostos paramétricos da variável, utilizou-se a comparação pareada de médias de amostras independentes através do **teste t de Student**, com as significâncias dos testes ajustadas através da **correção de Dunn-Bonferroni**. Para as variáveis que não cumpriam os pressupostos paramétricos, as comparações de grupos independentes foram feitas através do **teste U de Mann-Whitney**. Para avaliar o grau de associação entre as variáveis antropométricas, bioquímicas/clínicas e de citometria, e as variáveis correspondentes aos níveis das citoquinas estudadas, utilizou-se a **correlação de Pearson**, após normalização por transformação logarítmica.

Considerou-se uma diferença como estatisticamente significativa sempre que $p < 0.05$.

7.6. ÉTICA E DEONTOLOGIA

Os laboratórios do CGMNPEM sendo de **acesso condicionado** e a utilização de **códigos de barras** em todo o material que aí é manipulado estão em concordância com as normas da Comissão Nacional de Proteção de Dados.

É igualmente importante ressaltar que qualquer estudo de Investigação Clínica em Crianças pressupõe, para além da validade científica, um certo número de condicionantes, nomeadamente que o acompanhamento seja feito por um Médico com formação em Pediatria. Todos os trabalhos aqui citados foram submetidos e aprovados pela **Direção-Geral da Saúde**, pelo **Ministério da Ciência e da Educação** e pela **Comissão de Ética do Hospital Central Garcia de Orta** (Anexo 5) de acordo com os Princípios da Declaração de Helsínquia. O **Consentimento Informado Escrito** está indicado no Anexo 6, sendo que apenas participaram no estudo as crianças cujos Pais/Encarregados de Educação assinaram o referido documento.

RESULTADOS

8. RESULTADOS

8.1. PREÂMBULO

Antes da análise dos resultados obtidos convém esclarecer a forma como a recolha dos dados clínicos da amostra foram obtidos.

Como já foi referido, este estudo faz parte integrante de um projeto plurianual financiado pelo Ministério da Saúde, intitulado “Estudo Nutricional, Bioquímico e Genético, de uma População Infantil Pré-obesa e Obesa da Região Sul” (Direção Geral da Saúde - 27/2008).

Nos três trabalhos publicados e anteriormente referidos, está bem explícita qual a minha contribuição na sua execução. Assim, quando em 2013 tomei a decisão de me candidatar a esta Tese de Doutoramento, intitulada “ **Prevalência de certos biomarcadores como possíveis fatores de risco de doença ateromatosa numa população infantil de 9 anos de idade com excesso de peso**”, foi necessário que todas as crianças da minha amostragem fossem por mim observadas, o que implicou uma alteração na vida profissional de modo a poder estar presente sobretudo no período da manhã, nas escolas onde se iam efetuar as medições antropométricas e de bio impedância. Refira-se que houve o cuidado de ter sempre presente um médico pediatra, como aliás tinha sido sempre norma durante todo o projeto anteriormente realizado.

8.2. CARACTERIZAÇÃO GERAL

A amostra em estudo foi analisada sobre o ponto de vista clínico (antropometria e bio impedância), bioquímico, da quantificação de algumas citocinas inflamatórias /não, inflamatórias e ainda do padrão de marcação da ativação clássica (M1) / não clássica (M2) dos monócitos.

A avaliação foi assim primeiramente efetuada tendo em conta os parâmetros antropométricos, de acordo com a classificação preconizada pela IOTF.

8.2.1. RESULTADOS CLÍNICOS

8.2.1.1. ANTROPOMETRIA E BIO IMPEDÂNCIA

A descrição das características antropométricas e de bio impedância numa amostra de **201** crianças (98 raparigas e 103 rapazes) com uma idade média de $9,29 \pm 0,49$ anos, está pormenorizada na tabela 16 e apresenta uma distribuição equilibrada entre os géneros.

No que diz respeito à corpulência (segundo os critérios segundo a *IOTF*) os resultados mostram que **71,7% apresentam corpulência normal** enquanto que **28,9% têm excesso de peso/obesidade**.

O sexo **feminino**, contudo, apresenta uma taxa de **sobrepeso/obesidade** ligeiramente superior - **33,7,0%** - em relação aos indivíduos masculinos, que é de **24,3%**.

Os dados antropométricos apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos com **corpulência normal** e com **excesso de peso/obesidade** em relação ao **IMC**, **zIMC**, **Perímetro abdominal**, **Perímetro da anca**, **Perímetro do braço** e **Perímetro da perna**, tal como para a relação **Perímetro abdominal/Estatura**. Igualmente em relação à Bio impedância – **% Massa Gorda** e **Calorias em Repouso** – apresentam diferenças estatisticamente significativas para as duas categorias de corpulência referidas ($p < 0,05$).

Quando se analisam as diferenças antropométricas entre os géneros, não parecem existir quaisquer diferenças entre os sexos com exceção da relação **Perímetro abdominal/Perímetro da anca**, cuja diferença entre o grupo corpulência normal e com excesso de peso/obesidade é estatisticamente significativa para o sexo masculino.

Refira-se que estes resultados enquadram-se nos obtidos na análise da população total estudada (5514), cujos resultados constam na publicação já citada ¹⁶.

Tabela 16 - Descrição das características antropométricas (segundo a IOTF) e de bio impedância da população em estudo.

The_role_of_the_placenta_in_the_developm	IOTF*			GÉNERO					
	Total	Corpulência Normal	Excesso peso/obesidade	FEMININO			MASCULINO		
				Total	Corpulência Normal	Excesso peso/obesidade	Total	Corpulência Normal	Excesso peso/obesidade
n=201	n=143	n=58	n=98	n=65	n=33	n=103	n=78	n=25	
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Idade (anos)	9,29 ± 0,49	9,30 _a ± 0,49	9,26 _a ± 0,47	9,24 _x ± 0,47	9,24 _a ± 0,47	9,14 _a ± 0,42	9,36 _x ± 0,50	9,35 _a ± 0,51	9,40 _a ± 0,49
Antropometria									
Peso (Kg)	33,2 ± 7,04	29,98_a ± 4,64	41,22_b ± 5,34	33,46 _x ± 6,58	29,90_a ± 4,15	40,54_b ± 4,41	32,98 _x ± 8,48	30,05_a ± 5,06	42,13_b ± 6,34
Estatura (cm)	134,9 ± 11,5	134,1 _a ± 0,76	136,8 _a ± 19,1	136,0 _x ± 5,9	134,5_a ± 5,8	139,0_b ± 5,0	133,8 _x ± 14,9	133,8 _a ± 6,4	133,9 _a ± 28,6
IMC	17,93 ± 2,62	16,58_a ± 1,54	21,25_b ± 1,54	17,97 _x ± 2,54	16,48_a ± 1,45	20,92_b ± 1,35	17,89 _x ± 2,7	16,68_a ± 1,62	21,69_b ± 1,67
zIMC	0,63 ± 1,0	0,15_a ± 0,76	1,80_b ± 0,34	0,67 _x ± 0,99	0,12_a ± 0,75	1,73_b ± 0,29	0,60 _x ± 1,01	0,18_a ± 0,77	1,90_b ± 0,37
P. Abdominal (cm)	62,71 ± 7,44	59,37_a ± 4,45	71,18_b ± 6,77	62,72 _x ± 6,96	59,27_a ± 4,38	69,73_b ± 5,93	62,69 _x ± 7,92	59,44_a ± 4,56	73,10_b ± 7,45
P Anca (cm)	70,14 ± 7,27	66,87_a ± 5,30	78,12_b ± 4,85	70,02 _x ± 6,95	66,21_a ± 4,57	77,63_b ± 4,1	70,24 _x ± 7,6	67,41_a ± 5,85	78,74_b ± 5,71
P. Abdominal/P. Anca (cm)	0,9 ± 0,06	0,89 _a ± 0,54	0,91 _a ± 0,08	0,90 _x ± 0,06	0,896 _a ± 0,05	0,894 _a ± 0,09	0,896 _x ± 0,06	0,886_a ± 0,06	0,925_b ± 0,05
P. Abdominal/Estatura	0,46 ± 0,05	0,44_a ± 0,33	0,51_b ± 0,05	0,46 _x ± 0,05	0,44_a ± 0,03	0,5_b ± 0,05	0,46 _x ± 0,05	0,44_a ± 0,03	0,52_b ± 0,05
P. Braço (cm)	21,49 ± 11,35	20,56_a ± 13,32	23,77_a ± 2,0	22,40 _x ± 15,95	21,92 _a ± 19,7	23,45 _a ± 1,22	20,61 _x ± 2,89	19,42_a ± 1,76	24,18_b ± 2,66
P. perna (cm)	28,44 ± 3,91	27,33_a ± 3,96	31,16_b ± 1,99	28,17 _x ± 2,67	26,88_a ± 2,12	30,77_b ± 1,59	28,71 _x ± 4,81	27,72_a ± 5,02	31,66_b ± 2,36
Bio impedância									
Massa Gorda (%)	22,14 ± 6,51	20,44_a ± 5,78	26,09_b ± 6,44	22,67 _x ± 6,71	21,03_a ± 6,32	26,25_b ± 6,0	21,38 _x ± 6,29	19,94_a ± 5,27	25,84_b ± 7,17
Músculo-esquelético %	31,04 ± 2,49	31,14 _a ± 2,71	30,80 _a ± 1,84	31,06 _x ± 2,06	31,32 _a ± 2,2	30,60 _a ± 1,73	31,01 _x ± 2,85	30,98 _a ± 3,1	31,08 _a ± 1,97
Calorias em repouso (Kcal/dia)	1189,97 ± 118,83	1152,0_a ± 105,6	1280,1_b ± 98,9	1185,8 _x ± 124,5	1150,2 _a ± 130,3	1255,7 _a ± 76,5	1193,8 _x ± 113,8	1154,2_a ± 81,1	1312,5_b ± 116,4

*De acordo com os cut-offs da World Obesity/Policy & Prevention (IOTF). n – Número de crianças.

Os valores na mesma linha e subtabela que não compartilham o mesmo subscrito são estatisticamente diferentes com resultado $p < 0,05$ no teste t para médias de colunas independentes (indicadas a **negrito**) (_{a,b; x,y}). DP, desvio-padrão; IMC, índice de massa corporal; n, número de crianças. P, perímetro; zIMC, IMC z-score.

8.2.2. RESULTADOS BIOQUÍMICOS

8.2.2.1. Bioquímica

Os dados bioquímicos em estudo estão analisados na tabela 17 e não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre os dois gêneros ($p > 0.05$).

Tal como é suportado pelos dados do estudo global, não existe diferença estatisticamente diferente entre os grupos com **corpulência normal** e com **excesso peso/obesidade** para o parâmetro **colesterol total**. Contudo, **todas as restantes variáveis referentes ao perfil lipídico – HDL-c, LDL-c, LDL oxidada, TG, Apo A₁ e Apo B, - são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), incluindo as suas relações (Apo B/Apo A₁, CT/HDL-c, LDL-c/HDL-c e IA, com exceção da relação LDL-c / Apo B.**

Igualmente, o valor da **glicémia não é estatisticamente diferente naqueles dois grupos de corpulência**; porém, **a insulina** e consequentemente o **HOMA-IR**, já são **significativamente diferentes ($p < 0,05$).**

A **leptina** é outro parâmetro que confirma os dados do estudo global, apresentando **valores diferentes ($p < 0,05$) nos dois grupos em apreço** ¹²⁶.

Tabela 17 - Descrição das características bioquímicas da população em estudo

	Total	IOTF*		Gênero		
		N=201	Corpulência Normal	Excesso peso/obesidade	Feminino	Masculino
			n=143	n=58	n=101	n=104
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
Glicemia (mg/dl)	82,20 ± 9,16	81,86 _a ± 9,93	83,03 _a ± 6,91	81,27 _a ± 9,76	82,76 _a ± 9,12	
Insulinemia (μU/ml)	3,83 ± 3,18	3,13_a ± 2,3	5,69_b ± 4,32	4,16 _a ± 3,5	3,45 _a ± 2,73	
HOMA-IR	0,77 ± 0,61	0,64_a ± 0,47	1,14_b ± 0,79	0,84 _a ± 0,7	0,81 _a ± 1,02	
CT (mg/dl)	169,40 ± 28,39	168,83 _a ± 27,82	170,83 _a ± 29,95	169,98 _a ± 27,98	169,77 _a ± 29,8	
HDL-c (mg/dl)	59,14 ± 12,10	61,38_a ± 12,02	53,62_b ± 10,5	58,51 _a ± 11,98	59,78 _a ± 12,18	
LDL-c (mg/dl)	96,37 ± 24,0	93,54 _a ± 22,56	103,29 _b ± 26,78	97,53 _a ± 23,9	95,90 _a ± 26,12	
LDLox (mU/L)	6,67 ± 1,59	6,38_a ± 1,45	7,61_b ± 1,73	6,91 _a ± 1,45	6,55 _a ± 1,7	
TG (mg/dl)	63,92 ± 27,03	58,34_a ± 23,82	77,67_b ± 29,66	68,63 _a ± 27,59	59,53 _b ± 25,36	
Apo A₁ (g/L)	1,34 ± 0,22	1,37_a ± 0,21	1,26_b ± 0,23	1,32 _a ± 0,23	1,35 _a ± 0,21	
Apo B (g/L)	0,73 ± 0,15	0,71_a ± 0,14	0,79_b ± 0,16	0,74 _a ± 0,14	0,73 _a ± 0,16	
Apo B/Apo A₁	0,57 ± 0,16	0,54_a ± 0,15	0,64_b ± 0,17	0,59 _a ± 0,16	0,55 _a ± 0,15	
LDL-c/APO B	130,27 ± 12,54	130,33 _a ± 12,57	130,11 _a ± 12,58	130,11 _a ± 12,17	130,68 _a ± 13,06	
CT/HDL-c	2,95 ± 0,66	2,82_a ± 0,57	3,28_b ± 0,75	2,99 _a ± 0,64	2,93 _a ± 0,68	
LDL-c/HDL	1,71 ± 0,61	1,59_a ± 0,53	2,01_b ± 0,69	1,75 _a ± 0,59	1,68 _a ± 0,64	
IA	1,17 ± 0,75	1,00_a ± 0,62	1,54_b ± 0,87	1,22 _a ± 0,25	1,14 _a ± 0,25	
Prot. totais (ng/dl)	6,91 ± 0,42	6,85_a ± 0,42	7,04_b ± 0,39	6,95 _a ± 0,43	6,86 _a ± 0,41	
Ferritina (ng/dl)	40,36 ± 22,72	40,36 _a ± 23,55	40,38 _a ± 20,91	38,95 _a ± 19,67	42,04 _a ± 24,69	
Creatinemia (mg/dl)	0,58 ± 0,10	0,58 _a ± 0,11	0,58 _a ± 0,09	0,59 _a ± 0,1	0,57 _a ± 0,1	
Leptina (ng/dl)	6,44 ± 6,44	4,29_a ± 5,14	12,12_b ± 6,11	7,62 _a ± 6,44	5,26 _a ± 6,16	

*De acordo com os *cut-offs* da *World Obesity/Policy & Prevention*. n: Número de crianças; DP: desvio padrão; CT: colesterol total; HDL-c: Lipoproteína de elevada densidade; LDL-c: Lipoproteína de baixa densidade; LDLox: Fração oxidada da LDL; TG: triglicéridos; HOMA-IR: *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*; Apo: apolipoproteína; IA: Índice aterogênico [(TC-HDL-c) x apo B]/(HDL-c x apo A).

Os valores na mesma linha e subtabela que não compartilham o mesmo subscrito são estatisticamente diferentes com resultado $p < 0,05$ no teste t para médias de colunas independentes (indicadas a **negrito**).

8.2.2.2. Corpulência Normal e Dislipidemia

Tal como no estudo global ¹²⁶, também nesta amostra se verificam crianças com **corpulência normal** mas que **já apresentam dislipidemia** (tabela 18). De facto, cerca de **47%** (67 em 143) apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) para **todos os parâmetros do perfil lipídico excetuando os TG**; contudo, o índice aterogénico apesar de estar aumentado neste grupo, ainda não apresenta alteração estatisticamente significativa.

Tabela 18 - Características bioquímicas entre grupos corpulência IOTF e por grupos com e sem dislipidemia.

	<i>Corpulência normal*</i>		<i>Excesso peso/obesidade*</i>	
	Sem dislipidemia	Com dislipidemia	Sem dislipidemia	Com dislipidemia
	n = 76	n = 67	n = 29	n = 29
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Glicémia (mg/dl)	81,22 _a ± 9,41	82,38 _a ± 10,46	84,03 _a ± 7,49	82,03 _a ± 6,25
Insulinémia (μU/ml)	2,80 _a ± 1,47	3,45 _a ± 2,83	5,87 _a ± 5,40	5,54 _a ± 3,28
HOMA-IR	0,56 _a ± 0,26	0,71 _a ± 0,59	1,16 _a ± 0,96	1,12 _a ± 0,62
LDL-c (mg/dl)	79,07_a ± 13,67	109,55_b ± 19,38	83,59_a ± 17,01	123,00_b ± 19,13
LDLox (mU/L)	5,92 _a ± 1,36	6,46 _a ± 1,64	6,90_a ± 1,39	8,07_b ± 1,61
HDL-c (mg/dl)	56,43_a ± 9,69	66,79_b ± 11,98	52,86_a ± 9,12	54,38 _a ± 11,83
CT (mg/dl)	147,62_a ± 13,91	192,35_b ± 18,05	147,10_a ± 15,72	194,55_b ± 20,31
CT/HDL	2,69_a ± 0,53	2,97_b ± 0,60	2,85_a ± 0,50	3,71_b ± 0,72
LDL-c/HDL-c	1,47_a ± 0,48	1,72_b ± 0,56	1,65_a ± 0,51	2,38_b ± 0,65
TG (mg/dl)	55,00 _a ± 20,41	62,00 _a ± 27,03	67,48_a ± 20,77	87,86_b ± 33,83
Apo A1 (g/L)	1,28_a ± 0,18	1,47_b ± 0,20	1,20 _a ± 0,21	1,32 _a ± 0,23
Apo B (g/L)	0,63_a ± 0,09	0,81_b ± 0,12	0,67_a ± 0,10	0,90_b ± 0,11
Apo B/Apo A1	0,50_a ± 0,14	0,57_b ± 0,15	0,58_a ± 0,16	0,71_b ± 0,15
LDL-c/Apo B	126,03_a ± 11,88	135,30_b ± 11,62	123,95_a ± 10,79	136,27_b ± 11,28
I.A.	0,91 _a ± 0,62	1,12 _a ± 0,61	1,15_a ± 0,61	1,99_b ± 0,92
Leptina (ng/dl)	4,00 _a ± 5,20	4,59 _a ± 5,17	11,53 _a ± 6,38	12,63 _a ± 6,03

*De acordo com os *cut-offs* da *World Obesity/Policy & Prevention*. n: Número de crianças; DP: desvio padrão; CT: colesterol total; HDL-c: Lipoproteína de elevada densidade; LDL-c: Lipoproteína de baixa densidade; LDLox: Fração oxidada da LDL; TG: triglicéridos; HOMA-IR: *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*; Apo: apolipoproteína; IA: Índice aterogénico [(TC-HDL-c) x apo B]/(HDL-c x apo A).

Os valores na mesma linha e subtabela que não compartilham o mesmo subscrito são estatisticamente diferentes com resultado $p < 0,05$ no teste t para médias de colunas independentes (indicadas a **negrito**).

8.2.2.3. Diferenças bioquímicas entre os grupos com e sem dislipidemia

No grupo que apresenta dislipidemia, a maioria dos parâmetros bioquímicos que foram analisados encontram-se aumentados nos indivíduos que apresentam excesso peso/obesidade (excetuando glicemia, colesterol total e o Índice Aterogénico).

No grupo sem dislipidemia os valores bioquímicos significativamente diferentes entre os grupos IOTF são a insulina, o HOMA-IR e os TG, assim como os valores de Apo B, a relação Apo B/Apo A1 e a leptina (tabela 19).

Tabela 19 - Características bioquímicas entre grupos com e sem dislipidemia e por grupos corpulência IOTF.

	<i>Sem dislipidemia</i>		<i>Com dislipidemia</i>	
	Corpulência normal*	Excesso peso/obesidade*	Corpulência normal*	Excesso peso/obesidade*
	n = 76	n = 29	n = 67	n = 29
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Glicemia (mg/dl)	81,22 _a ± 9,41	84,03 _a ± 7,49	82,38 _a ± 10,46	82,03 _a ± 6,25
Insulinemia (μU/ml)	2,80_a ± 1,47	5,87_b ± 5,40	3,45_a ± 2,83	5,54_b ± 6,25
HOMA-IR	0,56_a ± 0,26	1,16_b ± 0,96	0,71_a ± 0,59	1,12_b ± 0,62
LDL-c (mg/dl)	79,07 _a ± 13,67	83,59 _a ± 17,01	109,55_a ± 19,38	123,00_b ± 19,13
LDL_{ox} (mU/L)	5,92 _a ± 1,36	6,46 _a ± 1,64	6,90_a ± 1,39	8,07_b ± 1,61
HDL-c (mg/dl)	56,43 _a ± 9,69	52,86 _a ± 9,12	66,79_a ± 11,98	54,38_b ± 11,83
CT (mg/dl)	147,62 _a ± 13,91	147,10 _a ± 15,72	192,35 _a ± 18,05	194,55 _a ± 20,31
CT/HDL	2,69 _a ± 0,53	2,85 _a ± 0,50	2,97_a ± 0,60	3,71_b ± 0,72
LDL-c/HDL-c	1,47 _a ± 0,48	1,65 _a ± 0,51	1,72_a ± 0,56	2,38_b ± 0,61
TG (mg/dl)	55,00_a ± 20,41	67,48_b ± 20,77	62,00_a ± 27,03	87,86_b ± 33,83
Apo A1 (g/L)	1,28 _a ± 0,18	1,20 _a ± 0,21	1,47 _a ± 0,20	1,32_b ± 0,23
Apo B (g/L)	0,63_a ± 0,09	0,67_b ± 0,10	0,81_a ± 0,12	0,90_b ± 0,11
Apo B/Apo A1	0,50_a ± 0,14	0,58_b ± 0,16	0,57_a ± 0,15	0,71_b ± 0,15
LDL-c/Apo B	126,03 _a ± 11,88	123,95 _a ± 10,79	135,30 _a ± 11,62	136,27 _a ± 11,28
I.A.	0,91 _a ± 0,62	1,15 _a ± 0,61	1,12_a ± 0,61	1,99_b ± 0,92
Leptina (ng/dl)	4,00_a ± 5,20	11,53_b ± 6,38	4,59_a ± 5,17	12,63_b ± 6,03

*De acordo com os *cut-offs* da *World Obesity/Policy & Prevention*. n: Número de crianças; DP: desvio padrão; CT: colesterol total; HDL-c: Lipoproteína de elevada densidade; LDL-c: Lipoproteína de baixa densidade; LDL_{ox}: Fração oxidada da LDL; TG: triglicéridos; HOMA-IR: *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*; Apo: apolipoproteína; IA: Índice aterogénico [(TC-HDL-c) x Apo B]/(HDL-c x Apo A₁).

Os valores na mesma linha e subtabela que não compartilham o mesmo subscrito são estatisticamente diferentes com resultado $p < 0,05$ no teste t para médias de colunas independentes (indicadas a **negrito**).

8.2.2.4. Antropometria e quantificação de citocinas

Se nos reportarmos aos valores das concentrações no soro das citocinas analisadas, não se observam diferenças significativas em relação ao género ($p > 0,05$) e igualmente no que diz respeito à corpulência nos dois grupos considerados com exceção do **IFN- γ** , cujo valor é já significativamente diferente ($p < 0,05$). entre **corpulência normal e excesso de peso** (tabela 20).

Tabela 20 - Quantificação citocinas da população em estudo

		IOTF*			Género	
		Total	Corpulência normal	Excesso peso/obesidade	Feminino	Masculino
		<i>n=201</i>	<i>n=143</i>	<i>n=58</i>	<i>n=101</i>	<i>n=104</i>
		Média \pm DP (pg/ml)	Média \pm DP (pg/ml)	Média \pm DP (pg/ml)	Média \pm DP (pg/ml)	Média \pm DP (pg/ml)
Inflamatórias	IL-2	0,06 \pm 0,26	0,07 _a \pm 0,28	0,05 _a \pm 0,21	0,07 _a \pm 0,26	0,06 _a \pm 0,27
	IL-6	0,83 \pm 2,05	0,83 _a \pm 2,34	0,84 _a \pm 1,07	0,80 _a \pm 1,03	0,85 _a \pm 2,68
	IFN-γ	1,11 \pm 2,62	0,78_a \pm 1,72	1,96_b \pm 3,99	1,16 _a \pm 2,60	1,09 _a \pm 2,67
	TNF-α	0,24 \pm 1,20	0,28 _a \pm 1,41	0,13 _a \pm 0,31	0,35 _a \pm 1,53	0,13 _a \pm 0,70
Não Inflamatórias	IL-4	0,00 \pm 0,02	0,00 _a \pm 0,02	0,01 _a \pm 0,03	0,00 _a \pm 0,03	0,00 _a \pm 0,01
	IL-10	0,47 \pm 1,00	0,44 _a \pm 1,01	0,52 _a \pm 0,98	0,57 _a \pm 0,98	0,38 _a \pm 0,99

*De acordo com os cut-offs da World Obesity/Policy & Prevention. n – Número de crianças; DP: desvio padrão.

Nota: os valores na mesma linha e subtabela que não compartilham o mesmo subscrito são bastante diferentes em $p < 0,05$ no teste de igualdade de duas etapas para médias de coluna (indicadas a **negrito**). Células sem nenhum subscrito não são incluídas no teste. Os testes consideram variâncias iguais.

1. Os testes são ajustados para todas as comparações entre pares em uma linha de cada subtabela mais interna usando a correção *Bonferroni*.

8.2.2.5. Comparação da expressão de citocinas com os grupos de corpulência

Não parece existir qualquer diferença entre os valores logaritmizados da expressão das citocinas analisadas com os grupos de corpulência da amostra que apresentam ou não dislipidemia (tabela 21).

Tabela 21 - Correlações de Citoquinas com os grupos de corpulência que apresentam ou não dislipidemia

		<i>Corpulência normal*</i>		<i>Excesso peso/obesidade*</i>	
		Sem dislipidemia	Com dislipidemia	Sem dislipidemia	Com dislipidemia
		<i>n</i> = 76	<i>n</i> = 29	<i>n</i> = 67	<i>n</i> = 29
		Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
<i>Inflamatórias</i>	log IL-2	-1,82 _a ± 0,56	-1,93 _a ± 0,037	-1,89 _a ± 0,42	-1,74 _a ± 0,67
	log IL-6	-0,93 _a ± 1,04	-0,51 _a ± 1,01	-1,15 _a ± 1,02	-1,14 _a ± 1,07
	log IFN-γ	-1,19 _a ± 1,12	-0,80 _a ± 1,27	-1,50 _a ± 0,95	-1,32 _a ± 1,17
	log TNF-α	-1,72 _a ± 0,75	-1,56 _a ± 0,80	-1,79 _a ± 0,62	-1,72 _a ± 0,68
<i>Anti-inflamatórias</i>	log IL-4	-1,97 _a ± 0,16	-1,95 _a ± 0,25	-1,98 _a ± 0,14	-1,90 _a ± 0,41
	log IL-10	-1,17 _a ± 0,97	-0,88 _a ± 0,91	-1,25 _a ± 0,94	-1,04 _a ± 1,06

*De acordo com os *cut-offs* da *World Obesity/Policy & Prevention*. *n* – Número de crianças. DP – desvio padrão.

Nota: os valores na mesma linha e subtabela que não compartilham o mesmo subscrito são bastante diferentes em $p < ,05$ no teste de igualdade de duas etapas para médias de coluna. Células sem nenhum subscrito não são incluídas no teste. Os testes consideram variâncias iguais.

1. Os testes são ajustados para todas as comparações entre pares em uma linha de cada subtabela mais interna usando a correção *Bonferroni*.

8.2.2.6. Comparação da expressão de citocinas dos grupos da amostra que apresentam ou não dislipidemia e por grupos de corpulência

Observa-se uma única diferença **significativa** que parece existir entre estes dois grupos ($p < 0,05$), **negativa**, e diz respeito à expressão de **IL-6** nos indivíduos sem dislipidemia entre os grupos de corpulência normal e excesso de peso/obesidade (tabela 22).

Tabela 22 - Correlações entre grupos com e sem dislipidemia por grupos IOTF com Citoquinas

		<i>Sem dislipidemia</i>		<i>Com dislipidemia</i>	
		Corpulência normal* n = 76	Excesso peso/obesidade* n = 67	Corpulência normal* n = 29	Excesso peso/obesidade* n = 29
		Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
<i>Inflamatórias</i>	<i>log IL-2</i>	-1,82 _a ± 0,56	-1,93 _a ± 0,37	-1,89 _a ± 0,42	-1,74 _a ± 0,67
	<i>log IL-6</i>	-0,93_a ± 1,04	-0,51_b ± 1,01	-1,15 _a ± 1,02	-1,14 _a ± 1,07
	<i>log IFN-γ</i>	-1,19 _a ± 1,12	-0,80 _a ± 1,27	-1,50 _a ± 0,95	-1,32 _a ± 1,17
	<i>log TNF-α</i>	-1,72 _a ± 0,75	-1,56 _a ± 0,80	-1,79 _a ± 0,62	-1,72 _a ± 0,68
<i>Anti-inflamatórias</i>	<i>log IL-4</i>	-1,97 _a ± 0,16	-1,95 _a ± 0,25	-1,98 _a ± 0,14	-1,90 _a ± 0,41
	<i>log IL-10</i>	-1,17 _a ± 0,97	-0,88 _a ± 0,91	-1,25 _a ± 0,94	-1,04 _a ± 1,06

*De acordo com os *cut-offs* da *World Obesity/Policy & Prevention*. n – Número de crianças. DP – desvio padrão.

Nota: os valores na mesma linha e subtabela que não compartilham o mesmo subscrito são bastante diferentes em $p < 0,05$ no teste de igualdade de duas etapas para médias de coluna. Células sem nenhum subscrito não são incluídas no teste. Os testes consideram variâncias iguais.

1. Os testes são ajustados para todas as comparações entre pares em uma linha de cada subtabela mais interna usando a correção *Bonferroni*.

8.2.2.7. Antropometria e Monócitos Mon 1, 2 e 3

A caracterização dos monócitos foi efetuada segundo os critérios anteriormente definidos e a análise dos resultados revela que a maioria dos monócitos circulantes, quer quando analisados sob o ponto de vista da corpulência ou do género, pertencem ao grupo **Mon 1** (quer dizer, são CD14⁺/CD16⁻); o grupo que está seguidamente mais representado é o denominado como **Mon 2** (CD14⁺/CD16⁺) e também aqui não se verificam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de corpulência e de género. O mesmo se verifica em relação ao grupo de monócitos representado em minoria – **Mon 3** (CD14⁺/CD16⁺⁺) (tabela 23).

Tabela 23 – Proporções das populações de monócitos Mon 1, 2 e 3, como indicado, no total de células CD14⁺

	IOTF*			Género	
	Total	Corpulência Normal	Excesso peso/obesidade	Feminino	Masculino
	<i>n</i> =201	<i>n</i> =143	<i>n</i> =58	<i>n</i> =101	<i>n</i> =104
	Média (%) ± DP	Média (%) ± DP	Média (%) ± DP	Média (%) ± DP	Média (%) ± DP
Mon 1	76,42 ± 16,5	75,71 _a ± 17,32	78,17 _a ± 14,28	75,57 _a ± 18,43	77,39 _a ± 14,08
Mon 2	16,64 ± 16,44	17,28 _a ± 17,24	15,07 _a ± 14,31	17,47 _a ± 18,4	15,56 _a ± 14,05
Mon 3	1,17 ± 0,88	1,19 _a ± 0,93	1,11 _a ± 0,76	1,21 _a ± 0,92	1,13 _a ± 0,83

*De acordo com os cut-offs da World Obesity/Policy & Prevention. *n* – Número de crianças. DP – desvio padrão.

Nota: os valores na mesma linha e subtabela que não compartilham o mesmo subscrito são bastante diferentes em $p < 0,05$ no teste de igualdade de duas etapas para médias de coluna. Células sem nenhum subscrito não são incluídas no teste. Os testes consideram variâncias iguais.

1. Os testes são ajustados para todas as comparações entre pares em uma linha de cada subtabela mais interna usando a correção Bonferroni..

8.2.2.8. Antropometria e Monócitos M1 – M2

Se fizermos a análise sob o ponto de vista da caracterização tipo **M1** (CD163⁻/CD206⁻) e tipo **M2** (CD163⁺/CD206⁺, ou CD163⁻/CD206⁺ ou CD163⁺/CD206⁻), verifica-se que a maioria dos monócitos circulantes são do tipo **M2**, não se verificando também diferenças estatisticamente significativas quer entre os grupos de corpulência, quer entre os géneros (tabela 24).

Tabela 24 - Proporções das populações de monócitos M1, M2 e M1/M2, como indicado, no total de células CD14+

	IOTF*			Género	
	Total	Corpulência Normal	Excesso peso/obesidade	Feminino	Masculino
	<i>n</i> =201	<i>n</i> =143	<i>n</i> =58	<i>n</i> =101	<i>n</i> =104
	Média (%) ± DP	Média (%) ± DP	Média (%) ± DP	Média (%) ± DP	Média (%) ± DP
M1	12,53 ± 14,04	12,87 _a ± 15,37	11,69 _a ± 10,11	11,95 _a ± 13,85	13,00 _a ± 14,07
M2	75,07 ± 15,09	73,95 _a ± 16,41	77,87 _a ± 10,83	75,87 _a ± 15,39	74,72 _a ± 14,69
M1/M2	0,34 ± 1,40	0,41 _a ± 1,65	0,17 _a ± 0,20	0,34 _a ± 1,47	0,33 _a ± 1,30

*De acordo com os cut-offs da World Obesity/Policy & Prevention. *n* – Número de crianças. DP – desvio padrão.

Nota: os valores na mesma linha e subtabela que não compartilham o mesmo subscrito são bastante diferentes em $p < 0,05$ no teste de igualdade de duas etapas para médias de coluna. Células sem nenhum subscrito não são incluídas no teste. Os testes consideram variâncias iguais.

1. Os testes são ajustados para todas as comparações entre pares em uma linha de cada subtabela mais interna usando a correção Bonferroni..

8.2.2.9. Comparação das populações de monócitos Mon 1, 2 e 3 e M1 - M2 com os grupos de corpulência e por dislipidemia

Não parece existir qualquer diferença da expressão das populações de monócitos consideradas nos grupos em análise (tabelas 25 e 26).

Tabela 25 - Monócitos Mon 1, Mon 2 e Mon 3, por grupos com e sem dislipidemia e grupos IOTF

	<i>Sem dislipidemia</i>		<i>Com dislipidemia</i>	
	Corpulência normal	Excesso peso/obesidade	Corpulência normal	Excesso peso/obesidade
	n = 76	n = 29	n = 67	n = 29
	Média (%) ± DP	Média (%) ± DP	Média (%) ± DP	Média (%) ± DP
Mon 1	74,00 _a ± 19,33	77,98 _a ± 12,66	77,66 _a ± 14,61	78,37 _a ± 15,91
Mon 2	19,03 _a ± 19,55	15,95 _a ± 11,94	15,28 _a ± 14,05	14,21 _a ± 16,45
Mon 3	1,28 _a ± 1,00	1,06 _a ± 0,78	1,09 _a ± 0,85	1,16 _a ± 0,74

*De acordo com os *cut-offs* da *World Obesity/Policy & Prevention*

Nota: os valores na mesma linha e subtabela que não compartilham o mesmo subscrito são bastante diferentes em $p < 0,05$ no teste de igualdade de duas etapas para médias de coluna. Células sem nenhum subscrito não são incluídas no teste. Os testes consideram variâncias iguais.

1. Os testes são ajustados para todas as comparações entre pares em uma linha de cada subtabela mais interna usando a correção *Bonferroni*.

Tabela 26 - Monócitos M1 e M2 por grupos com e sem dislipidemia e grupos IOTF

	<i>Sem dislipidemia</i>		<i>Com dislipidemia</i>	
	Corpulência normal	Excesso peso/obesidade	Corpulência normal	Excesso peso/obesidade
	n = 76	n = 29	n = 67	n = 29
	Média (%) ± DP	Média (%) ± DP	Média (%) ± DP	Média (%) ± DP
M1	12,85 _a ± 14,78	9,89 _a ± 7,40	12,90 _a ± 16,13	13,44 _a ± 12,05
M2	74,43 _a ± 15,83	80,68 _a ± 8,67	73,40 _a ± 17,15	75,15 _a ± 12,12
M1/M2	0,38 _a ± 1,50	0,13 _a ± 0,12	0,44 _a ± 1,81	0,21 _a ± 0,26

*De acordo com os *cut-offs* da *World Obesity/Policy & Prevention*

Nota: os valores na mesma linha e subtabela que não compartilham o mesmo subscrito são bastante diferentes em $p < 0,05$ no teste de igualdade de duas etapas para médias de coluna. Células sem nenhum subscrito não são incluídas no teste. Os testes consideram variâncias iguais.

Os testes são ajustados para todas as comparações entre pares em uma linha de cada subtabela mais interna usando a correção *Bonferroni*

8.2.2.10. Correlações entre antropometria e níveis de citocinas

Observa-se uma correlação muito positiva ($p < 0,01$) entre os valores antropométricos **peso** ($r=0,249$), **IMC** ($r=0,223$), **zIMC** ($r=0,194$), **Perímetro Abdominal** ($r=0,191$), com a concentração no soro da citocina pró-inflamatória **IFN- γ** .

Não se encontraram mais correlações positivas entre antropometria e citocinas (tabela 27).

Tabela 27 - Correlações entre antropometria e bio impedância com citocinas inflamatórias e não inflamatórias

	Citoquinas					
	Inflamatórias				Não inflamatórias	
	IL-2	IL-6	TNF- α	IFN- γ	IL-4	IL-10
Peso	-0,057	0,033	-0,114	0,249**	-0,020	-0,010
Estatura	0,008	-0,025	-0,104	0,128	-0,046	0,026
IMC	-0,070	0,037	-0,099	0,223**	0,034	-0,017
zIMC_IOTF	-0,077	0,050	-0,107	0,194**	0,010	-0,018
Perímetro Abdominal	-0,055	0,044	-0,078	0,240**	0,042	0,014
Perímetro Abdominal/Estatura	-0,053	0,038	-0,048	0,191**	0,096	0,019
Massa Gorda	-0,130	0,064	-0,040	0,113	0,013	-0,151

Teste de **Correlação de Pearson**

* Correlações estatisticamente significativas no nível $p < 0,05$; ** Correlações estatisticamente significativas no nível $p < 0,01$.

8.2.2.11. Correlações entre expressão de citocinas e parâmetros bioquímicos

No que que respeita às correlações entre os valores dos **parâmetros bioquímicos e a expressão de citocinas**, encontrou-se **correlação positiva** ($p < 0,05$) entre o valor da **insulinemia e de TG** com os valores do **IFN- γ** ($r = 0,190$ e $r = 0,151$, respetivamente); esta citocina também está correlacionada mas **negativamente** ($p < 0,05$) com os valores dos parâmetros **LDL-c** ($r = -0,154$), **CT** ($r = -0,149$) e **Apo B** ($r = -0,139$).

Quanto às restantes citocinas, não se observaram associações significativas, com exceção de uma **correlação negativa** ($p < 0,05$) da **IL-2** com a relação **Apo B/Apo A₁** ($r = -0,153$) e outra, também **negativa**, entre a **IL-4** e a mesma relação **Apo B/Apo A₁** ($r = -0,171$) (tabela 28).

Tabela 28 - Correlações entre Bioquímica e citocinas inflamatórias e não inflamatórias

	Citoquinas					
	Inflamatórias				Não inflamatórias	
	IL-2	IL-6	TNF- α	IFN- γ	IL-4	IL-10
Glicémia (mg/dl)	0,002	0,054	-0,127	-0,078	0,023	-0,005
Insulinemia (μ U/ml)	-0,066	-0,013	-0,036	0,190*	-0,070	0,041
HOMA-IR	-0,070	-0,012	-0,037	0,116	-0,063	0,113
LDL-c (mg/dl)	-0,067	-0,088	-0,091	-0,154*	-0,117	-0,047
Fração Oxidada LDL (mU/L)	0,062	0,022	-0,246	-0,138	-0,149	0,102
HDL-c (mg/dl)	0,001	-0,068	-0,037	-0,093	0,037	-0,075
CT (mg/dl)	-0,039	-0,110	-0,105	-0,149*	-0,085	-0,068
CT/HDL-c	-0,031	-0,032	-0,048	-0,011	-0,067	0,017
LDL-c/HDL-c	-0,049	-0,034	-0,045	-0,038	-0,73	0,008
TG (mg/dl)	-0,129	-0,089	-0,037	0,151*	-0,037	-0,021
Apo A1 (g/L)	0,101	-0,036	-0,034	-0,075	-0,044	-0,046
Apo B (g/L)	-0,107	-0,096	-0,111	-0,139*	-0,066	-0,067
Apo B/Apo A1	-0,153*	-0,050	-0,065	-0,029	-0,004	-0,018
LDL/Apo B	0,064	-0,029	0,008	-0,156*	-0,171*	0,010
Índice Aterogénico (IA)	-0,086	-0,024	-0,045	-0,026	-0,006	-0,008
Leptina (ng/dl)	-0,032	0,001	-0,069	0,121	0,003	0,035

Teste de **Correlação de Pearson**

* Correlações estatisticamente significativas no nível **$p < 0,05$** ; ** Correlações estatisticamente significativas no nível **$p < 0,01$** .

8.2.2.12. Correlações das diferentes expressões de monócitos com os parâmetros bioquímicos

No que diz respeito à expressão de **monócitos Mon 1, 2 e 3** e os valores dos parâmetros bioquímicos, podemos identificar **correlações significativas, positivas ($p < 0,05$)** entre a relação **Apo B/Apo A₁** e a expressão de **Mon 2 ($r = 0,180$)**, assim como entre os valores do **IA** e as populações **Mon 1 ($r = 0,162$)** e **Mon 2 ($r = 0,184$) ($p < 0,05$)**. Verifica-se também uma correlação **significativa ($p < 0,05$)** mas **negativa**, entre os valores da relação **Apo B/Apo A₁** e a população de **monócitos Mon 1 ($r = -0,167$)**.

No respeitante à expressão de **monócitos M1 - M2**, identificam-se **correlações significativas ($p < 0,05$)**, mas **negativas**, entre os valores de **TG** e a **M1 ($r = -0,174$)** e dos valores de **Apo A₁** com **M2 ($r = -0,183$)**. Por outro lado, existe **correlação significativa ($p < 0,05$)** mas **positiva**, entre os valores do **IA** e a expressão e **monócitos M1 ($r = 0,164$)** e ao **rácio M1/M2 ($r = 0,184$)**, assim como do valor da **leptina com M1 ($r = 0,194$)** (tabela 29).

Tabela 29 - Correlações das diferentes expressões de monócitos com os parâmetros bioquímicos

	Monócitos					
	Mon1	Mon2	Mon3	%M1	%M2	M1/M2
Glicémia (mg/dl)	0,082	-0,054	-0,043	-0,106	0,040	-0,045
Insulinémia (μ U/ml)	-0,016	0,004	0,021	0,088	-0,141	0,055
HOMA-IR	0,044	-0,066	-0,008	-0,003	-0,051	0,006
LDL-c (mg/dl)	0,026	-0,041	-0,046	0,083	-0,049	0,033
HDL-c (mg/dl)	0,113	-0,113	0,001	-0,079	0,038	-0,048
Colesterol Total (mg/dl)	0,054	-0,070	-0,017	0,047	-0,061	0,000
Colesterol Total/HDL	-0,088	0,070	0,009	0,117	-0,104	0,037
Colesterol LDL/HDL	-0,066	0,051	-0,009	0,111	-0,078	0,048
Triglicéridos (mg/dl)	-0,010	-0,019	0,001	-0,174*	-0,045	0,016
APO A1 (g/L)	0,101	-0,135	0,064	0,018	-0,183*	-0,031
APO B (g/L)	-0,011	0,002	-0,025	0,097	-0,047	0,013
APO B/APO A1	-0,167*	0,180*	-0,026	0,128	0,006	0,153
LDL/APO B	0,101	-0,116	-0,094	0,014	-0,042	0,060
Índice Aterogénico (IA)	0,162*	0,184*	-0,069	0,164*	-0,137	0,184*
Fração Oxidada LDL (mU/L)	0,044	-0,066	-0,008	-0,003	-0,051	0,006
Leptina (ng/dl)	-0,077	0,078	0,020	0,194*	-0,143	0,030

Teste de **Correlação de Pearson**

* Correlações estatisticamente significativas no nível **$p < 0,05$** ; ** Correlações estatisticamente significativas no nível **$p < 0,01$** .

8.2.2.13. Correlação das subpopulações de monócitos com a expressão de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias

Verifica-se uma correlação **significativa** ($p < 0,05$), **negativa** ($r = -0,543$), entre a expressão de **IL-2 e de Mon 1**.

No que diz respeito à correlação entre a expressão de citocinas e a marcação de monócitos M1 – M2, verifica-se uma correlação **positiva significativa** entre o **IFN- γ com M1** ($r = 0,273$) e o **rácio M1/M2** ($r = 0,252$); pelo contrário, existe evidência de correlações **muito significativas** ($p < 0,01$), **negativas**, entre o **TNF- α e M1** ($r = -0,369$) e entre a **IL-10** com a expressão de **monócitos M1** ($r = -0,299$) e o **rácio M1/M2** ($r = -0,290$) (tabela 30).

Tabela 30 - Correlação entre tipo de ativação de monócitos e tipo de citocina

		Monócitos					
		Mon 1	Mon 2	Mon 3	M1	M2	M1/M2
Inflamatórias	IL-2	-0,543*	0,587*	0,316	-0,479	-0,307	-0,457
	IL-6	-0,064	-0,002	-0,120	-0,036	-0,058	-0,028
	IFN-γ	-0,081	-0,072	-0,156	0,273*	-0,102	0,252*
	TNF-α	-0,110	-0,091	-0,264	-0,369*	0,073	-0,325
Não Inflamatórias	IL-4	0,065	-0,078	-0,539	-0,518	-0,748	-0,482
	IL-10	0,022	-0,082	-0,166	-0,299**	0,002	-0,290**

Teste de **Correlação de Pearson**

* Correlações estatisticamente significativas no nível **$p < 0,05$** ; ** Correlações estatisticamente significativas no nível **$p < 0,01$**

DISCUSSÃO

9. DISCUSSÃO

9.1. DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Segundo a OMS, as Doenças Cardiovasculares (DCV) provocam, em cada ano, 3,9 milhões de mortes na Europa e mais de 1,8 milhões na União Europeia (EU), (45% e cerca de 37% respetivamente). São consideradas a principal causa de mortalidade no sexo masculino em 12 países da EU e a principal no sexo feminino em todos exceto em 2 ¹⁰⁰.

No que respeita à morbilidade das DCV e considerando os **anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs)** estes têm vindo a diminuir na maioria dos países europeus na última década, embora ainda sejam responsáveis pela perda de 64 milhões de DALYs em toda a Europa e cerca de 26 milhões na EU. De referir que dos DAYLYs perdidos por todas as patologias, as DCV representam cerca de 1/4 na Europa e 1/5 na UE ¹⁰⁰.

É bem conhecida a existência de vários fatores de risco associados à génese das DCV. Para além dos predisponentes, estes estão habitualmente associados ao estilo de vida, em que os fatores alimentares, como consumo de gordura/energia e a inatividade física concorrem também para uma elevada prevalência da obesidade por todo o Mundo ^{137,138}.

Refira-se que as DCV têm como fator comum a existência de um processo inflamatório crónico na origem do aparecimento da lesão aterosclerótica, a qual é resultante da participação das células da parede dos vasos arteriais e igualmente de células do SI ¹³⁹. É ainda influenciada por fatores genéticos bem como pela hemodinâmica circulatória, com participação do perfil lipoproteico ^{140 141}.

Estes fenómenos são grandemente afetados pela existência de um certo número de doenças crónicas como a obesidade, diabetes, doenças autoimunes e doença renal crónica, entre outras, que também apresentam um processo inflamatório crónico ¹⁴².

9.2. OBESIDADE

A prevalência do excesso de peso/obesidade tomou proporções epidémicas nas últimas décadas. Dados da OMS referem que em 2016, os valores da obesidade tinham triplicado desde 1975 e que 1,9 biliões de adultos teriam excesso de peso. Destes, 650 milhões eram obesos ¹².

A prevalência de crianças e adolescentes com excesso de peso/obesidade tem também aumentado em todo o Mundo ¹⁴³. A OMS refere que mais de 340 milhões de crianças e adolescentes dos 5 aos 19 anos apresentavam excesso de peso ou obesidade em 2016 ¹².

Na Europa, estudos recentes sobre obesidade infantil demonstram que a prevalência de obesidade grave varia bastante entre os países, sendo os valores mais elevados no sul da Europa. De acordo com a definição da OMS, a obesidade grave varia de 1,0% nas crianças suecas e moldavas a 5,5% em crianças maltesas. A prevalência foi geralmente mais alta entre o sexo masculino do que no feminino. Em muitos países, 1 em cada 4 crianças obesas seriam

severamente obesas. Aplicando as estimativas de prevalência baseadas na definição da OMS a toda a população de crianças de 6 a 9 anos em cada país, cerca de 398.000 seriam severamente obesas nos 21 países europeus. A tendência entre 2007 e 2013 e a análise por idade da criança não mostraram um padrão claro. Valores para Portugal estimaram que cerca de 36% das crianças da idade analisada (7 anos) eram obesas (~24% com excesso de peso, ~8% com obesidade e 3,4% com obesidade severa) ¹⁴⁴.

Das crianças da nossa amostra, **28,9% apresentavam excesso de peso/obesidade**, e que o sexo **feminino** apresenta uma taxa de **sobrepeso/obesidade** ligeiramente superior - **33,7,0%** - em relação aos indivíduos masculinos, que é de **24,3%**. Estes resultados enquadram-se nos obtidos na amostra de estudo global em que, das 5514 crianças avaliadas **6,2% tinham baixo peso, 66,1% tinham corpulência normal e 27,6% tinham excesso de peso, sendo que 6,9% eram obesas** ¹⁶.

9.3. DOENÇA CARDIOVASCULAR E OBESIDADE

A ligação entre obesidade e aterosclerose vai muito para além da sobreposição da incidência e da associação com risco cardiovascular, apresentando também vias fisiopatológicas em comum, uma vez que ambas possuem na sua génese o armazenamento de lípidos; por esse motivo acompanham-se de forma subjacente de um processo inflamatório crónico, caracterizado pela ativação da imunidade inata e adaptativa ^{141,145}. Em ambas as patologias, portanto, um dos fatores comuns é a dislipidémia (TG no TA e ésteres de colesterol no ateroma). O conhecimento fisiopatológico da associação entre hiperlipidemia e aterosclerose tem vindo a evoluir, mas apesar das evidências contemporâneas demonstrarem a existência de outros fatores, os dados estatísticos da análise populacional durante o último século (observação e análise de dados experimentais) reforçam e apoiam o peso da obesidade na origem duma dislipidemia, que por sua vez desempenha um papel importante na aterogénese, situação de base para o desenvolvimento de muitas DCV ^{30,146}.

A obesidade infantil não provoca normalmente desde logo, alteração do estado de saúde que seja incapacitante. Também na aterosclerose e apesar da evidência do seu aparecimento muito precoce ^{147,148}, apenas na idade adulta se verificam os sintomas deletérios que provocam DCV. Tal justifica que, havendo a possibilidade de analisar antropométrica/bioquimicamente e por bio impedância uma população infantil, fosse relevante verificar a existência não só dum processo inflamatório que caracteriza ambas as patologias, mas também se é ou não já notória a ativação da imunidade, característica na aterosclerose.

9.3.1. ATEROSCLEROSE

A compreensão da fisiopatologia da aterogénese evoluiu substancialmente nas últimas décadas. Vários estudos comprovaram que a sua génese reside no armazenamento lipídico, mas agora é reconhecida também, como uma condição inflamatória subaguda da parede do

vaso, caracterizada por infiltração de macrófagos e células T, que interagem entre si e com células da parede arterial. Os mecanismos patológicos da obesidade por outro lado, recapitulam muitas características dos processos inflamatórios em ação na aterosclerose ³⁰, pelo que vários estudos foram capazes de evidenciar a existência de fatores comuns entre a gênese da obesidade e aterosclerose o que permitiu promover inovações para o diagnóstico, prognóstico e prevenção das duas condições.

Estes, têm utilizado vários modelos que iremos referir resumidamente, tentando quando possível correlacioná-los com os nossos dados, dando maior ênfase, contudo, ao modelo clínico, por ter sido essencialmente este o utilizado no decurso desta Tese:

- Modelos animais

- Modelos de análise de lesões ateroscleróticas em artérias

- Modelos clínicos

9.3.1.1. Modelos animais

Utilizados para uma melhor compreensão do processo aterosclerótico, englobam tanto pequenos (como murganhos, coelhos, ratos, etc.) como grandes (porcos ou mesmo primatas não humanos) animais, sendo contudo reconhecido que não existe um modelo animal único, pois cada um apresenta vantagens e limitações ¹⁴⁹.

O murganho tem sido o pequeno animal mais estudado, muito embora existam parâmetros que diferem entre as duas espécies, o que como é óbvio irá influenciar a compreensão da gênese e da evolução da lesão: nos humanos estas são mais frequentes a nível das artérias coronárias, carótidas e vasos periféricos essencialmente nas artérias ilíacas, enquanto que nos murganhos estas são essencialmente a nível da raiz da aorta e artérias inominadas ^{150,151}. A vantagem da utilização deste modelo, reside no baixo custo de utilização, bem como o uso de espécies geneticamente modificadas como por exemplo as que apresentam hipercolesterolemia por ausência de HDL-c, ou as que se acompanham de uma “ablação” da Apo E ou ainda do recetor da LDL (LDLR). De notar que, contudo, nos humanos é rara a situação de existência de déficit de Apo E e que, pelo contrário, é relativamente frequente a hipercolesterolemia por ausência de LDLR ¹⁵²⁻¹⁵³. Dentre de alguns dos inconvenientes da sua utilização, referira-se a não manifestação do fenómeno de instabilidade da placa o qual está na gênese do processo trombótico bem como da ausência da “capa fibrosa”, o que é observado frequentemente na aterosclerose humana crónica ¹⁵⁴⁻¹⁵⁵.

Considerando agora os trabalhos que empregam como modelo os grandes animais a sua manutenção bem como a sua utilização é não só muito mais onerosa, como envolve um período muito mais longo no desenvolvimento do complexo da lesão, contrariamente ao que sucede nos murganhos.

De um modo resumido, refira-se que quando o modelo é o porco, onde é possível desenvolver espontaneamente as lesões e acelerá-las utilizando uma dieta aterogénica, esta espécie é suficientemente grande para permitir não só as medições não invasivas das lesões como a colheita de material arterial para análise ^{156,157}. Uma das vantagens da utilização deste modelo animal é permitir estudar as interações existentes entre a hemodinâmica local e a resposta da camada endotelial arterial ¹⁵⁸. Os estudos que caracterizaram o *transcriptoma* endotelial das lesões ateroscleróticas do arco aórtico, em locais sensíveis e resistentes, concluíram que era diferente a expressão génica nos diferentes locais ¹⁵⁹. O modelo porcino das hipercolesterolémias familiares demonstraram o desenvolvimento de lesões complexas tendo na sua génese variantes da Apo B₁₀₀; contudo o principal inconveniente reside na diferença não só na composição assim como no tamanho da partícula LDL em resposta à dieta aterogénica entre porcos e o homem ¹⁶⁰.

O coelho como modelo animal, revelou ser o mais sensível de todos no que respeita à sobrecarga alimentar de colesterol ¹⁶¹. Na espécie **coelho branco da Nova Zelândia (NZW)** alimentado com dieta rica em colesterol, predominam as lipoproteínas remanescentes e as lesões são compostas em grande parte por células esponjosas derivadas de macrófagos ¹⁶². Foi no coelho que o impacto das lipoproteínas de diferentes tamanhos na aterosclerose foi estudado pela primeira vez por *Duff & McMillan* ¹⁶³. Também nesta espécie e à semelhança do porco, foram identificadas diferentes linhagens com hipercolesterolemia familiar, com diferentes géneses e que foram exaustivamente estudadas ¹⁶⁴⁻¹⁶⁵. No entanto, estes autores afirmam que o coelho se adequa menos à manipulação genética que os murganhos.

Finalmente de referir os modelos animais utilizando primatas não humanos que foram muito importantes no estudo da aterosclerose e do metabolismo das lipoproteínas ¹⁶⁶. Foram utilizadas várias espécies de primatas tendo em conta a maior ou menor suscetibilidade na indução da lesão ¹⁶⁷⁻¹⁶⁸. Resumindo, o uso deste modelo tem a vantagem de apresentar um **metabolismo das lipoproteínas tipo humanoide**, com predominância de moléculas não HDL-c, e subclasses de HDL-c semelhantes às dos humanos, expressando também a proteína de **transferência do colesterol esterificado (CETP)** ¹⁶⁹⁻¹⁷⁰. A possibilidade de utilização destes animais, com um tipo de patologia muito semelhante à desenvolvida pelos humanos, foi muito importante para o conhecimento não só dos fatores dietéticos implicados na aterosclerose mas também para o conhecimento da génese e do desenvolvimento das lesões ^{171,172}.

9.3.1.2. Modelos de análise de lesões ateroscleróticas em artérias

Os estudos que analisam as artérias após cirurgia de revascularização por endarteriectomia são inúmeros e habitualmente têm como objetivo comparar as diferentes subpopulações de monócitos residentes nos vasos de indivíduos assintomáticos e sintomáticos.

A forma como o estudo deste material é realizado depende da finalidade do mesmo e pode variar desde a análise direta recorrendo a métodos imuno-histológicos até ao procedimento de recolha das células residentes para posterior análise *in vitro* recorrendo a métodos de ativação/expressão.

Macrófagos M1 pró-inflamatórios foram originalmente descritos a partir de estudos realizados na década de 1960 por *Mackaness* e colegas ¹⁷³ que demonstraram que macrófagos murinos exibiam atividade antimicrobiana aumentada dependente de estímulos, em resposta a infeções por *Mycobacterium bovis*, por bacilo Calmette-Guerin (BCG) ou *Listeria monocytogenes*. Complementarmente, Stein et al. (1992) ¹⁷⁴ demonstraram que os macrófagos poderiam ser polarizados para um estado "**alternativo**" (**M2**) na presença de IL-4 e caracterizados pela expressão do **recetor de manose de macrófagos (CD206)**.

Na aterosclerose humana, os produtos bacterianos como lipopolissacárido (LPS) assim como citocinas inflamatórias (IFN- γ e TNF- α), induzem os macrófagos a um estado de ativação clássica, referida como do tipo M1. Os principais marcadores desta ativação de M1 são a produção de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12, IL-23. Estas células do tipo M1 são caracterizadas pela alta produção de óxido nítrico (NO) e intermediários de oxigénio reativo, sendo assim nomeados pelo facto de estarem incluídos na cascata das respostas polarizadas para o tipo Th1 ¹⁷⁵. Contrariamente as citocinas Th2 não são simples inibidores dessa ativação clássica, mas participam diretamente na indução de um fenótipo de macrófago distinto: o macrófagos M2 ativado alternativamente ^{174,176} que é principalmente funcional na remodelação tecidual, angiogénese e igualmente na progressão tumoral, ou ainda envolvido na imunorregulação e reações alérgicas. Estas células tipicamente expressam doses **elevadas de IL-10** e baixas de IL-12 ^{175,177}.

Os produtos da oxidação lipídica, (LDLox) funcionam como ligantes aos **recetores de eliminação** ¹⁷⁸. Assim, a retenção de LDLox é reconhecida e interage com dois principais recetores de eliminação a nível dos macrófagos, tais como recetores de classe A (SR) AI/II e recetores de classe B (CD36). O SRAI/II reconhece a modificação da proteína Apo B da LDLox; os fosfolipídios oxidados são reconhecidos pelo recetor CD36. Após esta interação, os macrófagos são ativados e absorvem a LDLox ¹⁷⁹. Assim, o complexo LDLox/CD36 induz a sua fagocitose e a ativação de macrófagos adicionais, bem como podem apoiar a participação da LDLox não apenas na ativação de macrófagos, mas também na sua retenção ¹⁸⁰⁻¹⁸¹. Para além do anteriormente exposto, os macrófagos induzem a progressão da inflamação via **IL-1 β , TNF- α , espécies de oxigénio reativas (ROS) e metaloproteinases** ¹⁸¹.

De referir que praticamente **em todas as crianças analisadas no nosso estudo**, o marcador **CD36** estava presente nos monócitos, o que está de acordo com *Gaetano* e colaboradores, que ao analisar expressões diferenciais de diferentes marcadores de macrófagos em

pacientes, ateroscleróticos sintomáticos e assintomáticos, não notaram qualquer diferença na expressão de CD36 nos dois grupos ⁷¹.

Note-se que a nossa amostra é composta por crianças de 9 anos, obviamente assintomáticas, não se encontrando diferenças estatisticamente significativas (Tabela 24) entre os grupos corpulência normal *versus* excesso de peso/obesidade, quando se compara a expressão de monócitos ativados de forma clássica (M1) ou de forma alternativa (M2). Contudo, é notório um **incremento ligeiro** nos valores de M2 no grupo dos indivíduos com excesso de peso/obesidade. Estudos efetuados por *Gaetano*, e também por *Bouhlei* utilizando vasos arteriais, notaram que os macrófagos M1 e M2 estavam presentes na placa aterosclerótica e que os M2 eram notórios nos locais mais estáveis das mesmas ^{71,86}, muito embora nestes estudos não exista qualquer referência quanto à existência ou não de excesso de peso/obesidade.

Posteriormente a *Bouhlei, Finn* e colaboradores ¹⁹⁹ também concluíram que a hemoglobina desempenharia o papel de estímulo na diferenciação dos macrófagos a nível das placas ateroscleróticas. A redução do ferro intracelular nestes macrófagos não esponjosos, desempenharia um papel importante, pela conseqüente redução de ROS, o que impulsionaria a transcrição dos transportadores da cassete de ligação ao ATP (ABC) através da ativação do recetor $X\alpha$ a nível hepático (LXR α). A redução intracelular de ferro de macrófagos poderia ser uma via promissora para aumentar o transporte reverso do colesterol. Este estudo efetuado em células humanas identificadas também por imuno-histoquímica, revelou que monócitos com a marcação tipo M2 (CD163⁺ e CD206⁺), logo do tipo anti-inflamatório, estão presentes em placas ateroscleróticas em regiões com hemorragia ou mesmo na angiogénese. Igualmente, resultados semelhantes mas obtidos a partir de tecidos a nível das coronárias com hemorragia, *Boyle* e colaboradores ⁹⁰ testaram a mesma hipótese e vieram demonstrar que existia um novo subconjunto de macrófagos associado à hemorragia antioxidante (HAMac) definido pela expressão de CD163 alto e HLA-DR baixo, que seriam distintos dos macrófagos presentes no núcleo lipídico pró-inflamatórios. Da mesma forma *Guo* e colaboradores ¹⁸² encontraram valores estatisticamente significativos aumentados de CD163⁺ ($p < 0,01$) nos vasos que apresentavam angiogénese nas placas removidas de carótidas. Apesar da eliminação da hemoglobina pelo recetor CD163 (hemoglobina-haptoglobina) se considerar ser identificador de um fenótipo de **macrófago anti-inflamatório alternativo**, com ausência de células esponjosas e habitualmente ser considerado **ateroprotetor**, concluiu que estaríamos perante um **papel aterogénico inesperado na aterosclerose** para os macrófagos CD163⁺. Em conclusão, nas lesões ateroscleróticas, estes macrófagos CD163⁺ estão associados à progressão da placa e possível microvascularidade.

No nosso estudo a percentagem de monócitos M2 é **ligeiramente superior no grupo com excesso de peso/obesidade**. Estes resultados, contudo, têm de ser analisados com

prudência uma vez que dizem respeito a uma expressão sistêmica das células, o que implica não se poder extrapolar resultados a partir dos trabalhos que foram apresentados, pois podem existir fatores interferentes na sua expressão.

O modelo *ex-vivo* para aterosclerose humana, não é comparável com experiências em células *in vitro*. As linhas celulares podem ser facilmente armazenadas e cultivadas, mas não são fenotípica e funcionalmente idênticas às células primárias, as quais podem ser obtidas mais facilmente por intermédio de uma regular colheita de sangue. Contudo, nas experiências de cultura de células *in vitro*, não é possível investigar a influência de moléculas específicas no complexo inflamatório em lesões ateroscleróticas ¹⁰⁶.

Assim, nos trabalhos em que foram utilizadas para análise métodos imuno-histoquímicos para caracterização de subpopulações de monócitos em vasos arteriais, é comum socorrerem-se da cultura dos monócitos a partir do sangue total.

A nosso conhecimento, são relativamente escassos os estudos *ex-vivo* que fazem a análise concomitante da expressão de monócitos e de citocinas. O trabalho já referido de *Gaetano* ⁷¹, analisou a expressão das citocinas Th1-TNF- α , e IL-6, assim como de Th2, IL-10, e IL-13, em indivíduos ateroscleróticos sintomáticos e assintomáticos a partir da expressão dos respetivos genes por quantificação dos transcritos RNA em PCR *Tempo Real*. Os dados obtidos demonstraram valores estatisticamente aumentados de citocinas Th1 e diminuídos de Th2 nos indivíduos sintomáticos, enquanto que nos assintomáticos os resultados foram o inverso.

Igualmente, *Finn* e colaboradores ¹⁸³, compararam a libertação de citocinas a partir de macrófagos diferenciados a partir do complexo hemoglobina/haptoglobina (Hb/Hp) *versus* os tratados com IL-4 ou LPS. Os diferenciados com Hb/Hp expressaram níveis elevados de antagonistas dos recetores de IL-10 e IL-1 (IL-1Ra) semelhantes aos macrófagos diferenciados por IL-4 e expressaram níveis significativamente mais elevados da proteína 1 quimioatractante de monócitos (MCP-1) *versus* macrófagos de controle diferenciados com IL-4, mas significativamente inferior aos macrófagos tratados com LPS.

Refira-se que, como já foi anteriormente citado, o nosso grupo em estudo era composto apenas por crianças assintomáticas e embora a metodologia usada para a quantificação das citocinas não seja comparável, **não foram encontradas diferenças significativas** na expressão das citocinas referidas tanto nas crianças com corpulência normal como nas que apresentavam excesso de peso/obesidade.

9.3.1.3. Modelos clínicos

9.3.1.3.1. Doença Cardiovascular e Dislipidemia

São inúmeros os trabalhos que associam a ocorrência de obesidade infantil com as alterações do perfil lipídico.

Dados obtidos a partir de **autópsias** que fizeram parte integrante do **Bogalusa Heart Study** (Newman WP et al., 1986) ¹⁸⁵ e igualmente o **Estudo de Determinantes Patobiológicos da Aterosclerose na Juventude (PDAY)** ^{185,186} demonstram **associações positivas significativas** entre fatores de risco de DCV potencialmente modificáveis, como CT, LDL-c e pressão arterial com a presença e a extensão das lesões ateroscleróticas na aorta e artérias coronárias¹⁸⁶.

Na componente patológica do **Bogalusa Heart Study**, a análise epidemiológica a longo prazo dos fatores de risco para DCV numa população birracial, concluiu-se que crianças saudáveis com vida ao ar livre tinham falecido devido a causas **não - DCV**^{184,187}.

Igualmente, ainda o estudo **PDAY** em 3.000 pessoas, de 15 a 34 anos e que morreram por causas como acidentes e homicídios, quantificou os fatores de risco por meio da análises de amostras de sangue colhidas *post-mortem*, ^{186,188}.

Estes trabalhos, confirmaram **associações positivas entre fatores de risco modificáveis** (incluindo hipertensão, tabagismo, obesidade, lípidos não HDL-c), com a presença e extensão de lesões arteriais e **associação negativa do HDL-C cardioprotetor** com essas lesões.

O **Muscotine Study** ¹⁸⁹, trabalho observacional longitudinal marcante na compreensão dos fatores de risco para DCV em crianças e jovens, ao correlacionar positivamente **os níveis de CT sérico e/ou IMC medidos na infância** com a **medida média da espessura da íntima das carótidas**, obtida por ecografias daqueles indivíduos, quando realizadas em adultos (33 aos 42 anos).

Resultados semelhantes foram observados no já referido estudo **Bogalusa**: o nível da **lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) na infância** e o **IMC** previam o **aumento da espessura média da íntima nas carótidas** na idade adulta e provaram a ligação entre exposições a fatores de risco incluindo LDL-C, IMC, pressão arterial sistólica elevados, assim como tabagismo em adolescentes dos 12 aos 18 anos com aterosclerose pré-clínica na idade adulta ¹⁸⁹.

O **Young Finns Study** reafirmou a ligação entre exposições aos fatores de risco enumerados em adolescentes de 12 a 18 anos e a aterosclerose pré-clínica na idade adulta. Os resultados obtidos nesta coorte prospetiva de 2229 jovens adultos dos 24 a 39 anos são relevantes, porque os fatores de risco presentes na adolescência demonstraram a capacidade de prever a espessura média da íntima da carótida do adulto, independentemente da existência ou não dos fatores de risco atuais ¹⁹⁰.

Outros **estudos não invasivos** com a participação de adolescentes e adultos jovens, são consistentes com os resultados referidos, indicando que o agrupamento dos múltiplos fatores de risco afeta adversamente a espessura média da íntima das carótidas durante os períodos de desenvolvimento infantil ^{191,192}.

Em conclusão, os resultados laboratoriais/patológicos recentes e igualmente não invasivos, fornecem **evidências convincentes da ligação entre fatores de risco estabelecidos mas potencialmente modificáveis** com os **processos ateroscleróticos acelerados** que se verificam na adolescência e na idade adulta, reforçando a necessidade da prevenção primária se iniciar no princípio da vida. Refira-se que a análise de cerca de 6000 crianças mostrou uma percentagem muito elevada e uma idade muito precoce do **rebound da obesidade** (a maioria entre os 3 e os 4 anos), o que indica já a influência nesta idade de fatores de risco que, excluindo as causas genéticas serão essencialmente de índole nutricional.

Muitos outros estudos ^{41, 193-196} com maior ou menor complexidade associam obesidade com as comorbilidades, desde perfil o lipídico alterado, resistência à insulina e síndrome metabólica às doenças comuns do adulto como apneia do sono, hipertensão, doença renal, certos cancros e, **evidentemente DCV**.

Os **resultados antropométricos e bioquímicos obtidos na nossa amostragem** e os do nosso **estudo global** ^{16 126} são obviamente **quase coincidentes**, com a exceção do Perímetro da Anca, em que, não existe ainda diferença estatisticamente significativa entre os grupos de corpulência considerados, provavelmente pela menor dimensão da amostra.

Os **resultados bioquímicos no estudo global** e no qual se inclui a nossa amostra ¹²⁶, efetuado em 1496 crianças da região de Lisboa e Vale do Tejo, demonstrou que quando se analisa a existência de fatores de risco DCV em populações pediátricas dever-se-á ter em consideração a elevada proporção de crianças que possuem parâmetros bioquímicos anormais, sendo importante ressaltar que a maioria dos trabalhos anteriormente publicados e que utilizaram as crianças como pertencente ao grupo de controlo (“normais”) de acordo com o IMC e/ou de bio impedância. Contudo, parece-nos importante ressaltar que **70,1% das crianças com "IMC normal"** tinham pelo menos um **parâmetro bioquímico anormal** e **64,8% tinham dislipidemia**, o que demonstra que embora clinicamente estejam dentro do grupo considerado “normal” (IMC), não o são já metabolicamente. Esta ou estas alterações, ainda não têm expressão fenotípica sugerindo-se assim que, **estudos futuros propondo avaliar o risco DCV em populações pediátricas** deverão ter em consideração **vários parâmetros antropométricos, bio impedância e bioquímicos** para excluir do grupo de controle "normal" aqueles que possuem um ou mais parâmetros fora dos valores recomendados. Esta constatação é de qualquer maneira reforçada por uma recomendação da Associação Americana de Pediatria que previa já em 2008 para determinadas condições a vigilância das crianças a partir dos dois anos ¹⁹⁷. Para além do referido, verificou-se também que, apenas **26,6% das crianças com sobrepeso** e **18,6% com obesidade não apresentavam dislipidemia**, o que indica que **crianças com excesso de peso** (definido pelo IMC) têm **maior probabilidade de apresentar alterações adversas no perfil lipídico**.

Na nossa amostra, também foram encontradas **diferenças estatisticamente significativas no valor de IMC e zIMC entre os grupos de corpulência considerados** (corpulência normal *versus* excesso de peso/obesidade); **não havendo, contudo, diferenças entre gêneros.**

Curiosamente, numa população infantil de 10,8 anos, *Zhu*¹⁹⁸, encontrou diferenças entre os gêneros para as variáveis antropométricas (Peso, Altura, IMC, Perímetro Abdominal e relação Perímetro Abdominal/Perímetro Anca) mas não no Perímetro da Anca isolado.

Contrariamente, *Maffeis* e colaboradores¹⁹⁹ num estudo semelhante, não encontrou diferenças antropométricas significativas na linha de base entre os gêneros, com exceção do peso.

Na nossa amostra, **não existem diferenças significativas de gênero para o grupo de corpulência excesso de peso /obesidade.** Também *Blüher* e colaboradores²⁰⁰ ao analisar várias medições antropométricas com marcadores de risco cardiometabólico, num estudo efetuado numa população infantil de ± 13 anos, obesa (IMC > 30), da Alemanha, Áustria e Suíça, não encontrou diferenças de gênero em relação às variáveis IMC, zIMC, Perímetro Abdominal e relação Perímetro Abdominal/Altura.

Os valores das variáveis bioquímicas na nossa amostra, tanto as referentes ao perfil lipídico como as do metabolismo da glucose, foram consentâneas com estudos semelhantes efetuados em idêntica faixa etária. *Chang* e colaboradores²⁰¹, em crianças dos 6 aos 13 anos, igualmente não encontraram diferenças significativas da glicemia em relação aos grupos de corpulência; contudo, relativamente à insulina e HOMA-IR, são já estatisticamente diferentes e muito significativos, verificando-se o mesmo na nossa amostra, com a particularidade interessante de apresentar valores muito semelhantes. O perfil lipídico naquele estudo é, também, muito idêntico ao das nossas amostras, **não existindo diferenças para o valor do CT** em relação aos grupos de corpulência considerados, mas para todas as outras variáveis incluindo as suas relações - **LDL-c, HDL-c, LDL-c / CT, HDL-c / CT, LDL-c / HDL-c** – que são **estatisticamente muito diferentes** nos indivíduos com excesso de peso/obesidade. De realçar para além do referido os **valores baixos e estatisticamente significativos de HDL-C e Apo A₁** no grupo de corpulência com excesso de peso/obesidade, bem como, **mais elevados de LDL-c, Apo B**, assim como as relações **Apo B/Apo A₁, e CT/HDL-c**. Os nossos resultados são praticamente sobreponíveis com estes resultados (tabela 17). Refira-se que diferentes outros trabalhos^{202,203} apresentam resultados muito semelhantes com os valores das nossas amostras.

O valor da **LDLox** também demonstrou na nossa análise ser significativamente diferente entre os **grupos de corpulência normal** e com **excesso de peso/obesidade**, em consentâneo com outros estudos efetuados tanto em crianças²⁰⁴ como em adultos²⁰⁵.

A nosso conhecimento não existem publicações sobre estudos em crianças que tivessem aplicado o **Índice Aterogénico (IA)** $[IA = ([TC-HDL-c] \times [apo B]) / ([HDL-c] \times [apo A_1])]$ ¹³⁵ que

utilizámos para a avaliação da relação entre a **fração aterogénica (LDL-c) e anti-atерogénica (HDL-c)**, pelo que não são conhecidos dados de referência para este índice. Existem, porém, valores de referência para a população adulta. Refira-se que, quando aplicado nas nossas amostras, aparenta ter uma **sensibilidade semelhante ao índice LDL-C/HDL-c**. A utilização deste índice para determinação da fração aterogénica, baseou-se no conhecimento de que os resultados por ele obtido, discriminam melhor os indivíduos a risco, porque se baseia na quantidade relativa de Apo B e colesterol na LDL, assim como de Apo A na HDL, que podem diferir ²⁰⁶. Tal poderá identificar, por exemplo, indivíduos com risco de DCV, ainda que apresentem valores aceitáveis de CT.

Os valores do IA por nós obtidos, foram sempre **estatisticamente diferentes, aumentados, no grupo de corpulência excesso de peso/obesidade**. Contudo, no que apresentava excesso de peso/obesidade, mas ainda sem dislipidémia, o seu valor apesar de estar aumentado, ainda não é estatisticamente significativo (tabela 18). De qualquer forma, indica o aumento do risco relativo de DCV.

O teor em **leptina**, regulador a longo prazo do apetite e do balanço energético, também está **significativamente aumentado** nos grupos de corpulência considerados, tal como em estudos semelhantes, tanto em crianças ^{207,208} como em adultos ^{205,209,210}.

Moniz e colaboradores ²¹¹ num estudo efetuado em 886 crianças (média de 9,4 anos), refere que 46% apresentavam pelo menos um fator de risco cardiovascular. Esta constatação é compatível com os valores da nossa amostra que, comparando os perfis lipídicos entre indivíduos dislipidémicos ou não, **47% das que apresentam corpulência normal (IMC) já possuem uma variável do perfil lipídico alterada**.

Também na nossa amostra, apesar dos valores de **insulina e HOMA-IR** não serem ainda estatisticamente significativos, estão aumentados no grupo com excesso de peso/obesidade, quer apresentem ou não dislipidémia. A nosso ver o mais relevante, verifica-se no grupo **corpulência normal**, em que os indivíduos com **dislipidémia**, apresentam já valores de insulina e HOMA-IR muito superior ao normal. Tal significa, portanto, para além do risco cardiovascular, que existe já um aumento nestas crianças do risco de apresentarem resistência à insulina.

Para além do incremento óbvio e estatisticamente significativo do **CT**, as crianças **fenotipicamente normais mas dislipidémicas**, apresentavam o valor de **LDL-c** significativamente aumentado (tabela 18).

Não conhecemos até à data qualquer publicação que faça referência à **análise entre os grupos com ou sem dislipidémia por grupos de corpulência** (tabela 19). O que parece ser relevante nesta análise é a expressão significativamente aumentada dos **TG** nas crianças sem dislipidémia, mas que apresentem excesso de peso/obesidade. Este incremento dos TG reforça a noção dos erros nutricionais na génese da dislipidémia na infância ²¹². Este dado

assume particular importância, uma vez que estudos recentes indicam que, os **níveis basais de TG predizem a mortalidade por doenças cardiovasculares dos indivíduos de famílias com hipertrigliceridemia familiar, assim como em indivíduos pertencentes a famílias com hiperlipemia familiar combinada** ²¹³, o que nos sugere a necessidade de se reverem as estratégias de prevenção a adotar ²¹⁴.

9.3.1.3.2. Obesidade e Inflamação

Não existem, a nosso conhecimento, estudos efetuados em crianças, que sejam exatamente comparáveis com este trabalho no respeitante à avaliação de marcadores de inflamação e a marcadores de monócitos.

Com exceção do **INF- γ** , cujos valores são **significativamente diferentes entre os grupos de corpulência considerados**, não foram encontradas quaisquer outras diferenças nas citocinas estudadas. *Utsal* e colaboradores ²¹⁵ num estudo efetuado em crianças de 10-11 anos, também encontrou um incremento estatisticamente significativo desta citocina nos indivíduos obesos.

Apesar de na nossa amostra **não se ter encontrado diferença significativa entre os grupos de corpulência em relação ao TNF- α** , *Breslin* e colaboradores ²¹⁶, num estudo efetuado em crianças de aproximadamente 11 anos, encontrou níveis séricos significativamente maiores nas com obesidade, comparativamente às normais. Contudo, neste estudo, a análise estatística foi efetuada dividindo as crianças em três grupos: corpulência normal, sobrepeso e com obesidade.

Schipper e colaboradores ²¹⁷ encontraram, em crianças entre os 6 e os 16 anos encontrou diferenças significativas para o **TNF- α** entre obesos e não obesos. Curiosamente, estes autores verificaram, **tal como nós**, que os valores médios desta citocina **diminuem nos indivíduos obesos**, embora no nosso estudo não seja estatisticamente significativo (tabela 20). Inversamente, *Aygun* e colaboradores ²⁰⁸, encontraram valores aumentados desta citocina em crianças de aproximadamente 9 anos. Igualmente, *Suárez-Álvarez* e colaboradores ²¹⁰ trabalhando sobre mediadores de inflamação em adultos, também encontraram um incremento do valor de **TNF- α** estatisticamente significativo em indivíduos obesos adultos.

No nosso estudo, não obtivemos quaisquer diferenças estatisticamente significativas para os valores das citocinas inflamatórias **IL-2** e **IL-6**, assim como das anti-inflamatórias **IL-4** e **IL-10**.

Aygun e colaboradores ²⁰⁸ contrariamente, notaram valores significativamente aumentados da IL-6 e diminuídos de IL-4 nas crianças obesas, *Utsal* e colaboradores ²¹⁵, não notaram diferenças na expressão de IL-2 nem IL-10, mas sim na citocina inflamatória IL-6. *Carolan* e

colaboradores ²¹⁸, numa população infantil (12-13 anos) encontraram também valores significativamente diferentes para os valores de TNF- α entre os grupos atrás referidos.

Shmidt e colaboradores ²¹⁹ em adultos obesos e não obesos, verificaram que o grupo dos obesos apresentava concentrações séricas significativamente elevadas de IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- γ e TNF- α em comparação ao grupo não obeso.

Matia-Garcia ²²⁰, em adultos jovens (18-30 anos), porém, não encontraram quaisquer diferenças estatisticamente significativas quer para os valores de IFN- γ , quer das outras citocinas: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12.

9.3.1.3.3. Obesidade e marcadores de monócitos

Não encontramos diferenças estatisticamente significativas (tabela 23), nos grupos de corpulência considerados em função da expressão de monócitos **Mon 1** (CD14⁺/CD16⁻), **Mon 2** (CD14⁺/CD16⁺) e **Mon 3** (CD14⁺/CD16⁺⁺).

Em todos os grupos de corpulência a percentagem superior de monócitos pertencia ao grupo considerado “clássico” - **Mon 1** (76%), sendo a segunda subpopulação os monócitos considerados “intermédios” – **Mon 2** (17%) e por último os monócitos “não clássicos” – **Mon 3** (1,2%). Tal está de acordo com *Passlick* e colaboradores ²²¹ que já em 1989 tinham demonstrado existirem subconjuntos de monócitos morfológica e funcionalmente distintos: a maioria dos monócitos circulantes é caracterizada pela expressão superficial do recetor LPS CD14, enquanto não expressa o recetor CD16. Recentemente, outras publicações mais comprovaram estes dados ^{85,222-223}.

Em humanos, os monócitos clássicos CD14⁺⁺/CD16⁻ convertem-se em monócitos não clássicos CD14⁺/CD16⁺⁺ através de uma subpopulação intermediária de monócitos CD4⁺⁺/CD16⁺ ^{224,225}. Trabalhos mais recentes comprovam também os dados anteriormente referidos ²²⁶.

Apesar dos nossos resultados não demonstrarem ser estatisticamente significativos (tabela 23), **a nossa amostra demonstra um incremento dos monócitos Mon 1** quando se observam os valores das crianças com excesso de peso/obesidade (75,71% versus 78,17%). De salientar que este incremento parece ser devido à custa da % Mon 2 (17,28 versus 15,07), uma vez que a % de Mon 3 parece inalterável. *Breslin* e colaboradores ²¹⁶, num estudo em crianças, considerando apenas monócitos Mon 1 e Mon 2, verificaram valores superiores de Mon 1 nos obesos, comparativamente às crianças “normais”. *Schipper* e colaboradores ²¹⁷, encontraram da mesma forma um aumento significativo de monócitos CD14⁺ (Mon 1) nas obesas comparativamente ao grupo de controlo. Também *Rogacev* e colaboradores ²²⁷, em adultos obesos com aterosclerose subclínica demonstraram o aumento da percentagem relativa desta população em obesos com aterosclerose subclínica. Os mesmo autores, ²²⁸ noutro trabalho em adultos (65 anos) com história de eventos cardiovasculares, confirmaram

a proporção relativa destes leucócitos. *Wildgruber* e colaboradores ²²⁹, ainda em adultos (>70 anos) com doença arterial periférica severa, também encontra confirmaram esta percentagem relativa.

Keustermans e colaboradores ²³⁰, num estudo efetuado em adultos sobre a expressão genética de monócitos e a associação com a obesidade e a complexidade da aterosclerose, referem que as crianças obesas apresentam um número maior e estatisticamente significativo ($p < 0,001$) de monócitos clássicos CD14⁺⁺/CD16⁻ (Mon 1), assim como, um número mais elevado de monócitos intermédios CD14⁺⁺/CD16⁺ (Mon 2) do que as crianças do grupo “magras”. Estes dados estão de acordo com os nossos achados, apesar de as diferenças não serem ainda estatisticamente diferentes.

Com base nas suas características inflamatórias, supõe-se que os macrófagos M1 promovam o desenvolvimento da aterosclerose, enquanto os macrófagos M2, em geral, possam ser considerados protetores ²³¹.

Vários estudos **associaram os marcadores CD163 e/ou CD206 á polarização M1/M2 dos monócitos na hipercolesterolemia humana, aterosclerose e DCV** ^{71,183,200,232-233}.

Estes marcadores CD163 e CD206 exibiram padrões de indução mutuamente exclusivos após estimulação por um painel de moléculas anti-inflamatórias e, portanto, a ativação alternativa não é um processo único, o que está na base da existência da variedade de populações celulares diferentes ²³⁴.

Na nossa amostra (tabela 24) verifica-se que a maioria dos monócitos circulantes são do tipo **M2** (CD163⁺/CD206⁺ e/ou CD163⁺/CD206⁻), não se verificando diferenças estatisticamente significativas quer entre os grupos de corpulência, quer entre os géneros. Contudo, a proporção relativa de **monócitos M2 está aumentada no grupo de corpulência com excesso de peso/obesidade** (73,95% versus 77,87%, respetivamente), comprovado pela alteração da proporção M1/M2 (de 0,41 para 0,17, respetivamente).

A nosso conhecimento apenas *Fadini* e colaboradores ²³⁵, num estudo sobre hipercolesterolemia familiar (HF), hipercolesterolemia não familiar (HNF) e aterosclerose em adultos, utilizaram estes marcadores para identificar e enumerar subconjuntos tradicionais de monócitos e subpopulações de forma mais definida. Ao utilizar as marcações M1 e M2 verificaram que os pacientes com HF e NFH apresentaram aumento de M1, pró-inflamatórios, enquanto verificaram simultaneamente uma diminuição dos M2 no grupo NFH em comparação ao grupo HF e nos controlos. Os resultados foram os mesmos quando expressos em percentagem de monócitos, leucócitos ou células /ml. Em conclusão, a razão M1/ M2, que reflete o balanço de polarização, aumentou significativamente na HF, mas mais acentuadamente, na HNF.

Também na nossa amostra, existe um incremento dos monócitos anti-inflamatórios M2 e do rácio M1/M2, nas crianças com excesso de peso/obesidade, embora de variação não significativa.

9.3.1.3.4. Correlação Obesidade – Marcadores de inflamação

Vários são os estudos efetuados em crianças, que correlacionam os valores das citocinas séricas com valores antropométricos.

Klunder-Klunder e colaboradores ²³⁶, em crianças sensivelmente da mesma idade da nossa amostra (9,5 anos) não encontraram correlações positivas para os valores de IFN- γ nem de IL-6 entre crianças eutróficas e obesas. Porém, *Aygun* e colaboradores ²⁰⁸ numa população infantil ligeiramente mais nova (8,9 anos) encontraram diferenças muito significativas entre o grupo de controlo e crianças obesas para IL-2, IL-6 e TNF- α .

Chang e colaboradores ²⁰¹, no trabalho já referido, encontraram valor estatisticamente diferente para TNF- α ($p < 0,05$) e não para IL-6, (entre os grupos referidos).

Como referido, *Schipper* e colaboradores ²¹⁷ em crianças, não encontraram qualquer correlação entre os grupos de corpulência normal e obeso com as citocinas que analisou, com exceção do TNF- α para o qual haveria uma **correlação negativa com a obesidade**, no nível de significância $P < 0,05$. Relembramos que na nossa amostra o **valor desta citocina também parece diminuir no grupo de corpulência excesso de peso/obesidade** (tabela 20).

Vários estudos em adultos, também correlacionam valores antropométricos com citocinas inflamatórias/não, inflamatórias. Assim, *Schmidt* e colaboradores ²¹⁹ numa população adulta dos 34 aos 41 anos obesa/não obesa, estudaram o efeito das citocinas inflamatórias na obesidade geral e central e quais os efeitos moduladores da atividade física. Encontrou concentrações significativamente elevadas nos indivíduos obesos para IL-10, IFN- γ e TNF- α . *Azizian* e colaboradores ²³⁷ também em adultos (~50 anos) encontrou, de entre o painel de citocinas que utilizado, verificaram que a IL-10 e o IFN- γ eram significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre indivíduos não obesos, com sobrepeso e obesos.

9.3.1.3.5. Correlações entre expressão de citocinas e parâmetros bioquímicos

Para além das correlações negativas dos valores de IL-2 com Apo B/Apo A₁ e da IL-4 com LDL/Apo B, na nossa amostra apenas encontramos correlações estatisticamente significativas de IFN- γ : positivamente com os valores da insulinémia e TG e negativamente com os valores de LDL-C, Apo B e com o rácio LDL/Apo B.

Num trabalho já citado anteriormente ²³⁶, também verificaram a existência de possíveis correlações entre os valores das citocinas IL-6 e IFN- γ em crianças eutróficas e obesas. Enquanto que nas **crianças eutróficas** encontra valores associados positivamente entre o IFN- γ e os valores da insulinémia, HOMA-IR e CT, assim como da IL-6 com os valores da

insulinémia e HOMA-IR, nas crianças obesas a associação positiva apenas se verifica entre a IL-6 com os valores dos TG.

Chang e colaboradores ²⁰¹ também em crianças, não encontraram qualquer associação entre os valores de TNF- α e IL-6 com os valores de HDL-c, LDL-c, CT, TG e de HDL-c-CT.

Matia-García e colaboradores ²²⁰, em adultos jovens (18-30 anos), não encontraram qualquer correlação entre os valores de IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- γ e a glicémia, o CT, ou os TG.

9.3.1.3.6. Correlação expressão de monócitos – citocinas

Tanto quanto nos foi possível verificar, não encontramos trabalhos que efetuassem estudos estatísticos correlacionando subpopulações de monócitos com a expressão de citocinas no âmbito da obesidade infantil.

Pensamos ser relevante verificar a possível existência de associação positiva na expressão dos **monócitos inflamatórios M1 e do rácio M1/M2** com os **valores do IFN- γ** , o que parece **validar a existência de uma resposta inflamatória**, tendo em conta as **correlações dos valores desta citocina com as variáveis antropométricas** (tabela 27). Para mais, o valor da **citocina anti-inflamatória IL-10 está correlacionado negativamente com os grupos de monócitos mencionados**, o que parece reforçar o afirmado anteriormente.

Por último, verifica-se uma **correlação negativa entre os monócitos M1 e a citocina TNF- α** , o que parece também estar de acordo com o que encontramos: ou seja, parece haver uma **diminuição dos valores desta citocina no grupo excesso de peso/obesidade** (tabela 22).

9.4. DOENÇA CARDIOVASCULAR, OBESIDADE E NUTRIÇÃO

As DCV que afetam o mundo atual, assentam a sua génese na aterosclerose e na hipertensão, embora ambas resultem muitas vezes de **erros nutricionais** podendo até, pelo menos em parte, serem abordadas apenas sob este ponto de vista ^{238,239}. A adoção de um estilo de vida saudável, com prática de atividade física adequada e quando acompanhadas por uma nutrição equilibrada, constituem fatores de prevenção primária, na redução de risco de DCV ²⁴⁰. Infelizmente, tendo em conta os dados preliminares do estudo global e do qual a nossa amostra faz parte, parece verificar-se que estas crianças ingerem amiudadamente alimentos com elevado valor calórico, com fracas propriedades nutricionais e que se acompanham, igualmente, de uma elevada taxa de sedentarismo. O que parece ser mais relevante, é o facto de estes erros aparentarem serem muito precoces na infância, tendo em conta o elevadíssimo número de crianças que apresentam **rebound precoce da adiposidade** ²⁴¹⁻²⁴². Estes fatores poderão mesmo constituir uma das principais explicações para as alterações clínicas e bioquímicas por nós encontradas.

Estes resultados, contudo, encontram-se ainda em análise e não fazem parte deste trabalho de Tese.

9.5. LIMITAÇÕES

A limitação fundamental deste estudo, reside em se terem analisado respostas sistémicas de fenómenos que sabemos ter ações eminentemente locais. Para minimizar esta questão possivelmente dever-se-ia analisar uma amostra de maior dimensão.

O grupo de risco poderia tido uma melhor definição se pudesse ter sido estudado um grupo de crianças que tivessem tido um *reboud precoce da adiposidade*. Isto porque estas crianças quando adolescentes obesas, apresentam um risco metabólico aumentado em comparação com seus pares também obesos mas com desenvolvimento normal da adiposidade, pela maior probabilidade daqueles se tornarem adultos obesos. Esta constatação está de facto neste momento em fase de estudo, mas tudo indica que na nossa amostra possa existir uma percentagem muito elevada destas crianças.

CONCLUSÕES

10. CONCLUSÕES

Do decorrente da publicação *Anthropometric features as predictors of atherogenic dyslipidemia and cardiovascular risk in a large population of school-aged children* (Anexo 3):

- Existência de proporção não expectável de crianças que apresentavam pelo menos uma das variáveis do perfil lipídico alterada e o que é mais significativo é que tais dados se constatavam não só nas que apresentavam **excesso de peso/obesidade** mas também nas com **IMC normal**;
- A análise estatística poderia prever de forma independente a **existência de alterações do perfil lipídico**, o que representa fator de risco de DCV;
- Analisando os vários parâmetros antropométricos, o **IMC**, o **Perímetro abdominal** e a **relação Perímetro abdominal/altura**, estas apresentavam **correlação positiva com a dislipidemia**, enquanto que os **Perímetros da anca**, do **braço** e da **perna**, **ajustados ao IMC**, pelo contrário, uma **correlação inversa**;
- Em conclusão, a contribuição de cada parâmetro para o perfil lipídico, varia de acordo com a especificidade do mesmo e que as variáveis antropométricas que forem selecionadas podem ajudar a prever o incremento da probabilidade de se possuírem fatores de risco para DCV.

As conclusões atrás referidas, levaram-nos a propor a realização da presente Tese - **“Prevalência de biomarcadores de doença cardiovascular numa população infantil com excesso de peso”**, cuja realização nos permite concluir:

- A **amostra de 201 crianças**, fazendo parte da população infantil global analisada, apresenta uma **taxa elevada de sobrepeso/obesidade**, de acordo com a prevalência europeia e mundial;
- Da mesma forma se constata que esta população, apresenta uma **proporção muito elevada, não espectável, de alterações do perfil lipídico**;
- Assinalam-se **valores crescentes do HOMA-IR para as crianças dos grupos de risco**, antecipando desde esta idade uma **resistência à insulina muito precoce assim como um provável estado de pré-diabetes**;
- Mais surpreendentemente, verifica-se uma proporção **significativa com um IMC dentro dos valores normais e que já apresentam dislipidemia**;
- Os **TG elevados no subgrupo das crianças com sobrepeso/obesidade mas ainda sem outra alteração dos lípidos estudados**, configura uma possível existência de **erros nutricionais** já desde uma idade muito precoce. Ressalva-se que estudos recentes correlacionam os **níveis elevados de TG com a taxa de mortalidade por DCV**;

- Parece ser possível inferir a existência de uma **expressão inflamatória, em resposta à condição de excesso de peso/obesidade**, em particular por parte da **citoquina inflamatória IFN- γ** ;
- Tal como outros estudos efetuados no âmbito da obesidade e de forma não expectável, parece **existir uma diminuição da produção de TNF- α** , nas crianças com sobrepeso/obesidade;
- Comprovadamente, verifica-se uma **expressão superior de Mon 1 (CD14⁺⁺/CD16⁻) no grupo com excesso de peso/obesidade**, comprovando que nesta idade precoce já existem alterações da resposta imune que são semelhantes às observadas nas lesões ateroscleróticas;
- Parece, contudo, existir ainda uma **predominância de monócitos circulantes do tipo M2 (anti-inflamatórios)** que de alguma forma, ao estarem aumentados nas crianças com sobrepeso/obesidade, **indica uma possível resposta anti-inflamatória à condição existente**,
- Mais relevante ainda parece ser a **associação positiva** da expressão de **monócitos M1 e rácio M1/M2** com a **citoquina inflamatória IFN- γ** , que nos permite sugerir a hipótese da existência de **uma resposta inflamatória**, tendo em conta também, a associação desta citoquina com o grupo de corpulência excesso de peso/obesidade;
- Estas observações são **concordantes com a prevalência de uma inflamação subjacente à obesidade e também com possíveis modificações da resposta imune responsável pelas alterações ateroscleróticas de tipo subclínicas**, que sabemos existir nesta idade pediátrica e mesmo mais precocemente.

Perspetivas futuras...

Tendo em conta que se têm identificado, para além das causas genéticas, outras essencialmente do tipo comportamental (nutricionais e de atividade física), parece-nos relevante ao avaliar os dados encontrados neste estudo, sugerir uma investigação mas de cariz longitudinal, onde pudesse existir intervenção; esta, tendo em conta a idade pediátrica, teria de ser educacional e obviamente no âmbito de um projeto que pudesse envolver pais/encarregados de educação assim como toda a comunidade educativa.

Numa perspetiva de investigação aplicada, seria interessante verificar qual a resposta celular nos monócitos dos indivíduos com frações aterogénicas da LDL quando polarizados pela sua própria LDL nativa. Pensamos que desta forma se poderia estabelecer um possível vínculo entre frações aterogénicas de LDL em crianças e o aparecimento precoce de lesões do tipo aterosclerótico.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Center for Development of Human Services. *Child Development Guide*. New York; 2015.
2. World Health Organization. *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems. - 10th Revision, Edition 2010*. Vol 18. 10Th ed. (Data WLC-P, ed.). Geneva; 2011.
3. Persaud KLMTVN. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. 8Th ed. (Saunders, ed.); 2007.
4. Sadler TW. *Langman's Medical Embryology. — 12th Ed.* (Wilkins LW&, ed.). Philadelphia; 2012.
5. World Health Organization. Obesity and overweight. Obesity and overweight. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Published 2018. Accessed March 3, 2019.
6. Wells JCK. The evolution of human fatness and susceptibility to obesity: an ethological approach. *Biol Rev*. 2006;81(02):183. doi:10.1017/S1464793105006974
7. Eknoyan G. A History of Obesity, or How What Was Good Became Ugly and Then Bad. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2006;13(4):421-427. doi:10.1053/j.ackd.2006.07.002
8. Seshadri KG. Obesity: A Venusian story of Paleolithic proportions. *Indian J Endocrinol Metab*. 2012;16(1):134-135. doi:10.4103/2230-8210.91208
9. Wrangham R, Carmody R. Human adaptation to the control of fire. *Evol Anthropol*. 2010;19(5):187-199. doi:10.1002/evan.20275
10. Fogel RW. *The Escape from Hunger and Premature Death, 1700–2100*. Cambridge: Cambridge University Press; 2004. doi:10.1017/CBO9780511817649
11. Racette SB, Deusinger SS, Deusinger RH. Obesity: Overview of Prevalence, Etiology, and Treatment. *Phys Ther*. 2003;83(April 2003). doi:10.1093/ptj/83.3.276
12. OMS. Obesity and Overweight. *Fact sheet n° 311*. 2018;(February 2018):2561-2565. doi:10.1007/978-3-319-33228-4_447
13. Francesco Branca HN and TL. *The Challenge of Obesity in the WHO European Region and the Strategies for Response*. Vol 40. World Heal. (Francesco Branca HN and TL, ed.). Copenhagen; 2007. doi:10.1249/MSS.0b013e318164f33c
14. Caballero B. The global epidemic of obesity: An overview. *Epidemiol Rev*. 2007;29(1):1-5. doi:10.1093/epirev/mxm012

15. Padez C, Fernandes T, Mourão I, Moreira P, Rosado V. Prevalence of overweight and obesity in 7-9- year-old Portuguese children: Trends in body mass index from 1970-2002. *Am J Hum Biol.* 2004;16(6):670-678. doi:10.1002/ajhb.20080
16. Almeida SM, Furtado JM, Mascarenhas P, et al. Anthropometric predictors of body fat in a large population of 9-year-old school-aged children. *Obes Sci Pract.* 2016;2(3):272-281. doi:10.1002/osp4.51
17. Crocker MK, Yanofski Jak A. Pediatric Obesity: Etiology and Traetment. *Endocrinol Metab Clin North Am J.* 2009;38(3):525-548. doi:10.1016/j.ecl.2009.06.007.Pediatric
18. Herrera BM, Lindgren CM. The genetics of obesity. *Curr Diab Rep.* 2010;10(6):498-505. doi:10.1007/s11892-010-0153-z
19. Loos RJF, Bouchard C. Obesity--is it a genetic disorder? *J Intern Med.* 2003;254(5):401-425. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14535962>.
20. Martinez-Santibañez G, Cho KW, Lumeng CN. Imaging White Adipose Tissue with Confocal Microscopy. *Methods Enzymol.* 2014;537:17-30. doi:10.1016/B978-0-12-411619-1.00002-1
21. Spiegelman EDR and BM, Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature.* 2006;444(7121):847-853. doi:10.1038/nature05483.Adipocytes
22. Frühbeck G. Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. *Methods Mol Biol.* 2008;456:1-22. doi:10.1007/978-1-59745-245-8_1
23. Atkinson K. *The Biology and Therapeutic Application of Mesenchymal Cells-Vol I.* (Atkinson K, ed.). Hoboken, NJ, USA, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2016. doi:10.1002/9781118907474
24. Frühbeck G. The Adipose Tissue as a Source of Vasoactive Factors. *Curr Med Chem Hematol Agents.* 2005;2(3):197-208. doi:10.2174/1568016043356255
25. C. Ricour, J. Ghisolfi, G. Putet OG. *Traité de Nutrition Pédiatrique.* Maloine.; 1996. <http://www.sudoc.fr/003049442>.
26. Cannon B, Nedergaard J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol Rev.* 2004;84:277-359. doi:10.1152/physrev.00015.2003.-The
27. Bray GA. *An Atlas of Obesity and Weight Control.* The Parthe. New York: CRC Press; 2003. doi:10.1201/9780367805494
28. Henegar C, Tordjman J, Achard V, et al. Adipose tissue transcriptomic signature

- highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biol.* 2008;9(1):1-32. doi:10.1186/gb-2008-9-1-r14
29. Lovren F, Teoh H, Verma S. Obesity and Atherosclerosis: Mechanistic Insights. *Can J Cardiol.* 2015;31(2):177-183. doi:10.1016/j.cjca.2014.11.031
 30. Rocha VZ, Libby P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2009;6:399-409. doi:10.1038/nrcardio.2009.55
 31. Brown SP, Miller WC, Eason JM. *Exercise Physiology : Basis of Human Movement in Health and Disease.* Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
 32. Wells JCK, Fewtrell MS. Measuring body composition. *Arch Dis Child.* 2006;91(7):612-617. doi:10.1136/adc.2005.085522
 33. Brožek, J.M., Henschel A. *Techniques for Measuring Body Composition: Proceedings of a Conference, Quartermaster Research and Engineering Center Natick, Massachusetts.* Headquarte. (Sciences-National NA of, Council. R, eds.); 1961.
 34. Karnik S, Kanekar A. Childhood obesity: a global public health crisis. *Int J Prev Med.* 2012;3(1):1-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22506094>. Accessed March 3, 2019.
 35. Wijnhoven HAH, Van Bokhorst-De Van Der Schueren MAE, Heymans MW, et al. Low mid-upper arm circumference, calf circumference, and body mass index and mortality in older persons. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci.* 2010;65 A(10):1107-1114. doi:10.1093/gerona/glq100
 36. W.H.O. WHO Media centre Obesity and overweight Fact sheet. 2015:3-7. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
 37. Dietz WH, Bellizzi MC. Introduction: The use of body mass index to assess obesity in children. *Am J Clin Nutr.* 1999;70(1):123S-5S. doi:10.1093/ajcn/70.1.123s
 38. Rolland-Cachera MF. Childhood obesity: Current definitions and recommendations for their use. *Int J Pediatr Obes.* 2011;6(5-6):325-331. doi:10.3109/17477166.2011.607458
 39. Cole TJ, Lobstein T. Extended international (IOTF) body mass index cut-offs for thinness, overweight and obesity. *Pediatr Obes.* 2012;7(4):284-294. doi:10.1111/j.2047-6310.2012.00064.x
 40. Duren DL, Sherwood RJ, Czerwinski SA, et al. Body composition methods: Comparisons and interpretation. *J Diabetes Sci Technol.* 2008;2(6):1139-1146.

doi:10.1177/193229680800200623

41. George A. Bray CB. *Handbook of Obesity - Clinical Applications*. 2 Th. (MARCEL DEKKER IN, ed.). New York; 2008.
42. Andersen RE. *Obesity: Etiology, Assessment, Treatment, and Prevention*. 1 Th. (Human Kinetics Publishers I, ed.); 2003.
43. Jean-Charles Fruchart GS. *Lipides et Lipoprotéines*. Boehringer.; 1979.
https://books.google.pt/books/about/Lipides_et_lipoprotéines.html?id=C_d2vgAACAAJ&redir_esc=y. Accessed October 5, 2019.
44. Feingold KR, Grunfeld C. *Introduction to Lipids and Lipoproteins*. MDText.com, Inc.; 2000. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26247089>. Accessed January 17, 2020.
45. Skipski VP, Barclay M, Barclay RK, Fetzer VA, Good JJ, Archibald FM. Lipid composition of human serum lipoproteins. *Biochem J*. 1967;104(2):340-352.
doi:10.1042/bj1040340
46. Gruffat D, Durand D, Graulet B, Bauchart D. Regulation of VLDL synthesis and secretion in the liver. *Reprod Nutr Dev*. 1996;36(4):375-389.
doi:10.1051/rnd:19960404
47. Savonen R, Hiden M, Hultin M, et al. The tissue distribution of lipoprotein lipase determines where chylomicrons bind. *J Lipid Res*. 2015;56(3):588-598.
doi:10.1194/jlr.M056028
48. Paul T. Williams, John J. Albers, Ronald M. Krauss and PDSW. Associations of lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) mass concentrations with exercise, weight loss, and plasma lipoprotein subfraction concentrations in men. *Atherosclerosis*. 1990;82(1-2):53-58.
49. Gary F. Lewis DJR. New Insights Into the Regulation of HDL Metabolism and Reverse Cholesterol Transport. *Circ Res*. 2005;96(24):1221-1232.
doi:10.1161/01.RES.0000170946.56981.5c
50. Abul K. Abbas AHL and SP. *Cellular and Molecular Immunology, Ninth Edition*. (Elsevier, ed.). Philadelphia; 2018.
51. Gray D. Immunological Memory. *Annu Rev Immunol*. 1993;11(1):49-77.
doi:10.1146/annurev.iy.11.040193.000405
52. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature*. 2009;457(7229):557-561. doi:10.1038/nature07665

53. Germain RN, Margulies DH. The Biochemistry and Cell Biology of Antigen Processing and Presentation. *Annu Rev Immunol.* 1993;11(1):403-450.
doi:10.1146/annurev.iy.11.040193.002155
54. William E. Paul. *Fundamental Immunology, Seventh Edition.* 7th ed. (William E. Paul, ed.). Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Williams; 2013.
<http://solution.lww.com/Book/ShowWithResource/273900?resourceId=274103>.
Accessed September 18, 2019.
55. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(12):953-964. doi:10.1038/nri1733
56. Judy Owen, Jenni Punt SS. *Kuby Immunology.* Seventh Ed.; 2013.
57. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman SP, Lichtman AH, Pillai S. *Basic Immunology: Functions and Disorders.* Fifth edit. (Elsevier, ed.). St. Louis, Missouri 63043; 2016.
doi:978-1-4557-0707-2
58. Christian Weber; Eduard Shantsila; Michael Hristov; Giuseppina Caligiuri; Tomasz Guzik; Gunnar H. Heine; Imo E. Hoefer; Claudia Monaco; Karlheinz Peter; Ed Rainger; Agneta Siegbahn; Sabine Steffens; Johann Wojta; Gregory Y. H. Role and analysis of monocyte subsets in cardiovascular disease. *Thromb Haemost.* 2016;116(10):626-637. doi:10.1160/th16-02-0091
59. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular 8ª Edição.* 8 Th. (Pillai AKAHL and SP, ed.); 2015.
60. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2006;81(3):584-592. doi:10.1189/jlb.0806510
61. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties cytes that develop in the BM from dividing monoblasts, are released in the bloodstream as nondividing cells, and enter tissues, where their fate remains largely a. *Immunity.* 2003;19:71-82.
62. Ziegler-Heitbrock HWL, Fingerle G, Ströbel M, et al. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol.* 1993;23(9):2053-2058. doi:10.1002/eji.1830230902
63. Belge K-U, Dayyani F, Horelt A, et al. The Proinflammatory CD14+CD16+DR++ Monocytes Are a Major Source of TNF. *J Immunol.* 2002;168(7):3536-3542.
doi:10.4049/jimmunol.168.7.3536
64. Grage-Griebenow E, Flad H-D, Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood

- monocyte subsets. *J Leukoc Biol.* 2001;69(1):11-20.
65. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27(1):669-692. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132557
 66. Fingerle-Rowson G, Auers J, Kreuzer E, Fraunberger P, Blumenstein M, Ziegler-Heitbrock LHW. Expansion of CD14+CD16+monocytes in critically ill cardiac surgery patients. *Inflammation.* 1998;22(4):367-379. doi:10.1023/A:1022316815196
 67. Yoshikai Y. Immunological Protection Against Mycobacterium tuberculosis Infection. *Crit Rev Immunol.* 2006;26(6):515-526. doi:10.1615/CritRevImmunol.v26.i6.40
 68. Mantovani A, Sica A, Locati M. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol.* 2007;37(1):14-16. doi:10.1002/eji.200636910
 69. Colin S, Chinetti-Gbaguidi G, Staels B. Macrophage phenotypes in atherosclerosis. *Immunol Rev.* 2014;262(1):153-166. doi:10.1111/imr.12218
 70. De Paoli F, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. Macrophage phenotypes and their modulation in atherosclerosis. *Circ J.* 2014;78(8):1775-1781. doi:10.1253/circj.CJ-14-0621
 71. de Gaetano M, Crean D, Barry M, Belton O. M1- and M2-type macrophage responses are predictive of adverse outcomes in human atherosclerosis. *Front Immunol.* 2016;7(JUL). doi:10.3389/fimmu.2016.00275
 72. Tabas I, Bornfeldt KE. Macrophage Phenotype and Function in Different Stages of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118(4):653-667. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306256
 73. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity.* 2014;41(1):14-20. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.008
 74. Frostegård J, Ulfgren A-K, Nyberg P, et al. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis.* 1999;145(1):33-43. doi:10.1016/S0021-9150(99)00011-8
 75. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages Sequentially Change Their Functional Phenotype in Response to Changes in Microenvironmental Influences. *J Immunol.* 2005;175(1):342-349. doi:10.4049/jimmunol.175.1.342

76. Van Ginderachter JA, Movahedi K, Hassanzadeh Ghassabeh G, et al. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: Picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology*. 2006;211(6-8):487-501.
doi:10.1016/j.imbio.2006.06.002
77. Wintergerst ES, Jelk J, Asmis R. Differential expression of CD14, CD36 and the LDL receptor on human monocyte-derived macrophages. *Histochem Cell Biol*. 1998;110(3):231-241. doi:10.1007/s004180050285
78. Poston RN, Hussain IF. The immunohistochemical heterogeneity of atheroma macrophages: Comparison with lymphoid tissues suggests that recently blood-derived macrophages can be distinguished from longer-resident cells. *J Histochem Cytochem*. 1993;41(10):1503-1512. doi:10.1177/41.10.7504008
79. Komohara Y, Hirahara J, Horikawa T, et al. AM-3K, an anti-macrophage antibody, recognizes CD163, a molecule associated with an anti-inflammatory macrophage phenotype. *J Histochem Cytochem*. 2006;54(7):763-771.
doi:10.1369/jhc.5A6871.2006
80. P. Philippidis, J.C. Mason, B.J. Evans, I. Nadra, K.M. Taylor DOH and RCL, Circ. Hemoglobin Scavenger Receptor CD163 Mediates Interleukin-10 Release and Heme Oxygenase-1 Synthesis: Antiinflammatory Monocyte-Macrophage Responses In Vitro, in Resolving Skin Blisters In Vivo, and After Cardiopulmonary Bypass Surgery. *Circ Res*. 2004;94:119-126. doi:10.1161/01.RES.0000109414.78907.F9
81. Boyle JJ, Harrington HA, Piper E, et al. Coronary intraplaque hemorrhage evokes a novel atheroprotective macrophage phenotype. *Am J Pathol*. 2009;174(3):1097-1108.
doi:10.2353/ajpath.2009.080431
82. Rothe G, Gabriel H, Kovacs E, et al. Peripheral Blood Mononuclear Phagocyte Subpopulations as Cellular Markers in Hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16(12):1437-1447. doi:10.1161/01.ATV.16.12.1437
83. Häkkinen T, Karkola K, Ylä-Herttuala S. Macrophages, smooth muscle cells, endothelial cells, and T-cells express CD40 and CD40L in fatty streaks and more advanced human atherosclerotic lesions: Colocalization with epitopes of oxidized low-density lipoprotein, scavenger receptor, and CD16 (FcγRI. *Virchows Arch*. 2000;437(4):396-405. doi:10.1007/s004280000239
84. Waldo SW, Li Y, Buono C, et al. Heterogeneity of human macrophages in culture and in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol*. 2008;172(4):1112-1126.
doi:10.2353/ajpath.2008.070513

85. Schlitt A, Heine GH, Blankenberg S, et al. CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF- α levels. *Thromb Haemost.* 2004;92(2):419-424. doi:10.1160/TH04-02-0095
86. Bouhlef MA, Derudas B, Rigamonti E, et al. PPAR γ activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab.* 2007;6(2):137-143. doi:10.1016/j.cmet.2007.06.010
87. Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors: new targets for the pharmacological modulation of macrophage gene expression and function. *Curr Opin Lipidol.* 2003;14(5):459-468. doi:10.1097/01.mol.0000092630.86399.00
88. Ditiatkovski M, Toh BH, Bobik A. GM-CSF deficiency reduces macrophage PPAR- γ expression and aggravates atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(10):2337-2344. doi:10.1161/01.ATV.0000238357.60338.90
89. Qiao JH, Tripathi J, Mishra NK, et al. Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice. *Am J Pathol.* 1997;150(5):1687-1699. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2010.04.002
90. Fabunmi RP, Sukhova GK, Sugiyama S, Libby P. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 in human atheroma and regulation in lesion-associated cells: A potential protective mechanism in plaque stability. *Circ Res.* 1998;83(3):270-278. doi:10.1161/01.RES.83.3.270
91. Schönbeck U, Mach F, Sukhova GK, et al. Expression of Stromelysin-3 in Atherosclerotic Lesions: Regulation via CD40–CD40 Ligand Signaling In Vitro and In Vivo. *J Exp Med.* 1999;189(5):843-853. doi:10.1084/jem.189.5.843
92. Halpert I, Sires UI, Roby JD, et al. Matrilysin is expressed by lipid-laden macrophages at sites of potential rupture in atherosclerotic lesions and localizes to areas of versican deposition, a proteoglycan substrate for the enzyme. *Proc Natl Acad Sci.* 1996;93(18):9748-9753. doi:10.1073/pnas.93.18.9748
93. Johnson JL, Sala-Newby GB, Ismail Y, Aguilera CM, Newby AC. Low tissue inhibitor of metalloproteinases 3 and high matrix metalloproteinase 14 levels defines a subpopulation of highly invasive foam-cell macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(9):1647-1653. doi:10.1161/ATVBAHA.108.170548
94. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(1):23-35.

doi:10.1038/nri978

95. John B. Zabriskie MD. *Essential Clinical Immunology.*; 2009.
doi:10.1017/CBO9780511575266
96. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2014;1843(11):2563-2582. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.05.014
97. Tedgui A, Mallat Z, Tedgui A, et al. Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways. *Physiol Rev.* 2006;86(2):515-581.
doi:10.1152/physrev.00024.2005
98. WHO. Cardio-Vascular Diseases. 2017;(May 2017):1-6. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
99. Townsend N, Nichols M, Scarborough P, Rayner M. Cardiovascular disease in Europe - Epidemiological update 2015. *Eur Heart J.* 2015;36(40):2696-2705.
doi:10.1093/eurheartj/ehv428
100. Wilkins E, Wilson L, Wickramasinghe K, et al. *European Cardiovascular Disease Statistics 2017 Edition.*; 2017. doi:978-2-9537898-1-2
101. Doll R, Peto R, Boreham J, Sutherland I. Mortality from cancer in relation to smoking: 50 Years observations on British doctors. *Br J Cancer.* 2005;92(3):426-429.
doi:10.1038/sj.bjc.6602359
102. World Health Organization. *The World Health Report (2002). Reducing Risks, Promoting Healthy Life.*; 2002. doi:10.1080/1357628031000116808
103. *OBESITY: PREVENTING AND MANAGING THE GLOBAL EPIDEMIC Report.*; 2000.
104. Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol.* 1977;86(3):675-684. doi:PMC2032127
105. Getz GS, Reardon CA. Animal Models of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(5):1104-1115. doi:10.1161/ATVBAHA.111.237693
106. Erbel C, Okuyucu D, Akhavanpoor M, et al. A human ex vivo atherosclerotic plaque model to study lesion biology. *J Vis Exp.* 2014;(87):1-6. doi:10.3791/50542
107. Krause WJ. *KRAUSE'S ESSENTIAL HUMAN HISTOLOGY.* Third Edit.; 2005.
<https://mospace.umsystem.edu/xmlui/bitstream/handle/10355/11238/KrausesEssentialHuman.pdf?sequence=1>.
108. Robert L. Sorenson, Sorenson RL. *Atlas of Human Histology.* 2 Th. (School

- (University of Minnesota Medical, ed.). Minnesota; 2008. doi:10.1097/00000441-196712000-00051
109. Mescher AL. Junqueira's Basic Histology. Education M-H, ed. *McGraw-Hill Educ.* 2011;44(8):085201. doi:10.1088/1751-8113/44/8/085201
 110. Linton MF, Yancey PG, Davies SS, et al. *The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis*. MDTText.com, Inc.; 2000. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26844337>. Accessed January 17, 2020.
 111. Stoll G, Bendszus M. Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization. *Stroke*. 2006;37(7):1923-1932. doi:10.1161/01.STR.0000226901.34927.10
 112. Sakakura K, Nakano M, Otsuka F, Ladich E, Kolodgie FD, Virmani R. Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression. *Hear Lung Circ*. 2013;22(6):399-411. doi:10.1016/j.hlc.2013.03.001
 113. Boyle J. Macrophage Activation in Atherosclerosis: Pathogenesis and Pharmacology of Plaque Rupture. *Curr Vasc Pharmacol*. 2005;3(1):63-68. doi:10.2174/1570161052773861
 114. Woollard KJ. Immunological aspects of atherosclerosis. *Clin Sci (Lond)*. 2013;125(5):221-235. doi:10.1042/CS20120576
 115. Wang T, Butany J. Pathogenesis of atherosclerosis. *Diagnostic Histopathol*. 2017;23(11):473-478. doi:10.1016/j.mpdhp.2017.11.009
 116. Li D, Mehta JL. Oxidized LDL, a critical factor in atherogenesis. *Cardiovasc Res*. 2005;68(3):353-354. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16253212>.
 117. Yoshida H, Kisugi R. Mechanisms of LDL oxidation. *Clin Chim Acta*. 2010;411(23-24):1875-1882. doi:10.1016/j.cca.2010.08.038
 118. Virmani R, Burke AP, Willerson JT, Farb A, Narula J, Kolodgie FD. The Pathology of Vulnerable Plaque. *Vulnerable Atheroscler Plaque Strateg Diagnosis Manag*. 2007;47(8):19-36. doi:10.1002/9780470987575.ch2
 119. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res*. 2014;114(12):1852-1866. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302721
 120. Lloyd-Jones DM, O'Donnell CJ, D'Agostino RB, Massaro J, Silbershatz H, Wilson PWF. Applicability of cholesterol-lowering primary prevention trials to a general population: The Framingham Heart Study. *Arch Intern Med*. 2001;161(7):949-954.

doi:10.1001/archinte.161.7.949

121. Sniderman AD, Wolfson C, Teng B, Franklin FA, Bachorik PS, Kwiterovich PO. Association of hyperapobetalipoproteinemia with endogenous hypertriglyceridemia and atherosclerosis. *Ann Intern Med.* 1982;97(6):833-839. doi:10.7326/0003-4819-97-6-833
122. Wilkins JT, Ning H, Stone NJ, et al. Coronary heart disease risks associated with high levels of HDL cholesterol. *J Am Heart Assoc.* 2014;3(2):1-8. doi:10.1161/JAHA.113.000519
123. Catapano AL, Graham I. 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias1. Catapano AL, Graham I. 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias. *Lale Tokgozoglu* 2016:2999–3058. *Lale Tokgozoglu.* 2016:2999-3058. doi:10.1093/eurheartj/ehw272
124. Lusis AAJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000;407(6801):233-241. doi:10.1038/35025203.Atherosclerosis
125. Tanner JM, Whitehouse RH. Clinical longitudinal standards for height, weight, height velocity, weight velocity, and stages of puberty. *Arch Dis Child.* 1976;51:170-179. doi:10.1136/adc.51.3.170
126. Furtado JM, Almeida SM, Mascarenhas P, et al. Anthropometric features as predictors of atherogenic dyslipidemia and cardiovascular risk in a large population of school-aged children. Palazón-Bru A, ed. *PLoS One.* 2018;13(6):e0197922. doi:10.1371/journal.pone.0197922
127. Almeida SM, Furtado JM, Mascarenhas P, et al. Association between LEPR, FTO, MC4R, and PPARG-2 polymorphisms with obesity traits and metabolic phenotypes in school-aged children. *Endocrine.* 2018;60(3):466-478. doi:10.1007/s12020-018-1587-3
128. Sampé, M.; Pedron G., Roy-Pernot MP. *Auxologie méthode et séquences.* 1979:7-189.
129. McCarthy HD, Jarrett K V, Crawley HF, et al. The development of waist circumference percentiles in British children aged 5.0 – 16.9 y. *Eur J Clin Nutr.* 2001;55(10):902-907. doi:10.1038/sj.ejcn.1601240
130. Michel Sempé, Guy Pédrón M-PR-P. *Auxologie Méthode et Séquences.* Theraplix.; 1979.
131. Tanaka NI, Miyatani M, Masuo Y, Fukunaga T, Kanehisa H. Applicability of a

- segmental bioelectrical impedance analysis for predicting the whole body skeletal muscle volume. *J Appl Physiol*. 2007;103(5):1688-1695.
doi:10.1152/jappphysiol.00255.2007
132. Soghier L, Pham K, Rooney S. *Reference Range Values for Pediatric Care*. American Academy of Pediatrics; 2014. <https://ebooks.aappublications.org/content/reference-range-values-for-pediatric-care>. Accessed December 8, 2019.
 133. Mayo Clinic Laboratories. *Lipids and Lipoproteins in Blood Plasma (Serum)*.; 2016:1-9. papers2://publication/uuid/662A6BD3-F13A-467B-803D-F539B38926A6.
 134. D. R. Mattheus, J. P. Hosker, B. A. Rudenski, B. A. Naylor DFT and RCT. Homeostasis model assessment : insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28:412-419.
 135. Berg JE, Hostmark AT. Cardiovascular risk determination: discrepancy between total cholesterol evaluation and two compound laboratory indices in Norway. *J Epidemiol Community Health*. 1994;48(4):338-343. doi:10.1136/jech.48.4.338
 136. McCarthy HD, Cole TJ, Fry T, Jebb SA, Prentice AM. Body fat reference curves for children. *Int J Obes*. 2006;30(4):598. doi:10.1038/sj.ijo.0803232
 137. Bjorntorp P. *International Textbook of Obesity*. Vol 988707. John Wiley. (Per Bjorntorp, ed.). Chichester - New York - Weinheim - Brisbane - Singapore - Toronto: Library of Congress Cataloging-in-Publication Data International; 2001.
 138. Raghuvver G. Lifetime cardiovascular risk of childhood obesity. *Am J Clin Nutr*. 2010;91((suppl)):1514S-1519S. doi:10.3945/ajcn.2010.28701D.1514S
 139. Andersson J, Libby P, Hansson GK. Adaptive immunity and atherosclerosis. *Clin Immunol*. 2010;134(1):33-46. doi:10.1016/j.clim.2009.07.002
 140. VanderLaan PA, Reardon CA, Getz GS. Site Specificity of Atherosclerosis: Site-Selective Responses to Atherosclerotic Modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(1):12-22. doi:10.1161/01.ATV.0000105054.43931.f0
 141. Ross R. Inflammation or Atherogenesis. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-126. doi:10.1056/NEJM199901143400207
 142. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: The Road Ahead Review. *Cell*. 2001;104:503-516. <https://www.mcdb.ucla.edu/Research/Arispe/course-224/Edwards1.pdf>. Accessed October 14, 2012.
 143. McCrindle BW. Will childhood obesity lead to an epidemic of premature cardiovascular

- disease? *Evid Based Cardiovasc Med.* 2006;10(2):71-74.
doi:10.1016/j.ebcm.2006.04.015
144. Spinelli A, Buoncristiano M, Kovacs VA, et al. Prevalence of severe obesity among primary school children in 21 European countries. *Obes Facts.* 2019;12(2):244-258.
doi:10.1159/000500436
 145. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006;444(7121):860-867. doi:10.1038/nature05485
 146. Steinberg D. An interpretive history of the cholesterol controversy, part IV: The 1984 Coronary Primary Prevention Trial ends it - Almost. *J Lipid Res.* 2006;47(1):1-14.
doi:10.1194/jlr.R500014-JLR200
 147. Hong YM. Atherosclerotic cardiovascular disease beginning in childhood. *Korean Circ J.* 2010;40(1):1-9. doi:10.4070/kcj.2010.40.1.1
 148. Sontichai W, Dejkhamron P, Pothacharoen P, Kongtaweelert P, Unachak K, Ukarapol N. Subtle inflammation: A possible mechanism of future cardiovascular risk in obese children. *Korean J Pediatr.* 2017;60(11):359-364. doi:10.3345/kjp.2017.60.11.359
 149. Getz GS, Reardon CA. Animal Models of atherosclerosis. *Anim Model Study Hum Dis Second Ed.* 2012;32(5):1104-1115. doi:10.1161/ATVBAHA.111.237693.Animal
 150. Daugherty A, Rateri DL. Development of experimental designs for atherosclerosis studies in mice. *Methods.* 2005;36(2 SPEC. ISS.):129-138.
doi:10.1016/j.ymeth.2004.11.008
 151. Yazdi FT, Clee SM, Meyre D. Obesity genetics in mouse and human: Back and forth, and back again. *PeerJ.* 2015;2015(3):1-69. doi:10.7717/peerj.856
 152. Yang X, Peterson L, Thieringer R, et al. Identification and validation of genes affecting aortic lesions in mice. *J Clin Invest.* 2010;120(7):2414-2422.
doi:10.1172/JCI42742DS1
 153. Langheinrich AC, Michniewicz A, Sedding DG, et al. Correlation of vasa vasorum neovascularization and plaque progression in aortas of apolipoprotein E^{-/-}/low-density lipoprotein^{-/-} double knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(2):347-352. doi:10.1161/01.ATV.0000196565.38679.6d
 154. Bentzon JF, Falk E. Atherosclerotic lesions in mouse and man: Is it the same disease? *Curr Opin Lipidol.* 2010;21(5):434-440. doi:10.1097/MOL.0b013e32833ded6a
 155. Zhou J, Møller J, Danielsen CC, et al. Dietary supplementation with methionine and

- homocysteine promotes early atherosclerosis but not plaque rupture in apoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(9):1470-1476.
doi:10.1161/hq0901.096582
156. REISER R, SORRELS MF, WILLIAMS MC. Influence of high levels of dietary fats and cholesterol on atherosclerosis and lipid distribution in swine. *Circ Res.* 1959;7(November):833-846. doi:10.1161/01.RES.7.6.833
157. Koskinas KC, Feldman CL, Chatzizisis YS, et al. Natural history of experimental coronary atherosclerosis and vascular remodeling in relation to endothelial shear stress: A serial, in vivo intravascular ultrasound study. *Circulation.* 2010;121(19):2092-2101. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.901678
158. Gerrity RG, Richardson M, Somer JB, Bell FP, Schwartz CJ. Endothelial cell morphology in areas of in vivo Evans blue uptake in the aorta of young pigs. II. Ultrastructure of the intima in areas of differing permeability to proteins. *Am J Pathol.* 1977;89(2):313-334.
159. Civelek M, Manduchi E, Riley RJ, Stoeckert CJ, Davies PF. Coronary artery endothelial transcriptome in vivo identification of endoplasmic reticulum stress and enhanced reactive oxygen species by gene connectivity network analysis. *Circ Cardiovasc Genet.* 2011;4(3):243-252. doi:10.1161/CIRCGENETICS.110.958926
160. Prescott MF, McBride CH, Hasler-Rapacz J, Von Linden J, Rapacz J. Development of complex atherosclerotic lesions in pigs with inherited hyper-LDL cholesterolmia bearing mutant alleles for apolipoprotein B. *Am J Pathol.* 1991;139(1):139-147.
161. Duff GL. Experimental cholesterol arteriosclerosis and its relationship to human arteriosclerosis. *Arch Pathol.* 1935;20:81-304.
https://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:bPslosgmZZEJ:scholar.google.com/+Arch.+Pathol.,+20,+81,+1935&hl=pt-PT&as_sdt=0,5. Accessed February 3, 2020.
162. Bocan TMA, Bak Mueller S, Mazur MJ, Uhlendorf PD, Quenby Brown E, Kieft KA. The relationship between the degree of dietary-induced hypercholesterolemia in the rabbit and atherosclerotic lesion formation. *Atherosclerosis.* 1993;102(1):9-22.
doi:10.1016/0021-9150(93)90080-E
163. L. DG, McMillan GC. The effect of alloxan diabetes on experimental cholesterol atherosclerosis in the rabbit. *J Exp Med.* 1949;89(6):611-630.
doi:10.1084/jem.89.6.611

164. Shiomi M, Ito T, Watanabe Y. Hypercholesterolemia and atherosclerosis in the WHHL rabbit, an animal model of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 1983;3(1):87-101.
165. Shiomi M, Ito T. The Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbit, its characteristics and history of development: A tribute to the late Dr. Yoshio Watanabe. *Atherosclerosis*. 2009;207(1):1-7. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.03.024
166. Portman OW, Andrus SB. Comparative Evaluation of Three Species of New World Monkeys for Studies of Dietary Factors, Tissue Lipids, and Atherogenesis. *J Nutr*. 1965;87(4):429-438. doi:10.1093/jn/87.4.429
167. Vesselinovitich D, Getz GS, Hughes RH, Wissler RW. Atherosclerosis in the rhesus monkey fed three food fats. *Atherosclerosis*. 1974;20(2):303-321. doi:10.1016/0021-9150(74)90015-X
168. Wolfe MS, Sawyer JK, Morgan TM, Bullock BC, Rudel LL. Dietary polyunsaturated fat decreases coronary artery atherosclerosis in a pediatric-aged population of African green monkeys. *Arterioscler Thromb*. 1994;14(4):587-597. doi:10.1161/01.atv.14.4.587
169. Armstrong ML, Megan MB. Lipid depletion in atheromatous coronary arteries in rhesus monkeys after regression diets. *Circ Res*. 1972;30(6):675-680. doi:10.1161/01.RES.30.6.675
170. Kushwaha RS, McGill HC. Diet, plasma lipoproteins and experimental atherosclerosis in baboons (*Papio sp.*). *Hum Reprod Update*. 1998;4(4):420-429. doi:10.1093/humupd/4.4.420
171. Armstrong DDH and ML. Blood Flow through Vasa Vasorum of Coronary Arteries in Atherosclerotic Monkeys. *Arteriosclerosis*. 1986;6(3):326-331.
172. Williams JK, Armstrong ML, Heistad DD. Vasa vasorum in atherosclerotic coronary arteries: Responses to vasoactive stimuli and regression of atherosclerosis. *Circ Res*. 1988;62(3):515-523. doi:10.1161/01.RES.62.3.515
173. Blanden BYR V, Lefford MJ, Mackaness AGB. The host response to Calmette-Guérin Bacillus infection in mice. *J Exp Med*. 1969;129:1079-1107.
174. Stein BM, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 Potently Enhances Murine Macrophage Mannose Receptor Activity: A Marker of Alternative Immunologic Macrophage Activation. *J Exp Med*. 1992;176(July):287-292.
175. Mantovani A, Garlanda C, Locati M. Macrophage diversity and polarization in

- atherosclerosis: A question of balance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(10):1419-1423. doi:10.1161/ATVBAHA.108.180497
176. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* 2010;32(5):593-604. doi:10.1016/j.immuni.2010.05.007
177. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004;25(12):677-686. doi:10.1016/j.it.2004.09.015
178. Sathishkumar K, Gao X, Raghavamenon AC, Murthy SN, Kadowitz PJ, Uppu RM. Oxidized Low-Density Lipoprotein. *Methods Mol Biol.* 2010;610(1):403-417. doi:10.1007/978-1-60327-029-8
179. Wu M-Y, Li C-J, Hou M-F, Chu P-Y. New Insights into the Role of Inflammation in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Int J Mol Sci.* 2017;18(10):2034. doi:10.3390/ijms18102034
180. Kohno M, Yokokawa K, Yasunari K, et al. Induction by lysophosphatidylcholine, a major phospholipid component of atherogenic lipoproteins, of human coronary artery smooth muscle cell migration. *Circulation.* 1998;98(4):353-359. doi:10.1161/01.CIR.98.4.353
181. Poledne R, Králová Lesná I. Inflammation and atherosclerosis. *Vnitr Lek.* 2018;64(12):1142-1146. doi:10.1309/j63v-5lth-wyfc-vdr5
182. Guo L, Akahori H, Harari E, et al. CD163+ macrophages promote angiogenesis and vascular permeability accompanied by inflammation in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2018;128(3):1106-1124. doi:10.1172/JCI93025
183. Finn A V., Nakano M, Polavarapu R, et al. Hemoglobin Directs Macrophage Differentiation and Prevents Foam Cell Formation in Human Atherosclerotic Plaques. *J Am Coll Cardiol.* 2012;59(2):166-177. doi:10.1016/j.jacc.2011.10.852
184. Newman WP III, Fredman DS, Voors AW, Gard PD, Srinivasan SR, Cresanta JL, Williamson GD, Webber LS and BG, Newman WP III, Fredman DS, Voors AW, Gard PD, Srinivasan SR, Cresanta JL, Williamson GD WL, GS B, et al. Relation of Serum Lipoprotein Levels and Systolic Blood Pressure To Early Atherosclerosis. *N Engl J Med.* 1986;314(3):138-144. doi:10.1056/NEJM198601163140302
185. Perrone J, Hollander JE, De Roos F, Berenson GS. Cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults [4] (multiple letters). *N Engl J Med.* 1998;339(15):1083-1084. doi:10.1056/NEJM199810083391514

186. McGill HC, McMahan CA, Zieske AW, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP. Effects of nonlipid risk factors on atherosclerosis in youth with a favorable lipoprotein profile. *Circulation*. 2001;103(11):1546-1550. doi:10.1161/01.CIR.103.11.1546
187. Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, et al. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. *N Engl J Med*. 1998;338(23):1650-1656. doi:10.1056/NEJM199806043382302
188. McGill HC, McMahan CA, Malcom GT, Oalmann MC, Strong JP. Effects of Serum Lipoproteins and Smoking on Atherosclerosis in Young Men and Women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17(1):95-106. doi:10.1161/01.ATV.17.1.95
189. Davis PH, Dawson JD, Riley WA, Lauer RM. Carotid intimal-medial thickness is related to cardiovascular risk factors measured from childhood through middle age the muscatine Study. *Circulation*. 2001;104(23):2815-2819. doi:10.1161/hc4601.099486
190. Raitakari O, Juonala M, Nnema TR, Kerblom H, Viikari J. Cardiovascular risk factors in childhood as predictors of carotid artery intima-media thickness in adulthood. *Jama*. 2003;290(17):2277-2283. doi:10.1016/s1567-5688(03)91137-8
191. Knoflach M, Kiechl S, Kind M, et al. Cardiovascular risk factors and atherosclerosis in young males: ARMY study (atherosclerosis risk-factors in male youngsters). *Circulation*. 2003;108(9):1064-1069. doi:10.1161/01.CIR.0000085996.95532.FF
192. Sanchez A, Barth JD, Zhang L. The carotid artery wall thickness in teenagers is related to their diet and the typical risk factors of heart disease among adults (4). *Atherosclerosis*. 2000;152(1):265-266. doi:10.1016/S0021-9150(00)00532-3
193. Meigs JB, D'Agostino RB, Wilson PWF, Cupples LA, Nathan DM, Singer DE. Risk variable clustering in the insulin resistance syndrome: The Framingham Offspring Study. *Diabetes*. 1997;46(10):1594-1600. doi:10.2337/diacare.46.10.1594
194. Lew EA. Mortality and weight: Insured lives and the American Cancer Society studies. *Ann Intern Med*. 1985;103(6 II):1024-1029. doi:10.7326/0003-4819-103-6-1024
195. Falkner B, Daniels SR. Summary of the fourth report on the diagnosis, evaluation, and treatment of high blood pressure in children and adolescents. *Hypertension*. 2004;44(4):387-388. doi:10.1161/01.HYP.0000143545.54637.af
196. Jacobson TA, Brown S. Body weight and mortality among women. *N Engl J Med*. 1996;334(11):733. doi:10.1097/00006205-199511000-00011
197. Spiotta RT, Luma GB, Obesity E, Risk C. Evaluating Obesity and Cardiovascular Risk Factors in Children and Adolescents. *Am Acad Fam Physicians*. 2008;78(9):1052-

1058. doi:10.4103/2230-8210.91176
198. Zhu Y, Shao Z, Jing J, et al. Body mass index is better than other anthropometric indices for identifying dyslipidemia in Chinese children with obesity. *PLoS One*. 2016;11(3):1-11. doi:10.1371/journal.pone.0149392
 199. Maffeis C, Moghetti P, Grezzani A, Clementi M, Gaudino R, Tatò L. Insulin Resistance and the Persistence of Obesity from Childhood into Adulthood. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(1):71-76. doi:10.1210/jcem.87.1.8130
 200. Blüher S, Molz E, Wiegand S, et al. Body Mass Index, Waist Circumference, and Waist-to-Height Ratio as Predictors of Cardiometabolic Risk in Childhood Obesity Depending on Pubertal Development. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(8):3384-3393. doi:10.1210/jc.2013-1389
 201. Chang CJ, Jian DY, Lin MW, Zhao JZ, Ho LT, Juan CC. Evidence in Obese Children: Contribution of Hyperlipidemia, Obesity-Inflammation, and Insulin Sensitivity. *PLoS One*. 2015;10(5). doi:10.1371/journal.pone.0125935
 202. N-F C, E.B. R, D-J. W, et al. Relationship between anthropometric variables and lipid levels among school children: The Taipei children heart study. *Int J Obes*. 1998;22(1):66-72. doi:10.1038/sj.ijo.0800546
 203. Nielsen TRH, Lausten-Thomsen U, Fonvig CE, et al. Dyslipidemia and reference values for fasting plasma lipid concentrations in Danish/North-European White children and adolescents. *BMC Pediatr*. 2017;17(1):1-11. doi:10.1186/s12887-017-0868-y
 204. Okur I, Tumer L, Ezgu FS, et al. Oxidized low-density lipoprotein levels and carotid intima-media thickness as markers of early atherosclerosis in prepubertal obese children. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2013;26(7-8):657-662. doi:10.1515/jpem-2012-0374
 205. Weinbrenner T, Schröder H, Escurriol V, et al. Circulating oxidized LDL is associated with increased waist circumference independent of body mass index in men and women. *Am J Clin Nutr*. 2006;83(1):30-35. doi:83/1/30 [pii]
 206. Sniderman A, Shapiro S, Marpole D, Skinner B, Teng B, Kwiterovich PO. Association of coronary atherosclerosis with hyperapobetalipoproteinemia [increased protein but normal cholesterol levels in human plasma low density (β) lipoproteins]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(1):604-608. doi:10.1073/pnas.77.1.604
 207. Falorni A, Bini V, Molinari D, et al. Leptin serum levels in normal weight and obese

- children and adolescents: relationship with age, sex, pubertal development, body mass index and insulin. *Int J Obes*. 1997;21(10):881-890.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9347406>.
208. Aygun AD, Gungor S, Ustundag B, Gurgoze MK, Sen Y. Proinflammatory cytokines and leptin are increased in serum of prepubertal obese children. *Mediators Inflamm*. 2005;2005(3):180-183. doi:10.1155/MI.2005.180
209. Ståhlman M, Fagerberg B, Adiels M, et al. Dyslipidemia, but not hyperglycemia and insulin resistance, is associated with marked alterations in the HDL lipidome in type 2 diabetic subjects in the DIWA cohort: Impact on small HDL particles. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2013;1831(11):1609-1617.
doi:10.1016/j.bbalip.2013.07.009
210. Suárez-Álvarez K, Solís-Lozano L, Leon-Cabrera S, et al. Serum IL-12 is increased in Mexican obese subjects and associated with low-grade inflammation and obesity-related parameters. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:967067. doi:10.1155/2013/967067
211. Moniz M, Marques T, Cabral M, et al. Factores de risco cardiovascular e obesidade infantil. *Acta Med Port*. 2011;24(SUPPL.2):327-332.
212. Budoff M. Triglycerides and triglyceride-rich lipoproteins in the causal pathway of cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2016;118(1):138-145.
doi:10.1016/j.amjcard.2016.04.004
213. Do R. Common variants associated with plasma triglycerides and risk for coronary heart disease. *Nat Genet*. 2013;45(11):1345-1352. doi:10.1038/ng.2795.Common
214. D'Adamo E, Guardamagna O, Chiarelli F, et al. Atherogenic Dyslipidemia and Cardiovascular Risk Factors in Obese Children. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:1-9.
doi:10.1155/2015/912047
215. Utsal L, Tillmann V, Zilmer M, et al. Elevated serum IL-6, IL-8, MCP-1, CRP, and IFN- γ levels in 10- to 11-year-old boys with increased BMI. *Horm Res Paediatr*. 2012;78(1):31-39. doi:10.1159/000339831
216. Breslin WL, Johnston CA, Strohacker K, et al. Obese Mexican American children have elevated MCP-1, TNF- α , monocyte concentration, and dyslipidemia. *Pediatrics*. 2012;129(5). doi:10.1542/peds.2011-2477
217. Schipper HS, Nuboer R, Prop S, et al. Systemic inflammation in childhood obesity: Circulating inflammatory mediators and activated CD14 $^{++}$ monocytes. *Diabetologia*. 2012;55(10):2800-2810. doi:10.1007/s00125-012-2641-y

218. Carolan E, Hogan AE, Corrigan M, et al. The impact of childhood obesity on inflammation, innate immune cell frequency, and metabolic microRNA expression. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(3):474-478. doi:10.1210/jc.2013-3529
219. Schmidt FM, Weschenfelder J, Sander C, et al. Inflammatory cytokines in general and central obesity and modulating effects of physical Activity. *PLoS One.* 2015;10(3):1-17. doi:10.1371/journal.pone.0121971
220. Matia-García I, Muñoz-Valle JF, Reyes-Castillo Z, et al. Correlation between cytokine profile and metabolic abnormalities in young subjects. *Int J Clin Exp Med.* 2016;9(8):16596-16604.
221. Passlick B, Flieger D, Loms Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood.* 1989;74(7):2527-2534. doi:10.1182/blood.v74.7.2527.bloodjournal7472527
222. Hristov M, Leyendecker T, Schuhmann C, et al. Circulating monocyte subsets and cardiovascular risk factors in coronary artery disease. *Thromb Haemost.* 2010;104(2):412-414. doi:10.1160/TH10-01-0069
223. Flynn MC, Pernes G, Lee MKS, Nagareddy PR, Murphy AJ. Monocytes, macrophages, and metabolic disease in atherosclerosis. *Front Pharmacol.* 2019;10(JUN):1-13. doi:10.3389/fphar.2019.00666
224. Korkosz M, Bukowska-Strakova K, Sadis S, Grodzicki T, Siedlar M. Monoclonal antibodies against macrophage colony-stimulating factor diminish the number of circulating intermediate and nonclassical (CD14(++)CD16+)/CD14(+)CD16(++) monocytes in rheumatoid arthritis patient. *Blood.* 2012;119(22):5329-5330. doi:10.1182/blood-2012-02-412551
225. Hilgendorf I, Swirski FK, Robbins CS. Monocyte fate in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(2):272-279. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303565
226. Krychtiuk KA, Kastl SP, Pfaffenberger S, et al. Association of small dense LDL serum levels and circulating monocyte subsets in stable coronary artery disease. *PLoS One.* 2015;10(4):1-15. doi:10.1371/journal.pone.0123367
227. Rogacev KS, Ulrich C, Blomer L, et al. Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis. *Eur Heart J.* 2010;31(3):369-376. doi:10.1093/eurheartj/ehp308
228. Rogacev KS, Cremers B, Zawada AM, et al. CD14++CD16+ monocytes independently predict cardiovascular events: A cohort study of 951 patients referred for elective

- coronary angiography. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(16):1512-1520.
doi:10.1016/j.jacc.2012.07.019
229. Wildgruber M, Aschenbrenner T, Wendorff H, et al. The “intermediate” CD14++ CD16+ monocyte subset increases in severe peripheral artery disease in humans. *Sci Rep*. 2016;6(December):1-8. doi:10.1038/srep39483
230. Keustermans GC, Kofink D, Eikendal A, et al. Monocyte gene expression in childhood obesity is associated with obesity and complexity of atherosclerosis in adults. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-8. doi:10.1038/s41598-017-17195-3
231. Stöger JL, Goossens P, de Winther MPJ. Macrophage heterogeneity: relevance and functional implications in atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol*. 2010;8(2):233-248. doi:10.2174/157016110790886983
232. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*. 2001;409(6817):198-201. doi:10.1038/35051594
233. Patel VK, Williams H, Li SCH, Fletcher JP, Medbury HJ. Monocyte inflammatory profile is specific for individuals and associated with altered blood lipid levels. *Atherosclerosis*. 2017;263:15-23. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2017.05.026
234. Porcheray F, Viaud S, Rimaniol AC, et al. Macrophage activation switching: An asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol*. 2005;142(3):481-489. doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02934.x
235. Fadini GP, Simoni F, Cappellari R, et al. Pro-inflammatory monocyte-macrophage polarization imbalance in human hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2014;237(2):805-808. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.10.106
236. Klünder-Klünder M, Miguel Cruz, Rebeca García-Macedo SF-H. Hospital Infantil de México. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2014;71(1):8-1.
237. Azizian M, Mahdipour E, Mirhafez SR, et al. Cytokine profiles in overweight and obese subjects and normal weight individuals matched for age and gender. *Ann Clin Biochem*. 2016;53(6):663-668. doi:10.1177/0004563216629997
238. Getz GS, Reardon CA. Nutrition and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(12):2499-2506. doi:10.1161/ATVBAHA.107.155853
239. Berenson GSGS, Srinivasan SR, Nicklas TA. Atherosclerosis: a nutritional disease of childhood. *Am J Cardiol*. 1998;82(10 (Supplement 2)):22T-29T. doi:10.1016/S0002-9149(98)00719-X

240. Sirtori CR, Galli C, Anderson JW, Arnoldi A. Nutritional and nutraceutical approaches to dyslipidemia and atherosclerosis prevention: Focus on dietary proteins. *Atherosclerosis*. 2009;203(1):8-17. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.06.019
241. Rolland-Cachera M, Patois E, Bellisle F, Semp M. Adiposity rebound in children: A simple indicator for predicting obesity. *Am J Clin Nutr*. 1984;39(1):129-135. doi:10.1093/ajcn/39.1.129
242. Ip EH, Marshall SA, Saldana S, et al. Determinants of Adiposity Rebound Timing in Children. *J Pediatr*. 2017;184:151-156.e2. doi:10.1016/j.jpeds.2017.01.051
243. Ziegler-Heitbrock HWL, Ulevitch RJ. CD14: Cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today*. 1993;14(3):121-125. doi:10.1016/0167-5699(93)90212-4
244. Zanoni I, Granucci F. Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013;4(JUL):1-6. doi:10.3389/fcimb.2013.00032
245. Kim D, Kim JY. Anti-CD14 antibody reduces LPS responsiveness via TLR4 internalization in human monocytes. *Mol Immunol*. 2014;57(2):210-215. doi:10.1016/j.molimm.2013.09.009
246. Devitt A, Moffatt OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL, Gregory CD. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature*. 1998;392(6675):505-509. doi:10.1038/33169
247. Thomas L, Bielemeier A, Lambert PA, Darveau RP, Marshall LJ, Devitt A. The N-Terminus of CD14 Acts to Bind Apoptotic Cells and Confers Rapid-Tethering Capabilities on Non-Myeloid Cells. *PLoS One*. 2013;8(7):1-13. doi:10.1371/journal.pone.0070691
248. Gessner JE, Grussenmeyer T, Kolanus W, Schmidt RE. The human low affinity immunoglobulin G Fc receptor III-A and III-B genes: Molecular characterization of the promoter regions. *J Biol Chem*. 1995;270(3):1350-1361. doi:10.1074/jbc.270.3.1350
249. Tanaka Y, Suzuki Y, Tsuge T, et al. FcγRIIa-131R allele and FcγRIIIa-176V/V genotype are risk factors for progression of IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20(11):2439-2445. doi:10.1093/ndt/gfi043
250. Gavasso S, Nygård O, Pedersen ER, et al. Fcγ receptor IIIA polymorphism as a risk-factor for coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2005;180(2):277-282. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.12.011
251. Robledo G, Márquez A, Dávila-Fajardo CL, et al. Association of the FCGR3A-158F/V

- gene polymorphism with the response to rituximab treatment in spanish systemic autoimmune disease patients. *DNA Cell Biol.* 2012;31(12):1671-1677.
doi:10.1089/dna.2012.1799
252. Treon SP, Yang G, Hanzis C, et al. Attainment of complete/very good partial response following rituximab-based therapy is an important determinant to progression-free survival, and is impacted by polymorphisms in FCGR3A in Waldenstrom macroglobulinaemia. *Br J Haematol.* 2011;154(2):223-228. doi:10.1111/j.1365-2141.2011.08726.x
253. Moroi R, Endo K, Kinouchi Y, et al. FCGR3A-158 polymorphism influences the biological response to infliximab in Crohn's disease through affecting the ADCC activity. *Immunogenetics.* 2013;65(4):265-271. doi:10.1007/s00251-013-0679-8
254. Bizzaro N, Goldschmeding R, Von dem Borne AEGK. Platelet satellitism is Fcγ RIII (CD16) receptor-mediated. *Am J Clin Pathol.* 1995;103(6):740-744.
doi:10.1093/ajcp/103.6.740
255. Drescher B, Witte T, Schmidt RE. Glycosylation of FcγRIII in N163 as mechanism of regulating receptor affinity. *Immunology.* 2003;110(3):335-340. doi:10.1046/j.1365-2567.2003.01743.x
256. Neculai D, Schwake M, Ravichandran M, et al. Structure of LIMP-2 provides functional insights with implications for SR-BI and CD36. *Nature.* 2013;504(7478):172-176.
doi:10.1038/nature12684
257. Rahaman SO. Tacca121000206.Pdf. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2010;121:206-220.
258. Bierling P, Godeau B, Fromont P, et al. Posttransfusion purpura-like syndrome associated with CD36 (Naka) isoimmunization. *Transfusion.* 1995;35(9):777-782.
doi:10.1046/j.1537-2995.1995.35996029165.x
259. Morishita K, Wakamoto S, Miyazaki T, et al. Life-threatening adverse reaction followed by thrombocytopenia after passive transfusion of fresh frozen plasma containing anti-CD36 (Nak a) isoantibody. *Transfusion.* 2005;45(5):803-806. doi:10.1111/j.1537-2995.2005.04320.x
260. Yamashita S, Hirano KI, Kuwasako T, et al. Physiological and pathological roles of a multi-ligand receptor CD36 in atherogenesis; insights from CD36-deficient patients. *Mol Cell Biochem.* 2007;299(1-2):19-22. doi:10.1007/s11010-005-9031-4
261. Özer NK, Negis Y, Aytan N, et al. Vitamin E inhibits CD36 scavenger receptor

- expression in hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis*. 2006;184(1):15-20.
doi:10.1016/j.atherosclerosis.2005.03.050
262. Meex SJR, Van Der Kallen CJH, Van Greevenbroek MMJ, et al. Up-regulation of CD36/FAT in preadipocytes in familial combined hyperlipidemia. *FASEB J*. 2005;19(14):2063-2065. doi:10.1096/fj.04-2403fje
263. Selvakumar A, Mohanraj BK, Eddy RL, Shows TB, White PC, Dupont B. Genomic organization and chromosomal location of the human gene encoding the B-lymphocyte activation antigen B7. *Immunogenetics*. 1992;36(3):175-181.
doi:10.1007/BF00661094
264. Racke MK, Scott DE, Quigley L, et al. Distinct roles for B7-1 (CD-80) and B7-2 (CD-86) in the initiation of experimental allergic encephalomyelitis. *J Clin Invest*. 1995;96(5):2195-2203. doi:10.1172/JCI118274
265. Leifeld L, Trautwein C, Dumoulin FL, Manns MP, Sauerbruch T, Spengler U. Enhanced expression of CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), and CD40 and their ligands CD28 and CD154 in fulminant hepatic failure. *Am J Pathol*. 1999;154(6):1711-1720.
doi:10.1016/S0002-9440(10)65427-2
266. Short JJ, Vasu C, Holterman MJ, Curiel DT, Pereboev A. Members of adenovirus species B utilize CD80 and CD86 as cellular attachment receptors. *Virus Res*. 2006;122(1-2):144-153. doi:10.1016/j.virusres.2006.07.009
267. Schwartz JCD, Zhang X, Fedorov AA, Nathenson SG, Almo SC. Structural basis for co-stimulation by the human CTLA-4/B7-2 complex. *Nature*. 2001;410(6828):604-608.
doi:10.1038/35069112
268. Zheng Y, Manzotti CN, Liu M, Burke F, Mead KI, Sansom DM. CD86 and CD80 Differentially Modulate the Suppressive Function of Human Regulatory T Cells. *J Immunol*. 2004;172(5):2778-2784. doi:10.4049/jimmunol.172.5.2778
269. Marín LA, Moya-Quiles MR, Miras M, et al. Evaluation of CD86 gene polymorphism at + 1057 position in liver transplant recipients. *Transpl Immunol*. 2005;15(1):69-74.
doi:10.1016/j.trim.2005.04.003
270. Abdallah AM, Renzoni EA, Anevlavis S, et al. A polymorphism in the promoter region of the CD86 (B7.2) gene is associated with systemic sclerosis. *Int J Immunogenet*. 2006;33(3):155-161. doi:10.1111/j.1744-313X.2006.00580.x
271. Hock BD, Drayson M, Patton WN, Taylor K, Kerr L, McKenzie JL. Circulating levels and clinical significance of soluble CD86 in myeloma patients. *Br J Haematol*.

- 2006;133(2):165-172. doi:10.1111/j.1365-2141.2006.05983.x
272. Kuo SH, Chen LT, Chen CL, et al. Expression of CD86 and increased infiltration of NK cells are associated with Helicobacter pylori-dependent state of early stage high-grade gastric MALT lymphoma. *World J Gastroenterol*. 2005;11(28):4357-4362. doi:10.3748/wjg.v11.i28.4357
273. Ritter M, Buechler C, Langmann T, Schmitz G. Genomic organization and chromosomal localization of the human CD163 (M130) gene: A member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;260(2):466-474. doi:10.1006/bbrc.1999.0866
274. Fabriek BO, Bruggen R Van, Deng DM, et al. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood*. 2009;113(4):887-892. doi:10.1182/blood-2008-07-167064
275. Kim SJ, Ruiz N, Bezouška K, Drickamer K. Organization of the gene encoding the human macrophage mannose receptor (mrc1). *Genomics*. 1992;14(3):721-727. doi:10.1016/S0888-7543(05)80174-0
276. Nguyen DG, Hildreth JEK. Involvement of macrophage mannose receptor in the binding and transmission of HIV by macrophage. *Eur J Immunol*. 2003;33(2):483-493. doi:10.1002/immu.200310024
277. Chinetti-Gbaguidi G, Baron M, Bouhlel MA, et al. Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display low cholesterol handling but high phagocytosis because of distinct activities of the PPAR γ and LXR α pathways. *Circ Res*. 2011;108(8):985-995. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.233775
278. Varasteh Z, Mohanta S, Li Y, et al. Targeting mannose receptor expression on macrophages in atherosclerotic plaques of apolipoprotein E-knockout mice using 68 Ga-NOTA-anti-MMR nanobody: non-invasive imaging of atherosclerotic plaques. *EJNMMI Res*. 2019;9. doi:10.1186/s13550-019-0474-0

ANEXOS

CD - GRUPOS DE DIFERENCIAÇÃO - (*Cluster of Differentiation*)

➤ **CD14 (Antigénio de diferenciação de monócitos)**

Recetor de reconhecimento de padrões que deteta moléculas antigénicas principalmente na superfície de microrganismos, sendo designado como recetor de lipopolissacarídeo (LPS), antigénio de diferenciação de monócitos. Mutações no seu gene podem impedir resposta inflamatória adequada em situação de infeção.

O CD14 apresenta sequência única que codifica para dois tipos de proteína:

- Uma **proteína de membrana** ancorada em glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) de 50 a 55 kD (mCD14)
- uma **proteína sérica solúvel** derivada de monócitos ou fígado (sCD14) que não possui âncora.

Ambas as moléculas são críticas para a transdução dum sinal dependendo de lipopolissacarídeo (LPS), mas o sCD14 confere sensibilidade ao LPS em células sem mCD14. Níveis elevados de estão associados a doenças infecciosas inflamatórias e com alta mortalidade ²⁴³⁻²⁴⁴.

Fisiopatologia

Recetor de reconhecimento de padrões vinculado ao GPI que deteta moléculas antigénicas na superfície de bactérias (ácido lipoteicóico em gram-positivos, lipopolissacarídeos em gram-negativos), micobactérias (glicolipídios) e fungos, como parte do sistema imunológico inato.

A forma solúvel de CD14 é secretada pelos hepatócitos e monócitos; em baixas concentrações, conferindo resposta do LPS a células negativas para CD14.

Os macrófagos com um complexo multiproteico de CD14, e TLR4 ligam-se ao LPS, causando a ativação de macrófagos e a libertação de citocinas ²⁴⁵; inversamente, a superestimulação pode causar um choque tóxico ²⁴⁶. A deteção de lipopolissacarídeo induz a produção de IL12 (mediada por CD14), produzindo IFN- γ , que afasta o sistema imunológico do fenótipo Th2 alérgico, associado à produção de IgE, sendo também importante na depuração de células apoptóticas ^{246, 247}.

➤ **CD16 (RECEPTOR DE IMUNOGLOBULINA G Fc III-2; FCRIII-2)**

O recetor Fc com baixa afinidade para a IgG (FCGR3 ou CD16) é codificado por 2 genes quase idênticos, FCGR3A e FCGR3B, resultando na expressão específica de isoformas alternativas ancoradas a nível das membranas. O FCGR3A codifica para uma proteína transmembranar expressa em monócitos/macrófagos ativados, células *NK* e um subconjunto

de células T. Inversamente, o FCGR3B codifica para uma proteína ancorada em GPI expressa pelos neutrófilos, após estimulação por IFN- γ por eosinófilos ²⁴⁸.

Os monócitos CD14⁺/CD16⁺, têm capacidade aumentada para produzir citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , e estão elevados em várias doenças inflamatórias, incluindo a doença arterial coronária ²⁴⁸.

Os polimorfismos de CD16a influenciam:

- Gravidade, mas não a incidência de nefropatia por IgA em pacientes japoneses ²⁴⁹.
- Patogénese da doença arterial coronária ²⁵⁰.
- Resposta clínica ao *rituximab* ^{251,252} e *infiximab* para a doença de Crohn ²⁵³

A perda de CD16a em crianças está associada a infecções virais recorrentes.

Fisiopatologia

Liga várias moléculas de IgG, incluindo o fator reumatoide e mediando a citotoxicidade dependente de anticorpo, a fagocitose ou outras respostas dependentes de anticorpo e ainda na saturação de plaquetas ²⁵⁴. A afinidade ao ligante é regulada por glicosilação ²⁵⁵.

➤ CD36 (antigénio de diferenciação leucocitária)

Neculai e colaboradores, em 2013, determinaram a estrutura cristalina da Proteína 2 de Membrana Integral do Lisossoma (LIMP-2) e inferiram, por homologia, a estrutura do SR-B1 e do CD36. O LIMP2 mostra um feixe helicoidal no qual a beta-gluco-cerebrosidase se liga ao SR-B1 e ao CD36. De notar que a estrutura cristalina também mostra a existência de uma grande cavidade que atravessa todo o comprimento da molécula e a análise de mutagenese do SR-B1 indica que esta cavidade funciona como um túnel através do qual os ésteres de colesterol são libertados da lipoproteína, ligada ao folheto externo da membrana plasmática. O mesmo trabalho forneceu evidências que apoiam um modelo no qual os constituintes lipídicos dos ligantes na superfície do recetor são transferidos para a membrana através desse túnel, respondendo pela característica de transferência lipídica seletiva do SR-B1 e do CD36 ²⁵⁶.

Fisiopatologia

Este marcador funciona como um recetor eliminador de fosfolipídios oxidados, células em apoptose, certos patogénios microbianos, assim como para a trombospondina, o colagénio e a LDL oxidada ²⁵⁷.

Encontra-se também associado a distúrbios plaquetários, atuando como molécula de adesão e agregação celular, nas interações plaquetas-monócitos e células plaquetárias tumorais. O iso-anticorpo CD36 pode causar púrpura pós-transfusão e refratariedade à transfusão de plaquetas ²⁵⁸ hipotensão e trombocitopenia severa ou hidropisia fetal ²⁵⁹.

O déficit em CD36 está na origem da deficiência em glicoproteína IV plaquetária, sendo mais comum na população asiática e africana. Podemos considerar 2 subgrupos:

- Tipo I, caracterizado por plaquetas e monócitos/macrófagos exibindo completa deficiência de CD36;
- Tipo II sem a expressão superficial de CD36 nas plaquetas, mas com expressão quase normal em monócitos/macrófagos.

A deficiência de CD36 está também associada à hiperlipidemia, resistência à insulina e hipertensão ²⁶⁰. Quando associado à aterosclerose é o recetor de eliminação da LDL oxidada ²⁶¹. Também transporta ácidos gordos de cadeia longa, e efetua uma regulação positiva na hiperlipidemia combinada familiar ²⁶².

➤ **CD80 (ligando 1 do antígeno CD28, B7-1 ou BB1)**

O cDNA do gene B7-1, faz antever uma proteína de membrana do tipo I, isto é, possui um péptido sinal que é clivado após migração através da membrana endoplasmática. Prevê-se que a proteína contenha 2 domínios extracelulares estruturalmente semelhantes aos da Ig, uma região transmembranar hidrofóbica e um domínio citoplasmático curto ²⁶³.

As células T precisam de dois sinais para ativação; o primeiro é o péptido antigénico apresentado no MHC classe II através do recetor de células T; o segundo (co-estimulatório) é entregue por CD80 ou CD86, expresso na superfície das células apresentadoras de antígenos, que interagem com CD28 ou CD152 (CTLA-4) ²⁶⁴.

Fisiopatologia

Tem um papel crítico nas respostas autoimunes, humorais ou em situação de transplante. O seu aumento pode causar apresentação excessiva de antígenos na **insuficiência hepática fulminante**, como um passo inicial na sua patogénese antes do início do dano tecidual ²⁶⁵.

Constitui um recetor para algumas espécies de adenovírus ²⁶⁶.

➤ **CD86 (ligando 2 do antígeno CD28, B7-2 ou BB2)**

Marcador proteico de membrana do tipo I, membro da superfamília das imunoglobulinas e expresso por células apresentadoras de antígenos, é o ligante de duas proteínas na superfície celular das células T, o antígeno CD28 e a proteína associada aos linfócitos T citotóxicos. A ligação dessa proteína ao antígeno CD28 é um sinal de estimulação e ativação da célula T ²⁶⁷. O seu papel é idêntico ao CD86 ²⁶⁸.

Fisiopatologia

Os marcadores CD80 e CD86 parecem ter funções opostas nas células T reguladoras ²⁶⁸. Os polimorfismos estão associados à aceitação do transplante de fígado ²⁶⁹ e à esclerose sistémica ²⁷⁰. A expressão aumentada pode causar apresentação excessiva de antígenos na insuficiência hepática fulminante, como um passo inicial na sua patogénese antes do início do

dano tecidual ²⁶⁵. Níveis solúveis circulantes elevados são um mau fator prognóstico no mieloma ²⁷¹. Da mesma forma que o CD80 constitui também um recetor para algumas espécies de adenovírus ²⁶⁶. Está associado ao Linfoma de tecido linfoide associado à mucosa (MALT) de grau elevado e dependente de *Helicobacter pylori*, do estomago ²⁷².

➤ **CD163 (recetor de eliminação da hemoglobina)**

O antígeno CD163 é um membro da superfamília do recetor sequestrador rico em cisteína (SRCR), é expresso exclusivamente por monócitos e macrófagos. Possui 9 domínios SRCR, cada um dos quais é codificado por um exão em separado, semelhante a outros membros da subfamília SRCR do grupo B. Duas variantes citoplasmáticas de CD163 surgem do *splicing* alternativo do íntron 15, enquanto que uma variante truncada e uma extracelular resultam do *splicing* alternativo do íntron 5 ou 7, respetivamente ²⁷³.

Fisiopatologia

Constitui uma proteína macrofágica indutora de sinal regulada por fase aguda, e funciona como um recetor que elimina a hemoglobina através da mediação da endocitose dos complexos haptoglobina-hemoglobina. Este recetor liga apenas o complexo haptoglobina e hemoglobina, o que indica a exposição a um neo-epítipo de ligação ao recetor. A interação recetor-ligante é de alta afinidade e dependente de cálcio. Os complexos de hemoglobina e haptoglobina multimérica (fenótipo 2-2) exibem maior afinidade funcional por CD163 do que os complexos de hemoglobina e haptoglobina dimérica (fenótipo 1-1). A endocitose específica de complexos de haptoglobina-hemoglobina mediada por CD163 foi mensurável em células transfectadas com cDNA CD163 e em células de linfoma mielomonocítico que expressam CD163 ²³².

O CD163 é também expresso como uma proteína imobilizada ou nas células e suporta a ligação a bactérias gram-negativas ou positivas através do motivo de ligação celular no seu segundo domínio de eliminação. A expressão de CD163 em monócitos promove a produção de citocinas pró-inflamatórias induzidas por bactérias que podem ser bloqueadas por anticorpos anti-CD163. Tal parece demonstrar que o recetor CD163 em macrófagos de tecidos residentes, atua como um sensor imune inato de bactérias e um indutor de inflamação local ²⁷⁴.

➤ **CD206 (recetor de macrófago de manose, MMR, MR)**

O reconhecimento de estruturas complexas de hidratos de carbono, desempenha um papel importante em vários processos biológicos, incluindo o reconhecimento célula-célula, renovação das glicoproteínas séricas e neutralização de agentes patogénicos ²⁷⁵. Muitas das lectinas endógenas de animais que medeiam os eventos de reconhecimento, compartilham um motivo estrutural comum dependente de Ca²⁺ que foi designado como domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) do tipo C. O recetor de manose encontrado nos

macrófagos e nas células endoteliais do fígado é o único exemplo conhecido de uma lectina do tipo C que contém múltiplos CRDs do tipo C. Uma função do recetor é ligar estruturas com alto teor de manose na superfície de vírus, bactérias e fungos potencialmente patogénicos, para que possam ser neutralizados pelo processo de fagocitose.

Fisiopatologia

A MMR medeia a associação inicial do vírus da imunodeficiência humana (HIV) com macrófagos sem expressão da molécula de adesão intercelular específica de célula dendrítica DC-SIGN (CD209). A captação e a transmissão de vírus de macrófagos para células T, pode ser bloqueada por manina, manose e lectina de ligação à manose, mas não pela galactose. As células sem MMR não são inibidas por esses agentes, podendo-se assim concluir que a MMR tem um papel substancial na ligação e transmissão do HIV-1 pelos macrófagos ²⁷⁶.

Uma expressão elevada de CD206, foi relatada em macrófagos localizados na capa fibrosa das placas, enquanto que, macrófagos apoptóticos do núcleo lipídico mostraram apenas baixa expressão ^{277 278}. Portanto, o direccionamento eficaz de macrófagos usando conjugados de rádio específicos para MMR, é uma potencial abordagem para a imagiologia de placas ateroscleróticas.

ANEXO 2

ORIGINAL ARTICLE

Anthropometric predictors of body fat in a large population of 9-year-old school-aged children

Silvia M Almeida^{1,2}, José M Furtado^{1,2}, Paulo Mascarenhas², Maria E Ferraz¹, Luís R Silva^{1,2}, José C Ferreira^{1,3}, Mariana Monteiro⁴, Manuel Vilanova^{5,6} and Fernando P Ferraz^{1,2}

¹Centro de Genética Médica e Nutrição Pediátrica Egas Moniz, Campus Universitário, Monte da Caparica, Portugal; ²Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Campus Universitário, Monte da Caparica, Portugal; ³Department of Obstetrics and Gynecology of University of Medicine of Warsaw, Warsaw, Poland; ⁴Clinical and Experimental Endocrinology Group, Unit for Multidisciplinary Research in Biomedicine UMIB, ICBAS, University of Porto, Portugal; ⁵Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, and IBMC – Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto, Portugal; ⁶Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto, Portugal

Received 29 January 2016; revised 31 May 2016; accepted 12 June 2016

Address for correspondence: SM Almeida, Campus Universitário, Quinta da Granja, Monte de Caparica, 2829-511 Caparica, Portugal. E-mail: cgmnp@egasmoniz.edu.pt

This manuscript has been revised by BioMed Proofreading.

Summary

Objective

To develop and cross-validate predictive models for percentage body fat (%BF) from anthropometric measurements [including BMI z-score (zBMI) and calf circumference (CC)] excluding skinfold thickness.

Methods

A descriptive study was carried out in 3,084 pre-pubertal children. Regression models and neural network were developed with %BF measured by Bioelectrical Impedance Analysis (BIA) as the dependent variables and age, sex and anthropometric measurements as independent predictors.

Results

All %BF grade predictive models presented a good global accuracy ($\geq 91.3\%$) for obesity discrimination. Both overfat/obese and obese prediction models presented respectively good sensitivity (78.6% and 71.0%), specificity (98.0% and 99.2%) and reliability for positive or negative test results ($\geq 82\%$ and $\geq 96\%$). For boys, the order of parameters, by relative weight in the predictive model, was zBMI, height, waist-circumference-to-height-ratio (WHR) squared variable ($_Q$), age, weight, CC $_Q$ and hip circumference (HC) $_Q$ (adjusted $r^2 = 0.847$ and RMSE = 2.852); for girls it was zBMI, WHR $_Q$, height, age, HC $_Q$ and CC $_Q$ (adjusted $r^2 = 0.872$ and RMSE = 2.171).

Conclusion

%BF can be graded and predicted with relative accuracy from anthropometric measurements excluding skinfold thickness. Fitness and cross-validation results showed that our multivariable regression model performed better in this population than did some previously published models.

Keywords: Anthropometry, body fat grade models, prediction equations, children.

Introduction

Childhood obesity is a worldwide epidemic and World Health Organization European Region studies indicate Portugal as the country with the highest rate of overweight among 7 to 9-year-old children (1).

There is evidence supporting improved outcomes for interventions aiming at early detection and correction of

overweight (2,3). Frequently, Body Mass Index (BMI) [weight (kg) / height (m)²] is used as a screening tool of obesity. However, as all methods based on weight and height, the major limitation is its inability to distinguish weight status from adiposity (4,5).

Ideally, the definition of childhood obesity should accurately reflect body fat and have cut-off points to predict adverse health effects (6,7). Because children are constantly growing, this task becomes more difficult than in adults and any measure of excess weight need to be adjusted to age (6,7).

This manuscript has been revised by BioMed Proofreading.

© 2016 The Authors.

Obesity Science & Practice published by John Wiley & Sons Ltd, World Obesity and The Obesity Society. Obesity Science & Practice 1
This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

Accurate methods to assess adiposity [e.g. densitometry, dual-energy x-ray absorptiometry (DXA), computed tomography] are not suitable for use as a screening tool (8). As an alternative, anthropometric measurements, such as BMI, waist circumference (WC), hip circumference (HC), mid-upper arm circumference (MUAC), calf circumference (CC) and subcutaneous skinfold thickness [triceps (TSF) and subscapular (SSF)] can be performed easily, quickly, inexpensively, reliably and can be used in epidemiologic studies (8). However, there is no general consensus on the reliance, use and application of single anthropometric indices as identifiers of adiposity in children (6). Therefore, specific predictive equations of %BF from several anthropometric measurements have been developed in children (9–13). However Goran *et al.* (10) failed in validating Slaughter equation, reason why they derived a new one. Dezenberg *et al.* (11) also found that both Goran (10) and Slaughter (13) equations did not accurately predict fat mass in a heterogeneous group of children. Furthermore, these cross-validated equations are skinfold dependent, which has many disadvantages such as not being recommended for children of the same age and sex with BMI >95th percentile (14,15).

Therefore, the present study's main objective is to develop new, sex-specific, %BF predictive models derived from simple anthropometric measurements excluding skinfold thickness. Prior to the determination of %BF, all children were also assessed for overweight (as defined by BMI) (16,17) and overfatness (as defined by bioimpedance estimates of body fatness) (18) with specifically developed %BF grade prediction models. Using %BF cut-offs, children were categorized into four grades ('underfat', 'normal', 'overfat' and 'obese') (18) or only into two grades ('overfat/obese' and 'others' or only 'obese' and 'others'). Such models were built for obesity screening purposes using simple anthropometric measurements. Finally, the predictive model was cross-validated and compared with previously published models.

Methods

Study design and participants

The descriptive and the multivariable regression analysis here reported are part of a Project titled 'Nutritional, Biochemical and Genetic Study of an Overweight and Obese Children Population in the Southern Region', approved by the Directorate General of Health, the Ministry of Science and Education and also by the Ethics Committee of the Hospital Garcia de Orta, according to Helsinki Declaration. The project was carried out from

January of 2009 to June 2013 in a population of pre-pubertal children (based on Tanner stage) recruited from 87 public schools of Lisbon and Tagus Valley urban region and included anthropometric, BIA, biochemical and genetic analysis.

To be included in the study, the children should have completed 9 years of age during the ongoing school year, with the exact chronologic ages calculated in days, as the date of examination minus birth date. This assumption reduced the initial population of 5,989 to 5,577 children. The age criteria was applied because it is a late enough age for obesity rebound and because, at this age, there is less possibility of spontaneous regularization of corpulence (19).

Children transferred to another school, missing the minimal required measurements or whose parents abandoned participation were also excluded, leaving 5,514 children. All children's parents were required to give informed consent to participate in the study. Because of lack of consent for some of the procedures, especially venous blood draws (out of the scope of this specific study), the number of children enrolled was reduced to 3,084 (Figure 1).

Anthropometric and bioelectrical impedance analysis

Clinical procedures were carried out at school under the guidance of two pediatric specialists, which had previously been assessed for the equivalence of their measuring performance. All anthropometric measurements were taken with participants dressed in lightweight clothing and without shoes.

Height was measured to the nearest 0.1 cm at the end of a deep inspiration (20) (stadiometer – Seca 217, Hamburg, Deutschland). Weight was measured to the nearest 0.1 kg (digital calibrated scale – Seca 899). zBMI was determined using the least mean squares method (21) and was used to categorize subjects as 'thin' (grades 1, 2 and 3), 'normal weight', 'overweight' or 'obese' according to World Obesity/Policy and Prevention (International Obesity Task Force – IOTF) cut-offs (16,17).

The following circumference measurements, also taken, to the nearest 0.1 cm, with the tape snug but not compressing the skin, were made using a flexible and inextensible tape (Seca 203)

MUAC was measured on the upper left arm, flexed at 90°, at the midpoint between the acromion and the olecranon (20). CC was measured at the point of the widest diameter of the calf (20). Both measurements were taken while participants were sitting. WC and HC were measured in the standing position, with the first at umbilicus level (22) at the end of normal expiration and

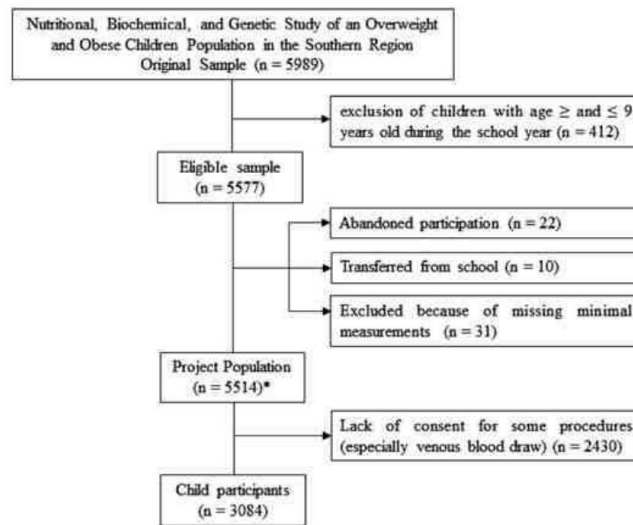


Figure 1 Flowchart of child participation in the study. *Project population sample was used to characterize the nutritional status of the population.

the second at the widest part of the hip at the level of the great trochanter (20). Waist–hip ratio (WHR) was defined as WC/HC. WHtR was defined as WC/height.

Skinfold thickness was measured with a Harpenden Skinfold Caliper (West Sussex, UK) at two sites (TSF and SSF), was read twice and the mean value was recorded. Whenever the two values differed greatly, a third measurement was made. Measurements were recorded by one observer for the left side of the body (20) to the precision of ± 0.5 mm. For the measurement of TSF, the midpoint of the back of the upper arm between the tips of the olecranon and the acromion processes was determined with the arm flexed at 90° (20). The SSF was measured at immediately below the inferior angle of the scapula (20). Centrality index was defined as SSF/TSF.

Tetrapolar whole-body BIA (measured with Omron BF 511 – 500 mÅ, 50 KHz, Kyoto, Japan) was used to evaluate %BF, percentage of skeletal muscle (%SM) and resting metabolic rate (RMR), all of which have been validated previously in children against Magnetic Resonance Imaging findings (23). Children were measured 2 h or more after breakfast according to the manufacturer instructions. For the assessment of adiposity, based on bioimpedance, four grades ('underfat', 'normal', 'overfat' and 'obese') were defined using McCarthy body fat reference curves for children and adolescents (18).

Statistical analysis

Descriptive statistic, group comparison tests, modeling and associated plots were performed using SPSS 23.0 (IBM corp., Armonk, NY, US). Missing data were ignored and outliers were included in the statistics.

Because parametric assumptions were not met across all groups, Spearman correlations evaluated the relationship between the anthropometric measures and both BMI z-score and %BF, and Kruskal–Wallis ANOVA, Mann–Whitney ranks and Mood's median tests were used for group comparisons. A Mann–Whitney multi-comparison test was applied in groups with a case size above 20. For smaller groups, differences were evaluated through Hedge's *g* effect size.

Next, and for cross-validation purposes, the sample was split, for each model, into two different sets with % BF stratification: 70% of the sample was randomly selected from %BF strata and allocated to a model-training sample set, while the remaining 30% was allocated to a validation sample set. Anthropometric features, measured %BF and other characteristics of each set were compared through Mann–Whitney test to check for homogeneity between the two groups. Models for %BF grade classification and for %BF value prediction were built and evaluated.

Percentage BF grade predictors were developed using the measured anthropometric variable's training data

through multinomial/binomial logistic regression and neural network (NN) analysis and the outcomes were further evaluated through Bayesian analysis. The global working sample size was dependent on the selected variables and is reported in Table 2 for each obesity grade predictor. Finally, to build a %BF predictive model the best candidate parameter was pre-selected through a stepwise forward, based on the Akaike information criterion across 1,000 bootstrap regression models. This bagging procedure required no missing values for all the candidate variables reducing the available sample to 2,201 children. This sample was split in two different sets: 70% were randomly assigned from %BF strata to a model-training set, while the remaining 30% were allocated to a cross-validation set. To build a linear regression, a model training set was used, choosing the final model parameters through stepwise forward. Model fitness was evaluated through root mean square error (RMSE) and adjusted r^2 . Root mean square prediction error (RMSPE) and the measured versus predicted adjusted r^2 were used as cross-validation performance indexes to validate each model development step.

Furthermore, our %BF measurements were compared with %BF values calculated from previously published %BF prediction equations. Most of these equations required skinfold thickness data, reducing the working sample to 603 children. Cross-validation indexes such as the mean predicted %BF, the measured versus predicted adjusted r^2 as well as the RMSPE were calculated. Significant differences between the predicted and measured %BF were screened by the paired Student's t test. Statistical significance was considered when $p < 0.05$. The equations that were used in the comparison were Slaughter *et al.* (13), Goran *et al.* (10), Dezenberg *et al.* (11) and Marrodán *et al.* (24), because their parameters are included in those used in this study.

Results

A population sample of 5,514 schoolchildren (2,772 boys and 2,742 girls) with mean age 9.75 ± 0.57 years was characterized anthropometrically. Results showed that according to IOTF definition, 6.2% were 'underweight' (thinness grades 1, 2 or 3), 66.1% were 'normal weight', 27.6% were 'overweight' including 6.9% 'obese' (Table S1).

Mean values of anthropometric characteristics, with the exception of BMI, zBMI, WHR and %SM, were significantly higher in girls than in boys (Mann-Whitney, $p < 0.05$) (Tables 1 and S1).

The ethnic composition of the sample subjects was 87.4% Caucasian, 11.3% Afro-Portuguese and 1.3% other ethnicities. Differences between ethnicities were

found in WC, HC, WHR, %BF and %SM (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$), with Afro-Portuguese children having lower values, but being higher than Caucasian children (Mann-Whitney, $p < 0.05$) (Table 1).

Like zBMI, %BF was also categorized by adiposity grades. Differences were noticed for height (between 'underfat', 'normal' and 'overfat' and also between 'overfat' and 'obese' groups), WHR and SSF (both between 'underfat' and 'normal' groups) (Table S2). Figure 2 illustrates how sample size was dependent on the selected variables.

There were different strengths in the association between %BF and the measured anthropometric variables. Results indicates that all parameters, except WHR ($r = 0.307$) and %SM ($r = 0.462$), showed a strong correlation with %BF. Nevertheless, zBMI ($r = 0.935$), BMI ($r = 0.902$) and WHtR ($r = 0.838$) presented the highest values (Table S3). Scatter plots between %BF and anthropometric parameters (Figure S1) were constructed to further explore these relationships. Because most scatter plots demonstrate a slight upward curve, just like the one present in the association between %BF and zBMI (Figure 3), four non-linear models (quadratic, cubic, logarithmic and exponential) were compared. The linear, quadratic and cubic presented the highest squared correlation values (Table S4). Because no meaningful difference was found and for simplicity, quadratic models were selected.

For the creation of screening models, all anthropometric measurements (including quadratic functions of the parameters) as well as age and sex were taken into account. However, only the variables that contributed most to the classification model, and the associated cross-validation performance results, are presented in Table 2. Results indicate that the NN model failed to classify children who were in the 'underfat' grade (18.8% correctly predicted) and, in less extension, those in the 'overfat' grade (56.7% correctly predicted). In contrast to the previous model, the multinomial logistic model (MLM) approach showed a higher accuracy in classifying 'underfat' grade children. The global cross-validation results of the two models show that both are very strong obesity grade predictors: 91.3% for NN versus 91.4% for MLM. Individual analyses of each group demonstrate that NN is a better classification predictor for 'normal' and 'obese' grades. Most significant differences are found in the 'underfat' and 'overfat' grade groups (18.8% and 56.7% for NN, 43.1% and 58.7% for MLM, respectively).

For the creation of only two grades screening models ('overfat/obese' or exclusively 'obese' child grades), a binomial logistic regression was built. The results indicate that when BMI z-score, WHtR, WC, weight, height and sex parameters were used, 95.1% of children belonging

Table 1 Descriptive characteristics (by sex and ethnicity) of the study sample

Characteristic	Sex			Ethnicity			
	Male		Female	Caucasian		Afro-Portuguese	Others
	n	Mean ± SD	n	Mean ± SD	n	Mean ± SD	n
Age ^a	1,487	9.78 ± 0.58*	1,597	9.73 ± 0.56*	2,560	9.71 ± 0.57 _a	37
Weight (kg)	1,487	35.26 ± 8.45**	1,597	35.57 ± 8.35**	2,560	35.31 ± 8.47 _a	37
Height (cm)	1,487	138.3 ± 6.99*	1,597	138.2 ± 7.33*	2,560	137.9 ± 7.12 _a	37
BMI (kg/m ²)	1,487	18.44 ± 3.18**	1,597	18.24 ± 3.19**	2,560	18.37 ± 3.21 _a	37
BMI z-score	1,487	0.60 ± 1.08**	1,597	0.66 ± 1.06**	2,560	0.64 ± 1.07 _a	37
WC (cm)	1,368	64.75 ± 8.84**	1,444	65.68 ± 9.25**	2,382	65.33 ± 9.15 _a	34
HC (cm)	1,078	71.03 ± 7.81**	1,158	72.53 ± 8.00**	1,955	71.8 ± 7.89 _a	27
WHR (WC/HC)	1,078	0.90 ± 0.05**	1,158	0.89 ± 0.06**	1,955	0.90 ± 0.06 _a	27
WHR (WC/height)	1,368	0.47 ± 0.05**	1,444	0.48 ± 0.06**	2,385	0.47 ± 0.07 _a	34
MUAC (cm)	1,368	20.94 ± 2.94**	1,444	21.32 ± 2.74**	2,385	21.2 ± 2.85 _a	34
CC (cm)	1,368	29.08 ± 3.25*	1,444	29.09 ± 3.27*	2,385	29.1 ± 3.29 _a	34
TSF (mm)	284	12.65 ± 6.47**	319	13.99 ± 5.51**	522	13.53 ± 5.95 _a	14
SSF (mm)	284	9.53 ± 6.68**	319	11.13 ± 6.70**	522	10.42 ± 6.75 _a	14
BF (%)	1,368	21.22 ± 7.34**	1,457	22.34 ± 7.88**	2,380	22.03 ± 7.62 _a	35
SM (%)	1,368	32.56 ± 2.79**	1,457	31.41 ± 2.52**	2,380	31.84 ± 2.71 _a	35
RMR (Kcal/day)	1,368	1,237 ± 120.96**	1,457	1,185 ± 95.42**	2,380	1,209 ± 112.85 _a	35

^aAge in days were converted in years for a better comparison between groups.

^{*}Distribution (mean ranks) and medians are the same between groups – Mann-Whitney ($p > 0.05$) and Mood's median test ($p > 0.05$).

^{**}Distributions are different between groups – Mann-Whitney ($p < 0.05$) and mean test ($p < 0.05$). Distribution (mean ranks) are different between groups with different letters: a, b [Mann-Whitney ($p < 0.05$)]. The test of significance adjustments was made using Dunn-Bonferroni correction. BF (body fat), BMI (body mass index), CC (calf circumference), HC (hip circumference), MUAC (mid upper arm circumference), RMR (resting metabolic rate), SM (skeletal muscle), SSF (subscapular skinfold thickness), TSF (triceps skinfold thickness), WC (waist circumference), WHR (waist-hip ratio) and WHR (waist circumference-to-height-ratio).

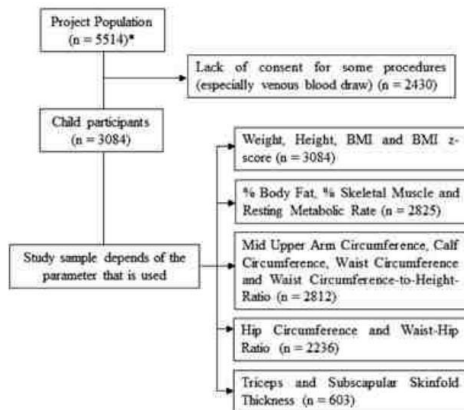


Figure 2 Flowchart of child participation in the study according to the anthropometric and BIA parameters that were selected. *Project population sample was used to characterize the nutritional status of the population.

to the 'overfat/obese' grade were correctly classified. This model presented a posterior probability of correct positive and negative test results of 87% (95% confidence interval [CI]: 83%–91%) and 96% (95% CI: 96%–97%), respectively. On the other hand, to accurately classify 97.9% of the children as belonging to the 'obese' grade, only the BMI z-score, WC, WHR, weight and height parameters were required (Table 2). These latter screening model results showed that 82% (95% CI: 73%–88%) of the children with a positive result were effectively into the 'obese' grade and 99% (95% CI: 98%–99%) that presented a negative result were not.

Finally, a %BF predictive model was developed and validated using simple anthropometric variables. In the

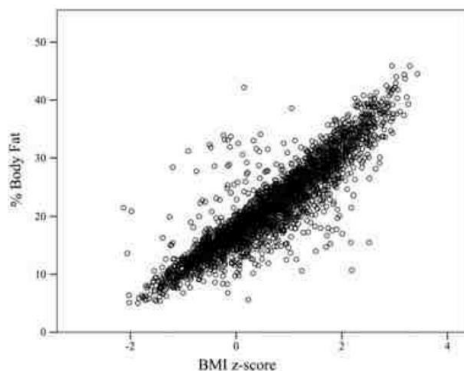


Figure 3 Scatter plots between %BF and BMI z-score.

resulted set of bootstrap models zBMI, WHtR and WHtR_Q (importance: 0.114, 0.0842 and 0.0807, respectively) were globally the best predictors, with SSF and TSF (importance: 0.0516 and 0.0500, respectively) presenting a relatively smaller predictive power (Table S5). The %BF predictive models for both sexes and the stepwise cross-validation of the %BF predictive equations are shown in Table 3. The training and validation subsamples did not differ significantly in %BF and anthropometric measurements (Kruskal–Wallis, $p > 0.05$ for every parameter; data not shown).

The results indicate that, for boys, BMI z-score, height, squared WHtR, age, weight, squared CC and squared HC are the variables that most contributed to the adjusted r^2 positive alterations (Table 3). The final step predictive equation is, therefore: $22.589 + (3.776 \times \text{BMI z-score}) - (0.426 \times \text{height}) + (12.038 \times \text{waist circumference-to-height-ratio_Q}) + (0.001 \times \text{age}) + (0.482 \times \text{weight}) - (0.043 \times \text{calf circumference_Q}) + (2.229 \times \text{calf circumference}) + (0.001 \times \text{hip circumference_Q})$; adjusted $r^2 = 0.847$, RMSE = 2.852.

For girls, the preferred model includes BMI z-score, waist circumference-to-height-ratio_Q, height, age, hip_Q and calf_Q circumferences (Table 4). The final step predictive equation is: $23.628 + (6.195 \times \text{BMI z-score}) + (19.689 \times \text{waist circumference-to-height-ratio_Q}) - (0.180 \times \text{height}) + (0.004 \times \text{age}) + (0.001 \times \text{hip circumference_Q}) + (0.03 \times \text{calf circumference_Q})$; adjusted $r^2 = 0.872$, RMSE = 2.717.

The predictive parameters for the equations account for 84.7% and 87.2% of the %BF variance (adjusted r^2) in the training sample set for boys and girls, respectively. Figure 4 shows the predicted and measured %BF values for boys and girls in the validation subsample using the predictive models showed in Table 4. In addition, this table compares cross-validation results obtained with our equation, with those from previously published predictive equations (10,11,13,24). In contrast to our equation, most of these previous equations have in common the use of skinfold thickness and none of their predictions fitted very well our data, with RMSE/RMSPE below 3%. Only ours and Slaughter's equation (13) presented estimated mean values not significantly different from the measured %BF mean. However, our equation shows a better identity fit (adjusted $r^2 = 0.947$) with smaller prediction errors (RMSE = 1.989 and RMSPE = 2.915) than all tested previous published equations.

Discussion

Our study demonstrates that, based on a relatively large sample of pre-pubertal children, predictive models for %

Table 2 %BF obesity grade prediction models

%BF grade	Accuracy (%)*		Accuracy (%)*; Specificity (%)*; Sensitivity (%)*	
	Neural networks (n = 2,202)	Multinomial logistic regression (n = 2,759)	Binomial logistic regression (overfat/obese) (n = 2,216)	Binomial logistic regression (obese) (n = 2,216)
Underfat	18.8	43.1	—	—
Normal	98.0	97.7	—	—
Overfat	56.7	58.7	95.1; 98.0; 78.6	—
Obese	74.2	73.2	—	97.9; 99.2; 71.0
Global	91.3	91.4	—	—
Selected variable	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9	1, 3, 6, 7, 10, 11	1, 2, 3, 6, 8, 12	1, 2, 3, 6, 8

Selected variables: (1) weight, (2) height (cm), (3) BMI z-score, (4) hip circumference (cm), (5) calf circumference (cm), (6) waist circumference-to-height-ratio, (7) age (in days), (8) waist circumference (cm), (9) mid upper arm circumference (cm), (10) squared BMI z-score and (11) squared waist circumference-to-height-ratio, 12 (sex).

*Shown results are related to the performance of each model in the validation sample set. BMI (body mass index).

Table 3 Stepwise cross-validation of %BF predictive equation from anthropometric measurements with measured versus predicted data

Stepwise model predictors	Training set		Validation set	
	Adjusted r^2	RMSE (%)	Adjusted r^2	RMSPE (%)
Boys (n = 759 in the training set and 301 in validation subsample)				
BMI z-score	0.807	3.209	0.762	3.612
BMI z-score, height	0.828	3.033	0.806	3.248
BMI z-score, height, waist circumference-to-height-ratio_Q	0.837	2.947	0.817	3.162
BMI z-score, height, waist circumference-to-height-ratio_Q, age	0.840	2.918	0.821	3.134
BMI z-score, height, waist circumference-to-height-ratio_Q, age, weight	0.842	2.907	0.823	3.120
BMI z-score, height, waist circumference-to-height-ratio_Q, age, weight, calf circumference_Q	0.844	2.886	0.823	3.121
BMI z-score, height, waist circumference-to-height-ratio_Q, age, weight, calf_Q and calf circumferences	0.846	2.870	0.823	3.117
BMI z-score, height, waist circumference-to-height-ratio_Q, age, weight, calf_Q, calf and hip_Q circumferences	0.847	2.852	0.823	3.110
Girls (n = 778 in the training set and 363 in validation subsample)				
BMI z-score	0.831	3.117	0.832	3.226
BMI z-score, waist circumference-to-height-ratio_Q	0.852	2.915	0.856	2.996
BMI z-score, waist circumference-to-height-ratio_Q, height	0.860	2.832	0.861	2.929
BMI z-score, waist circumference-to-height-ratio_Q, height, age	0.869	2.747	0.865	2.902
BMI z-score, waist circumference-to-height-ratio_Q, height, age, hip circumference_Q	0.870	2.731	0.868	2.868
BMI z-score, waist circumference-to-height-ratio_Q, height, age, Hip_Q and calf_Q circumferences	0.872	2.717	0.869	2.867

r (correlation coefficient), RMSE (root mean square error), RMSPE (root mean square prediction error), _Q (squared variable). Candidate predictors included age (in days), BMI z-score [body mass index (kg/m²)], height (in cm), calf and hip waist circumferences (in cm), waist circumference-to-height-ratio and weight (in kg).

BF can be developed from anthropometric measurements excluding skinfold thickness.

The data shows that both zBMI (r=0.935) and BMI (r=0.902) have the strongest correlation with %BF, which

Table 4 Comparison of current study model and previously published equations performances to predict %BF

(n = 603)	Predicted %BF	Adjusted r^2	RMSE (%)	RMSPE (%)
Current model [§]	21.588 ± 7.326	0.947	1.765	2.915
Goran <i>et al.</i> (10)	20.430 ± 5.219 [‡]	0.675	4.358	5.427
Dezenberg <i>et al.</i> (11)	25.559 ± 5.865 [‡]	0.592	4.875	6.673
Slaughter <i>et al.</i> (13)	21.027 ± 8.680	0.704	4.156	5.406
Marrodán <i>et al.</i> (24)	24.235 ± 6.098 [‡]	0.634	4.625	5.744

[§]This predicted versus measured regression was built using the same sample (n = 603) that was used for the previously published equations cross-validation. r (measured versus estimated %BF identity regression Spearman coefficient correlation), RMSE (root mean square error), RMSPE (root mean square prediction error), SD (standard deviation), [‡]significantly different from measured %BF mean (21.370 ± 7.642).

is consistent with Pecoraro *et al.* (25) ($r=0.92$ for BMI); however, Boeke *et al.* (26) ($r=0.81$ for BMI and zBMI) and Gutin *et al.* ($r=0.82$ for BMI) (27) presented lower correlation results. This may be because of the fact that these authors have studied small sample sizes or because they used bipolar impedance (28).

Recent studies have also tried to determine which measure – WC, HC, WHC or WHtR – is better suited for the diagnosis of overfatness; however, until now, there has been no general agreement (14,29–31). The study here reported shows that all these variables, with the exception of WHtR, are strongly correlated with %BF, with WHtR presenting the highest correlation. Watts *et al.* (15) found strong correlations between DEXA total body fat and BMI ($r=0.86$), WC ($r=0.81$) and HC ($r=0.88$). Bigorna *et al.* (32) showed that BMI and WC had a high correlation and similar accuracies as predictors of adiposity. However, Aeberli *et al.* showed that WC performed slightly better than BMI in predicting %BF (29). On the

contrary, to Brambilla *et al.* (30), WHtR is a better predictor of adiposity than WC or BMI.

One of the main results of our study, to the best of our knowledge, is the first validated body fat grade predictor model that can be used as a screening tool for obesity.

Both, NNs and multinomial logistic regression models, were shown to be very strong obesity grade predictors (global accuracy ≥ 91.3%). However, the later model showed 2.29 times more sensitivity in classifying children in the ‘underfat’ grade (presenting similar accuracy in the other grade categories) and has the advantage of only requiring weight, height, WC and age. In contrast, NNs require the same parameters, plus CC, HC and MUAC.

Binomial logistic regression indices have also demonstrated a very good global accuracy, with a high specificity and sensitivity. To classify children into the ‘overfat/obese’ grade, or exclusively into the ‘obese’ grade, only three direct measurements are needed: weight, height and WC. The obese screening model also requires sex as a parameter.

Another major contribution of this work is the development of a cross-validated %BF predictive equation that, to the best of our knowledge, is the first developed in children that includes zBMI and CC as predictors and excludes the use of skinfold thickness. There are advantages in this exclusion because skinfold thickness has several problems: (i) it has higher errors at higher levels of adiposity (14,15); (ii) it lacks high-quality calibrated calipers (15); (iii) it requires highly trained anthropometrists (15); and (iiii) as demonstrated by our study, it has relatively small %BF predictive power. Furthermore, the results of this study suggest the need of sex-specific equations only requiring, for both sexes, small and simple anthropometric measurements (height, weight, WC, HC and CC), as well as age (in days).

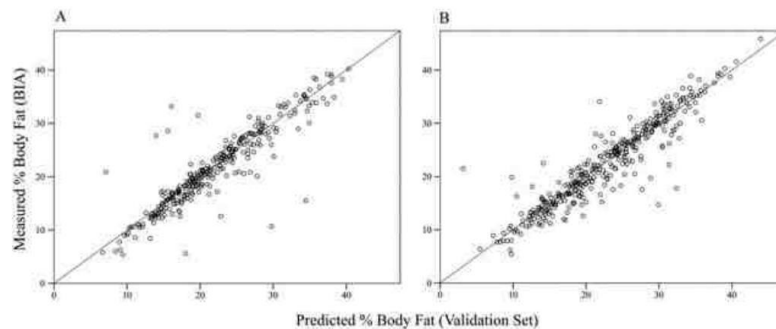


Figure 4 Scatter plot between %BF measured by BIA and validation set predicted %BF [A, male model (cross-validation n = 301); B, female model (cross-validation n = 363)]. Dotted line shows the identity regression (Y = X).

© 2016 The Authors.

Obesity Science & Practice published by John Wiley & Sons Ltd, World Obesity and The Obesity Society. Obesity Science & Practice

The equations developed by Slaughter *et al.* (13), Goran *et al.* (10), Dezenberg *et al.* (11) and Marrodán *et al.* (24) were also applied in the present study. This last equation was selected because of being exclusively based on WHtR. However, the predictor's choice was based on previous studies' findings, which have no general consensus between authors, and was not cross-validated.

The results of this study also show that ours and Slaughter's equations (13) have both a significant agreement between predicted and measured %BF. The remaining equations underestimate or overestimate %BF (Table 4). Furthermore, our equation presented a higher fitness than Slaughter's, as demonstrated by the better respective adjusted r^2 , RMSE and RMSPE, when applied to the cross-validation sample subset.

Several other studies have also explored the validation of these equations in their own populations. Hussain *et al.* (33) in 99 Pakistani children (9–19 years old) concluded that Slaughter's equation (13) presented a reasonable correlation with DXA measured %BF, while Goran's (10) and Dezenberg's (11) equations underestimate and overestimate, respectively, %BF. L'Abbée *et al.* (34) also reported an overestimation of %BF in a sample of 30 Dutch children (6–7 years old) by the Dezenberg equation (11) compared to the isotope dilution technique. However, for Nasredinne *et al.* (12), these three predictive equations underestimated %BF in pre-pubertal Lebanese children. Huang *et al.* (35) also indicated that the Dezenberg predictive equation (11) is not appropriate in predicting total body fat in Latin children.

Differences in lifestyles, cultural background and environmental living conditions between populations may be the reason for the above described poor fitness of prior developed models to different populations. Although our models were cross-validated (which is not the case in the others), for the same reasons, it may also result in its sub-optimal generalization. Therefore, they will also need to be validated in other populations before extrapolations are warranted.

In conclusion, %BF can be graded and predicted with reasonable accuracy, in children with characteristics similar to the ones from our sample, from anthropometric measurements even excluding skinfold thickness. Fitness and cross-validation results showed that our multivariable regression models performed better in this population than did previously published models.

Acknowledgements

The authors thank the children, parents and teachers at the participating schools, Susana Adam for skinfold thickness measurements, João Vintém and Solange Campos

for managing the program and Júlio Guilherme and Hélder Carrilho for their computer work.

Funded by the Directorate General of Health – Ministry of Health and, in part, by Egas Moniz Higher Education Cooperative (Martins dos Santos). An informatics platform was funded by Rui Nabeiro (Nabeiro Group).

Disclosure

The authors declared no conflict of interest.

Author contributions

SA, JMF and FF designed the study; SA, FPF, MEF and LRS conducted anthropometric and BIA measurements; PM performed statistical analysis; SA and JMF wrote the manuscript under the guidance of FPF; JCF, MM and MV critical reviewed the preliminary draft of this manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

References

1. Franca F, Nikogosian H, Lobstein T. The challenge of obesity in the WHO European region and the strategies for response. *WHO Regional Office of Europe* 2007; **1–76**.
2. Juonala M, Magnussen CG, Berenson GS, et al. Childhood adiposity, adult adiposity, and cardiovascular risk factors. *N Engl J Med* 2011; **365**: 1876–1885.
3. Skinner AC, Perrin EM, Moss LA, Skelton JA. Cardiometabolic risks and severity of obesity in children and young adults. *N Engl J Med* 2015; **373**: 1307–1317.
4. Eto C, Komiya S, Nakao T, Kikkawa K. Validity of the body mass index and fat mass index as an indicator of obesity in children aged 3–5 year. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci* 2004; **23**: 25–30.
5. Gómes-Ambrosi J, Silva C, Galofré JC, et al. Body mass index classification misses subjects with increased cardiometabolic risk factors related to elevated adiposity. *Int J Obes* 2012; **36**: 286–294.
6. De Onis M. The use of anthropometry in the prevention of childhood overweight and obesity. *Int J Obes* 2004; **28**(Suppl3): S81–S85.
7. Must A, Anderson SE. Body mass index in children and adolescents: considerations for population-based applications. *Int J Obes (Lond)* 2006; **30**: 590–594.
8. Goran MI. Measurement issues related to studies of childhood obesity: assessment of body composition, body fat distribution, physical activity, and food intake. *Pediatrics* 1998; **101**(3 Pt 2): 505–518.
9. Bray GA, DeLany JP, Harsha DW, Volaufova J, Champagne CC. Evaluation of body fat in fatter and leaner 10-y-old African American and white children: the Baton Rouge children's study. *Am J Clin Nutr* 2001; **73**: 687–702.
10. Goran MI, Driscoll P, Johnson R, Nagy TR, Hunter G. Cross-calibration of body-composition techniques against dual-energy X-ray absorptiometry in young children. *Am J Clin Nutr* 1996; **63**: 299–305.
11. Dezenberg CV, Nagy TR, Gower BA, Johnson R, Goran MI. Predicting body composition from anthropometry in pre-adolescent children. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; **23**: 253–259.

12. Nasredinne L, Naja F, Hills AP, Youssef SK, Chahine J, Hwalla N. Validity of predictive equations developed to estimate body fat from anthropometry and bioelectrical impedance analysis in 8–10 year-old children. *Clin Nutr* 2012; **31**: 364–371.
13. Slaughter MH, Lohman TG, Boileau RA, et al. Skinfold equations for estimation of body fatness in children and youth. *Hum Biol an Int Rec Res* 1988; **60**: 709–723.
14. Mei Z, Grummer-Strawn LM, Wang J, Thornton JC, Freedman DS, Pierson RN Jr, Dietz WH, Horlick M. (n.d) Do skinfold measurements provide additional information to body mass index in the assessment of body fatness among children and adolescents? *Pediatrics* 2007; **119**: e1306–e1313
15. Watts K, Naylor LH, Davis EA, et al. Do skinfolds accurately assess changes in body fat in obese children and adolescents? *Med Sci Sports Exerc* 2006; **38**: 439–444.
16. Cole TJ, Flegal KM, Nicholls D, Jackson A. Body mass index cut offs to define thinness in children and adolescents: international survey. *BMJ* 2007; **335**: 166–167.
17. Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: International Survey. *BMJ* 2000; **320**: 1240.
18. McCarthy HD, Cole TJ, Fry T, Jebb SA, Prentice AM. Body fat reference curves for children. *Int J Obes (Lond)* 2006; **30**: 598–602.
19. Abraham S, Collins G, Nordsieck M. Relationship of childhood weight status to morbidity in adults. *HSMHA Health Rep* 1971; **86**: 273–284.
20. Sampé M, Pedron G, Roy-Pernot MP. *Auxologie, Méthode et Séquences*. Theraplix, 1979.
21. Cole TJ. The LMS method for constructing normalized growth standards. *Eur J Clin Nutr* 1990; **44**: 45–60.
22. McCarthy HD, Jarrett KV, Crawley HF. The development of waist circumference percentiles in British children aged 5.0–16.9 y. *Eur J Clin Nutr* 2001; **55**: 902–907.
23. Oshima Y, Shiga T, Namba H, Kuno S. Estimation of whole-body skeletal muscle mass by bioelectrical impedance analysis in the standing position. *Obes Res Clin Pract* 2010; **4**: e1–e82.
24. Marrodán M, Alvarez JRM, de Espinosa MG-M, et al. Predicting percentage body fat through waist-to-height ratio (WtHR) in Spanish schoolchildren. *Public Health Nutr* 2014; **17**: 870–876.
25. Pecoraro P, Guida B, Caroli M, et al. Body mass index and skinfold thickness versus bioimpedance analysis: fat mass prediction in children. *Acta Diabetol* 2003; **40**(Suppl1): S278–S281.
26. Boeke CE, Oken E, Kleinman KP, Rifas-Shiman SL, Taveras EM, Gillman MW. Correlations among adiposity measures in school-aged children. *BMC Pediatr* 2013; **13**: 99.
27. Gutin B, Litaker M, Islam S, Manos T, Smith C, Trieber F. Body-composition measurement in 9–11-y-old children by dual-energy X-ray absorptiometry, skinfold thickness measurement and bioimpedance analysis. *Am J Clin Nutr* 1996; **63**: 287–92.
28. Dittmar M. Comparison of bipolar and tetrapolar impedance techniques for assessing fat mass. *Am J Hum Biol* 2004; **16**: 593–597.
29. Aeberli I, Gut-Knabenhans M, Kusche-Ammann RS, Molinari L, Zimmermann MB. A composite score combining waist circumference and body mass index more accurately predicts body fat percentage in 6- to 13-year-old children. *Eur J Nutr* 2013; **52**: 247–253.
30. Brambilla P, Bedogni G, Heo M, Pietrobelli A. Waist circumference-to-height ratio predicts adiposity better than body mass index in children and adolescents. *Int J Obes (Lond)* 2013; **37**: 943–946.
31. Cameron N, Jones LL, Griffiths PL, Norris SA, Pettifor JM. How well do waist circumference and body mass index reflect body composition in pre-pubertal children? *Eur J Clin Nutr* 2009; **63**: 1065–1070.
32. Bigornia SJ, LaValley MP, Benfield LL, Ness AR, Newby PK. Relationships between direct and indirect measures of central and total adiposity in children: what are we measuring? *Obesity* 2013; **21**: 2055–2062.
33. Hussain Z, Jafar T, Zaman MU, Parveen R, Saeed F. Correlations of skinfold thickness and validation of prediction equations using DEXA as the gold standard for estimation of body fat composition in Pakistani children. *BMJ* 2014; **4**: e004194.
34. L'Abée C, Visser GH, Liem ET, Kok DE, Sauer PJ, Stolk RP. Comparison of methods to assess body fat in non-obese six to seven-year-old children. *Clin Nutr* 2010; **29**: 317–22.
35. Huang TT-K, Watkins MP, Goran MI. Predicting total body fat from anthropometry in Latino children. *Obes Res* 2003; **11**: 1192–1199.

Supporting Information

Supplementary Table 1. Anthropometric characteristics and sex distribution of the project population (n = 5,514).

Supplementary Table 2. Physical characteristics distributed by adiposity grades.

Supplementary Table 3. Anthropometric correlations with obesity indices.

Supplementary Table 4. Anthropometric fitting models of %BF.

Supplementary Table 5. Importance of predictors for %BF.

Supplementary Figure 1. Scatter plots correlating %BF and anthropometric parameters

ANEXO 3

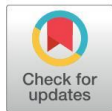
RESEARCH ARTICLE

Anthropometric features as predictors of atherogenic dyslipidemia and cardiovascular risk in a large population of school-aged children

José M. Furtado^{1,2*}, Sílvia M. Almeida^{1,2}, Paulo Mascarenhas^{1,2}, Maria E. Ferraz¹, José C. Ferreira^{1,3}, Manuel Vilanova^{4,5}, Mariana P. Monteiro⁶, Fernando P. Ferraz^{1,2}

1 Centro de Genética Médica e Nutrição Pediátrica Egas Moniz, Campus Universitário, Monte da Caparica, Portugal, **2** Instituto Universitário Egas Moniz, Campus Universitário, Monte da Caparica, Portugal, **3** Department of Obstetrics and Gynecology of University of Medicine of Warsaw, Warsaw, Poland, **4** Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, and IBMC—Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto, Porto, Portugal, **5** Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, Portugal, **6** Clinical and Experimental Endocrinology Group, Unit for Multidisciplinary Research in Biomedicine UMIB, ICBAS, University of Porto, Porto, Portugal

* cgmnp@egasmoniz.edu.pt



OPEN ACCESS

Citation: Furtado JM, Almeida SM, Mascarenhas P, Ferraz ME, Ferreira JC, Vilanova M, et al. (2018)

Anthropometric features as predictors of atherogenic dyslipidemia and cardiovascular risk in a large population of school-aged children. *PLoS ONE* 13(6): e0197922. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197922>

Editor: Antonio Palazón-Bru, Universidad Miguel Hernandez de Elche, SPAIN

Received: July 7, 2017

Accepted: May 10, 2018

Published: June 1, 2018

Copyright: © 2018 Furtado et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was funded by the Directorate General of Health - Ministry of Health and, in part, by Egas Moniz Higher Education Cooperative, grant number 27-2008 (Martins dos Santos). An informatics platform was funded by Rui Nabeiro (Nabeiro Group). There was no additional external funding received for this study.

Abstract

Background

Autopsy studies reveal that atherosclerosis lesions can be found as early as two years of age. To slow the development of this early pathology, obesity and dyslipidemia prevention should start from childhood making it urgent to explore new ways to evaluate dyslipidemia risk in children that can be applied widely, such as the non-invasive anthropometric evaluation.

Objective

Assess the metabolic profile of a pediatric population at a specific age to describe the association between anthropometric and biochemical cardiovascular disease risk factors; and evaluate selected anthropometric variables as potential predictors for dyslipidemic cardiovascular risk.

Design and methods

Anthropometric features, bioimpedance parameters and fasting clinical profile were assessed in Lisbon and the Tagus Valley region pre-pubertal nine-year-old children (n = 1.496) from 2009–2013 in a descriptive, cross-sectional study. Anthropometric variables predictive power was evaluated through regression analysis.

Results

At least one abnormal lipid parameter was found in 65% of “normal weight”, 73% of “overweight” and 81% of “obese” children according to the International Obesity Task Force

Competing interests: The authors declared no conflicts of interest.

(IOTF) standards. Dyslipidemia was present in 67.8% of children. Waist-hip ratio (WHR) explained 0.4% of total cholesterol (TC) variance. Waist circumference (WC) explained 2.8% of apolipoprotein (APO) A1 variance. Waist-circumference-to-height-ratio (WHtR) explained 2.7%, 2.8% and 1.9% of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c), APO B, and N_HDL-c variance, respectively. Children with abnormally high WHR levels had an increase in risk of 4.49, 3.40 and 5.30 times, respectively, for developing cardiovascular disease risk factors measured as high-risk levels of TC, LDL-c and non-HDL-c (N_HDL-c) ($p < 0.05$). Only 29.9% of "normal weight" children had no anthropometric, bioimpedance or biochemical parameters associated with CV risk.

Conclusion

A large proportion of school age children have at least one lipid profile abnormality. BMI, zBMI, calf circumference (CC), hip circumference (HC), WC, and WHR are directly associated with dyslipidemia, whereas HC and calf circumference (CC) adjusted to WC, and mid-upper arm circumference (MUAC), are all inversely associated with dyslipidemia. Selected anthropometric variables are likely to help predict increased odds of having CV risk factors.

Introduction

Cardiovascular disease (CVD) is the major cause of morbidity and death in Western Societies [1]. CVD-related symptoms usually appear in the fourth decade of life; however, pathophysiologic process of atherosclerosis begins much earlier and is related to dyslipidemia [2]. Autopsy studies reveal that atherosclerosis lesions of fatty streak and fibrous plaques can be found as early as two years of age, and that plaque thickness is directly related to age, body mass index (BMI), total cholesterol (TC), triglycerides (TG), and low-density lipoprotein (LDL-c) levels and is inversely proportional to high-density lipoprotein (HDL-c) concentrations [3]. Because oxidative stress is increased in subclinical atherosclerosis, novel biomarkers, such as oxidized low-density lipoproteins (oxLDL), are also directly related to atherosclerosis and considered better predictors of acute coronary artery disease than standard lipid parameters or other conventional risk factors [4,5]. In adults, circulating oxLDL was shown to be associated with obesity [6], insulin resistance [7], type 2 diabetes mellitus [8], metabolic syndrome [9], and CVD [10]; whereas in children and adolescents it was associated with obesity and insulin resistance [11–13]. Previous research emphasized the contribution of excess dietary intake of cholesterol, saturated and trans fats, and carbohydrates, to the obesity epidemic and to the rising prevalence of the metabolic/insulin resistance syndrome [14]. The growing prevalence of overweight and obesity—the proportion of overweight and obese children rose 47.1% between 1980 and 2013 [15]—is a serious public health concern worldwide since obesity is known to increase insulin resistance, facilitates the development of dyslipidemia [16,17], and is considered a key pathophysiologic process that increases the risk of premature CVD [13]. Actually, studies report that such CVD risk factors are already present in children and adolescents [18,19]. Because atherosclerosis begins in childhood, the extended latent period, between elevated risk and the actual occurrence of cardiovascular (CV) outcomes, provides a window of time to explore early processes that contribute to the development of CVD and to target intervention [12]. Therefore, to slow the development of atherosclerosis and decrease CVD-related death and morbidity in adulthood, obesity and dyslipidemia prevention should begin in childhood

and adolescence [3,20]. While assessment of dyslipidemia status is diagnosed through a lipid profile blood test, there is an urgent call for new potential methods to evaluate dyslipidemia risk in children that can be applied widely, such as the non-invasive anthropometric evaluation. Because children grow continuously, assessment of childhood obesity (adiposity) requires that the BMI be adjusted for sex and age (using grow charts). This anthropometric index, together with other anthropometric measures, may have unexplored potential for screening CVD-risk associated features. For instance, in a previous study [21], we developed a new sex-specific model that predicts percent body fat (% BF), as defined by bioimpedance, from simple anthropometric measurements. The aims of this study were: 1) to assess the metabolic profile of a pediatric population at a specific age; 2) to describe the association (positive or negative direction and magnitude) between anthropometric and biochemical cardiovascular disease risk factors in school-aged children; and 3) to evaluate selected anthropometric variables as potential predictors of a dyslipidemic cardiovascular risk, for the future development of an early prognostic model of cardiovascular disease risk including, although not exclusively, anthropometric measurements.

Methods

Study design and participants

The descriptive and cross-sectional study here reported is part of a larger project entitled "Nutritional, Biochemical and Genetic Study of an overweight and obese children population in the Southern Region". This project was approved by the Directorate General of Health, the Ministry of Science and Education of Portugal, and by the Ethics Committee of the Hospital Garcia de Orta, according to the principles of Helsinki Declaration. The project was conducted from January 2009 to June 2013 in a population of pre-pubertal children (based on Tanner stage) recruited from 87 public schools in Lisbon and the Tagus Valley metropolitan region, which included anthropometric, bioelectrical impedance, biochemical, and genetic analysis.

To be included in the study, children should have completed nine years of age during the present school year; this inclusion criterion reduced the initial population from 5.989 to 5.577 children. The exact chronologic age in days was calculated as the date of examination minus the date of birth. Children who transferred to another school, who were missing the minimum required measurements, or whose parents abandoned participation were also excluded, leaving 5.514 eligible children.

The parents of all enrolled children were required to give informed consent. Because of lack of consent for venous blood sampling of the enrolled children, the sample size for this study here declined to 3.084. Additional children were excluded if they reported to be non-fasting at the time of blood withdrawal or if their parents withdrew the consent. These exclusions produced a final analytical sample of 1.496 children. To issue the possibility of self-selection bias we compared anthropometric data between participants and non-participants. No significant differences were found (data not shown).

Anthropometric and bioelectrical impedance analysis

Clinical procedures were performed in the schools under the supervision of two pediatric consultants. All anthropometric measurements [weight, height, BMI, BMI z-score (zBMI), waist circumference (WC), hip circumference (HC), waist-hip ratio (WHR), waist-circumference-to-height-ratio (WHtR), mid-upper arm circumference (MUAC), calf circumference (CC), bioelectrical impedance (% BF), percent skeletal muscle (% SM) and resting metabolic rate (RMR)] were obtained with participants dressed in lightweight clothing and without shoes, using the methods previously described [21]. Children were categorized as "normal

weight”, “overweight,” or “obese” according to World Obesity/Policy & Prevention (International Obesity Task Force–IOTF) cut-off values [22]. The cut-off values used to assess WC [23], WHtR [24], and % BF [25] were based on those proposed by McCarthy et al. For WHR an internal cut-off value was used (data not shown).

Biochemical analysis

Participants were instructed to fast for 12 hours, and whole blood was sampled by venipuncture in the morning at school. Blood samples were refrigerated at approximately 5°C until transferred to our center, immediately processed for serum separation, serum aliquots frozen (-80°C) on the same day, and stored until further analysis.

Serum samples were assessed for biochemical parameters, including the characterization of the lipid profile by measurement of lipid fractions and lipoprotein: TC, HDL-c, LDL-c, non-HDL cholesterol (N_HDL-c) and triglycerides (TG), as well as apolipoproteins A1 (Apo A1) and B (Apo B), using turbidimetric immuno-enzymatic assays. Dyslipidemia was defined as the presence of one or more parameters of the serum lipid profile beyond the normal range. Abnormal lipid concentrations in blood were defined by established cut-offs as follows: total cholesterol >170 mg/dl, LDL-c >110 mg/dl, and N_HDL-c \geq 120 mg/dl, as defined by the American Academy of Pediatrics, [26] and HDL-c <40 mg/dl, triglycerides > 75 mg/dl, APO A1 <1.2 g/L, and APO B > 0.9 g/L, as defined by the Laboratories of the Mayo Clinic [27].

Serum samples were also tested for glucose (Glucose oxidase method), creatinine (Jaffé method), total proteins (Biuret method), and ferritin (immunoassay method); normal values were defined as follows: glucose <100 mg/dl, creatinine 0.4–1.0 mg/dl, total proteins 6–8.3 mg/dl, and ferritin 7–140 ng/ml [26].

All biochemical determinations were performed using *Horiba Medical* reagents in a *Horiba Pentra C400* auto analyzer (France), and obtained inter and intra-assay coefficients of variation were always <3%.

Insulin (kit—10-1113-01, Mercodia), leptin (kit—10-1199-01, Mercodia), and oxLDL (kit—10-1143-01, Mercodia) were measured by ELISA in a DS2 auto analyzer from *Dynex Technologies* (Magellan Biosciences, USA). The homeostasis model assessment of insulin resistance (Homa-IR), was calculated from glucose (mg/dl) and insulin (μ U/ml), using the following formula: $\text{Homa-IR} = (\text{insulin } (\mu\text{U/ml}) \times \text{glucose (mg/dl)})/405$. For these parameters internal cut-off values were used. Normal values were defined as follows: insulin < 16.3 μ U/ml, Homa-IR < 0.69, leptin < 6.32 ng/ml, and oxLDL < 1.38mU/L.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed with SPSS for Windows statistical package (SPSS Inc., Chicago, version 21). Descriptive statistics for anthropometric and biochemical/clinical parameters were calculated by IOTF categories, ethnicity groups and gender, and differences between means were t-tested with Bonferroni adjustment. The relationships between anthropometric and biochemical variables were evaluated through partial correlation coefficients, stepwise (bidirectional) multiple linear regression and stepwise backwards (Wald) logistic regression. Both regression analyses were fitted including the constant and hierarchically adjusted for age, gender, and ethnicity with selected coefficients internally validated by simple bootstrap (1000 samples) with bias corrected and accelerated 95% confidence interval. Girls were the reference attribute (value = 0) for Gender. Caucasians were the reference attribute (value = 0) for ethnicity. The stepwise linear regression used the F-statistic p-value as criterion for independent variable insertion (0.05) or removal (0.10). The dependent variables were pediatric biochemical/clinical parameters (lipid profile and oxLDL), whereas the independent

variables (covariates) were the anthropometric parameters (BMI, zBMI, WC, HC, WHR, WHtR, MUAC, and CC). The influence of selected anthropometric variables on the variance of the assumed biochemical cardiovascular risk factors was evaluated through the cumulative adjusted r^2 . Effect sizes of selected independent variables were estimated by the models standardized coefficients (Beta). Next, we used IOTF criteria for normal weight in combination with established biochemical and anthropometric pediatric cut-off points as criteria to select an “apparently healthy” subset of children from the study population, and thereafter define internal cut-off values for those variables without known pediatric cut-off values as the higher value for each in this subset. These cut-offs were used to turn the dependent and independent continuous variables into binomial ones, as each variable value was classified with the normal (0) or high value (1, risk factor) categorical attribute. Odds ratios were calculated using as dependent variables the binomial biochemical/clinical risk factor, and as independent binomial variables the anthropometric parameters. Cases with missing data were not included in the analysis. Significance was considered as p -value <0.05 for all tests.

Results

We characterized a cohort of 1,496 schoolchildren (723 boys and 773 girls) with a mean age of 9.75 years according to anthropometric, bioimpedance and biochemical parameters. According to IOTF criteria, 71.5% were “normal weight” and 28.5% were “overweight”, including 7.6% who were “obese”. Racial-ethnic composition was 87.5% Caucasian, 11.4% Afro-Portuguese, and 1.1% other ethnicities. Caucasian and Afro-Portuguese children differed in all anthropometric and bioimpedance parameters with the exception of height and % SM; Caucasians had higher values ($p < 0.05$) (S1 Table). No significant differences in biochemical levels were found between the two groups ($p > 0.05$), except for total proteins (S1 Table). For this reason, these two ethnic groups were merged in subsequent analyses. Other race-ethnic groups were not included; the sample sizes of the other groups were too small to justify a separate analysis. No differences were found between boys and girls in anthropometric and bioimpedance parameters with the exception of height, WHR, % SM and RMR ($p > 0.05$) (Table 1). In contrast, significant differences were observed between genders for glycemia, lipid profile (except for TC and LDL-c), total protein, creatinine, and leptin levels; girls had higher mean values, with the exception of glycemia, HDL-c, APO A1, and creatinine ($p < 0.05$) (Table 1).

Significant differences in all anthropometric and bioimpedance measurements were observed between children categorized to the “normal weight”, “overweight” and “obese” groups ($p < 0.05$) (S2 Table). No significant differences were observed in glucose, TC, total proteins and creatinine levels between the weight groups. However, the weight groups differed in HDL-c, TG, APO A1, TC/HDL, LDL/HDL, and leptin mean values ($p < 0.05$) (Table 2). In contrast to other biochemical parameters, HDL-c and Apo A1 were significantly lower in the “overweight” and “obese” groups. “Normal weight” and “overweight/obese” groups differed significantly in LDL-c, APO B, APO B/APO A1, N_HDL-c, ferritin, insulin, Homa-IR, and oxLDL mean values. “Normal and overweight” children had significantly lower LDL/APO B than those within the “obese” category. Differences found between boys and girls of the “normal weight” group were the same as those previously described for the overall population, whereas no differences other than in leptin levels were found when “overweight” and “obese” gender groups were compared. “Overweight” and “obese” boys also had higher levels of creatinine and APO A1, respectively.

Correlation analysis of lipid profile parameters showed that anthropometric parameters (except for WHtR and HC for LDL/HDL) were positively and moderately correlated with TG,

Table 1. Descriptive characteristics of the study population of children by gender.

Characteristic	Total (n = 1496)	Male (n = 723)	Female (n = 773)
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
Age [§]	9.74 ± 0.61	9.76a ± 0.63	9.71a ± 0.58
Anthropometry			
Weight (Kg)	35.74 ± 8.72	35.98 _a ± 8.92	35.52 _a ± 8.52
Height (cm)	138.5 ± 7.4	138.9 _b ± 7.3	138.1 _a ± 7.5
BMI (Kg/m ²)	18.44 ± 3.24	18.44 _a ± 3.29	18.44 _a ± 3.18
zBMI	0.67 ± 1.08	0.67 _a ± 1.1	0.67 _a ± 1.07
WC (cm)	65.25 ± 9.15	65.0 _a ± 9.1	65.5 _a ± 9.2
HC (cm)	71.8 ± 8	71.3 _a ± 8.1	72.3 _a ± 7.9
WHR (WC/HC)	0.89 ± 0.05	0.90 _b ± 0.05	0.89 _a ± 0.05
WHtR (WC/height)	0.472 ± 0.06	0.47 _a ± 0.06	0.48 _a ± 0.06
MUAC (cm)	21.2 ± 2.9	21.1 _a ± 3	21.3 _a ± 2.7
CC (cm)	29.2 ± 3.4	29.2 _a ± 3.4	29.1 _a ± 3.3
Bioelectrical impedance			
BF (%)	21.9 ± 7.7	21.4 _b ± 7.5	22.4 _a ± 7.9
SM (%)	31.9 ± 2.8	32.6 _b ± 2.74	31.2 _a ± 2.65
RMR (Kcal/day)	1211 ± 116	1244 _b ± 126	1181 _a ± 96
Biochemical Parameters			
Glycemia (mg/dl)	78.1 ± 12.8	79.1 _b ± 11.8	76.8 _a ± 9.7
TC (mg/dl)	170.6 ± 29.5	169.4 _a ± 29.4	171.6 _a ± 29.5
LDL-c (mg/dl)	93.8 ± 24.6	91.1 _b ± 24.3	96.2 _a ± 24.6
HDL-c (mg/dl)	56.5 ± 11.2	57.5 _b ± 11.5	55.6 _a ± 10.9
TG (mg/dl)	62.3 ± 26.8	58.8 _b ± 26.4	65.2 _a ± 26.1
APO A1 (g/L)	1.36 ± 0.19	1.38 _b ± 0.19	1.34 _a ± 0.18
APO B (g/L)	0.74 ± 0.17	0.72 _b ± 0.17	0.76 _a ± 0.16
APO B/APO A1	0.6 ± 0.1	0.5 _b ± 0.1	0.6 _a ± 0.1
LDL-c/Apo B	1.27 ± 15.1	1.27 _a ± 1.6	1.26 _a ± 1.4
TC/HDL	3.09 ± 0.63	3.02 _b ± 0.63	3.16 _a ± 0.61
N_HDL-c (mg/dl)	114 ± 26.7	111 _b ± 26.7	116 _a ± 26.4
LDL/HDL	1.72 ± 0.56	1.65 _b ± 0.55	1.79 _a ± 0.55
Total Proteins (mg/dl)	7.3 ± 0.7	7.2 _b ± 0.67	7.4 _a ± 0.73
Ferritin (ng/ml)	38.8 ± 21.3	38.9 _a ± 20.3	38.7 _a ± 22.2
Creatinine (mg/dl)	0.6 ± 0.11	0.61 _b ± 0.09	0.59 _a ± 0.11
Insulin (μU/ml) ¹	7.2 ± 11.19	6.81 _a ± 11.74	7.45 _a ± 10.59
Homa-IR	1.41 ± 2.47	1.26 _a ± 1.97	1.53 _a ± 2.83
Leptin (ng/ml) ²	10.71 ± 10.8	8.73 _b ± 9.83	12.56 _a ± 11.7
oxLDL (mU/L) ³	6.55 ± 1.78	6.34 _a ± 1.71	6.75 _a ± 1.82

[§]Age in days were converted to years for between-group comparisons.

¹(Female-272/Male-246)

²(Female -266/Male -246)

³(Female F-129/Male -133).

Gender means of each characteristic are compared through Bonferroni-adjusted t-tests, and statistical significance of differences are reported as different associated letters: a,b) (p<0.05). APO A1 (apolipoprotein A1); APO B (apolipoprotein B); BMI (body mass index); CC (calf circumference); HC (hip circumference); HDL-c (high-density lipoproteins cholesterol); LDL-c (low-density lipoproteins cholesterol); HOMA-IR (homeostatic model assessment-insulin resistance); MUAC (mid-upper arm circumference); N_HDL-c (non-HDL cholesterol); oxLDL (oxidized low-density lipoprotein); RMR (resting metabolic rate); TC (total cholesterol); TG (triglycerides); WC (waist circumference); WHR (waist-hip ratio); WHtR (waist circumference-to-height-ratio); zBMI (BMI z-score); % BF (percent body fat); and % SM (percent skeletal muscle).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197922.t001>

Table 2. Descriptive biochemical characteristics by gender and IOTF category^A.

Biochemical parameters	Normal			Overweight			Obese		
	Total (n = 1071)	Male (n = 523)	Female (n = 548)	Total (n = 312)	Male (n = 140)	Female (n = 172)	Total (n = 113)	Male (n = 60)	Female (n = 53)
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
Glucose (mg/dl)	77.7 ± 13.1*	78.6 _b ± 10.8	76.2 _a ± 9.4	79.4 ± 12.6*	80.9 _a ± 15.3	78.2 _a ± 9.9	78.9 ± 10.8*	79.1 _a ± 10.6	78.6 _a ± 11.2
TC (mg/dl)	169.9 ± 29.0*	167.6 _b ± 28.0	171.9 _a ± 29.7	172.5 ± 30.3*	173.3 _a ± 30.7	171.8 _a ± 30.1	172.3 ± 31.5*	175.7 _a ± 36.5	168.6 _a ± 24.6
LDL-c (mg/dl)	91.7 ± 23.7*	87.7 _b ± 22.4	95.1 _a ± 24.3	98.5 ± 25.3**	98.1 _a ± 24.7	98.8 _a ± 25.9	101.0 ± 27.5**	103.6 _a ± 31.2	98.2 _a ± 22.6
HDL-c (mg/dl)	57.9 ± 11.3*	59.2 _b ± 11.5	56.8 _a ± 11.1	54.2 ± 10.3*	54.6 _a ± 10.4	53.9 _a ± 10.3	49.0 ± 8.1****	49.6 _a ± 8.9	48.4 _a ± 7.3
TG (mg/dl)	58.0 ± 23.1*	53.6 _b ± 20.8	61.8 _a ± 23.2	68.2 ± 28.8**	66.0 _a ± 30.9	70.0 _a ± 26.9	86.2 ± 36.5***	87.3 _a ± 35.2	84.9 _a ± 38.2
APO A1 (g/L)	1.37 ± 0.2*	1.39 _b ± 0.2	1.35 _a ± 0.2	1.33 ± 0.2**	1.35 _a ± 0.2	1.32 _a ± 0.2	1.27 ± 0.2***	1.31 _b ± 0.2	1.24 _a ± 0.1
APO B (g/L)	0.72 ± 0.2*	0.70 _b ± 0.2	0.75 _a ± 0.2	0.77 ± 0.2**	0.76 _a ± 0.2	0.78 _a ± 0.2	0.78 ± 0.2**	0.80 _a ± 0.2	0.76 _a ± 0.2
APO B/APO A1	0.5 ± 0.1*	0.5 _b ± 0.1	0.6 _a ± 0.1	0.6 ± 0.1**	0.6 _a ± 0.1	0.6 _a ± 0.1	0.6 ± 0.2**	0.6 _a ± 0.2	0.6 _a ± 0.2
LDL-c/Apo B	1.26 ± 1.6*	1.26 _b ± 1.7	1.26 _a ± 1.4	1.27 ± 1.5*	1.29 _a ± 1.5	1.27 _a ± 1.4	1.29 ± 1.2**	1.29 _a ± 1.1	1.29 _a ± 1.4
TC/HDL	3.0 ± 0.6*	2.9 _b ± 0.5	3.1 _a ± 0.6	3.25 ± 0.6**	3.2 _a ± 0.7	3.3 _a ± 0.6	0.6 ± 0.8***	3.6 _a ± 0.9	3.6 _a ± 0.7
N_HDL-c (mg/dl)	112.0 ± 25.7*	108.4 _b ± 24.5	115.1 _a ± 26.2	118.3 ± 27.7**	118.7 _a ± 27.8	118.0 _a ± 27.7	122.7 ± 30.0**	124.9 _a ± 34.4	120.2 _a ± 24.4
LDL/HDL	1.64 ± 0.5*	1.54 _b ± 0.5	1.73 _a ± 0.5	1.87 ± 0.6**	1.85 _a ± 0.6	1.89 _a ± 0.6	2.1 ± 0.7***	2.13 _a ± 0.7	2.08 _a ± 0.6
Total Proteins (mg/dl)	7.26 ± 0.7*	7.19 _b ± 0.6	7.34 _a ± 0.7	7.40 ± 0.8*	7.35 _a ± 0.8	7.43 _a ± 0.9	7.40 ± 0.7*	7.34 _a ± 0.8	7.45 _a ± 0.6
Ferritin (ng/ml)	37.3 ± 19.7*	37.1 _a ± 17.7	37.5 _a ± 21.5	41.4 ± 24.6**	43.6 _a ± 27.5	39.6 _a ± 21.8	45.5 ± 23.9**	42.9 _a ± 19.6	48.4 _a ± 27.7
Creatinine (mg/dl)	0.6 ± 0.1*	0.6 _b ± 0.1	0.59 _a ± 0.1	0.6 ± 0.1*	0.62 _b ± 0.1	0.58 _a ± 0.1	0.6 ± 0.1*	0.59 _a ± 0.1	0.62 _a ± 0.1
Insulin (μU/ml) ¹	5.09 ± 4.2*	4.8 _a ± 4.2	5.2 _a ± 3.5	9.91 ± 16.2**	10.3 _a ± 20.1	9.6 _a ± 12.4	1.2 ± 16.9**	8.6 _a ± 9.8	14.3 _a ± 22.49
Homa-IR	0.96 ± 0.9*	0.93 _a ± 0.8	0.97 _a ± 0.8	1.88 ± 3.0**	1.72 _a ± 3.2	2.0 _a ± 2.9	2.47 ± 4.9**	1.80 _a ± 2.3	3.26 _a ± 6.8
Leptin (ng/ml) ²	5.7 ± 6.3*	3.9 _b ± 1.6	6.7 _a ± 7.1	14.7 ± 6.4**	12.0 _a ± 6.7	17.1 _b ± 7.4	27.1 ± 16.5***	24.3 _b ± 13.5	31.8 _a ± 12.6
oxLDL (mU/L) ³	6.33 ± 1.6*	6.2 _a ± 1.6	6.5 _a ± 1.6	7.0 ± 1.9**	6.9 _a ± 1.8	7.1 _a ± 1.9	7.0 ± 2.3**	6.6 _a ± 2.0	7.3 _a ± 2.6

^AAccording to World Obesity/Policy & Prevention analysis cut-off values. Gender means of each characteristic were compared within each IOTF category whereas IOTF Grade means of each characteristic were compared through Bonferroni-adjusted t-tests. Statistical differences were reported as different associated letters (a,b) or symbols (*, **, ***, ****), respectively (p < 0.05).

¹(Female-272/Male-246)

²(Female-266/Male-246)

³(Female-129/Male-133).

APO A1 (apolipoprotein A1): APO B (apolipoprotein B); HDL-c (high-density lipoproteins cholesterol); LDL-c (low-density lipoproteins cholesterol); HOMA-IR (homeostatic model assessment-insulin resistance); N_HDL-c (non-HDL cholesterol); oxLDL (oxidized low-density lipoprotein); TC (total cholesterol); and TG (triglycerides).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197922.t002>

TC/HDL and LDL/HDL and inversely correlated to HDL-c (p < 0.05) (Table 3). Apo B/APO A1 was moderately and positively correlated with BMI and WHR (p < 0.05).

BMI (r = 0.159), zBMI (r = 0.143), WHtR (r = 0.145), and MUAC (r = 0.135) were positively correlated with oxLDL (p < 0.05). Other parameters, such as glucose and insulin, were moderately and significantly correlated with weight, BMI and zBMI (p < 0.05). Glucose was also moderately correlated with MUAC and insulin with HC (p < 0.05). We found the strongest correlations between leptin and all anthropometric parameters (p < 0.05). The correlation analysis of biochemical variables showed that oxLDL was strongly and significantly associated with TC, LDL-c, APO B, APO B/APO A1, TC/HDL, and N_HDL-c (S3 Table).

A careful analysis of these previous results showed a significant percentage of children within normal IOTF values had anthropometric, bioimpedance or biochemical values outside the pediatric reference range. Among 1.071 “normal weight” children only 320 (29.9%) had anthropometric, % BF, and biochemical parameters all within the normal range (Table 4).

The observation of abnormal parameters within the normal IOTF group led us to question how many children would meet all the pediatric reference criteria. The number of children

Table 3. Correlations between anthropometric and biochemical characteristics adjusted for age, gender and ethnicity.

	Glucose (mg/dl)	Insulin (mU/L)	Homa-IR	TC (mg/dl)	LDL-c (mg/dl)	HDL-c (mg/dl)	TG (mg/dl)	APO A1 (g/L)	APO B (g/L)	APO B/APO A1	LDL-c/Apo B	TC/HDL	N_HDL-c (mg/dl)	LDL/HDL	Leptin (ng/ml)	oxLDL (mU/L)
Weight (Kg)	0.227	0.294	0.270	NS	0.074	-0.271	0.303	-0.193	0.075	0.16	0.03	0.245	0.066	0.232	0.774	NS
Height (cm)	NS	0.228	0.211	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.297	NS
BMI (Kg/m ²)	0.238	0.217	0.196	NS	0.147	-0.263	0.318	-0.175	0.143	0.201	0.066	0.287	0.128	0.282	0.856	0.159
zBMI	0.254	0.213	0.19	NS	0.138	-0.25	0.267	-0.173	0.136	0.197	0.058	0.264	0.116	0.263	0.771	0.143
WC (cm)	0.141	0.185	0.167	NS	0.115	-0.253	0.264	-0.174	0.119	0.19	N/S	0.257	0.098	0.254	0.877	NS
WHR (WC/HC)	0.125	0.104	0.091	NS	0.168	-0.224	0.249	-0.144	0.168	0.211	0.068	0.271	0.142	0.276	0.879	NS
HC (cm)	0.149	0.247	0.219	NS	N/S	-0.24	0.246	-0.16	0.075	0.145	N/S	0.202	N/S	0.196	0.814	NS
WHtR (WC/height)	0.015	-0.057	-0.045	0.072	0.134	-0.096	0.112	-0.074	0.118	0.14	0.086	0.177	0.12	0.183	0.652	0.145
MUAC (cm)	0.212	0.191	0.165	NS	0.107	-0.238	0.233	-0.165	0.092	0.161	N/S	0.217	0.07	0.231	0.802	0.135
CC (cm)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.527	NS

Correlation coefficients are displayed if statistically significant $P < 0.05$. NS (not significant); APO A1 (apolipoprotein A1); APO B (apolipoprotein B); BMI (body mass index); CC (calf circumference); HC (hip circumference); HDL-c (high-density lipoproteins cholesterol); LDL-c (low-density lipoproteins cholesterol); HOMA-IR (homeostatic model assessment-insulin resistance); MUAC (mid-upper arm circumference); N_HDL-c (non-HDL cholesterol); oxLDL (oxidized low-density lipoprotein); TC (total cholesterol); TG (triglycerides); WC (waist circumference); WHR (waist-hip ratio); WHtR (waist circumference-to-height-ratio); and zBMI (BMI z-score).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197922.t003>

with dyslipidemia and/or any other abnormal biochemical parameter is shown in Fig 1. After evaluating the number of dyslipidemic disorders, 65% of “normal weight”, 73% of “overweight” and 81% of “obese” children had at least one abnormal lipid parameter equivalent to a CV risk factor. The risk of dyslipidemia was associated with zBMI. In addition, only 33% of “normal weight”, 24% of “overweight”, and 18% of “obese” children lacked any abnormal biochemical parameter among the parameters measured.

Results of the multiple linear regression analyses for lipid profile measures are presented in Table 5. WHR, WHtR, WC, HC, BMI and zBMI were significant determinants of lipid and lipoproteins levels depending on the analyzed biochemical parameter. However, the percentage of variance of lipid levels explained by these parameters was very low. CC and MUAC, after adjustment for WC, were inversely associated with high-risk levels of TG and HDL-c, indicating a protective effect against dyslipidemia (S4 Table). Results in Table 5 also show that WHR was a significant predictor for TC and N_HDL-c; it equally explained 0.4% of TC and N_HDL-c variances. WC explained 2.8%, 1.2%, and 0.8% of APO A1, APO B and N_HDL-c variance, respectively. WHtR explained 2.7%, 2.8%, and 1.9% of LDL-c, APO B, and N_HDL-c variance, respectively. BMI explained 0.4%, 9.7% and 0.3% of LDL-c, TG and N_HDL-c, respectively. Finally, HC explained 0.3% of LDL-c and zBMI explained 2.4% of TG. Male gender consistently showed a protective effect towards dyslipidemia. WHtR and BMI showed a positive (increasing) effect over LDL-c and N_HDL-c, favouring dyslipidemia in general.

The independent contributions of anthropometric parameters to predict an abnormal lipid profile (CVD risk factor), according to logistic models adjusted for ethnicity, age, and gender, are shown in Table 6. WHR was found to be the strongest predictor of those with CVD risk levels of TC, LDL-c, and N_HDL-c. Children with abnormal WHR levels had 4.5 (95% CI: 1.4–14.0), 3.4 (95% CI: 1.3–9.1), and 5.3 (95% CI: 1.7–16.5) times more risk of having a high risk level of TC, LDL-c and N_HDL-c ($p < 0.05$) than children with normal WHM levels, respectively. zBMI was the only independent predictor of oxLDL. In fact, children in the category of high zBMI had, on average, a 4.12 (95% CI: 1.20–14.15) times higher risk of having a high-risk level of oxLDL than those children with normal zBMI levels.

Table 4. Descriptive characteristics of the subset of children without risk factors by gender.

Characteristic	Total (n = 320)	Male (n = 174)	Female (n = 146)
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
Age ⁶	9.77 ± 0.57	9.7 _a ± 0.57	9.8 _a ± 0.57
Anthropometry			
Weight (Kg)	31.5 ± 5.1	31.64 _a ± 4.71	31.3 _a ± 5.5
Height (cm)	137.3 ± 7.2	137.5 _a ± 7.0	137.1 _a ± 7.6
BMI (Kg/m ²)	16.6 ± 1.6	16.7 _a ± 1.5	16.5 _a ± 1.7
zBMI	0.06 ± 0.74	0.1 _a ± 0.7	0.1 _a ± 0.78
WC (cm)	60.6 ± 5.3	60.4 _a ± 4.7	60.7 _a ± 5.9
HC (cm)	68.1 ± 5.7	67.3 _a ± 5.2	69.2 _a ± 6.1
WHR (WC/HC)	0.88 ± 0.05	0.89 _b ± 0.04	0.87 _a ± 0.05
WHtR (WC/height)	0.44 ± 0.03	0.44 _a ± 0.03	0.44 _a ± 0.04
MUAC (cm)	19.8 ± 1.9	19.7 _a ± 1.9	19.9 _a ± 2.0
CC (cm)	27.6 ± 2.3	27.7 _a ± 2.2	27.5 _a ± 2.5
Bioelectrical impedance			
BF (%)	17.7 ± 5.5	17.5 _a ± 5.3	17.9 _a ± 5.7
SM (%)	32.5 ± 3.22	33.1 _a ± 3.1	31.7 _a ± 3.2
RMR (Kcal/Day)	1168 ± 85	1193 _b ± 84	1138 _a ± 76
Biochemical Parameters			
Glucose (mg/dl)	76.1 ± 9.3	76.4 _a ± 9.5	75.8 _a ± 9.0
TC (mg/dl)	151.3 ± 13.7	150.5 _a ± 13.6	152.3 _a ± 13.7
LDL-c (mg/dl)	76.6 ± 15.3	74.7 _a ± 16.0	78.8 _a ± 14.2
HDL-c (mg/dl)	58.3 ± 8.0	59.6 _b ± 8.5	56.9 _a ± 7.2
TG (mg/dl)	47.4 ± 12.5	45.7 _b ± 12.5	49.4 _a ± 12.3
APO A1 (g/L)	1.39 ± 0.12	1.40 _a ± 0.13	1.37 _a ± 0.12
APO B (g/L)	0.62 ± 0.1	0.60 _b ± 0.1	0.65 _a ± 0.1
APO B/APO A1	0.5 ± 0.1	0.4 _b ± 0.1	0.5 _a ± 0.1
LDL-c/Apo B	1.22 ± 12.0	1.23 _a ± 12.6	1.22 _a ± 11.7
TC/HDL	1.4 ± 0.4	1.3 _b ± 0.4	1.4 _a ± 0.33
N_HDL-c (mg/dl)	93.0 ± 14.2	91.0 _b ± 14.3	95.5 _a ± 13.63
LDL/HDL	2.6 ± 0.4	2.6 _b ± 0.4	2.7 _a ± 0.36
Total Proteins (mg/dl)	7.1 ± 0.46	7.1 _a ± 0.46	7.1 _a ± 0.46
Ferritin (ng/ml)	35.8 ± 16.2	35.3 _a ± 15.3	36.3 _a ± 17.4
Creatinine (mg/dl)	0.60 ± 0.08	0.61 _b ± 0.09	0.58 _a ± 0.08
Insulin (μU/ml) ¹	4.6 ± 3.2	4.4 _a ± 2.7	4.8 _a ± 3.7
Homa-IR	0.89 ± 0.69	0.84 _a ± 0.61	0.93 _a ± 0.77
Leptin (ng/ml) ²	5.7 ± 6.3	5.1 _a ± 7.5	6.3 _a ± 5.1
oxLDL (mU/L) ³	5.8 ± 1.4	5.7 _a ± 1.3	5.9 _a ± 1.48

⁶ Age in days are converted in years for a better comparison between groups.

¹ (Female-38/ Male-37)

² (Female-40/Male-36)

³ (Female-24/Male-31).

Gender means are compared between each characteristic through Bonferroni-adjusted t-tests and statistical differences are reported as different associated letters: a,b (p < 0.05). Values outside the following biochemical normal cut-offs were considered risk factors: glucose < 100mg/dl. TC < 170 mg/dl. LDL-c < 110 mg/dl. HDL-c ≥ 40 mg/dl. TG ≤ 75 mg/dl. APO A1 > 1.2 g/L. APO B < 0.9 g/L. N_HDL-c < 120. Total proteins 6–8.3 mg/dl. Ferritin 7–140 ng/ml. creatinine 0.4–1.0 mg/dl. Insulin < 16.3 μU/ml. Homa-IR < 0.69. Leptin < 6.32 ng/ml and ox-LDL < 1.38 mU/L. APO A1 (apolipoprotein A1). APO B (apolipoprotein B): BMI (body mass index): CC (calf circumference): HC (hip circumference): HDL-c (high-density lipoproteins cholesterol): LDL-c (low-density lipoproteins cholesterol): HOMA-IR (homeostatic model assessment-insulin resistance): MUAC (mid-upper arm circumference): N_HDL-c (non-HDL cholesterol): oxLDL (oxidized low-density lipoprotein): RMR (resting metabolic rate): TC (total cholesterol): TG (triglycerides): WC (waist circumference): WHR (waist-hip ratio): WHtR (waist circumference-to-height-ratio): zBMI (BMI z-score): % BF (percent body fat): and % SM (percent skeletal muscle).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197922.t004>

Discussion

Obesity is associated with increased prevalence of dyslipidemia and related CV risk [28]. Previous studies have shown that obese children have significantly higher TC, LDL-c, TG, N_HDL-

Abnormal Biochemical Parameters

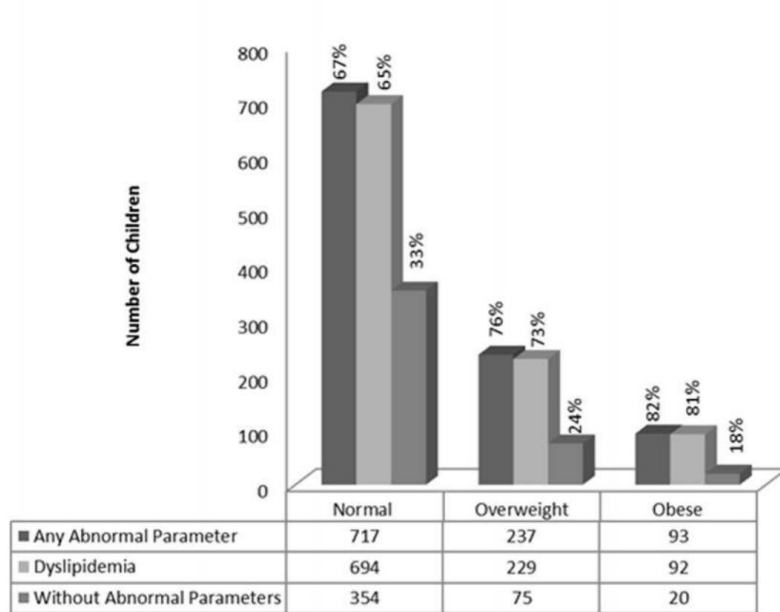


Fig 1. Distribution of abnormal biochemical parameters according to IOTF category.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197922.g001>

c, and lower HDL-c values [29–31]. With the exception of TC levels, our study results corroborate and agree with these findings. Gender is also an important determinant of CV risk. Kahn *et al* found that girls have higher insulin resistance and TG levels [32]. Likewise, Kumar *et al* [33] and Zhu *et al* [34] reported significantly higher TC and TG levels in girls (8–18 and 7–17 years-old, respectively). The first authors also showed that boys had higher levels of HDL-c, while the second reported a significantly higher mean concentration of LDL-c in girls. These results, with the exception of TC and insulin resistance, agree with our own findings and indicate that these girls may have a higher risk to develop CVD as adults. These differences might be related to how gender affects anthropometric variables.

Some studies suggest that childhood obesity has a considerable short-term and cumulative effect on the cardiovascular system that increases the risk of atherosclerosis in early adult life [35,36]. These effects could be mediated by the relationships between obesity and biochemical parameters, including lipid profile, insulin resistance, and metabolic syndrome. Blüher *et al*, in a cohort of 1.278 children aged 11 to 18 years, found that measures of insulin resistance were most strongly correlated to BMI SD, whereas absolute WC was most strongly associated with other metabolic risk markers, including the lipid profile, though differences in correlation coefficients were minor [37]. However, results of the National Health and Nutrition Examination Survey indicated that WC may be more useful than BMI for identifying adolescents at risk to develop insulin resistance and diabetes in early life [38]. Graves *et al* reported similar

Table 5. Final multiple regression models that explain the variance of blood lipids and lipoproteins. Independent control variables were gender, age and ethnicity; anthropometric measurements were independent covariates.

Dependent Variable (n = 1496)	Independent Variable	Std. Coef.	Coef. Sig.	Cumulative Adjusted r ²	Coef. Bootstrap Sig.
TC	Constant		0.00		<0.05
	Gender*	-0.07	0.02		<0.05
	Age	-0.04	0.22		0.21
	Ethnicity	0.04	0.20	0.004	0.24
	WHR*	0.07	0.03	0.008	<0.05
LDL-c	Constant		0.02		<0.05
	Gender*	-0.12	0.00		<0.05
	Age	0.07	0.06		0.07
	Ethnicity	0.05	0.10	0.011	0.13
	WHR*	0.33	0.00	0.038	<0.05
	WC	-0.24	0.07	0.050	0.07
	BMI*	0.22	0.00	0.054	<0.05
HDL-c	Constant		0.00		<0.05
	Gender*	0.10	0.00		<0.05
	Age*	-0.08	0.01		<0.05
	Ethnicity	0.01	0.88	0.014	0.81
	BMI*	-0.26	0.00	0.081	<0.05
	HC*	-0.18	0.03	0.057	<0.05
TG	Constant		0.00		<0.05
	Gender*	-0.15	0.00		<0.05
	Age	0.00	0.93		0.89
	Ethnicity	0.01	0.84	0.026	0.80
	BMI*	0.92	0.00	0.123	<0.05
APO A1	Constant		0.00		<0.05
	Gender*	0.10	0.00		<0.05
	Age*	-0.09	0.01		<0.05
	Ethnicity	-0.03	0.43	0.018	0.48
APO B	Constant		0.00		<0.05
	Gender*	-0.13	0.00		<0.05
	Age*	0.07	0.04		<0.05
	Ethnicity	0.06	0.70	0.015	0.75
	WHR*	0.46	0.00	0.043	<0.05
	WC*	-0.31	0.00	0.055	<0.05
N_HDL-c	Constant		0.10		0.09
	Gender*	-0.12	0.00		<0.05
	Age	0.04	0.23		0.24
	Ethnicity	0.05	0.11	0.010	0.10
	WHR*	0.25	0.01	0.029	<0.05
	WC*	-0.38	0.00	0.037	<0.05
	BMI*	0.22	0.00	0.040	<0.05
oxLDL	Constant		0.00		<0.05
	Gender*	-0.21	0.03		<0.05

(Continued)

Table 5. (Continued)

Dependent Variable (n = 1496)	Independent Variable	Std. Coef.	Coef. Sig.	Cumulative Adjusted r ²	Coef. Bootstrap Sig.
	Age	-0.16	0.08		0.08
	Ethnicity	0.09	0.35	0.000	0.33

*Variable with significant coefficient for p<0.05.

Std. Coef. (Standardized coefficient–Beta effect size). Sig. (Coefficients Significance). Bootstrap Sig. (Significance of Coefficients estimated by bootstrap). Statistically significant P <0.05. APO A1 (apolipoprotein A1): APO B (apolipoprotein B): BMI (body mass index): CC (calf circumference): HC (hip circumference): HDL-c (high-density lipoproteins cholesterol): LDL-c (low-density lipoproteins cholesterol): MUAC (mid-upper arm circumference): N_HDL-c (non-HDL cholesterol): oxLDL (oxidized low-density lipoprotein): TC (total cholesterol): TG (triglycerides): WC (waist circumference): WHR (waist-hip ratio): WHtR (waist circumference-to-height-ratio): and zBMI (BMI z-score).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197922.t005>

associations between these anthropometric measurements at ages 7–9 years and cross-sectional and prospective cardio-metabolic risk factors [39]. In contrast, other studies found WHtR to be more strongly associated with lipid outcomes [40,41]. Nevertheless, our own study data further supports that BMI is more strongly correlated with insulin resistance and the lipid profile than are WC or WHtR.

In addition, our data revealed that oxLDL is significantly and positively correlated with anthropometric parameters (BMI, zBMI, WHtR, and MUAC) and the lipid profile (TC, LDL-c, APO B, ApoB/ApoA1, TC/HDL, LDL/HDL, and N_HDL-c) and negatively correlated with HDL-c levels. Other studies that also explored these correlations reported similar results. In a

Table 6. Independent contributions of anthropometric parameters to the prediction of cardiovascular disease risk factors (adjusted for gender, age and ethnicity).

CVD Risk Factors (n = 1496)	Anthropometric variables	Odds ratio (95% CI)	Bootstrap Sig.	AUC (95% CI)
TC	HC	0.481 (0.206; 1.124)	0.10	
	WHR*	4.491 (1.435; 14.054)	<0.05	0.66 (0.52; 0.59)
LDL-c	BMI*	1.733 (1.26; 2.38)	<0.05	
	WHR*	3.40 (1.27; 9.10)	<0.05	0.61 (0.57; 0.65)
HDL-c	WC*	4.69 (1.78; 12.40)	<0.05	0.64 (0.56; 0.72)
TG	BMI*	2.21 (1.52; 3.23)	<0.05	
	WHtR	1.65 (0.95; 2.87)	0.09	
	CC	1.63 (0.98; 2.72)	0.07	0.66 (0.62; 0.70)
Apo A1	HC*	4.17 (1.44; 12.06)	<0.05	
	CC*	2.29 (1.24; 4.23)	<0.05	
	MUAC*	0.17 (0.04; 0.77)	<0.05	0.64 (0.59; 0.68)
Apo B	zBMI*	2.10 (1.43; 3.08)	<0.05	0.64 (0.60; 0.68)
N_HDL-c	BMI*	1.53 (1.13; 2.06)	<0.05	
	WHR*	5.30 (1.70; 16.48)	<0.05	0.59 (0.56; 0.63)

*Variable with significant coefficient for p<0.05.

Bootstrap Sig. (Significance of Coefficients estimated by bootstrap). AUC (area under the curve). CVD (cardio-vascular disease). CI (confidence interval). CV high risk lipid concentrations, based on established cut-offs values, were defined as follows: total cholesterol >170 mg/dl; LDL-c >110 mg/dl; HDL-c <40 mg/dl; triglycerides >75 mg/dl; APO A1 <1.2 g/L; APO B >0.9 g/L; N_HDL-c ≥120 mg/dl, and ox-LDL >1.38 mU/L. APO A1 (apolipoprotein A1): APO B (apolipoprotein B): BMI (body mass index): CC (calf circumference): HC (hip circumference): HDL-c (high-density lipoproteins cholesterol): LDL-c (low-density lipoproteins cholesterol): MUAC (mid-upper arm circumference): N_HDL-c (non-HDL cholesterol): oxLDL (oxidized low-density lipoprotein): TC (total cholesterol): TG (triglycerides): WC (waist circumference): WHR (waist-hip ratio): WHtR (waist circumference-to-height-ratio): and zBMI (BMI z-score).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197922.t006>

population of 35 children aged 7–11 years, Islam *et al* demonstrated that oxLDL immune complexes were significantly correlated with TC, LDL-c, and LDL/HDL levels [42]. Kelly *et al* showed that in children ox-LDL is significantly associated with adiposity independent of body fatness [31]. According to Norris *et al*, extreme pediatric obesity is associated with higher levels of oxidative stress and inflammation, suggesting that markers of early CVD and type 2 diabetes mellitus are already present in a population of young children and adolescents [43].

To the best of our knowledge, the present study is the first to describe, in the same population, relationships among extensive anthropometric, bioimpedance, and biochemical parameters, and to evaluate these parameters in a subset of “normal weight” children. Our results showed that according to the analyzed parameters only 29.9% of the “normal weight” children had no CV risk factor. Studies aiming to determine CV risk factors in pediatric populations should take into account the high proportion of children that have an abnormal biochemical parameter. Of note, most previously conducted studies only classified children as being “normal” according to one or two anthropometric or bioimpedance parameters. The findings of this study show that 70.1% of the “normal weight” children had a least one abnormal biochemical parameter and 64.8% had dyslipidemia. Therefore, these results suggest that future studies proposing to assess CV risk in pediatric populations should take into account several anthropometric, bioimpedance, and biochemical parameters to exclude from the “normal” control group those who have one or more parameters outside of the normal range.

The present study also revealed that only 26.6% of overweight and 18.6% obese children lack dyslipidemia, which indicates that children with a higher degree of overweight (defined by BMI) are more likely to have adverse alterations in their lipid profile. In a cohort of 293 adolescents (11–16 years-old), Bibiloni *et al* reported that 48.8% of participants had a positive diagnosis of dyslipidemia and also found that adolescents with a high BMI were more likely to have at least one lipid parameter beyond the normal range, which agrees with our own findings [44].

Several other studies also examined which obesity indexes best predict CV risks markers [32,38,43,44]. However, the relative strength of the associations between several anthropometric measurements and cardio-metabolic risk factors in childhood obesity has not been established. Study cohort size, age range, gender, ethnicity, pubertal stage, absence of internationally accepted classification with age- and gender-specific cut-off values for some anthropometric measures and geographical differences may explain the inconsistent results. In our current study, we determined the independent contribution of MUAC/WC, WHR (WC/HC) and CC/WC to CVD risk factors in children. Our results suggest that a large HC (adjusted for WC) could be protective for CVD, probably because it assesses skeletal frame size, adipose and muscle mass in the gluteofemoral region, which is positively correlated with leg fat mass and inversely with depots of abdominal visceral and subcutaneous fat [45,46]. The same interpretation applies to MUAC and CC. These results agree with studies of adult populations [47–49]. WC, WHR and WHtR have been used as indicators of abdominal obesity [50] and are associated with adverse CV risk factors. The results of the present study also demonstrate that these parameters, depending on the lipid parameter, are good predictors of a high-risk lipid profile in this population. However, WHR appears to be the better predictor for most lipid variables. Chu *et al* study of 1,366 children (12–16 years-old) concluded that anthropometric parameters (including BMI and WHR) were adequate predictors of blood lipid levels in both genders [51]. Zhu *et al* study of 2,243 school children aged 7–17 years with obesity demonstrated that BMI was better than WC and WHR for identifying dyslipidemia and that the distribution of lipid profiles in Chinese children differ between age groups [34]. According to Agirbasli *et al*, BMI was a better predictor of metabolic syndrome risk variables than skinfold thicknesses, WC, WHtR, and WHR in 9 year old children [52]. However, according to Savva *et al* WC and WHtR were better predictors of CVD risk factors than BMI [40]. The present

data suggests that this kind of investigation may have important public health implications because the proposition that anthropometric parameters are good predictors of metabolic risk factors (which might increase the risk of CVD) could justify early interventions.

The study limitations include: 1) the lack of information on the family history of hypercholesterolemia, which according to Kwiterovich [53] explains a large percentage of the variance in lipid concentrations; 2) the cross-sectional nature of the study, which prevents asserting a causal relationship between anthropometric predictors and the lipid profile; and 3) the difficulty in comparing our results with others, which limits external validity.

The primary strengths of this study include the large study population, the comprehensive assessment of surrogate markers of adiposity, some that were never evaluated in children before, and the diverse biochemical parameters. These extensive data have allowed the exploration of many correlations between anthropometric parameters and cardio-metabolic risk factors. Furthermore, we explore the anthropometric measurements as a mean of evaluate the risk for dyslipidemia, and like the precursor *forme fruste* of the osteosarcopenic obesity phenotype in healthy overweight/obese children reported in Stefanaki et al. [54], this dyslipidemia might be a sign of an “in development” earlier form of CVD in young children.

Conclusion

This study shows that a large proportion of school aged children have at least one abnormality of the lipid profile, including more than half the children of “normal weight” and the great majority of “overweight” and “obese” children. Anthropometric parameters were found to independently predict an altered lipid profile associated with CVD risk. BMI, WC, WHtR and WHR were more directly associated with dyslipidemia, whereas HC was inversely associated. The contribution of each anthropometric measurement to the lipid profile varied with the specific lipid parameter. Selected anthropometric variables are likely to help predict increased odds of having CV risk factors.

Supporting information

S1 Table. Descriptive characteristics of the study population of children by ethnicity. [§]Age in days were converted in years for a better comparison between groups. ¹ (Cauc-471/Afr-45/Oth-2). ² (Cauc-458/Afr-50/Oth-8). ³ (Cauc-245/Afr-16/Oth-1). Ethnic group means are compared between each characteristic through Bonferroni-adjusted t-tests. Statistical differences are reported as different associated letters: a, b ($p < 0.05$). APO A1 (apolipoprotein A1); APO B (apolipoprotein B); BMI (body mass index); CC (calf circumference); HC (hip circumference); HDL-c (high-density lipoproteins cholesterol); LDL-c (low-density lipoproteins cholesterol); HOMA-IR (homeostatic model assessment-insulin resistance); MUAC (mid-upper arm circumference); N_HDL-c (non-HDL cholesterol); oxLDL (oxidized low-density lipoprotein); RMR (resting metabolic rate); TC (total cholesterol); TG (triglycerides); WC (waist circumference); WHR (waist-hip ratio); WHtR (waist circumference-to-height-ratio); zBMI (BMI z-score); %BF (percentage body fat); and %SM (percentage skeletal muscle). (DOCX)

S2 Table. Descriptive clinical characteristics of the study population by gender and by IOTF category. ^ΔAccording to World Obesity/Policy & Prevention and bioelectrical impedance analysis cut-offs. [§]Age in days were converted in years for a better comparison between groups. Sex means between each characteristic were compared within each IOTF category while IOTF grade means were compared between each characteristic through Bonferroni-adjusted t-tests. Statistical differences were reported as different associated letters (a,b) or

symbols (*, **, ***), respectively ($p < 0.05$). BMI (body mass index): CC (Calf Circumference): HC (hip circumference): MUAC (mid upper arm circumference): RMR (resting metabolic rate): WC (waist circumference): WHR (waist-hip ratio): WHtR (waist circumference-to-height-ratio): zBMI (BMI z-score): %BF (percentage body fat): %BF (percentage body fat): and %SM (percentage skeletal muscle).
(DOCX)

S3 Table. Adjusted correlations between biochemical parameters. APO A1 (apolipoprotein A1): APO B (apolipoprotein B): HDL-c (high-density lipoproteins cholesterol): LDL-c (low-density lipoproteins cholesterol): HOMA-IR (homeostatic model assessment-insulin resistance): N_HDL-c (non-HDL cholesterol): oxLDL (oxidized low-density lipoprotein): TC (total cholesterol): TG (triglycerides).
(DOCX)

S4 Table. Independent contributions of MUAC and CC to prediction of cardiovascular disease risk factors (adjusted for ethnicity, age, gender and waist circumference). * Not significant. APO A1 (apolipoprotein A1): APO B (apolipoprotein B): CC (calf circumference): HDL-c (high-density lipoproteins cholesterol): LDL-c (low-density lipoproteins cholesterol): MUAC (mid-upper arm circumference): N_HDL-c (non-HDL cholesterol): and oxLDL (oxidized low-density lipoprotein). TC (total cholesterol): TG (triglycerides). (Adverse lipid concentrations of established cut-offs were defined as follows: total cholesterol > 170 mg/dl. LDL-c > 110 mg/dl. HDL-c < 40 mg/dl. triglycerides > 75 mg/dl. APO A1 < 1.2 . APO B > 0.9 g/L. N_HDL-c ≥ 120 . g/L. ox-LDL > 1.38 mU/L).
(DOCX)

S5 Table. TRIPOD checklist—prediction model development and validation. *Items relevant only to the development of a prediction model are denoted by D, items relating solely to a validation of a prediction model are denoted by V, and items relating to both are denoted D;V. We recommend using the TRIPOD Checklist in conjunction with the TRIPOD Explanation and Elaboration document.
(DOCX)

Acknowledgments

The authors thank the children, parents and teachers at the participating schools, Luís R Silva for part of anthropometric measurements, João Vintém and Solange Campos for managing the program, and Júlio Guilherme and Hélder Carrilho for their computer services.

Author Contributions

Conceptualization: Fernando P. Ferraz.

Formal analysis: Paulo Mascarenhas.

Investigation: José M. Furtado, Sílvia M. Almeida, Maria E. Ferraz, Fernando P. Ferraz.

Writing – original draft: José M. Furtado, Sílvia M. Almeida, Fernando P. Ferraz.

Writing – review & editing: José C. Ferreira, Manuel Vilanova, Mariana P. Monteiro.

References

1. Wilkins E, Wilson L, Wickramasinghe K, Bhatnagar P, Leal J, Luengo-Fernandez R, et al. European Cardiovascular Disease Statistics. Eur Hear Network, Brussels. 2017; 1–192.

2. Newman WP, Freedman DS, Voors AW, Gard PD, Srinivasan SR, Cresanta JL, et al. Relation of serum lipoprotein levels and systolic blood pressure to early atherosclerosis. The Bogalusa Heart Study. *N Engl J Med*. 1986; 314(3):138–44. <https://doi.org/10.1056/NEJM198601163140302> PMID: 3455748
3. Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman WP 3rd, Tracy RE, Wattigney WA. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. *N Engl J Med*. 1998; 338:1650–6. <https://doi.org/10.1056/NEJM199806043382302> PMID: 9614255
4. Wu T, Willett WC, Rifai N, Shai I, Manson JE, Rimm EB. Is Plasma Oxidized Low-Density Lipoprotein, Measured With the Widely Used Antibody 4E6, an Independent Predictor of Coronary Heart Disease Among U.S. Men and Women? *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48(5):973–9. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.03.057> PMID: 16949489
5. Meisinger C, Baumert J, Khuseynova N, Loewel H, Koenig W. Plasma oxidized low-density lipoprotein, a strong predictor for acute coronary heart disease events in apparently healthy, middle-aged men from the general population. *Circulation*. 2005; 112(5):651–7. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.529297> PMID: 16043640
6. Weinbrenner T, Schröder H, Escurriol V, Fito M, Elosua R, Vila J, et al. Circulating oxidized LDL is associated with increased waist circumference independent of body mass index in men and women. *Am J Clin Nutr*. 2006; 83(1):30–5. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.1.30> PMID: 16400046
7. Ho RC, Davy K, Davy B, Melby CL. Whole-body insulin sensitivity, low-density lipoprotein (LDL) particle size, and oxidized LDL in overweight, nondiabetic men. *Metabolism*. 2002; 51(11):1478–83. PMID: 12404201
8. Njajou OT, Kanaya AM, Holvoet P, Connelly S, Strotmeyer ES, Harris TB, et al. Association between oxidized LDL, obesity and type 2 diabetes in a population-based cohort, the Health, Aging and Body Composition Study. *Diabetes/metabolism Res Rev*. 2009; 25(8):733–9.
9. Van Guilder GP, Hoetzer GL, Greiner JJ, Stauffer BL, Desouza CA. Influence of metabolic syndrome on biomarkers of oxidative stress and inflammation in obese adults. *Obesity*. 2006; 14(12):2127–31. <https://doi.org/10.1038/oby.2006.248> PMID: 17189537
10. Holvoet P, Jenny NS, Schreiner PJ, Tracy RP, Jacobs DR. The Relationship Between Oxidized LDL and Other Cardiovascular Risk Factors and Subclinical CVD in Different Ethnic Groups: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis*. 2006; 194(1):245–252. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.08.002> PMID: 16982059
11. Steinberger J, Daniels SR, Eckel RH, Hayman L, Lustig RH, McCrindle B, et al. Progress and Challenges in Metabolic Syndrome in Children and Adolescents: A Scientific Statement From the American Heart Association Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation*. 2009; 119(4):628–47. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.191394> PMID: 19139390
12. Newman WP, Wattigney W, Berenson GS. Autopsy Studies in United States Children and Adolescents. Relation of risk factors to atherosclerotic lesions. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1991; 623:16–25. PMID: 2042824
13. Cruz ML, Weigensberg MJ, Huang TT, Ball G, Shaibi GQ, Goran MI. The metabolic syndrome in overweight Hispanic youth and the role of insulin sensitivity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2004; 89(1):108–13. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031188> PMID: 14715836
14. Daniels SR, Greer FR. Lipid Screening and Cardiovascular Health in Childhood. *Pediatrics*. 2008; 122:122–98.
15. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2014; 384(9945):766–781. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60460-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60460-8) PMID: 24880830
16. Berenson GS, Srinivasan SR, Nicklas TA. Atherosclerosis: a nutritional disease of childhood. *Am J Cardiol*. 1998; 82(10B):22T–29T. PMID: 9860370
17. McCrindle BW. Hyperlipidemia in children. *Thromb Res*. 2006; 118(1):49–58. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2005.01.006> PMID: 16709475
18. Okosun IS, Prewitt TE, Liao Y, Cooper RS. Association of waist circumference with ApoB to ApoAI ratio in black and white Americans. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1999; 23(5):498–504. PMID: 10375053
19. Flegal KM, Ogden CL. Childhood Obesity: Are We All Speaking the Same Language? *Adv Nutr An Int Rev J*. 2011; 2(2):159S–166S.
20. McGill HC Jr, McMahan CA, Zieske AW, Sloop GD, Walcott JV, Troxclair DA, et al. Associations of Coronary Heart Disease Risk Factors With the Intermediate Lesion of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20(8):1998–2004. PMID: 10938023

21. Almeida SM, Furtado JM, Mascarenhas P, Ferraz ME, Silva LR, Ferreira JC, et al. Anthropometric predictors of body fat in a large population of 9-year-old school-aged children. *Obes Sci Pract*. 2016; 2(3):272–81. <https://doi.org/10.1002/osp4.51> PMID: 27708844
22. Cole T. J.; Lobstein T. Extended international (IOTF) body mass index cut-offs for thinness, overweight and obesity. *Pediatr Obes*. 2012; 7(4):284–94. <https://doi.org/10.1111/j.2047-6310.2012.00064.x> PMID: 22715120
23. McCarthy HD, Jarrett KV, Crawley HF. The development of waist circumference percentiles in British children aged 5.0–16.9 y. *Eur J Clin Nutr*. 2001; 55(10):902–7. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601240> PMID: 11593353
24. McCarthy HD, Ashwell M. A study of central fatness using waist-to-height ratios in UK children and adolescents over two decades supports the simple message—'keep your waist circumference to less than half your height'. *Int J Obes*. 2006; 30(6):988–92.
25. McCarthy HD, Cole TJ, Fry T, Jebb SA, Prentice AM. Body fat reference curves for children. *Int J Obes*. 2006; 30(4):598–602.
26. Soghier L, Pham K, Rooney S. Reference Range Values for Pediatric Care. American Academy of Pediatrics. 2014; 1–176.
27. Clinic Mayo. Lipids and Lipoproteins in Blood Plasma (Serum). Mayo Clinic Laboratories. 2016.
28. Freedman DS, Dietz W, Srinivasan SR, Berenson GS. The Relation of Overweight to Cardiovascular Risk Factors Among Children and Adolescents: The Bogalusa Heart Study. *Pediatrics*. 1999; 103(6 Pt 1):1175–82.
29. Dai S, Yang Q, Yuan K, Loustalot F, Fang J, Daniels SR, et al. Non-High-Density Lipoprotein Cholesterol: Distribution and Prevalence of High Serum Levels in Children and Adolescents: United States National Health and Nutrition Examination Surveys. *J Pediatr*. 2014; 164(2):247–53. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.08.069> PMID: 24139441
30. Korsten-Reck U, Kromeyer-Hauschild K, Korsten K, Baumstark MW, Dickhuth HH, Berg A. Frequency of secondary dyslipidemia in obese children. *Vasc Health Risk Manag*. 2008; 4(5):1089–94. PMID: 19183757
31. Kelly AS, Jacobs DR Jr., Sinaiko AR, Moran A, Steffen LM, Steinberger J. Relation of Circulating Oxidized LDL to Obesity and Insulin Resistance in Children. *Pediatr Diabetes*. 2010; 11(8):552–5. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5448.2009.00640.x> PMID: 20102528
32. Kahn HS, El ghormli L, Jago R, Foster GD, McMurray RG, Buse JB, et al. Cardiometabolic risk assessments by body mass index z-score or waist-to-height ratio in a multiethnic sample of sixth-graders. *J Obes*. 2014; vol. 2014, Article ID 421658, 10 pages.
33. Kumar S, Mazumder S, Banerjee S, Mukherjee A, Lahiri R, Mukherjee DK. Lipid profile of Indian children and adolescents. *J Indian Med Assoc*. 2003; 101(7):403–4, 406. PMID: 14748377
34. Zhu Y, Shao Z, Jing J, Ma J, Chen Y, Li X, et al. Body mass index is better than other anthropometric indices for identifying dyslipidemia in Chinese children with obesity. *PLoS One*. 2016; 11(3):e0149392. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149392> PMID: 26963377
35. Davis PH, Dawson JD, Riley WA, Lauer RM. Carotid Intimal-Medial Thickness Is Related to Cardiovascular Risk Factors Measured From Childhood Through Middle Age: The Muscatine Study. *Circulation [Internet]*. 2001; 104(23):2815–9. Available from: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/hc4601.099486> PMID: 11733400
36. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 1983; 67(5):968–77. PMID: 6219830
37. Blüher S, Molz E, Wiegand S, Otto KP, Sergeev E, Tuschy S, et al. Body Mass Index, Waist Circumference, and Waist-to-Height Ratio as Predictors of Cardiometabolic Risk in Childhood Obesity Depending on Pubertal Development. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013; 98(8):3384–93. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-1389> PMID: 23775352
38. Lee JM, Davis MM, Woolford SJ, Gurney JG. Waist circumference percentile thresholds for identifying adolescents with insulin resistance in clinical practice. *Pediatric Diabetes*. 2009; 10(5):336–342. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5448.2008.00474.x> PMID: 19175894
39. Graves L, Garnett SP, Cowell CT, Baur LA, Ness A, Sattar N, et al. Waist-to-height ratio and cardiometabolic risk factors in adolescence: Findings from a prospective birth cohort. *Pediatr Obes*. 2014; 9(5):327–38. <https://doi.org/10.1111/j.2047-6310.2013.00192.x> PMID: 23894119
40. Savva SC, Tornaritis M, Savva ME, Kourides Y, Panagi A, Silikiotou N, et al. Waist circumference and waist-to-height ratio are better predictors of cardiovascular disease risk factors in children than body mass index. *Int J Obes*. 2000; 24(11):1453–8.

41. Yan W, Wang X, Yao H, Dai J, Zheng Y, Yang X, et al. Waist-to-height ratio and BMI predict different cardiovascular risk factors in Chinese children. *Diabetes Care*. 2006; 29(12):2760–1.
42. Islam S, Gutin B, Treiber F, Hobbs G, Kamboh I, Lopes-Virella M. Association of apolipoprotein A phenotypes and oxidized low-density lipoprotein immune complexes in children. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 1999; 153(1):57–62. PMID: [9895000](#)
43. Norris AL, Steinberger J, Steffen LM, Metzger AM, Schwarzenberg SJ, Kelly AS. Circulating Oxidized LDL and Inflammation in Extreme Pediatric Obesity. *Obesity*. 2011; 19(7):1415–9. <https://doi.org/10.1038/oby.2011.21> PMID: [21331062](#)
44. Bibiloni M del M, Salas R, De la Garza YE, Villarreal JZ, Sureda A, Tur JA. Serum Lipid Profile, Prevalence of Dyslipidaemia, and Associated Risk Factors Among Northern Mexican Adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016; 63(5):544–9. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001325> PMID: [27379432](#)
45. Molarius A, Seidell JC. Selection of anthropometric indicators for classification of abdominal fatness—a critical review. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1998; 22(8):719–27. PMID: [9725630](#)
46. Rocha PM, Barata JT, Teixeira PJ, Ross R, Sardinha LB. Independent and opposite associations of hip and waist circumference with metabolic syndrome components and with inflammatory and atherothrombotic risk factors in overweight and obese women. *Metabolism*. 2008; 57(10):1315–22. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2008.01.003> PMID: [18803932](#)
47. Katz EG, Stevens J, Truesdale KP, Cai J, Adair LS, North KE. Hip Circumference and Incident Metabolic Risk Factors in Chinese Men and Women: The People's Republic of China Study. *Metab Syndr Relat Disord*. 2011; 9(1):55–62. <https://doi.org/10.1089/met.2010.0045> PMID: [21091063](#)
48. Seidell JC, Pérusse L, Després JP, Bouchard C. Waist and hip circumferences have independent and opposite effects on cardiovascular disease risk factors: The Quebec Family Study. *Am J Clin Nutr*. 2001; 74(3):315–21. <https://doi.org/10.1093/ajcn/74.3.315> PMID: [11522554](#)
49. Mason C, Craig CL, Katzmarzyk PT. Influence of central and extremity circumferences on all-cause mortality in men and women. *Obesity*. 2008; 16(12):2690–5. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.438> PMID: [18927548](#)
50. Bacopoulou F, Efthymiou V, Landis G, Rentoumis A, Chrousos GP. Waist circumference, waist-to-hip ratio and waist-to-height ratio reference percentiles for abdominal obesity among Greek adolescents. *BMC Pediatr*. 2015; 15:50. <https://doi.org/10.1186/s12887-015-0366-z> PMID: [25935716](#)
51. Chu NF, Rimm EB, Wang DJ, Liou HS, Shieh SM. Relationship between anthropometric variables and lipid levels among school children: The Taipei children heart study. *Int J Obes*. 1998; 22(1):66–72.
52. Agirbasli M, Tanrikulu AM, Berenson GS. Metabolic Syndrome: Bridging the Gap from Childhood to Adulthood. *Cardiovasc Ther*. 2016; 34(1):30–6. <https://doi.org/10.1111/1755-5922.12165> PMID: [26588351](#)
53. Kwiterovich PO Jr. Recognition and management of dyslipidemia in children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93(11):4200–9. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1270> PMID: [18697860](#)
54. Stefanaki C, Peppas M, Boschiero D, Chrousos GP. Healthy overweight/obese youth: early osteosarcomenic obesity features. *European Journal of Clinical Investigation*. 2016; 46 issue (9): 767–8. <https://doi.org/10.1111/eci.12659> PMID: [27434725](#)

ANEXO 4



Association between LEPR, FTO, MC4R, and PPARG-2 polymorphisms with obesity traits and metabolic phenotypes in school-aged children

Sílvia M. Almeida^{1,2} · José M. Furtado^{1,2} · Paulo Mascarenhas² · Maria E. Ferraz¹ · José C. Ferreira¹ · Mariana P. Monteiro³ · Manuel Vilanova^{4,5} · Fernando P. Ferraz^{1,2}

Received: 17 October 2017 / Accepted: 19 March 2018 / Published online: 20 April 2018
© The Author(s) 2018

Abstract

Purpose Evaluate the relationship of leptin receptor (LEPR) rs1137101, fat mass obesity-associated (FTO) receptors 9939609, melanocortin-4 receptors (MC4R) rs2229616 and rs17782313, and proliferator-activated receptor-gamma (PPARG) rs1801282 with clinical and metabolic phenotypes in prepubertal children.

Research question What is the effect of polymorphisms on clinical and metabolic phenotypes in prepubertal children?

Methods A cross-sectional descriptive study was performed to evaluate anthropometric features, percentage body fat (% BF), biochemical parameters, and genotype in 773 prepubertal children.

Results FTO rs9939609 was associated with an increase in body mass index (BMI) and BMI z-score (zBMI). MC4R rs17782313 was associated with a decrease in BMI and +0.06 units in zBMI. LEPR, and PPARG-2 polymorphisms were associated with decreases in BMI and an increase and decrease units in zBMI, respectively. The homozygous SNPs demonstrated increases (FTO rs993609 and MC4R rs17782313) and decreases (LEPR rs1137101, PPARG rs1801282) in zBMI than the homozygous form of the major allele. In the overweight/obese group, the MC4R rs17782313 CC genotype showed higher average weight, zBMI, waist circumference, waist-circumference-to-height ratio, and waist-hip ratio, and lower BMI, mid-upper arm circumference, calf circumference, and %BF ($P < 0.05$). FTO rs9939609 AT and AA genotypes were associated with lower triglycerides ($P < 0.05$).

Conclusions We showed that MC4R rs17782313 and FTO rs9939609 were positively associated with zBMI, with weak and very weak effects, respectively, suggesting a very scarce contribution to childhood obesity. LEPR rs1137101 and PPARG-2 rs1801282 had weak and medium negative effects on zBMI, respectively, and may slightly protect against childhood obesity.

Keywords Polymorphisms · Anthropometry · Body fat · Biochemical parameters · Children

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12020-018-1587-3>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Sílvia M. Almeida
cgmp@egasmoniz.edu.pt

¹ Centro de Genética Médica e Nutrição Pediátrica Egas Moniz, Campus Universitário, Monte da Caparica, Portugal

² Instituto Universitário Egas Moniz, Campus Universitário, Monte da Caparica, Portugal

³ Clinical and Experimental Endocrinology Group, Unit for

Multidisciplinary Research in Biomedicine UMIB, ICBAS, University of Porto, Porto, Portugal

⁴ Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, and IBMC–Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto, Porto, Portugal

⁵ Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, Portugal

Springer

Introduction

Obesity prevalence has increased during the past century and the World Health Organization (WHO) estimates that the number of overweight/obese young children will reach 70 million in 2025 [1]. Obesity is a chronic disease with multifaceted etiology [2, 3]. Socioeconomic changes during the last decades have contributed to these phenomena, including the increased availability of high-fat foods and generalized adoption of sedentary lifestyles. Furthermore, there is evidence that genes play an important role in the rise of obesity [2, 3]. Heritability is estimated to account for 40–90% of the population adiposity variation. Seemingly, the presence of single nucleotide polymorphisms (SNPs) offer a protective factor in the development of non-communicable diseases, such as obesity related diseases [4–6]. With the development of high-throughput genotyping techniques, new approaches such as genome-wide linkage and genome-wide association studies (GWAS) have been used to understand genetic influences in obesity [7]. However, the majority of identified SNPs have unknown biological functions and some of these studies yielded contradictory results, suggesting a need for further examination into the functions of identified SNPs related to obesity.

Fat mass and obesity-associated (FTO) variant rs9939609 was the first [8] locus to be positively associated with obesity-related phenotypes [8–12]. FTO is highly expressed in the hypothalamus and liver, appears to function in the central nervous system, and may have a role in energy balance, food intake regulation, and adipogenesis [13, 14]. There may be cross-talk between the FTO protein and leptin, an adipose-derived cytokine implicated in food intake regulation, energy and glucose homeostasis, lipid metabolism, and reproductive function [15]. The influence of leptin on body weight control is mediated by binding to the long isoform of its receptor (LEPR-b), which stimulates gene transcription by activating cytosolic signal transducer and transcription (STAT) proteins [15]. Recent evidence suggests that the LEPR-b-STAT3 signaling pathway may be involved in FTO regulation by restricting energy in the hypothalamus [16] and there is evidence that the leptin receptor (LEPR) variant rs1137101 is positively associated with obesity [17–19].

Leptin acts with hypothalamic receptors to induce satiety by inhibiting the orexigenic neuropeptide Y (NPY)/agouti-related peptide (AgRP) neuronal activity and stimulating the anorexigenic proopiomelanocortin (POMC)/amphetamine-related transcript (CART) neurons [20]. POMC is cleaved into melanocortins and is processed to form the α -melanocyte hormone, which exerts catabolic activity via melanocortin-4 receptors (MC4R) to generate a feeling of fullness to suppress appetite [20]. MC4R is a G-protein-linked receptor

widely expressed in the hypothalamus and central nervous system, implicated in energy homeostasis and glucose and lipid metabolism [21]. The MC4R variant rs17782313 was the second gene that was positively associated with common obesity traits [22–25]. By contrast, the MC4R variant rs2229616 is negatively associated with obesity [26, 27].

Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARG) is another gene that has an important role in obesity. PPARG is a member of the nuclear hormone superfamily, which is involved in adipocyte differentiation and glucose metabolism [28]. There are evidences that PPARG deficiency results in increased leptin levels [28]. The PPARG rs1801282 variant is positively associated with obesity and has been extensively examined in epidemiological studies [29].

The aim of the present study was to assess the independent contributions of LEPR (rs1137101), FTO (rs9939609), MC4R (rs2229616 and rs17782313), and PPARG-2 (rs1801282) polymorphisms for clinically overweight or obesity phenotypes and endocrine-metabolic traits in prepubertal children.

Methods

Study design and participants

This descriptive cross-sectional study was part of a larger project (Nutritional, Biochemical, and Genetic Study of an Overweight and Obese Child Population in the Southern Region) approved by the Directorate General of Health, the Ministry of Science and Education of Portugal and by the Ethics Committee of the Hospital Garcia de Orta, according to the principles of Helsinki Declaration. The project was conducted from January 2009 to June 2013 in a population of prepubertal children (based on Tanner stage) recruited from 87 public schools in Lisbon and the Tagus Valley metropolitan region. Initially, 5989 subjects were initially recruited based on the assessment of anthropometric measurements, bioelectrical impedance, biochemical and genetic analysis.

To be included in the study, children should have completed nine years old during the ongoing school year, an inclusion criterion that reduced the initial population to 5577 children. The exact chronological age in days was calculated as the date of examination minus the date of birth. Children who transferred to another school prior to completing the minimum required measurements were excluded, further reducing the population to 5514 eligible children. Children whose parent did not provide written informed consent or withdrew consent for venous blood sampling, and those who self-reported as not fasting at the time of blood collection were excluded from the

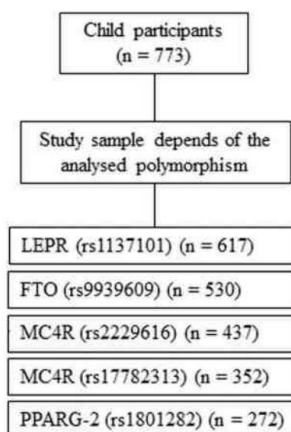


Fig. 1 Flowchart of subject participation according to the selected polymorphism

study, further reducing the sample size to 1496 children. For polymorphism analysis, 773 children were enrolled (Fig. 1). To address the possibility of self-selection bias, we compared anthropometric and biochemical data between selected and non-selected participants. No significant differences were found (data not shown).

Anthropometric and bioelectrical impedance analysis

Clinical assessments were performed in the schools under the supervision of two pediatric consultants. All anthropometric measurements (weight, height, BMI, BMI *z*-score (zBMI), waist circumference (WC), hip circumference (HC), waist-hip ratio (WHR), waist-circumference-to-height ratio (WHtR), mid-upper arm circumference (MUAC), calf circumference (CC), percent body fat (%BF), percent skeletal muscle (%SM), and resting metabolic rate (RMR)) were obtained from barefoot participants dressed with lightweight clothing using methods described previously [30]. zBMI was determined using the least mean squares method [30]. Children were categorized as normal weight (control group) or overweight/obese (case group) per the World Obesity/Policy and Prevention standards [formerly International Obesity Task Force (IOTF)] [31].

Biochemical analysis

Participants were instructed to fast for 12 hours before venipuncture for blood sampling in the morning at school. Blood samples were refrigerated at approximately 5 °C until transferred to our center immediately processed for serum

separation, frozen at −80 °C on the same day, and stored until further analysis. The following serum biochemical parameters were assessed: total cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL-c), low-density lipoprotein (LDL-c), triglycerides (TG), apolipoproteins A1 (Apo 1) and B (Apo B), glucose, creatinine, total proteins, ferritin, serum insulin and leptin. The homeostasis model assessment of insulin resistance (Homa-IR) was calculated from glucose (mg/dl) and insulin (μU/ml) using the following formula: $Homa-IR = (insulin \ (\mu U/ml) \times glucose \ (mg/dl))/405$. All assessments were made using methods previously described [Furtado JM, Almeida SM, Mascarenhas, P, et al. Anthropometric features as predictors of atherogenic dyslipidemia and cardiovascular risk in a large population of school-aged children. (Under review)].

Genotyping

Genomic DNA was extracted from a whole peripheral blood sample using the MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (Roche Diagnosis, 03730964001) and the MagNA Pure Compact Instrument (Roche Diagnostics GmbH, Germany) per the manufacturer's instructions. DNA samples were stored at −20 °C until use. Real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed in 96-well plates on an automated LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics, Vienna, Austria) using LightCycler FastStart DNA Master Hybprobe (Roche Diagnostics, Berlin, Germany) and LightSNPs (rs1137101 LEPR, rs9939609 FTO, rs2229616 and rs17782313 MC4R, and rs1801282 PPARG-2; TIB Molbiol Synthese labor, Berlin, Germany). The initial step for the allelic discrimination genotyping assay protocol included preincubation at 95 °C for 4 min, followed by 45 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, and annealing, extension, and detection for 40 s at 60 °C. To assess genotyping reproducibility, 10% of the sample was double-genotyped for all SNPs. Concordance rates >99% were obtained for the five tested SNPs. For negative control, Sterile PCR-grade H₂O was used for the negative control.

Statistical analysis

SPSS Statistics (IBM, version 24, Armonk, NY, USA) was used for all statistical test procedures. Unless otherwise indicated, variables in tables are means ± standard deviations. Multiple comparisons were made by pairwise *t*-tests with Dunn-Bonferroni adjustment. Pearson's chi-square statistic was utilized to examine allele/genotype distribution differences across categories and to test for Hardy-Weinberg equilibrium. Phenotype mean differences for each SNP genotype were obtained against the homozygous wild type genotype. Genotype and allele effects on BMI

Table 1 Descriptive clinical characteristics of the study population

Characteristic	Overall Mean ± SD	Gender		IOTF category ^a	
		Male Mean ± SD	Female Mean ± SD	Normal weight Mean ± SD	Overweight/obese Mean ± SD
Age ^{b, c}	9.81 ± 0.59	9.81 ± 0.61 _a	9.80 ± 0.57 _a	9.81 ± 0.60 ^c	9.76 ± 0.59 ^c
<i>Anthropometry</i>					
Weight (kg) ^e	35.60 ± 8.77	35.91 ± 8.50 _a	35.29 ± 9.02 _a	31.37 ± 4.95^c	45.39 ± 7.80^d
Height (cm) ^e	138.2 ± 7.2	138.7 ± 6.8_a	137.7 ± 7.4_b	136.9 ± 7.1^c	141.3 ± 6.2^d
BMI (kg/m ²) ^e	18.46 ± 3.37	18.50 ± 3.30 _a	18.42 ± 3.44 _a	16.66 ± 1.60^c	22.61 ± 2.66^d
zBMI ^e	0.65 ± 1.11	0.69 ± 1.07 _a	0.60 ± 1.14 _a	0.08 ± 0.76^c	1.97 ± 0.47^d
WC (cm) ^f	65.7 ± 9.68	65.4 ± 9.3 _a	66.0 ± 10.0 _a	61.2 ± 5.5^c	76.6 ± 9.0^d
HC (cm) ^g	71.0 ± 7.9	71.0 ± 7.8 _a	71.0 ± 8.0 _a	67.4 ± 5.2^c	80.0 ± 5.9^d
WHR (WC/HC)	0.89 ± 0.05	0.90 ± 0.05 _a	0.89 ± 0.05 _a	0.89 ± 0.05^c	0.92 ± 0.06^d
WHtR (WC/height)	0.48 ± 0.06	0.47 ± 0.06 _a	0.48 ± 0.06 _a	0.45 ± 0.35^c	0.54 ± 0.06^d
MUAC (cm) ^f	21.3 ± 3.1	21.3 ± 3.2 _a	21.3 ± 3.0 _a	19.9 ± 1.9^c	24.8 ± 2.5^d
CC (cm) ^f	29.3 ± 3.6	29.4 ± 3.5 _a	29.2 ± 3.7 _a	27.8 ± 2.6^c	32.9 ± 3.1^d
<i>Bioelectrical impedance</i>					
BF (%) ^f	21.89 ± 7.96	21.15 ± 7.36_a	22.63 ± 8.46_b	17.97 ± 5.12^c	31.16 ± 5.17^d
SM (%) ^f	31.87 ± 2.85	32.51 ± 2.78_a	31.25 ± 2.79_b	32.18 ± 2.99^c	31.15 ± 2.39^d
RMR (Kcal/day) ^f	1209 ± 114	1235 ± 120_a	1184 ± 103_b	1169 ± 90^c	1303 ± 13^d

Bold values highlights the statistically significant differences between groups

^aAccording to World Obesity/Policy and Prevention cut-offs

^bAge in days presented here as age in years. Distributions (mean ranks) vary between groups with different letters: subscript a, subscript b ($P < 0.05$)

^cDistributions (mean ranks) and medians are the same between groups ($P > 0.05$)

^dDistributions are different between groups ($P < 0.05$). Test of significance adjustment was performed using the Dun–Bonferroni correction

^e $n = 773, 381, 392, 540,$ and 233 for overall, M, F, normal weight and overweight/obese

^f $n = 661, 329, 332, 468,$ and 197 for overall, M, F, normal weight and overweight/obese

^g $n = 392, 195, 199, 278,$ and 116 for overall, M, F, normal weight and overweight/obese

BF body fat, BMI body mass index, CC calf circumference, F female, HC hip circumference, M male, MUAC mid-upper arm circumference, RMR resting metabolic rate, SM skeletal muscle, WC waist circumference, WHR waist-hip ratio, WHtR waist- circumference-to-height ratio, zBMI BMI z-score

(kg/m²) and zBMI for each SNP were calculated according to their formulae as described in Falconer [32]. Major allele dominance type was evaluated using the relationship between dominance and additive effects. Effect size for polymorphic allele on zBMI was graded according to the following cutoffs: very weak effect ($|\lambda| < 0.05$), weak effect ($0.05 < |\lambda| < 0.2$), medium effect ($0.8 > |\lambda| > 0.2$), and strong effect ($|\lambda| > 0.8$). A two-sided $P < 0.05$ determined the significance level for statistical analysis.

Results

A final sample of 773 Portuguese school children (381 boys and 392 girls) with a mean age of 9.81 years were characterized according to clinical and biochemical parameters. Significant gender-related differences were observed; relative to the values in girls, boys were significantly taller and presented higher mean values of %SM, RMR, HDL-c, Apo

A1, glucose, and creatinine, and lower mean values of %BF, LDL-c, TG, Apo B, TC/HDL, LDL/HDL, Apo B/Apo A1, TP, and leptin ($P < 0.05$) (Tables 1 and 2).

Study subjects were stratified by zBMI according to the IOTF category as normal weight (69.9%, $n = 540$) or overweight/obese (30.1%, $n = 233$). Several clinical and biochemical features became progressively poorer as BMI increased, with overweight/obese children presenting significantly higher anthropometric, bioimpedance (except for %SM), and biochemical parameters (except for TC, LDL/Apo B, creatinine, and ferritin) ($P < 0.05$) (Tables 1 and 2).

Four genes were genotyped, with three genotypes identified for each gene, namely: LEPR (AA, AG, GG); FTO (TT, AT, AA); MC4R [GG, GA, AA (rs2229616), TT, TC, CC (rs17782313)]; and PPARG-2 (CC, CG, GG). The three genotypes correspond to homozygous wild type, heterozygous, and homozygous polymorphic, respectively.

The frequencies of wild type (major) and polymorphic (minor) alleles and the genotypes for overweight/obese and

Table 2 Descriptive biochemical characteristics of the study population

Characteristic	Overall	Gender		IOTF category ^a	
	(n = 625)	Male (n = 306)	Female (n = 319)	Normal weight (n = 425)	Overweight/Obese (n = 200)
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
TC (mg/dl)	170.1 ± 31.0	169.0 ± 30.2 _a	171.2 ± 31.8 _a	169.8 ± 30.3 ^c	171.7 ± 33.2 ^c
LDL-c (mg/dl)	90.1 ± 24.4	87.3 ± 23.1_a	92.7 ± 25.3_b	88.0 ± 23.5^c	95.4 ± 25.9^d
HDL-c (mg/dl)	55.5 ± 11.2	56.5 ± 11.3_a	54.6 ± 10.9_b	57.3 ± 11.5^c	51.4 ± 9.5^d
TG (mg/dl)	61.2 ± 27.1	58.2 ± 27.0_a	64.2 ± 26.9_b	55.7 ± 21.1^c	73.6 ± 34.2^d
Apo A1 (g/L)	1.35 ± 0.18	1.37 ± 0.18_a	1.33 ± 0.17_b	1.37 ± 0.18^c	1.30 ± 0.16^d
Apo B (g/L)	0.73 ± 0.18	0.70 ± 0.17_a	0.76 ± 0.18_b	0.71 ± 0.17^c	0.77 ± 0.19^d
TC/HDL	3.14 ± 0.67	3.07 ± 0.65_a	3.21 ± 0.68_b	3.03 ± 0.61^c	3.40 ± 0.73^d
LDL/HDL	1.68 ± 0.55	1.61 ± 0.53_a	1.75 ± 0.56_b	1.59 ± 0.52^c	1.90 ± 0.56^d
Apo B/Apo A1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1_a	0.6 ± 0.2_b	0.5 ± 0.1^c	0.6 ± 0.2^d
LDL/Apo B	1.23 ± 0.16	1.24 ± 0.17 _a	1.23 ± 0.15 _a	1.23 ± 0.17^c	1.24 ± 0.14^c
Glucose (mg/dl)	78.5 ± 10.7	80.2 ± 11.2_a	76.8 ± 9.9_b	77.7 ± 10.5^c	79.8 ± 11.1^d
Creatinine (mg/dl)	0.60 ± 0.10	0.61 ± 0.09_a	0.59 ± 0.11_b	0.59 ± 0.10 ^c	0.60 ± 0.11 ^c
TP (mg/dl)	7.43 ± 0.75	7.33 ± 0.72_a	7.52 ± 0.76_b	7.36 ± 0.70^c	7.57 ± 0.84^d
Ferritin (ng/ml)	37.95 ± 21.32	36.72 ± 16.83 _a	39.12 ± 24.86 _a	37.29 ± 21.47 ^c	40.29 ± 21.29 ^c
Leptin (ng/ml) ^e	10.08 ± 11.12	7.71 ± 9.17_a	12.30 ± 12.30_b	5.27 ± 6.32^c	18.99 ± 12.57^d
Insulin (μU/ml) ^e	6.88 ± 9.58	6.74 ± 12.58 _a	7.01 ± 5.48 _a	5.29 ± 4.36^c	9.84 ± 14.69^d
Homa-IR	1.29 ± 1.20	1.17 ± 1.10 _a	1.40 ± 1.29 _a	1.04 ± 0.88^c	1.78 ± 1.56^d

Bold values highlights the statistically significant differences between groups

^aAccording to World Obesity/Policy and Prevention

^bAge in days was converted into age in years to compare groups. Distributions (mean ranks) vary between groups with different letters: subscript a, subscript b ($P < 0.05$)

^cDistributions (mean ranks) and medians are the same between groups ($P > 0.05$)

^dDistributions are different between groups ($P < 0.05$). Test of significance adjustment was performed using the Dunn-Bonferroni correction

^e $n = 330, 160, 170, 211, 119$ for overall, male, female, normal weight, overweight/obese, respectively

Apo A1 apolipoprotein A1, Apo B apolipoprotein B, HDL-c high-density lipoprotein cholesterol, LDL-c low-density lipoprotein cholesterol, TC total cholesterol, TG triglycerides, TP total proteins

normal weight children are presented in Table 3. No statistical differences were found in allele/genotype frequencies between overweight/obese (case) and normal weight (control) subjects for all polymorphisms ($P > 0.05$). The absence of a positive association was extensive, even when the polymorphism effect was analyzed by gender (Table S1) ($P > 0.05$). Genotype frequencies in both overweight/obese and normal weight were in accordance with Hardy-Weinberg equilibrium, except for the LEPR polymorphism in the control group ($P = 0.0058$) (Table 3).

The mean contribution of different genotypes of each polymorphism (mean (mean 95% CI)) were analyzed for the observed BMI, zBMI, %BF, and biochemical parameters. LEPR rs1137110 was associated with significantly lower BMI (-0.89 ($-1.68, -0.09$)) and zBMI (-0.24 ($-0.50, 0.01$)) in the GG genotype, and higher zBMI (0.13 ($-0.09, 0.35$)) in the heterozygous genotype (Table S2A). The FTO rs9939609 AG genotype was associated with significantly lower TC (-9.35 ($-16.44, -2.25$)), and the PPARG-2

rs1801282 GG genotype was associated with lower zBMI (-0.24 ($-0.50, 0.01$)) (Tables S2A and S2B). No other traits were associated with any statistical differences ($P > 0.05$) (Tables S2A and S2B).

To indirectly account for the childhood obesity propensity of each SNP, association analyses between the selected SNPs and zBMI/BMI were conducted (Table 4). Additive effects (half of the divergence between major and minor allele, homozygous outcome) of each selected SNP on zBMI resulted in the homozygous alleles for these selected SNPs were, on average $+0.12$ (FTO rs9939609), $+0.34$ (MC4R rs17782313), -0.30 (LEPR rs1137101) and -2.24 (PPARG rs1801282) zBMI units different than major allele homozygous. Conversely, the dominant effects of all SNPs for zBMI are in the opposite direction of the additive ones, reflecting a recessive zBMI inheritance pattern for these SNPs. LEPR rs1137101 and PPARG-2 rs1801282, on average, reduced zBMI / BMI (kg/m^2) by $-0.09/-0.25$ and $-0.15/-0.21$, respectively, with an average decreasing

Table 3 Allele and genotype frequencies of genetic variant polymorphisms in all subjects, overweight/obese subjects, and normal weight control subjects

Gene	SNP	Allele		<i>P</i>	Genotype			Hardy–Weinberg equilibrium test
		A	G*		AA	AG	GG	
LEPR	rs11371101	A	G*		AA	AG	GG	
	Overall	653 (0.53)	581 (0.47)		190 (0.31)	273 (0.44)	154 (0.25)	0.006**
	Overweight/obese	190 (0.56)	152 (0.44)	0.189	52 (0.3)	86 (0.5)	33 (0.19)	0.88
	Normal weight	395 (0.51)	375 (0.49)		115 (0.3)	165 (0.43)	105 (0.27)	0.0058**
FTO	rs9939609	T	A*		TT	AT	AA	
	Overall	557 (0.44)	483 (0.46)		159 (0.3)	259 (0.49)	112 (0.21)	0.73
	Overweight/obese	183 (0.55)	151 (0.45)	0.752	86 (0.3)	137 (0.47)	68 (0.23)	0.88
	Normal weight	346 (0.54)	298 (0.46)		93 (0.29)	160 (0.5)	69 (0.21)	1.00
MC4R	rs2229616	G	A*		GG	GA	AA	
	Overall	865 (0.99)	9 (0.01)		428 (0.98)	9 (0.02)	0 (0.00)	1.00
	Overweight/obese	242 (0.99)	2 (0.01)	0.600	120 (0.98)	2 (0.02)	0 (0.00)	1.00
	Normal weight	557 (0.99)	7 (0.01)		275 (0.98)	7 (0.02)	0 (0.00)	1.00
MC4R	rs17782313	T	C*		TT	TC	CC	
	Overall	554 (0.79)	150 (0.21)		222 (0.63)	110 (0.31)	20 (0.06)	0.2
	Overweight/obese	186 (0.82)	42 (0.18)	0.261	76 (0.67)	34 (0.3)	4 (0.04)	1.00
	Normal weight	330 (0.78)	94 (0.22)		132 (0.62)	66 (0.31)	14 (0.07)	0.16
PPARG-2	rs1801282	C	G*		CC	CG	GG	
	Overall	495 (0.91)	44 (0.09)		225 (0.83)	45 (0.17)	2 (0.01)	1.00
	Overweight/obese	131 (0.9)	15 (0.1)	0.539	58 (0.79)	15 (0.21)	0 (0.00)	1.00
	Normal weight	342 (0.91)	32 (0.09)		157 (0.84)	28 (0.15)	2 (0.01)	0.63

Bold values highlights the statistically significant differences between groups

CI confidence interval

*Polymorphic allele

***P* < 0.05

effect of change to minor allele (AECME) of -0.48 and -2.34 kg/m^2 on BMI, and -0.17 and -1.68 on zBMI, respectively. By contrast, FTO rs9939609 allele contributed, on average, an increase in our sample BMI by $+0.06$ kg/m^2 and zBMI by $+0.03$, with an increase in AECME of $+0.12$ kg/m^2 and $+0.06$ for BMI and zBMI, respectively. The MC4R rs17782313 allele, on average, reduced BMI by -0.12 kg/m^2 , with a decrease in AECME of -0.57 kg/m^2 on BMI, and accounted for an increase in effect of $+0.06$ zBMI units with an associated increase in zBMI AECME of $+0.26$. In general, LEPR and PPARG-2 polymorphisms had weak and medium negative (decreasing) effects on zBMI, respectively, whereas FTO rs9939609 and MC4R rs17782313 had very weak and weak positive (increasing) effects, respectively. However, the effect of PPARG-2 polymorphism was determined by screening only two polymorphic homozygous for zBMI / BMI (kg/m^2), due to the low relative frequency of the PPARG-2 polymorphic allele in the study population (9%). LEPR and PPARG-2 major alleles (wild type) showed overdominance and partial dominance for zBMI, while the major alleles showed

complete dominance for zBMI outcome in FTO rs9939609 and MC4R rs17782313 (Table 4).

We performed an association analysis of anthropometric traits, %BF, and biochemical parameters (dependent variables) on the three different genotypes (independent variable) of the selected genes using zBMI case-control groups (Tables 5 and 6). Significant differences were detected between anthropometric parameters and %BF in the LEPR polymorphism, where homozygous polymorphic normal weight children had significantly lower %BF than wild type homozygous and heterozygous ($P < 0.05$) (Table 5). Significant associations were observed for the MC4R rs17782313 CC genotypes in the overweight/obese group, with significantly higher mean scores for weight, zBMI, WC, WHR, and WHtR, and significantly lower mean scores for BMI, MUAC, CC, and %BF ($P < 0.05$) (Table 5). Higher mean scores in anthropometric parameters (height, BMI, zBMI, WC, HC, WHR, WHtR, MUAC, and CC) and %BF were also found for the FTO rs9939609 AA genotype in the overweight/obese group, whereas lower mean values of BMI, zBMI WC, WHtR, and %BF were observed for the

Table 4 Effects of polymorphisms on BMI and zBMI

	Polymorphism			
	LEPR rs11371101	FTO rs9939609	MC4R rs17782313	PPARG-2 rs1801282
BMI (kg/m²)				
Dominant effect	0.52	−0.01	0.05	1.45
Additive effect	−0.43	0.12	−0.54	−1.15
Population mean	18.56	18.7	18.37	18.3
Minor allele average effect	−0.25	0.06	−0.12	−0.21
Average effect of changing to minor allele	−0.48	0.12	−0.57	−2.34
zBMI				
Dominant effect	0.28	−0.07	−0.16	0.68
Additive effect	−0.15	0.06	0.17	−1.12
Population mean	0.81	1.27	1.63	1.24
Minor allele average effect	−0.09	0.03	0.06	−0.15
Average effect of changing to minor allele	−0.17	0.06	0.26	−1.68
Major allele Dominance type on zBMI	Overdominance	Complete dominance	Complete dominance	Partial dominance
SNP effect size on population zBMI	Weak decrease	Very weak increase	Weak increase	Medium decrease*

Bold values highlights the statistically significant differences between groups

BMI body mass index, *zBMI* BMI z-score

*Based on two minor homozygous alleles

LEPR rs1137110 GG genotype; however, these differences were not statistically significant ($P > 0.05$).

Regarding the biochemical parameters, children with LEPR rs1137110 AG and GG genotypes in the normal weight group had significantly higher glucose levels than children with AA genotype ($P < 0.05$). Children with FTO rs9939609 AT and AA genotypes in the overweight/obese group had significantly lower TG levels ($P < 0.05$) (Table 6). For the same polymorphism, normal weight subjects with the AA genotype had significantly higher levels of HDL-c ($P < 0.05$) (Table 6).

Discussion

Ethnicity and environmental factors (i.e., modifying the gene expression but not its structure) may affect specific genetic variants under specific conditions, which may distinctly affect obesity-related phenotypes. Obesity can be associated with different metabolic phenotypes of atherogenic lipid profiles and insulin resistance and several studies have investigated the links between obesity, biochemical traits, and polymorphisms to establish possible mechanisms of action [29, 32–34]. This genetic information could be useful to identify children at risk, plan early interventions, and reduce the life-long burden of obesity-related diseases. However, most studies of obesity-SNP associations have

yielded controversial results, and the mechanisms underlying the increased risk of obesity conferred by specific alleles remain unclear.

LEPR rs11371101

The LEPR rs11371101 variant is one of the most frequent LEPR gene polymorphisms and the most likely to have functional consequences [35]. Previous studies reported conflicting results with either positive [21–23] or no association [36] with obesity traits and metabolic parameters. For example, Pyrzaket et al. analyzed a cohort of 101 obese children (12–18 years old) and found that the LEPR gene variant was not associated with obesity, leptin, insulin resistance, or other metabolic abnormalities [36]. Similarly, Endo et al. verified that the LEPR Gln223Arg (rs11371101) polymorphism was not associated with obesity in 553 Japanese school children aged 9–15 years [37]. A meta-analysis of case-control studies and a systematic review also reported that there was no association between the LEPR gene polymorphism and obesity [35, 38]. By contrast, Shabana and Hasnain reported that the LEPR polymorphism was associated with weight, BMI, plasma glucose levels, TC, TG, HDL-c, and LDL-c, whereas it was not associated with WC, HC, and WHR in 475 Pakistani subjects (10–78 years) [39]. Our results show no statistical association between the LEPR polymorphism,

Table 5 Comparisons of anthropometric parameters and %BF among all three genotypes in overweight/obese and normal weight subjects

Gene	SNP	Genotype	$12,3$ (n:n:n)	Weight ¹ (kg)	Height ¹ (cm)	BMI ¹ (kg/m ²)	zBMI ¹	WC ² (cm)	HC ³ (cm)	WHR (WC/HC)	WHR (WC/height)	MUAC ⁴ (cm)	CC ⁵ (cm)	BF ² (%)
LEPR	rs11371101	Overweight/obese	AA (76;64;36)	47.2 ± 9.1 _a	141.4 ± 6.2 _a	23.29 ± 2.52 _a	2.11 ± 0.47 _a	78.34 ± 8.94 _a	82.4 ± 4.8 _a	0.93 ± 0.07 _a	0.557 ± 0.058 _a	24.8 ± 2.3 _a	33.3 ± 2.6 _a	32.45 ± 4.58 _a
			AG (127;102;65)	46.2 ± 7.9 _a	142.1 ± 6.5 _a	23.58 ± 2.73 _a	2.14 ± 0.47 _a	79.44 ± 9.16 _a	82.5 ± 7.4 _a	0.93 ± 0.05 _a	0.559 ± 0.055 _a	25.4 ± 2.5 _a	34.0 ± 3.4 _a	32.76 ± 5.80 _a
			GG (50;40;24)	45.8 ± 7.4 _a	143.1 ± 5.2 _a	23.18 ± 2.29 _a	2.07 ± 0.47 _a	70.09 ± 7.24 _a	84.0 ± 7.1 _a	0.94 ± 0.08 _a	0.552 ± 0.047 _a	25.6 ± 2.0 _a	33.7 ± 2.8 _a	31.15 ± 5.09 _a
		Normal weight	AA (107;74;16)	31.9 ± 5.1 _a	137.6 ± 7.2 _a	16.95 ± 1.66 _a	0.15 ± 0.78 _a	63.67 ± 5.76 _a	67.8 ± 7.0 _a	0.92 ± 0.04 _a	0.464 ± 0.033 _a	20.2 ± 1.8 _a	28.3 ± 2.3 _a	18.43 ± 4.58 _a
			AG (138;121;32)	31.8 ± 5.1 _a	138.1 ± 7.7 _a	16.89 ± 1.62 _a	0.13 ± 0.76 _a	63.45 ± 5.87 _a	67.1 ± 6.0 _a	0.90 ± 0.04 _a	0.460 ± 0.037 _a	20.3 ± 1.9 _a	28.4 ± 2.4 _a	18.20 ± 5.26 _a
			GG (99;84;16)	31.3 ± 5.0 _a	138.0 ± 7.7 _a	16.59 ± 1.81 _a	-0.05 ± 0.87 _a	62.02 ± 5.85 _a	66.6 ± 6.1 _a	0.90 ± 0.03 _a	0.451 ± 0.040 _a	20.1 ± 2.2 _a	28.1 ± 2.4 _a	16.89 ± 5.65 _b
FTO	rs939609	Overweight/obese	TT (86;79;61)	45.1 ± 6.9 _a	141.3 ± 6.7 _a	22.81 ± 2.25 _a	2.05 ± 0.42 _a	76.25 ± 8.10 _a	80.5 ± 5.6 _a	0.92 ± 0.06 _a	0.541 ± 0.052 _a	24.7 ± 2.5 _a	32.9 ± 2.8 _a	30.91 ± 5.31 _a
			AT (137;121;94)	45.0 ± 7.8 _a	141.4 ± 6.0 _a	22.89 ± 2.74 _a	2.04 ± 0.46 _a	76.49 ± 8.94 _a	80.9 ± 6.5 _a	0.92 ± 0.06 _a	0.542 ± 0.057 _a	24.8 ± 2.2 _a	32.9 ± 3.3 _a	31.59 ± 5.44 _a
			AA (68;59;46)	46.3 ± 8.3 _a	142.1 ± 6.4 _a	23.24 ± 2.33 _a	2.12 ± 0.40 _a	77.35 ± 8.52 _a	81.7 ± 5.7 _a	0.93 ± 0.06 _a	0.545 ± 0.051 _a	25.1 ± 2.2 _a	33.1 ± 3.1 _a	31.59 ± 5.63 _a
		Normal weight	TT (69;63;31)	31.5 ± 5.2 _a	138.0 ± 7.6 _a	16.85 ± 1.54 _a	0.16 ± 0.74 _a	62.01 ± 5.11 _a	69.7 ± 3.7 _a	0.87 ± 0.04 _a	0.451 ± 0.032 _a	20.0 ± 1.8 _a	28.0 ± 2.4 _a	18.17 ± 5.32 _a
			AT (119;100;62)	30.2 ± 4.9 _a	137.4 ± 7.1 _a	16.99 ± 1.49 _a	0.24 ± 0.71 _a	61.95 ± 5.67 _a	68.7 ± 5.0 _a	0.88 ± 0.05 _a	0.452 ± 0.035 _a	20.2 ± 1.7 _a	28.1 ± 2.3 _a	18.87 ± 4.87 _a
			AA (42;42;15)	31.8 ± 4.5 _a	136.8 ± 7.8 _a	16.56 ± 1.43 _a	0.02 ± 0.72 _a	61.03 ± 3.82 _a	67.5 ± 3.5 _a	0.88 ± 0.04 _a	0.449 ± 0.033 _a	19.8 ± 1.3 _a	28.2 ± 1.7 _a	18.00 ± 5.89 _a
MC4R	rs2229616	Overweight/obese	GG (226;204;166)	46.1 ± 8.2 _a	141.7 ± 6.2 _a	23.40 ± 2.77 _a	2.15 ± 0.46 _a	77.7 ± 9.42 _a	81.7 ± 6.0 _a	0.92 ± 0.06 _a	0.549 ± 0.060 _a	25.1 ± 2.4 _a	33.2 ± 3.3 _a	31.90 ± 5.92 _a
			GA (55;3)	52.1 ± 12.5 _a	144.4 ± 8.1 _a	24.05 ± 0.93 _a	2.29 ± 0.19 _a	80.4 ± 6.89 _a	84.0 ± 1.7 _a	0.94 ± 0.06 _a	0.556 ± 0.018 _a	25.9 ± 2.4 _a	35.0 ± 1.4 _a	32.92 ± 5.54 _a
			AA (0;0;0)											
		Normal weight	GG (199;173;84)	30.9 ± 4.9 _a	137.3 ± 7.2 _a	16.59 ± 1.51 _a	0.04 ± 0.73 _a	61.3 ± 4.76 _a	68.5 ± 4.3 _a	0.88 ± 0.05 _a	0.449 ± 0.031 _a	19.7 ± 1.7 _a	27.8 ± 2.1 _a	17.68 ± 5.24 _a
			GA (44;4)	33.5 ± 8.3 _a	137.7 ± 9.6 _a	16.25 ± 1.48 _a	-0.10 ± 0.70 _a	60.3 ± 7.43 _a	67.5 ± 1.3 _a	0.84 ± 0.05 _a	0.438 ± 0.027 _a	19.3 ± 2.5 _a	27.9 ± 2.8 _a	16.80 ± 5.68 _a
			AA (0;0;0)											
MC4R	rs17782313	Overweight/obese	TT (140;124;91)	47.3 ± 8.0 _{a,b}	142.6 ± 6.1 _a	23.92 ± 2.75 _a	2.22 ± 0.47 _a	79.5 ± 9.07 _a	83.3 ± 6.1 _a	0.93 ± 0.07 _a	0.559 ± 0.058 _a	25.6 ± 2.4 _a	34.0 ± 3.2 _a	32.93 ± 5.51 _a
			TC (77;69;57)	45.3 ± 6.8 _a	141.6 ± 5.8 _a	22.69 ± 2.11 _b	2.03 ± 0.40 _a	75.2 ± 7.98 _a	80.3 ± 5.2 _a	0.92 ± 0.06 _a	0.532 ± 0.051 _a	24.7 ± 2.0 _b	32.4 ± 2.8 _a	30.82 ± 4.91 _b
			CC (15;15;11)	57.4 ± 17.1 _b	141.7 ± 7.1 _a	23.89 ± 4.21 _b	2.26 ± 0.50 _{a,b}	80.6 ± 12.21 _a	81.5 ± 5.6 _a	0.94 ± 0.06 _a	0.568 ± 0.074 _{a,b}	25.2 ± 3.0 _{a,b}	33.3 ± 3.4 _a	31.35 ± 8.5 _b
		Normal weight	TT (80;67;32)	31.5 ± 5.1 _a	137.3 ± 7.6 _a	16.74 ± 1.37 _a	0.13 ± 0.66 _a	61.3 ± 4.76 _a	68.1 ± 4.2 _a	0.87 ± 0.05 _a	0.448 ± 0.029 _a	20.0 ± 1.5 _a	28.0 ± 2.2 _a	18.09 ± 5.06 _a
			TC (32;24;8)	31.2 ± 4.9 _a	137.0 ± 6.9 _a	16.85 ± 1.77 _a	0.11 ± 0.78 _a	61.2 ± 5.53 _a	70.4 ± 4.2 _a	0.86 ± 0.06 _a	0.450 ± 0.029 _a	19.7 ± 1.9 _a	27.6 ± 2.3 _a	17.60 ± 5.80 _a
			CC (4;4;1)	29.8 ± 6.1 _a	139.5 ± 9.8 _a	16.55 ± 1.49 _a	0.04 ± 0.76 _a	64.6 ± 6.51 _a	71.0 ^a	0.82 ^a	0.455 ± 0.012 _a	20.8 ± 1.9 _a	29.7 ± 2.1 _a	20.23 ± 5.3 _a
PPAR-2	rs1801282	Overweight/obese	CC (64;64;64)	43.2 ± 6.3 _a	139.0 ± 6.1 _a	22.04 ± 2.16 _a	1.95 ± 0.41 _a	72.70 ± 7.68 _a	79.3 ± 6.2 _a	0.92 ± 0.06 _a	0.522 ± 0.051 _a	23.9 ± 2.1 _a	31.4 ± 2.6 _a	29.96 ± 5.31 _a
			CG (12;12;12)	43.1 ± 7.3 _a	140.9 ± 7.8 _a	21.42 ± 1.18 _a	1.79 ± 0.28 _a	72.54 ± 4.87 _a	79.5 ± 5.2 _a	0.91 ± 0.04 _a	0.515 ± 0.023 _a	24.0 ± 1.3 _a	31.7 ± 2.1 _a	29.40 ± 3.69 _a
			GG (0;0;0)											
		Normal weight	CC (140;140;140)	30.6 ± 4.9 _a	136.8 ± 7.4 _a	16.82 ± 1.55 _a	0.23 ± 0.72 _a	60.31 ± 4.29 _a	68.8 ± 5.7 _a	0.88 ± 0.05 _a	0.442 ± 0.028 _a	20.0 ± 1.9 _a	27.6 ± 2.4 _a	19.29 ± 5.70 _a
			CG (33;33;33)	30.5 ± 4.3 _a	135.3 ± 6.3 _a	16.46 ± 1.58 _a	0.02 ± 0.80 _a	59.48 ± 4.17 _a	67.4 ± 4.8 _a	0.88 ± 0.04 _a	0.440 ± 0.027 _a	19.4 ± 1.9 _a	27.0 ± 2.1 _a	18.23 ± 5.20 _a
			GG (2;2;2)	27.2 ± 2.7 _a	136.9 ± 14.0 _a	17.87 ± 0.19 _a	0.90 ± 0.00 _a	63.00 ± 4.24 _a	72.5 ± 3.5 _a	0.87 ± 0.02 _a	0.461 ± 0.016 _a	21.5 ± 0.7 _a	28.0 ± 2.8 _a	22.75 ± 2.62 _a

Bold values highlights the statistically significant differences between groups

Distributions (mean ranks) are different between groups with different letters; subscript a, subscript b ($p < 0.05$). Test of significance adjustments was performed using the Dunn–Bonferroni correction

^aThis category was not used for comparisons because there was no other category to compare

^{BF} body fat, ^{BMI} body mass index, ^{CC} calf circumference, ^{HC} hip circumference, ^{MUAC} mid-upper arm circumference, ^{RMR} resting metabolic rate, ^{WC} waist circumference, ^{WHR} waist–hip ratio, ^{WHR} waist circumference-to-height-ratio, ^{zBMI} BMI z-score

^{12,3}(n:n:n) with n = number of children for each variable

Table 6 Comparisons of biochemical parameters among all three genotypes in overweight/obese and normal weight subjects

Gene	SNP	Genotype	$10^2(n,n)$	TC ¹ (mg/dl)	LDL-C ¹ (mg/dl)	HDL-C ¹ (mg/dl)	TG ¹ (mg/dl)	Apo A1 ¹ (g/L)	Apo B ¹ (g/L)	Lep ¹ (mg/dl)	Glucose ¹ (mg/dl)	Insulin ² (μU/ml)	Homa-IR	
LEPR	rs11371101	Overweight/ obese	AA (73:42)	172.9 ± 31.1 _a	98.3 ± 24.2 _a	50.9 ± 9.1 _a	76.2 ± 36.3 _a	1.31 ± 0.14 _a	0.78 ± 0.17 _a	22.13 ± 13.56 _a	78.9 ± 10.9 _a	8.66 ± 7.34 _a	1.89 ± 1.79 _a	
			AG (117:62)	172.7 ± 31.4 _a	96.8 ± 27.3 _a	51.1 ± 8.8 _a	77.6 ± 34.2 _a	1.29 ± 0.16 _a	0.76 ± 0.20 _a	19.86 ± 12.58 _a	79.2 ± 11.3 _a	8.98 ± 8.80 _a	1.83 ± 2.03 _a	
			GG (46:23)	170.3 ± 35.7 _a	97.6 ± 27.1 _a	50.5 ± 10.0 _a	77.2 ± 32.6 _a	1.30 ± 0.16 _a	0.78 ± 0.21 _a	18.79 ± 9.88 _a	78.3 ± 12.5 _a	18.41 ± 35.27 _a	3.16 ± 7.42 _a	1.13 ± 1.05 _a
		Normal weight	AA (102:64)	166.2 ± 26.5 _a	83.6 ± 19.4 _a	56.1 ± 10.6 _a	54.6 ± 20.2 _a	1.37 ± 0.19 _a	0.73 ± 0.16 _a	5.19 ± 4.72 _a	73.6 ± 10.3 _a	5.51 ± 4.46 _a	5.39 ± 4.75 _a	0.97 ± 0.79 _a
			AG (136:80)	166.7 ± 31.2 _a	85.3 ± 24.2 _a	54.9 ± 10.4 _a	56.9 ± 21.0 _a	1.34 ± 0.16 _a	0.70 ± 0.17 _a	5.89 ± 6.53 _a	76.5 ± 11.4 _{ab}	5.89 ± 6.53 _a	5.62 ± 3.28 _a	1.11 ± 0.76 _a
			GG (99:64)	173.3 ± 36.9 _a	88.5 ± 25.9 _a	56.7 ± 12.7 _a	58.8 ± 22.3 _a	1.37 ± 0.22 _a	0.73 ± 0.19 _a	4.78 ± 4.42 _a	78.7 ± 10.5 _b	4.78 ± 4.42 _a	11.05 ± 18.57 _a	2.86 ± 5.86 _a
FTO	rs9939609	Overweight/ obese	TT (71:47)	169.4 ± 33.5 _a	94.4 ± 27.6 _a	51.1 ± 9.5 _a	86.3 ± 42.6 _a	1.29 ± 0.15 _a	0.75 ± 0.19 _a	19.15 ± 10.36 _a	79.5 ± 11.9 _a	11.05 ± 18.57 _a	2.86 ± 5.86 _a	
			AT (121:74)	172.9 ± 28.0 _a	101.3 ± 24.6 _a	51.5 ± 9.9 _a	74.1 ± 32.0 _{ab}	1.30 ± 0.17 _a	0.79 ± 0.17 _a	18.09 ± 11.46 _a	80.4 ± 11.6 _a	8.10 ± 7.75 _a	1.64 ± 1.75 _a	
			AA (65:37)	172.9 ± 28.0 _a	98.9 ± 29.1 _a	51.5 ± 9.4 _a	71.5 ± 27.4 _b	1.31 ± 0.16 _a	0.77 ± 0.21 _a	19.14 ± 12.74 _a	79.9 ± 10.1 _a	11.04 ± 23.93 _a	1.53 ± 1.45 _a	
		Normal weight	TT (69:33)	172.4 ± 29.0 _a	90.7 ± 26.3 _a	58.6 ± 9.4 _{ab}	53.7 ± 21.7 _a	1.40 ± 0.16 _a	0.73 ± 0.18 _a	5.63 ± 6.71 _a	75.0 ± 11.0 _a	5.47 ± 4.73 _a	1.09 ± 0.93 _a	
			AT (116:60)	166.5 ± 30.0 _a	86.6 ± 21.4 _a	57.4 ± 10.8 _a	55.0 ± 20.2 _a	1.36 ± 0.18 _a	0.70 ± 0.14 _a	5.17 ± 5.17 _a	76.9 ± 10.4 _a	5.09 ± 3.25 _a	0.96 ± 0.66 _a	
			AA (41:23)	172.9 ± 33.3 _a	83.7 ± 24.1 _a	62.3 ± 14.5 _b	51.9 ± 21.0 _a	1.44 ± 0.20 _a	0.70 ± 0.20 _a	2.76 ± 1.56 _a	78.7 ± 10.0 _a	5.02 ± 4.87 _a	1.05 ± 1.23 _a	
MC4R	rs2229616	Overweight/ obese	GG (190:137)	170.5 ± 30.0 _a	99.5 ± 26.6 _a	50.6 ± 9.1 _a	80.0 ± 35.1 _a	1.29 ± 0.15 _a	0.77 ± 0.18 _a	19.52 ¹ ± 12.47	80.0 ± 10.5 _a	9.68 ± 16.93 _a	1.95 ± 3.52 ^a	
			GA (5:1)	186.2 ± 31.1 _a	112.6 ± 31.4 _a	54.4 ± 12.0 _a	79.4 ± 32.5 _a	1.33 ± 0.23 _a	0.83 ± 0.23 _a	12.60 ^b	78.8 ± 3.3 _a	4.00 ^b	1.26 ^b	
			AA (0:0)	169.7 ± 30.3 _a	86.9 ± 22.7 _a	58.1 ± 11.5 _a	55.2 ± 22.0 _a	1.38 ± 0.19 _a	0.71 ± 0.17 _a	4.67 ± 4.32 ^a	76.3 ± 10.3 _a	5.34 ± 4.69 ^a	0.98 ± 0.88 ^a	
		Normal weight	GG (4:1)	159.5 ± 27.7 _a	87.5 ± 24.1 _a	55.3 ± 10.3 _a	51.0 ± 11.3 _a	1.36 ± 0.13 _a	0.70 ± 0.13 _a	9.10 ^b	73.5 ± 3.9 _a	3.60 ^b	0.69 ^b	
			AA (0:0)	170.1 ± 30.0 _a	98.9 ± 27.0 _a	50.0 ± 8.6 _a	81.3 ± 35.8 _a	1.28 ± 0.15 _a	0.77 ± 0.18 _a	21.27 ± 12.69 _a	79.3 ± 11.0 _a	11.72 ± 21.80 _a	2.30 ± 4.50 _a	
			TT (125:76)	173.1 ± 27.0 _a	99.5 ± 23.9 _a	51.9 ± 10.2 _a	77.3 ± 35.5 _a	1.32 ± 0.17 _a	0.77 ± 0.16 _a	17.07 ± 10.06 _a	80.8 ± 9.5 _a	7.66 ± 6.71 _a	1.64 ± 1.54 _a	
MC4R	rs1782313	Overweight/ obese	CC (12:8)	160.7 ± 34.5 _a	91.9 ± 29.1 _a	48.3 ± 8.2 _a	73.2 ± 28.7 _a	1.28 ± 0.16 _a	0.70 ± 0.21 _a	19.47 ± 22.67 _a	81.1 ± 9.1 _a	8.15 ± 10.36 _a	1.72 ± 2.56 _a	
			TT (79:42)	170.0 ± 32.8 _a	86.4 ± 24.1 _a	59.7 ± 12.0 _a	53.1 ± 20.3 _a	1.41 ± 0.19 _a	0.70 ± 0.18 _a	4.88 ± 6.20 _a	77.3 ± 10.0 _a	5.88 ± 5.37 _a	1.18 ± 1.19 _a	
			TC (31:16)	173.7 ± 31.7 _a	87.9 ± 24.4 _a	56.6 ± 8.5 _a	57.3 ± 17.6 _a	1.39 ± 0.15 _a	0.75 ± 0.19 _a	6.27 ± 6.70 _a	78.0 ± 10.1 _a	5.38 ± 3.35 _a	1.09 ± 0.77 _a	
		Normal weight	CC (4:2)	169.9 ± 16.4 _a	99.3 ± 11.3 _a	47.0 ± 5.0 _a	73.3 ± 35.8 _a	1.27 ± 0.16 _a	0.78 ± 0.08 _a	6.13 ± 4.20 _a	73.0 ± 10.0 _a	3.03 ± 0.81 _a	0.53 ± 0.23 _a	
			CC (44:34)	170.5 ± 36.0 _a	102.9 ± 28.7 _a	52.5 ± 10.6 _a	75.1 ± 29.2 _a	1.31 ± 0.19 _a	0.78 ± 0.18 _a	18.23 ± 11.64 _a	85.8 ± 22.4 _a	10.48 ± 12.89 _a	2.70 ± 4.54 _a	
			GG (8:6)	170.0 ± 21.8 _a	102.9 ± 16.0 _a	52.1 ± 6.4 _a	61.5 ± 21.5 _a	1.29 ± 0.18 _a	0.77 ± 0.12 _a	16.34 ± 2.67 _a	79.1 ± 9.7 _a	6.41 ± 3.75 _a	1.48 ± 0.61 _a	
Normal weight	CC (101:35)	170.8 ± 24.4 _a	93.0 ± 21.4 _a	60.5 ± 10.3 _a	58.5 ± 22.3 _a	1.39 ± 0.17 _a	0.71 ± 0.13 _a	7.42 ± 12.13 _a	78.4 ± 10.2 _a	3.70 ± 2.76 _a	0.73 ± 0.48 _a			
	CC (22:7)	174.2 ± 26.2 _a	96.7 ± 20.9 _a	58.1 ± 8.0 _a	58.2 ± 16.1 _a	1.35 ± 0.14 _a	0.75 ± 0.12 _a	4.02 ± 2.65 _a	77.0 ± 8.2 _a	3.38 ± 2.08 _a	0.67 ± 0.38 _a			
	GG (2:1)	181.5 ± 68.6 _a	96.0 ± 11.3 _a	67.0 ± 35.4 _a	54.0 ± 18.4 _a	1.91 ^a	0.75 ± 0.06 _a	9.47 ^a	80.5 ± 6.4 _a	6.43 ^a	1.21 ^a			

Bold values highlights the statistically significant differences between groups

Distributions (mean ranks) vary between groups with different letters; subscript a, subscript b ($P < 0.05$). Test of significance adjustments was performed using the Dunn-Bonferroni correction

^aThis category was not used for comparisons because there was no other category to compare

^bThis category was not used for comparisons because the sum of case ponderations was less than two

Apo A1 apolipoprotein A1, Apo B apolipoprotein B, HDL-c high-density lipoprotein cholesterol, LDL-c low-density lipoprotein cholesterol, TC total cholesterol, TG triglycerides

^{1,2}(n,n) with n = number of children for each variable

anthropometric, and metabolic parameters in normal and overweight/obese children, potentially due to a recessive weak effect on zBMI despite his high frequency (47%) in the studied population.

FTO rs9939609

FTO functions have not yet been fully established. In an in vitro study, Wu et al. reported that FTO is a co-activator of the CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) family of transcriptional regulators, required in combination with PPARG for adipocyte differentiation, suggesting a role for FTO in the epigenetic regulation of adipose tissue development and maintenance [40]. Several studies reported a positive association between this polymorphism and BMI or other obesity traits in Caucasian populations [8, 10–12], including a study of a few anthropometric parameters by Albuquerque et al. in a cohort of 730 Portuguese children (6–12 years old) [9]. The frequency of the polymorphic allele described by Albuquerque et al. is within the range of our reported values, although the effect of the minor allele on BMI was higher (0.6 kg/m²) in the previous study. Studies in Oceanic [41], African [42], and Asian [43] populations found no association between the FTO variant and BMI. By contrast Wu et al. studied Han Chinese adolescents and reported that this FTO variant was positively associated with BMI and metabolic traits such as fasting glucose, insulin, TG, and TC [44]. Conversely, Li et al. found no association between this FTO variant and BMI, WC, %BF, fasting levels of plasma glucose, hemoglobin A1C, insulin, or β -cell function (estimated by homeostasis model assessment) in an adult Han Chinese population [43]. Mängee et al. also found no associations between this FTO variant and the previous biochemical parameters, HDL-c, oxidized LDL, insulin, Homa-IR, and leptin in Austrian (Styrian) adolescents [45]. Consistent with these results, the results of the current study suggest that this polymorphism has no effect, or eventually a recessive very weak increasing one, on zBMI, despite being present at a high frequency (46%) in the studied population.

MC4R rs2229616 and rs17782313

The MC4R variant is expressed in the central nervous system, and is part of the melanocortin pathway that controls food intake and energy homeostasis [21]. The most common coding MC4R polymorphism is MC4R rs2229616 (V103I missense variant) and it was the first described as showing no association with BMI, plasma insulin, and glucose levels in white British males [46]. Another study reported similar heterozygous frequencies in lean and obese individuals (4.2 vs. 4.5%, respectively), and found no homozygous frequencies for the polymorphic allele [26].

These results are consistent with our findings and indicate that the MC4R rs2229616 polymorphic allele is rare. By contrast, Geller et al. performed a meta-analysis of 7000 individuals and reported that the MC4R polymorphic allele was negatively associated with obesity [47], consistent with the results of other studies [26, 27]. A possible mechanism underlying the protective effect of the MC4R V103I polymorphism could be an increase in energy expenditure [47]. Consistent with others, our results indicate that the MC4R rs17782313 variant is positively associated with obesity traits in overweight/obese children [22–25]. This gene variant may facilitate obesity by increasing the intake of high-energy or fatty foods or promote overeating in response to emotional eating [48]. We did not identify any differences in biochemical parameters associated with different genotypes of this polymorphism.

García-Solis et al. studied 580 children (8–13 years old) and found that heterozygous subjects for this polymorphism risk allele were significantly associated with obesity but not with TC, HDL-c, or insulin levels [22]. Furthermore, Loos et al. confirmed that BMI in children (7–11 years old) was positively associated with each additional copy of the polymorphic allele, with a BMI increase of 0.10 kg/m² and 0.13 z-score units ($P < 7.3 \times 10^{-6}$), twice of that observed in adults ($P = 0.001$) [23] and in agreement with the results of the present study (0.26 zBMI units increase for changing to minor allele). In our population, this recessive increasing effect polymorphism for zBMI yielded a weak effect size. The results from populations of African-American children remain controversial [49].

PPARG-2 rs1801282

PPARG isoforms 1 and 2 are transcription factors that activate adipocyte differentiation and mediate the expression of specific fat cell genes [28]. However, PPARG-2 rs1801282 may not be associated with obesity and type 2 diabetes *mellitus* [50]. Although we did not detect significant associations, the results showed a trend toward reduced mean BMI in heterozygous overweight/obese children than in homozygous wild type. Furthermore, our results also suggest the presence of a recessive medium decreasing effect on zBMI, although there was a low frequency (9%) of this minor allele in the studied population, which is a limitation to this finding. This is consistent with a study of 194 premenopausal Caucasian Portuguese females, which also found no significant differences in BMI between the control and case groups for this polymorphism [51]. However, a meta-analysis concluded that PPARG variants contributed to human adiposity variation and predisposition for obesity [29]. These inconsistencies may suggest that PPARG polymorphisms may be labeled differently in

different ethnic populations, or that there are dissimilar gene-environment interactions.

Conclusion

We did not detect statistical associations between LEPR rs11371101, FTO rs9939609, MC4R rs2229616, and PPARG-2 rs1801282 polymorphisms and most obesity-related phenotypes and metabolic parameters. Possible explanations could be low statistical power, low carrier frequency, or moderate sample size for some variants. Age differences and genetic environment background could also explain the effect of genes influence in a trait at different developmental stages or the same genes may have a larger impact on a trait as it develops. A longitudinal study may potentially disclose this point, allowing an exploration of the life course genetic associations with clinical and biochemical parameters. Despite these limitations, our data identifies the BMI and zBMI effects of genetic traits that are likely related to obesity, although with modest impact in younger ages, which is in agreement with other authors [9, 23]. This study demonstrates that it is possible to detect and measure the influence of genetic variants on clinical and metabolic characteristics in childhood, reinforcing the concept that there is an important interaction between genes and environment (even if the role of environmental cues may not have much impact in such younger ages) in the development of excessive weight gain and its related complications.

The current study also collected data of weight and height since child birth (Personal Child Health Record) until 9 years of age, which allowed us to determine the adiposity rebound (AR) [52] and permitted us to conclude that over 50% of children (data not shown) had an AR prior to the age of 6 years, suggesting that negative environmental factors (e.g., nutritional) are already present in early ages which may explain the high rate of overweight/obesity in our population. Another strength of this study is the characterization of five gene SNPs that were cross-matched with an extensive panel of anthropometric and biochemical parameters. To our knowledge this is the first study trying to establish an association between clinical, metabolic phenotypes and LEPR rs11371101, MC4R rs2229616 and rs17782313 and PPARG-2 rs1801282 in Portuguese children and the first association between biochemical parameters dependent from obesity and FTO rs9939609 in the same population.

Finally, this study showed that MC4R rs17782313 and FTO rs9939609 were positively associated with zBMI, with weak and very weak effects, respectively, suggesting a very scarce contribution to childhood obesity at this age. LEPR rs1137101 and PPARG-2 rs1801282 had weak and medium

negative effects on zBMI, respectively, and may slightly protect against childhood obesity. Considering that, in our prepubertal children, the impact on obesity of the SNPs of the genes included in this study is very modest, so we think that, at this age, a clinical application is not justified. Therefore we recommend further research on this topic, with longitudinal design studies or cross-sectional studies including children at a more advanced stage of development taking in account the impact of environmental factors (specially nutritional and physical activity).

Acknowledgements The authors thank the children, parents, and teachers at the participating schools, João Vintém, and Solange Campos for managing the program.

Funding This work was funded by The Directorate General of Health, Ministry of Health, and, in part, by Egas Moniz Higher Education Cooperative (Martins dos Santos). An informatics platform was funded by Rui Nabeiro (Nabeiro Group).

Author contributions J.M.F., S.A., and F.F. designed the study; S.A., F.P.F., and M.E.F. conducted anthropometric and BIA measurements; P.M. performed statistical analysis; J.M.F. and S.A. wrote the manuscript under the guidance of FPF; and J.C.F., M.P.M., and M.V. critically reviewed the preliminary draft of this manuscript. All authors read and approved the final manuscript. This manuscript was edited by BioMed Proofreading.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the Directorate General of Health, the Ministry of Science and Education of Portugal, and by the Ethics Committee of the Hospital Garcia de Orta and with the the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Ethical Committee Approval Nº 73 (30/09/2008).

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

1. Comission on Ending Childhood Obesity. Facts and figures on childhood obesity. World Health Organization (Fact sheet). <http://www.who.int/end-childhood-obesity/facts/en/> (2014). Accessed May 2017
2. Y.N. Ang, B.S. Wee, B.K. Poh, M.N. Ismail, Multifactorial influences of childhood obesity. *Curr. Obes. Rep.* 2(1), 10–22 (2012)

3. S.M. Grundy, Multifactorial causation of obesity: implications for prevention. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**(Suppl 3), 563S–572SS (1998)
4. J.V. Hjelmborg, C. Fagnani, K. Silventoinen, et al., Genetic influences on growth traits of BMI: a longitudinal study of adult twins. *Obesity* **16**(4), 847–852 (2008).
5. H.H.M. Maes, M.C. Neale, L.J. Eaves, Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav. Genet.* **27**(4), 325–351 (1997)
6. J. Wardle, S. Carnell, C.M. Haworth, R. Plomin, Evidence for a strong genetic influence on childhood adiposity despite the force of the obesogenic environment. *Am. J. Clin. Nutr.* **87**(2), 398–404 (2008)
7. A. Locke, B. Kahali, S. Berndt et al., Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature* **518**(7538), 197–206 (2015)
8. T.M. Frayling, N.J. Timpson, M.N. Weedon et al., A Common Variant in the FTO Gene Is Associated with Body Mass Index and Predisposes to Childhood and Adult Obesity. *Science* **316**(5826), 889–894 (2007)
9. D. Albuquerque, C. Nóbrega, L. Manco, Association of FTO polymorphisms with obesity and obesity-related outcomes in Portuguese children. *PLoS One* **8**(1), e54370 (2013)
10. J. Bradfield, H. Taal, N. Timpson et al., A genome-wide association meta-analysis identifies new childhood obesity loci. *Nat. Genet.* **44**(5), 526–531 (2012)
11. C. Dina, D. Meyre, S. Gallina et al., Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat. Genet.* **39**(6), 724–726 (2007)
12. A. Scuteri, S. Sanna, W.M. Chen et al., Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet.* **3**(7), e115 (2007)
13. R. Larder, M.K. Cheung, Y.C. Tung, G.S. Yeo, A.P. Coll, Where to go with FTO? *Trends. Endocrinol. Metab.* **22**(2), 53–59 (2011)
14. Y.C. Tung, G.S. Yeo, From GWAS to biology: lessons from FTO. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1220**(1), 162–171 (2011)
15. C. Buettner, A. Pocai, E.D. Muse, A.M. Etgen, M.G. Myers Jr., L. Rossetti, Critical role of STAT3 in leptin's metabolic actions. *Cell. Metab.* **4**(1), 49–60 (2006)
16. P. Wang, F.J. Yang, H. Du et al., Involvement of Leptin Receptor Long Isoform (LepRb)-STAT3 Signaling Pathway in Brain Fat Mass- and Obesity-Associated (FTO) Downregulation during Energy Restriction. *Mol. Med.* **17**(5-6), 523–532 (2011)
17. N. Yiannakouris, M. Yannakoulia, L. Melistas, J.L. Chan, D. Klimis-Zacas, C.S. Mantzoros, The Q223R polymorphism of the leptin receptor gene is significantly associated with obesity and predicts a small percentage of body weight and body composition variability. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**(9), 4434–4439 (2001)
18. Y.C. Chagnon, W.K. Chung, L. Pérusse, M. Chagnon, R.L. Leibel, C. Bouchard, Linkages and associations between the leptin receptor (LEPR) gene and human body composition in the Québec Family Study. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **23**(3), 278–286 (1999)
19. Y.C. Chagnon, J.H. Wilmore, I.B. Borecki et al., Associations between the leptin receptor gene and adiposity in middle-aged caucasian males from the HERITAGE Family Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**(1), 29–34 (2000)
20. M. Baltatzis, A. Hatzitolios, K. Tziomalos, F. Iliadis, Ch Zamboulis, Neuropeptide Y and alpha-melanocyte-stimulating hormone: Interaction in obesity and possible role in the development of hypertension. *Int. J. Clin. Pract.* **62**(9), 1432–1440 (2008)
21. Y.X. Tao, The melanocortin-4 receptor: Physiology, pharmacology, and pathophysiology. *Endocr. Rev.* **31**(4), 506–543 (2010)
22. P. Garcia-Solis, M. Reyes-Bastidas, K. Flores et al., Fat mass obesity-associated (FTO) (rs9939609) and melanocortin 4 receptor (MC4R) (rs17782313) SNP are positively associated with obesity and blood pressure in Mexican school-aged children. *Br. J. Nutr.* **10**, 1–7 (2016)
23. R.J. Loos, C.M. Lindgren, S. Li et al., Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat. Genet.* **40**(6), 768–775 (2009)
24. L. Qi, P. Kraft, D.J. Hunter, F.B. Hu, The common obesity variant near MC4R gene is associated with higher intakes of total energy and dietary fat, weight change and diabetes risk in women. *Hum. Mol. Genet.* **17**(22), 3502–3508 (2008)
25. B. Xi, G.R. Chandak, Y. Shen, Q. Wang, D. Zhou, Association between Common Polymorphism near the MC4R Gene and Obesity Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* **7**(9), e45731 (2012)
26. E.H. Young, N.J. Wareham, S. Farooqi et al., The V103I polymorphism of the MC4R gene and obesity: population based studies and meta-analysis of 29 563 individuals. *Int. J. Obes.* **31**(9), 1437–1441 (2009)
27. D. Wang, J. Ma, S. Zhang et al., Association of the MC4R V103I polymorphism with obesity: a Chinese case-control study and meta-analysis in 55,195 individuals. *Obesity* **18**(3), 573–579 (2010)
28. A.J. Vidal-Puig, R.V. Considine, M. Jimenez-Liñan et al., Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J. Clin. Invest.* **99**(10), 2416–2422 (1997)
29. L.J. Tan, H. Zhu, H. He et al., Replication of 6 obesity genes in a meta-analysis of genome-wide association studies from diverse ancestries. *PLoS One* **9**(5), e96149 (2014)
30. S.M. Almeida, J.M. Furtado, P. Mascarenhas et al., Anthropometric predictors of body fat in a large population of 9-year-old school-aged children. *Obes. Sci. Pract.* **2**(3), 272–281 (2016)
31. T.J. Cole, T. Lobstein, Extended international (IOTF) body mass index cut-offs for thinness, overweight and obesity. *Pediatr. Obes.* **7**(4), 284–294 (2012)
32. D.S. Falconer. *Introduction to Quantitative Genetics*. 4th edn. (Longmans Green, Harlow, Essex, 1981)
33. A.S. Doney, J. Dannfald, C.H. Kimber et al., The FTO Gene Is Associated With an Atherogenic Lipid Profile and Myocardial Infarction in Patients With Type 2 Diabetes A Genetics of Diabetes Audit and Research Study in Tayside Scotland (Go-DARTS) study. *Circ. Cardiovasc Genet.* **2**(3), 255–259 (2009)
34. R. Do, S.D. Bailey, K. Desbiens et al., Genetic variants of FTO influence adiposity, insulin sensitivity, leptin levels, and resting metabolic rate in the Quebec family study. *Diabetes* **57**(4), 1147–1150 (2008)
35. N. Bender, N. Allemann, D. Marek et al., Association between variants of the leptin receptor gene (LEPR) and overweight: a systematic review and an analysis of the CoLaus study. *PLoS One* **6**(10), e26157 (2011)
36. B. Pyrzak, A. Wisniewska, A. Kucharska, M. Wasik, U. Demkow, No association of LEPR Gln223Arg polymorphism with leptin, obesity or metabolic disturbances in children. *Eur. J. Med. Res.* **14** (Suppl 4), 201–204 (2009)
37. K. Endo, H. Yanagi, C. Hirano, H. Hamaguchi, S. Tsuchiya, S. Tomura, Association of Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene and no association of Gln223Arg polymorphism of the leptin receptor gene in Japanese schoolchildren with obesity. *Int. J. Obes.* **24**(4), 443–449 (2000)
38. V. Paracchini, P. Pedotti, E. Taioli, Genetics of leptin and obesity: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* **162**(2), 101–114 (2005)
39. N.A. Shabana, S. Hasnain, Association of the leptin receptor Gln223 Arg polymorphism with lipid profile in obese Pakistani subjects. *Nutrition* **31**(9), 1136–1140 (2015)
40. Q. Wu, R.A. Saunders, M. Szkudlarek-Mikho, L. Serna Ide, K.V. Chin, The obesity-associated Fto gene is a transcriptional coactivator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **401**(3), 390–395 (2010)

41. J. Ohashi, I. Naka, R. Kimura et al., FTO polymorphisms in oceanic populations. *J. Hum. Genet.* **52**(12), 1031–1035 (2007)
42. S.F. Grant, M. Li, J.P. Bradfield et al., Association analysis of the FTO gene with obesity in children of Caucasian and African ancestry reveals a common tagging SNP. *PLoS One* **3**(3), e1746 (2008)
43. H. Li, Y. Wu, R.J. Loos et al., Variants in the fat mass- and obesity-associated (FTO) gene are not associated with obesity in a Chinese Han population. *Diabetes* **57**(1), 264–268 (2008)
44. J. Wu, J. Xu, Z. Zhang et al., Association of FTO polymorphisms with obesity and metabolic parameters in Han Chinese adolescents. *PLoS One* **9**(6), e98984 (2014)
45. H. Mangge, W. Renner, G. Almer, D. Weghuber, R. Möller, R. Horejsi: Rs9939609 variant of the fat mass and obesity-associated gene and trunk obesity in adolescents. *J. Obes.* 186368 (2011)
46. T. Gotoda, J. Scott, T. Aitman, Molecular screening of the human melanocortin-4 receptor gene: identification of a missense variant showing no association with obesity, plasma glucose, or insulin. *Diabetologia* **40**(8), 976–979 (1997)
47. F. Geller, K. Reichwald, A. Dempfle et al., Melanocortin-4 receptor gene variant I103 is negatively associated with obesity. *Am. J. Hum. Genet.* **74**(3), 572–581 (2004)
48. Z. Yilmaz, C. Davis, N.J. Loxton et al., Association between MC4R rs17782313 Polymorphism and Overeating Behaviours. *Int. J. Obes.* **39**(1), 114–120 (2015)
49. S.F.A. Grant, J.P. Bradfield, H. Zhang et al., Investigation of the locus near MC4R with childhood obesity in Americans of European and African ancestry. *Obesity* **17**(7), 1461–1465 (2009)
50. E.P.M. Mato, P.E. Pokam-Fosso, B. Atogho-Tiedeu et al., The Pro12Ala polymorphism in the PPAR- γ 2 gene is not associated to obesity and type 2 diabetes mellitus in a Cameroonian population. *BMC Obes.* **3**(1), 26 (2016)
51. F.F. Carlos, J. Silva-Nunes, O. Flores, Association of FTO and PPARG polymorphisms with obesity in Portuguese women. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* **6**, 241–245 (2013)
52. M.F. Rolland-Cachera, M. Deheeger, M. Maillot, F. Bellisle, Early adiposity rebound: causes and consequences for obesity in children and adults. *Int. J. Obes.* **30**, S11–S17 (2006)

ANEXO 5

COMISSÃO DE ÉTICA

DIAGRAMA 10/01 002 2125/1007

SAPULLENES

#4772 P.001 /001

Ho Sr Presidente do C. Etica
O Dr. (vossa) Condicio para
antecip

Autenticado em Assessor do CA
de 08.09.30

(Anexo) [Handwritten signature]

[Handwritten signature]
Director Clinico
Luis Antunes

Director Clinico
Luis Antunes

A Encarregado Director
ODIA NEVES

Exmo Senhor
Presidente do Conselho de Administração
Hospital Garcia de Orta

Acta n.º 42
30/07/08

Caparica, 4 de Agosto de 2008

Junto enviamos o nosso projecto de investigação intitulado "Estudo Nutricional Bioquímico e Genético de uma população infantil pré-obesa e obesa da região Sul" Assim, vimos solicitar aprovação para este trabalho de investigação decorra na vossa instituição, visto um dos seus médicos, a Dr.ª Teresa Alves ir participar neste projecto, efectuando inquéritos nutricionais a crianças com idade de 9 anos.

De notar que a sua participação neste estudo não implicará qualquer despesa para esse Hospital.

Aguardando o vosso parecer, subscrevo-me com a mais elevada consideração.

[Handwritten signature]

O Coordenador do
Projecto Prof. Doutor
Fernando Ferraz

Departamento de Genética Médica e Nutrição Pediátrica Clínica Universitária EgasMoniz
Cidade Universitária - Quinta do Oeiras
2125 NORTE DA CAPARICA, PORTUGAL - TEL: (351) 21 2968 13 - FAX: (351) 21 2968 19 - E-mail: ajd@geneticaegasmoniz.pt

*Ho Conselho de
Administração
de 06/08/08*

Exmo. Senhor
Dr. Álvaro de Carvalho
Presidente do Conselho de Administração do Hospital Garcia de Orta EPE
Piso 0
Almada, 06-08-2008

Assunto: Parecer sobre o pedido de Realização do Trabalho de Investigação denominado: "ESTUDO NUTRICIONAL BIOQUÍMICO E GENÉTICO DE UMA POPULAÇÃO INFANTIL PRÉ-OBESA E OBESA DA REGIÃO SUL", a realizar em parte no Serviço de Cirurgia Pediátrica, sendo investigadora principal a Dr.ª. Teresa Alves.

- Trata-se de um trabalho de investigação cujo o pedido de licenciamento preenche todos os requisitos exigidos por lei.
- O trabalho de investigação a decorrer nesta instituição, implica a realização de inquéritos nutricionais a uma amostra de crianças com idade de 9 anos.
- Não envolve qualquer intervenção terapêutica extra nem encargos para o hospital.
- O impresso para o Consentimento Informado está escrito de forma completa e compreensível.
- Os dados dos doentes serão colhidos de forma anónima e sob estrita confidencialidade

Do ponto de vista ético não vemos qualquer obstáculo ao início do estudo.

O estudo pode prosseguir.

Com os melhores cumprimentos,

A Comissão de Ética


(Jorge Fonseca)

*Luís de Sousa
Comissão de Ética*

ANEXO 6

CONSENTIMENTO INFORMADO

Centro de Genética Médica e Nutrição Pediátrica Egas Moniz
Campus Universitário - Quinta da Granja
2829-511 MONTE DA CAPARICA, PORTUGAL
TELEF.: (351) 21 294 68 41 – FAX: (351) 21 294 68 09
E-mail: cgmnp@egasmoniz.edu.pt

NUTRIÇÃO E OBESIDADE EM CRIANÇAS

Aos Pais/Encarregados de Educação

A **obesidade** representa um verdadeiro problema de Saúde Pública cuja frequência tem vindo a aumentar. Na **União Europeia, Portugal** é um dos países com uma percentagem de obesidade infantil das mais elevadas.

Este **Centro** no âmbito do **Programa Nacional de Combate à Obesidade** e com o patrocínio do **Ministério da Saúde, Ministério da Educação e Confederação Nacional das Associações de Pais**, está a realizar um estudo com o objectivo de melhor conhecer os factores envolvidos na origem da obesidade e assim contribuir para um melhor bem-estar e saúde da criança.

Julgamos ser muito importante que os **Pais/Encarregados de Educação** compreendam o interesse em que os seus filhos participem neste estudo, e a enorme importância da **colheita de sangue** que a experiência mostrou que muitas vezes irá revelar valores fora do normal. Esses dados deverão ser comunicados ao Pediatra/Médico de Família para que este possa tomar as medidas julgadas adequadas.

A experiência tem demonstrado que, para além do referido, um número importante de **crianças com peso e altura adequados à idade** podem apresentar valores fora do normal.

Este Projecto será efectuado em crianças nascidas entre **01/09/2002 e 30/06/2004**.

Julgamos **ser muito importante para as crianças** a sua participação neste estudo.

A Coordenadora da Escola



CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Aluno (a) _____ (nome e apelido),
Encarregado de Educação _____ (nome e apelido),
Escola _____, _____ ano, turma _____.

O Professor Doutor Fernando Ferraz, responsável pelo Centro de Genética Médica e Nutrição Pediátrica Da Clínica Universitária Egas Moniz, propôs-nos participar num estudo de investigação intitulado "Estudo Nutricional, Bioquímico e Genético de uma População Infantil Pré-obesa e Obesa da Região Sul", elaborado por este Centro, com o apoio financeiro da Direcção Geral da Saúde e em colaboração com as Direcções Regionais de Educação de Lisboa e do Alentejo e ainda com a Confederação Nacional das Associações de Pais.

Fomos informados que somos livres de aceitar ou de recusar participar no referido estudo, sem que isso altere as nossas relações no que diz respeito aos cuidados a serem prestados pelo Centro de Saúde.

A fim de esclarecer a nossa decisão, recebemos e bem compreendemos as seguintes informações:

- A investigação tem como objectivo o estudo sob o ponto de vista nutricional, antropométrico, bioquímico e genético de uma população infantil Pré obesa e/ou obesa;
- A participação consiste em:
 - recolha de antecedentes pessoais e familiares;
 - recolha de dados antropométricos (peso, altura, pregas cutâneas, perímetros);
 - determinação da bio impedância;
 - preenchimento de um inquérito alimentar;
 - recolha de dados sobre a prática do exercício físico;
 - recolha de dados para preenchimento de uma Escala de Graffar;
 - exame oral;
 - recolha de sangue periférico e de saliva para a determinação de certos parâmetros bioquímicos, genéticos e epigenéticos.
- A consequência deste estudo será a possibilidade de poder correlacionar todos os dados obtidos para a caracterização da população infantil na tentativa de definir grupos de risco em termos de obesidade;
- O protocolo de estudo recebeu a aprovação da Comissão de Ética do Hospital Garcia de Orta.

O nosso consentimento não liberta em nada os Investigadores das suas responsabilidades. Conservamos todos os nossos direitos garantidos pela Lei.

Poderemos a todo o momento, se o desejarmos, parar a nossa participação, sem suportar alguma responsabilidade.

Os dados recolhidos são estritamente confidenciais. Autorizamos a recolha, a escolha e tratamento dos dados contidos no processo pelas pessoas sujeitas ao segredo profissional. Os resultados das colheitas serão utilizados para fins de investigação médica, clínica ou fundamental. Em nenhum caso, o nosso nome aparecerá na publicação dos resultados.

Poderemos a todo o momento pedir informação complementar.

O signatário declara que leu, compreendeu e aceita /não aceita , participar nesta Investigação nas condições acima descritas.

Assinatura do Médico ou do
Investigador que o representa

Assinatura do Encarregado de Educação

Data: ____/____/20____

B.I. nº: _____

ANEXO 7

ANEXO 8
QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR

QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR

Centro de Genética Médica e Nutrição Pediátrica Egas Moniz

Campus Universitário, Quinta da Granja, Monte de Caparica

2829-511 Caparica

Telef.: (351) 21 294 68 41 - Fax: (351) 21 294 68 09 - E-mail: cgmp@egasmoniz.edu.pt

Nome: _____

Agrupamento: _____ Ano: _____ Turma: _____

Põe um X na fila que indica o número de vezes por semana que tomas esse alimento.
Procura ser verdadeiro nas tuas respostas.

Tipo de Alimentos	Frequência Alimentar			
	Nunca	1-3 dias por semana	4-6 dias por semana	Todos os dias
Água				
Leite simples				
Leite com chocolate				
Leite com café				
Iogurte simples				
Iogurte aromas ou frutas				
Pão com manteiga/margarina				
Pão com fiambre				
Pão com queijo				
Pão com doce				
Torradas				
Cereais				
Sobremesas lácteas / outros produtos lácteos				
Carne				
Peixe				
Sopa de legumes / hortaliça				
Vegetais (legumes, salada)				
Fruta fresca				
Sumos de fruta (100%)				
Refrigerantes / chás açucarados				
Refrigerantes diet ou light				
Batata frita pacote / snacks / pipocas / aperitivos salgados				
Pizza				
Batata frita (caseira)				
Hambúguer (caseiro)				
Hambúguer McDonalds				
Salsichas				
Cachorro				
Biscoitos / Bolachas doces / Bolos / Donuts				
Rebuçados / gomas / chocolates				

Assinatura _____ Data ____/____/____

ANEXO 9

QUESTIONÁRIO DE ATIVIDADE FÍSICA

Centro de Genética Médica e Nutrição Pediátrica Egas Moniz
 Campus Universitário, Quinta da Granja, Monte de Caparica
 2829-511 Caparica
 Telef.: (351) 21 294 68 41 - Fax: (351) 21 294 68 09 – E-mail: cgmnp@egasmoniz.edu.pt

Questão 5: Participas em competições desportivas?
 Faz uma cruz no quadrado correspondente

Nunca Não participo, Sim, a nível Sim, ao nível de
 participei mas já participei interescolar um clube

Sim, nível nacional e/ou internacional

Pensa nas actividades que realizaste fora da Escola durante a semana passada (**antes e depois da Escola e no fim-de-semana**).

Por cada actividade que efectuaste durante 15 ou mais minutos num dia, marca com um X para mostrares em que dia foi realizada essa actividade.

Actividade	Segunda	Terça	Quarta	Quinta	Sexta	Sábado	Domingo
Andar							
Ginástica							
Voleibol							
Dançar							
Escalar							
Ténis							
Basquetebol							
Badminton							
Correr							
Saltar à corda							
Futebol							
Nadar							
Surfar							
Bicicleta							
Patins / skate							
Gin. Aeróbia							
Outras							

(*) Pediatric Exercise Science, 2002, 14, 269-176

Assinatura _____ Data ___ / ___ / ___



Nome: _____

Agrupamento: _____ Ano: _____ Turma: _____

QUESTIONÁRIO DE ACTIVIDADE FÍSICA (*)

O presente questionário pretende identificar o nível de actividade física das crianças, por isso, serão propostas questões sobre os vossos hábitos de educação física. Procura ser sincero nas tuas respostas.

Questão 1: Fazes actividades desportivas extra-escola (num clube ou nouro sítio)?
Faz uma cruz no quadrado correspondente

Nunca Menos de uma Uma vez por Quase todos os dias
vez por semana vez por semana semana

Questão 2: Participas em actividades de lazer (ocupação do tempo livre) sem integrares um clube?
Faz uma cruz no quadrado correspondente

Nunca Menos de uma Uma vez por Quase todos os dias
vez por semana vez por semana semana

Questão 3: Para além das horas lectivas, quantas vezes praticas desportos durante, pelo menos, vinte minutos?
Faz uma cruz no quadrado correspondente

Nunca Pelo menos de uma Entre uma vez por mês
vez por mês e uma vez por semana

Entre 2 a 3 vezes Entre 4 a 6 vezes Todos os dias
por semana por semana

Questão 4: Fora do tempo escolar, quanto tempo por semana dedicas à prática de actividades desportivas ao ponto de ficares ofegante (respirar depressa e com dificuldade) ou transpirando?
Faz uma cruz no quadrado correspondente

Nunca Entre meia-hora Entre 2 a 3 horas Entre 4 a 6 horas
e uma hora

Sete ou mais horas

ANEXO 10

SUORTE ENVIADO AOS PAIS/ENCARREGADOS DE EDUCAÇÃO RESULTADOS ANALÍTICOS

CENTRO DE GENÉTICA MÉDICA E NUTRIÇÃO PEDIÁTRICA EGAS MONIZ

Campus Universitário, Quinta da Granja, Monte de Caparica

2829-511 Caparica

Telef.: (351) 21 294 68 41 - Fax: (351) 21 294 68 09 - E-mail: cgmnp@egasmoniz.edu.pt

Ex. mo(a) Senhor(a) Encarregado de Educação do Aluno _____

_____ Escola _____

No âmbito do projecto “Estudo Nutricional, Bioquímico e Genético de uma População Infantil Pré-obesa e Obesa da Região Sul”, foi efectuado pelo Centro de Genética Médica e Nutrição Pediátrica Egas Moniz, um certo número de determinações analíticas.

Em anexo juntamos os dados já obtidos.

Caso haja necessidade de mais algum esclarecimento, queira contactar o secretariado do Centro, pelo telefone **21 294 68 13/41**, das **10H00** às **14H00** e das **15H00** às **19H00** em qualquer dia útil.

Com os melhores cumprimentos,

O Coordenador do Projecto

Prof. Doutor Fernando Ferraz



Centro de Genética Médica e Nutrição Pediátrica Egas Moniz

Nome:
IMC: 16.65⁽¹⁾

Idade à data de observação: anos
Escola: EB 1 / JI Bairro Novo - 4 - 4º - 2010/2011

BIOQUÍMICA

Análise n.º1

	Resultado	Unidades	Valores desejáveis*
Glicose	59	mg/dl	60-100
Creatinina	0.68	mg/dl	0,4-1,0
Proteínas Totais	10.1	mg/dl	6,0-8,2
Ferritina	21.9	ng/ml	20,0-140,0
Colesterol Total**	224	mg/dl	< 170
Colesterol LDL**	88	mg/dl	< 110
Colesterol HDL**	71	mg/dl	≥ 40
Colesterol Total/Colesterol HDL	3.15		
Colesterol LDL/Colesterol HDL	1.24		
Triglicéridos**	66	mg/dl	≤100
Apo A1**	1.52	g/l	> 1,2
Apo B**	0.95	g/l	< 1,2
Apo B/Apo A1	0.62		< 0,8
Mg++	2.3	mg/dl	1,2-2,8
P	4.5	mg/dl	4,5-5,6
Na+	142.8	meq/l	135-145
K+	4.2	meq/l	3,4 - 5,0
Cl-	109.1	meq/l	98 - 107
Ca++	10.9	mg/dl	8,4 - 10,4

* Para crianças com 9-10 anos de idade e pressupondo um jejum de 12 horas.

** A avaliação do perfil lipídico deve ser repetida no mínimo duas vezes, com um intervalo de duas semanas, antes que qualquer medida diagnóstica ou terapêutica seja recomendada.

⁽¹⁾ Valores normais de IMC para a idade (9-10 anos):

Sexo masculino: >13,60 - <19,40

Sexo feminino: >13,25 - <19,10

O Patologista Clínico

Data: ___/___/___



Centro de Genética Médica e Nutrição Pediátrica Egas Moniz
Campus Universitário - Quinta da Granja
2829-511 Monte de Caparica, Portugal
Telef.: (351) 21 294 68 41 - Fax: (351) 21 294 68 09
E-mail: cgmnp@egasmoniz.edu.pt



ANEXO 11

TABELAS E FIGURAS SUPLEMENTARES

RESULTADOS

Table S1. Anthropometric characteristics and sex distribution of the Project population (n = 5514)

Characteristic	IOTF grades						Sex	
	grade 3 12 / 0.2%	Thinness grade 2 37 / 0.7%	grade 1 294 / 5.3%	Normal Weight 3647 / 66.1%	Overweight + Obesity 1524 / 27.6%	Obesity 382 / 6.9%	Male 2772 / 50.3%	Female 2742 / 49.7%
Age [‡] *	9.84 ± 0.63	9.72 ± 0.54	9.85 ± 0.54	9.73 ± 0.53	9.77 ± 0.42	9.75 ± 0.60	9.78 ± 0.53 _a	9.73 ± 0.52 _a
Weight (kg)**	23.3 ± 3.4	23.6 ± 2.1	25.8 ± 2.7	31.9 ± 4.6	44.6 ± 4.2	52.7 ± 7.4	34.9 ± 8.2 _a	35.1 ± 8.2 _b
Height (cm)**	138.2 ± 8.1	134.2 ± 5.7	134.9 ± 6.4	136.9 ± 6.8	140.8 ± 5.2	142.3 ± 6.7	137.7 ± 6.8 _a	138.0 ± 7.1 _a
BMI (kg/m ²)**	12.2 ± 0.5	13.1 ± 0.2	14.1 ± 0.3	16.9 ± 1.4	22.4 ± 1.1	25.9 ± 2.2	18.3 ± 3.2 _a	18.2 ± 3.2 _b
BMI z-score**	-3.0 ± 0.5	-2.1 ± 0.2	-1.3 ± 0.2	0.3 ± 0.6	1.9 ± 0.2	2.6 ± 0.3	0.6 ± 1.1 _a	0.6 ± 1.0 _b

[‡] Age in days were converted in years for a better comparison between groups. *Distribution (mean ranks) and medians are the same between groups - Kruskal-Wallis (p>0.05) and mean test (p>0.05). **Distributions are different between groups - Kruskal-Wallis (p<0.01). Distribution (mean ranks) are different between groups with different letters: a, b [Mann-Witney (p<0.05) and Mood's test (p<0.05)]. BMI (Body Mass Index).

Table S2. Physical characteristics distributed by adiposity grades.

Characteristic	Adiposity Grades			
	Underfat Mean (n)	Normal Mean (n)	Overfat Mean (n)	Obese Mean (n)
Age [‡]	9.84 (58) _a	9.72 (2333) _a	9.69 (286) _a	9.78 (145) _a
Weight (kg)	26.71 (58) _a	33.56 (2327) _b	43.68 (284) _c	52.28 (144) _d
Height (cm)	137.2 (58) _{a,b}	137.9 (2327) _a	139.7 (284) _{b,c}	141.4 (144) _c
BMI (kg/m ²)	14.09 (58) _a	17.52 (2327) _b	22.2 (284) _c	25.99 (144) _d
BMI z-score	-1.34 (58) _a	0.43 (2327) _b	1.91 (284) _c	2.58 (144) _d
WC (cm)	55.99 (58) _a	63.24 (2284) _b	74.78 (276) _c	84.71 (142) _d
HC (cm)	62.6 (44) _a	70.3 (1831) _b	79.9 (223) _c	86.9 (101) _d
WHR (WC/HC)	0.89 (44) _a	0.89 (1831) _a	0.92 (223) _b	0.94 (101) _c
WHtR (WC/height)	0.408 (58) _a	0.458 (2284) _b	0.535 (276) _c	0.599 (142) _d
MUAC (cm)	17.6 (58) _a	20.6 (2284) _b	24.1 (276) _c	26.6 (142) _d
CC (cm)	25.5 (58) _a	28.5 (2284) _b	32.1 (276) _c	35.0 (142) _d
TSF (mm)	6.51 (11) _a	12.11 (499) _b	19.48 (61) _c	25.61 (28) _d
SSF (mm)	5.11 (11) _a	8.63(499) _a	18.16 (61) _b	27.13 (28) _c
BF (%)	7.145 (58) _a	19.849 (2333) _b	32.464 (286) _c	38.081 (145) _d
SM (%)	33.37 (58) _a	32.39(2333) _b	29.83 (286) _c	28.81 (145) _d
RMR (Kcal/day)	1098 (58) _a	1191(2333) _b	1306 (286) _c	1388 (145) _d

[‡] Age in days were converted in years for a better comparison between groups. Distribution (mean ranks) are different between groups with different letters: a, b, c, d (Mann-Whitney). The test of significance adjustments were made using Dunn-Bonferroni correction. BF (body fat), BMI (body mass index), CC (Calf Circumference), HC (hip circumference), MUAC (mid upper arm circumference), RMR (resting metabolic rate), SM (skeletal muscle), SSF (subscapular skinfold thickness), TSF (triceps skinfold thickness), WC (waist circumference), WHR (waist-hip ratio), WHtR (waist circumference-to-height-ratio).

Table S3. Anthropometric correlations with obesity indices.

	Spearman correlation													
	BMI (kg/m ²)	BMI z-score	WC (cm)	HC (cm)	WHR (WC/HC)	WHtR (WC/height)	MUAC (cm)	CC (cm)	TSF (mm)	SSF (mm)	SSF/TSF	BF (%)	SM (%)	RMR (Kcal/day)
BF (%)	0.902	0.945	0.777	0.759	0.307	0.838	0.822	0.705	0.781	0.777	0.250	----	-0.462	0.613

Study sample depends on the anthropometric parameter that is used [Spearman correlation between: %BF and: BMI z-score (2825); WC, WHtR, MUAC and CC (n = 2912); HC and WHR (n = 2236); TSF and SSF (n = 603); %SM and RMR (n = 2825)]. BF (body fat), BMI (body mass index), CC (Calf Circumference), HC (hip circumference), MUAC (mid upper arm circumference), RMR (resting metabolic rate), SM (skeletal muscle), SSF (subscapular skinfold thickness), TSF (triceps skinfold thickness), WC (waist circumference), WHR (waist-hip ratio), WHtR (waist circumference-to-height-ratio).

Table S4. Anthropometric fitting models of %BF.

Anthropometric variable vs BF (%)	Model	r ²
BMI z-score	Cubic	0.83
BMI (kg/m ²)	Cubic	0.83
WHtR (WC/height)	Quadratic	0.74
SSF (mm)	Cubic	0.72
MUAC (cm)	Cubic	0.67
WC (cm)	Quadratic	0.66
TSF (mm)	Quadratic	0.64
HC (cm)	Quadratic	0.61
Weight (kg)	Quadratic	0.61
CC (cm)	Quadratic	0.52
SSF/TSF	Cubic	0.25
WHR (WC/HC)	Quadratic	0.10

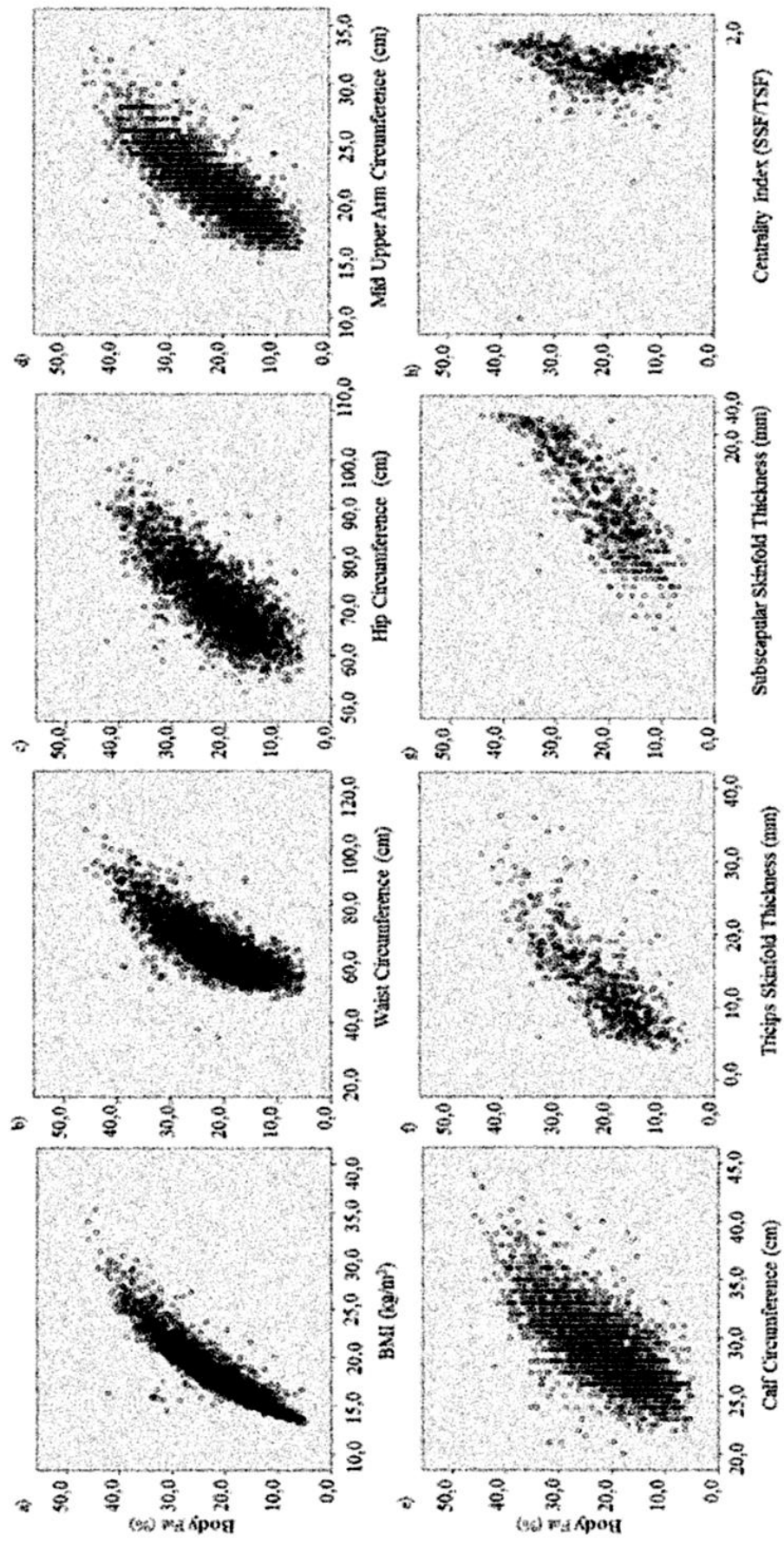
BF (body fat), BMI (body mass index), CC (Calf Circumference), HC (hip circumference), MUAC (mid upper arm circumference), SSF (subscapular skinfold thickness), TSF (triceps skinfold thickness), WC (waist circumference), WHR (waist-hip ratio), WHtR (waist circumference-to-height-ratio).

Table S5. Importance of predictors for %BF

Predictors	Importance	Predictors	Importance
BMI z-score*	0.1114	Weight (kg)	0.0448
WHtR*(WC/height)	0.0842	CC_Q*	0.0420
WHtR_Q	0.0807	CC* (cm)	0.0415
MUAC (cm)	0.0661	TSF_Q	0.0389
MUAC_Q	0.0646	SSF_Q	0.0376
WC* (cm)	0.0573	WHR_Q	0.0107
WC_Q	0.0559	WHR (WC/HC)	0.0104
HC_Q*	0.0529	Height (cm)	0.0008
HC* (cm)	0.0524	Age (y)	0.0007
SSF (mm)	0.0516	Ethnicity	0.0004
TSF (mm)	0.0500	Gender	0.0001
BMI z-score_Q	0.0451		

* Selected *a posteriori* by stepwise forward linear regression modeling. BF (body fat), BMI (body mass index), CC (Calf Circumference), HC (hip circumference), MUAC (mid upper arm circumference), _ Q (squared variable), SSF (subscapular skinfold thickness), TSF (triceps skinfold thickness), WC (waist circumference), WHR (waist-hip ratio), WHtR (waist circumference-to-height-ratio).

Figure S1



ANEXO 12

TABELAS E FIGURAS SUPLEMENTARES

RESULTADOS

S1 Table. Descriptive characteristics of the study population of children by ethnicity

<i>Characteristic</i>	Caucasian	African	Others
	(n = 1309)	(n = 171)	(n = 16)
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
Age [§]	9.71 _a ± 0.6	9.9 _b ± 0.7	9.79 _{ab} ± 0.5
<i>Anthropometry</i>			
Weight (Kg)	35.6 _a ± 8.8	36.3 _a ± 8.87	34.6 _a ± 7.51
Height (cm)	138.0 _a ± 7.3	141.1 _b ± 7.8	37.1 _{a,b} ± 7.5
BMI (Kg/m ²)	18.5 _a ± 3.27	18.1 _a ± 3.28	8.3 _a ± 2.93
zBMI	0.69 _a ± 1.07	0.46 _b ± 1.2	0.63 _{ab} ± 0.94
WC (cm)	65.5 _a ± 9.28	63.5 _b ± 8.64	63.4 _{ab} ± 6.95
HC (cm)	72.0 _a ± 7.8	71.2 _a ± 9.1	69.3 _a ± 8
WHR (WC/HC)	0.89 _a ± 0.05	0.88 _a ± 0.05	0.91 _a ± 0.04
WHtR (WC/height)	0.47 _a ± 0.06	0.45 _b ± 0.054	0.46 _{ab} ± 0.04
MUAC (cm)	21.2 _a ± 2.9	21.2 _a ± 2.9	20.4 _a ± 2.3
CC (cm)	29.2 _a ± 3.4	28.6 _a ± 3.3	28.2 _a ± 3
<i>Bioelectrical impedance</i>			
BF (%)	22.2 _a ± 7.7	20.2 _b ± 8.3	20.8 _{ab} ± 5.5
SM (%)	31.8 _a ± 2.8	32.6 _b ± 2.7	31.3 _{ab} ± 2.5
RMR (Kcal/day)	1211 _a ± 117	1219 _a ± 110	1170 _a ± 94
<i>Biochemical Parameters</i>			
Glycemia (mg/dl)	77.8 _a ± 10.7	78.7 _a ± 11.1	78.3 _a ± 13.4
TC (mg/dl)	170.4 _a ± 29	170.5 _a ± 33.1	182.5 _a ± 26.2
LDL-c (mg/dl)	94.0 _a ± 23.9	93.2 _a ± 28.3	102.3 _a ± 25.8
HDL-c (mg/dl)	56.4 _a ± 11.2	56.2 _a ± 11.1	58.7 _a ± 13.3
TG (mg/dl)	62.7 _a ± 27.1	59.5 _a ± 24.3	75.5 _a ± 28.8
APO A1 (g/L)	1.36 _a ± 0.19	1.34 _a ± 0.19	1.41 _a ± 0.15
APO B (g/L)	0.74 _a ± 0.16	0.72 _a ± 0.17	0.88 _b ± 0.3
APO B/APO A1	0.6 _a ± 0.1	0.5 _a ± 0.1	0.6 _a ± 0.2
LDL-c/Apo B	1.27 _a ± 1.5	1.27 _a ± 1.7	1.23 _a ± 2.7
TC/HDL	3.1 _a ± 0.6	3.1 _a ± 0.7	3.2 _a ± 0.8
N_HDL-c (mg/dl)	114 _a ± 26	114 _a ± 30	124 _a ± 23
LDL/HDL	1.73 _a ± 0.55	1.72 _a ± 0.6	1.82 _a ± 0.59
Total Proteins (mg/dl)	7.28 _a ± 0.7	7.42 _b ± 0.7	7.46 _{ab} ± 0.8
Ferritin (ng/ml)	39.4 _a ± 20.6	36.3 _a ± 22.1	52.5 _b ± 55.8
Creatinine (mg/dl)	0.59 _a ± 0.1	0.61 _a ± 0.1	0.6 _a ± 0.1
Insulin (μU/ml) ¹	7.1 _a ± 11.15	9.48 _a ± 15.48	4.24 _a ± 0.15
Homa-IR	1.38 _a ± 2.43	1.97 _a ± 3.45	0.75 _a ± 0.04
Leptin (ng/ml) ²	10.9 _a ± 10.7	10.9 _a ± 13.3	14.9 _a ± 9.6
oxLDL (mU/l) ³	6.6 _a ± 1.8	6.3 _a ± 2.0	6.6 _a

[§]Age in days were converted in years for a better comparison between groups. ¹(Cauc-471/Afr-45/Oth-2). ²(Cauc-458/Afr-50/Oth-8). ³(Cauc-245/Afr-16/Oth-1). Ethnic group means are compared between each characteristic through Bonferroni-adjusted t-tests. Statistical differences are reported as different associated letters: a, b (p < 0.05). APO A1 (apolipoprotein A1); APO B (apolipoprotein B); BMI (body mass index); CC (calf circumference); HC (hip circumference); HDL-c (high-density lipoproteins cholesterol); LDL-c (low-density lipoproteins cholesterol); HOMA-IR (homeostatic model assessment-insulin resistance); MUAC (mid-upper arm circumference); N_HDL-c (non-HDL cholesterol); oxLDL (oxidized low-density lipoprotein); RMR (resting metabolic rate); TC (total cholesterol); TG (triglycerides); WC (waist circumference); WHR (waist-hip ratio); WHtR (waist circumference-to-height-ratio); zBMI (BMI z-score); %BF (percentage body fat); and %SM (percentage skeletal muscle).

S2 Table: Descriptive clinical characteristics of the study population by gender and by IOTF category ^a.

Characteristic	Normal				Overweight				Obese			
	Male		Female		Male		Female		Male		Female	
	Total	Mean ± SD	Total	Mean ± SD	Total	Mean ± SD	Total	Mean ± SD	Total	Mean ± SD	Total	Mean ± SD
	(n = 1071)	(n=523)	(n=548)	(n = 312)	(n=140)	(n=172)	(n = 113)	(n=60)	(n=53)			
Age ^b	Mean ± SD	9.75 _a ± 0.59	9.75 _a ± 0.61	9.68 [*] ± 0.26	9.82 _a ± 0.76	9.57 _a ± 0.62	9.75 [*] ± 0.26	9.73 _a ± 0.51	9.78 _a ± 0.53			
Weight (Kg)	Mean ± SD	31.8 [*] ± 5.4	31.9 _a ± 5.4	31.6 _a ± 5.47	42.3 ^{***} ± 5.5	42.8 _a ± 6.1	41.9 _a ± 4.9	53.1 ^{***} ± 7.7	53.2 _a ± 7.5			
Height (cm)	Mean ± SD	137.2 [*] ± 7.4	137.6 _a ± 7.1	136.9 _a ± 7.6	140.6 ^{**} ± 6.6	141.4 _b ± 7.0	140.0 _a ± 6.2	143.4 ^{***} ± 6.6	143.2 _a ± 5.9			
BMI (Kg/m ²)	Mean ± SD	16.7 [*] ± 1.6	16.7 _a ± 1.5	16.8 _a ± 1.7	21.3 ^{**} ± 1.3	21.3 _a ± 1.3	21.3 _a ± 1.3	25.7 ^{***} ± 2.2	25.6 _a ± 2.2			
zBMI	Mean ± SD	0.12 [*] ± 0.8	0.12 _a ± 0.8	0.13 _a ± 0.8	1.7 ^{**} ± 0.3	1.8 _a ± 0.3	1.7 _a ± 0.3	2.6 ^{***} ± 0.3	2.6 _a ± 0.3			
WC (cm)	Mean ± SD	61.1 [*] ± 5.4	60.1 _a ± 4.9	61.3 _a ± 5.9	72.3 ^{**} ± 5.3	72.6 _a ± 5.3	72.1 _a ± 5.3	83.6 ^{***} ± 9.1	82.4 _a ± 9.8			
HC (cm)	Mean ± SD	68.2 [*] ± 5.6	67.6 _a ± 5.2	68.9 _a ± 5.8	78.6 ^{**} ± 4.7	78.3 _a ± 4.7	78.8 _a ± 4.7	86.0 ^{***} ± 6.5	85.6 _a ± 6.1			
WHR (WC/HC)	Mean ± SD	0.88 [*] ± 0.05	0.89 _a ± 0.05	0.88 _a ± 0.05	0.91 ^{**} ± 0.05	0.92 _a ± 0.04	0.90 _a ± 0.05	0.94 ^{***} ± 0.06	0.93 _a ± 0.07			
WHR (WC/height)	Mean ± SD	0.45 [*] ± 0.03	0.44 _a ± 0.03	0.45 _a ± 0.04	0.52 ^{**} ± 0.03	0.52 _a ± 0.03	0.52 _a ± 0.04	0.59 ^{***} ± 0.06	0.58 _a ± 0.06			
MUAC (cm)	Mean ± SD	19.9 [*] ± 1.9	19.7 _a ± 1.8	20.1 _a ± 1.9	23.7 ^{**} ± 1.6	23.8 _a ± 1.7	23.7 _a ± 1.5	26.4 ^{***} ± 2.4	26.6 _a ± 2.5			
CC (cm)	Mean ± SD	27.7 [*] ± 2.3	27.8 _a ± 2.2	27.7 _a ± 2.4	31.6 ^{**} ± 2.2	31.8 _a ± 2.2	31.5 _a ± 2.2	35.2 ^{***} ± 3.2	35.4 _a ± 2.7			
BF (%)	Mean ± SD	18.2 [*] ± 5.3	17.8 _a ± 4.96	18.55 _a ± 5.48	29.0 ^{**} ± 3.5	28.0 _a ± 3.16	29.7 _a ± 3.6	36.0 ^{***} ± 3.4	35.4 _a ± 3.2			
SM (%)	Mean ± SD	32.3 [*] ± 3.0	32.83 _a ± 3.0	31.7 _a ± 2.8	31.4 ^{**} ± 2.0	32.55 _a ± 1.9	30.46 _a ± 1.5	29.8 ^{***} ± 2.0	30.81 _a ± 1.6			
RMR (Kcal/day)	Mean ± SD	1166 [*] ± 86	1191 _a ± 85	1142 _a ± 78	1288 ^{**} ± 81	1338 _a ± 82	1249 _a ± 55	1406 ^{***} ± 117	1464 _a ± 117			

^aAccording to World Obesity/Policy & Prevention and bioelectrical impedance analysis cut-offs. ^bAge in days were converted in years for a better comparison between groups. Sex means between each characteristic were compared within each IOTF category while IOTF grade means were compared between each characteristic through Bonferroni-adjusted t-tests. Statistical differences were reported as different associated letters (a,b) or symbols (*, **, ***, ***) respectively (p < 0.05). BMI (body mass index); CC (Calf Circumference); HC (hip circumference); MUAC (mid upper arm circumference); RMR (resting metabolic rate); WC (waist circumference); WHR (waist-hip ratio); WHR (waist circumference-to-height-ratio); zBMI (BMI z-score); %BF (percentage body fat); %BF (percentage body fat); and %SM (percentage skeletal muscle).

S3 Table: Adjusted correlations between biochemical parameters.

	Total Proteins (mg/dl)	Ferritin (ng/ml)	Creatinine (mg/dl)	Leptin (ng/ml)	oxLDL (mU/L)	oxLDL/ LDL
Glycemia (mg/dl)	0.015	-0.005	0.071	0.137	0.085	0.042
Insulin (mU/L)	-0.047	-0.033	0.075	0.205	0.093	-0.072
Homa-IR	-0.058	-0.028	0.124	0.198	0.102	-0.058
TC (mg/dl)	0.310	0.073	0.069	0.079	0.639	-0.146
LDL-c (mg/dl)	0.159	0.097	0.003	0.196	0.696	-0.362
HDL-c (mg/dl)	0.054	-0.007	0.028	-0.175	-0.044	0.027
TG (mg/dl)	0.165	0.042	0.033	0.353	0.300	-0.078
APO A1 (g/L)	0.084	-0.004	0.032	-0.130	0.063	0.073
APO B (g/L)	0.251	0.099	0.024	0.152	0.602	-0.184
APO B/APO A1	0.160	0.077	-0.001	0.184	0.501	-0.188
LDL-c/Apo B	-0.076	0.026	-0.044	0.100	0.169	-0.240
TC/HDL	0.217	0.074	0.033	0.248	0.580	-0.157
LDL/HDL	0.097	0.087	-0.015	0.271	0.573	-0.302
N_ HDL-c (mg/dl)	0.318	0.079	0.064	0.156	0.700	-0.166

APO A1 (apolipoprotein A1): APO B (apolipoprotein B): HDL-c (high-density lipoproteins cholesterol): LDL-c (low-density lipoproteins cholesterol): HOMA-IR (homeostatic model assessment-insulin resistance): N_HDL-c (non-HDL cholesterol): oxLDL (oxidized low-density lipoprotein): TC (total cholesterol): TG (triglycerides).

S4 Table. Independent contributions of MUAC and CC to prediction of cardiovascular disease risk factors (adjusted for ethnicity, age, gender and waist circumference).

		Odds ratio (95% confidence interval)						
	TC (mg/dl)	LDL-c (mg/dl)	HDL-c (mg/dl)	TG (mg/dl)	Apo A1 (g/L)	Apo B (g/L)	N_HDL-c (mg/dl)	oxLDL (mU/L)
MUAC/WC	2.099 (0.285 – 15.475)*	7.284 (0.118 – 451.001)*	0.001 (0.000 – 338.38)*	0.036 (0.000 – 10.331)*	0.001 (0.000-0.684)	0.345 (0.001-93.96)*	2.210 (0.4- 12.222)*	41620 (0.003- 6.1E+11)*
CC/WC	0.674 (0.046 – 9.958)*	0.057 (0.001 – 2.226)*	0.000 (0.000 – 0.028)	0.001 (0.000 – 0.071)	0.02 (0.00-1.307)*	0.012 (0.00 -1.409)*	0.009 (0.000 – 0.268)	0.034 (0.000 – 4254.429)*

* Not significant. APO A1 (apolipoprotein A1); APO B (apolipoprotein B); CC (calf circumference); HDL-c (high-density lipoproteins cholesterol); LDL-c (low-density lipoproteins cholesterol); MUAC (mid-upper arm circumference); N_HDL-c (non-HDL cholesterol); and oxLDL (oxidized low-density lipoprotein). TC (total cholesterol); TG (triglycerides). (Adverse lipid concentrations of established cut-offs were defined as follows: total cholesterol > 170 mg/dl, LDL-c > 110 mg/dl, HDL-c < 40 mg/dl, triglycerides > 75mg/dl, APO A1 < 1.2, APO B > 0.9 g/L, N_HDL-c ≥ 120, g/L, ox-LDL > 1.38 mU/L).

TRIPOD Checklist: Prediction Model Development and Validation

Section/Topic	Item	Checklist Item	Page
Title and abstract			
Title	1	D;V Identify the study as developing and/or validating a multivariable prediction model, the target population, and the outcome to be predicted.	1
Abstract	2	D;V Provide a summary of objectives, study design, setting, participants, sample size, predictors, outcome, statistical analysis, results, and conclusions.	3-4
Introduction			
Background and objectives	3a	D;V Explain the medical context (including whether diagnostic or prognostic) and rationale for developing or validating the multivariable prediction model, including references to existing models.	6
	3b	D;V Specify the objectives, including whether the study describes the development or validation of the model or both.	6
Methods			
Source of data	4a	D;V Describe the study design or source of data (e.g., randomized trial, cohort, or registry data), separately for the development and validation data sets, if applicable.	7
	4b	D;V Specify the key study dates, including start of accrual; end of accrual; and, if applicable, end of follow-up.	7
Participants	5a	D;V Specify key elements of the study setting (e.g., primary care, secondary care, general population) including number and location of centres.	7
	5b	D;V Describe eligibility criteria for participants.	7
	5c	D;V Give details of treatments received, if relevant.	n/a
Outcome	6a	D;V Clearly define the outcome that is predicted by the prediction model, including how and when assessed.	10-11
	6b	D;V Report any actions to blind assessment of the outcome to be predicted.	n/a
Predictors	7a	D;V Clearly define all predictors used in developing or validating the multivariable prediction model, including how and when they were measured.	10-11
	7b	D;V Report any actions to blind assessment of predictors for the outcome and other predictors.	n/a
Sample size	8	D;V Explain how the study size was arrived at.	7
Missing data	9	D;V Describe how missing data were handled (e.g., complete-case analysis, single imputation, multiple imputation) with details of any imputation method.	11
Statistical analysis methods	10a	D Describe how predictors were handled in the analyses.	10
	10b	D Specify type of model, all model-building procedures (including any predictor selection), and method for internal validation.	10
	10c	V For validation, describe how the predictions were calculated.	n/a
	10d	D;V Specify all measures used to assess model performance and, if relevant, to compare multiple models.	10 and tables 5,6
	10e	V Describe any model updating (e.g., recalibration) arising from the validation, if done.	n/a
Risk groups	11	D;V Provide details on how risk groups were created, if done.	8-9
Development vs. validation	12	V For validation, identify any differences from the development data in setting, eligibility criteria, outcome, and predictors.	n/a
Results			
Participants	13a	D;V Describe the flow of participants through the study, including the number of participants with and without the outcome and, if applicable, a summary of the follow-up time. A diagram may be helpful.	11
	13b	D;V Describe the characteristics of the participants (basic demographics, clinical features, available predictors), including the number of participants with missing data for predictors and outcome.	n/a
	13c	V For validation, show a comparison with the development data of the distribution of important variables (demographics, predictors and outcome).	n/a
Model development	14a	D Specify the number of participants and outcome events in each analysis.	All tables
	14b	D If done, report the unadjusted association between each candidate predictor and outcome.	Table 3
Model specification	15a	D Present the full prediction model to allow predictions for individuals (i.e., all regression coefficients, and model intercept or baseline survival at a given time point).	n/a
	15b	D Explain how to use the prediction model.	n/a
Model performance	16	D;V Report performance measures (with CIs) for the prediction model.	Table 6
Model-updating	17	V If done, report the results from any model updating (i.e., model specification, model performance).	n/a
Discussion			
Limitations	18	D;V Discuss any limitations of the study (such as nonrepresentative sample, few events per predictor, missing data).	18
Interpretation	19a	V For validation, discuss the results with reference to performance in the development data, and any other validation data.	n/a
	19b	D;V Give an overall interpretation of the results, considering objectives, limitations, results from similar studies, and other relevant evidence.	14-18
Implications	20	D;V Discuss the potential clinical use of the model and implications for future research.	18
Other information			
Supplementary information	21	D;V Provide information about the availability of supplementary resources, such as study protocol, Web calculator, and data sets.	n/a
Funding	22	D;V Give the source of funding and the role of the funders for the present study.	2