



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MEDICINA E SAÚDE**

---



**SILVANA NEVES FERRAZ DE ASSUNÇÃO**

**CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS, METABOLISMO GLICÍDICO E DOENÇA  
HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES  
OBESOS.**

**TESE DE DOUTORADO**

**SALVADOR  
2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MEDICINA E SAÚDE**



---

**SILVANA NEVES FERRAZ DE ASSUNÇÃO**

**CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS, METABOLISMO GLICÍDICO E DOENÇA  
HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES  
OBESOS.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Saúde, da Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Medicina, da área de concentração em Medicina e Saúde.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Luciana Rodrigues Silva – Doutora em Medicina e Saúde

Coorientadores: Prof. Dr. Crésio Aragão Dantas Alves - Doutor em Medicina e Saúde

Prof. Dr. Ney Cristian Amaral Boa Sorte – Doutor em Saúde Coletiva

Salvador  
2017

Modelo de ficha catalográfica fornecido pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA para ser confeccionada pelo autor

Assunção, Silvana Neves Ferraz de  
CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS, METABOLISMO GLICÍDICO E DOENÇA  
HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCÓOLICA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES  
OBESOS / Silvana Neves Ferraz de Assunção. -- Salvador, 2017.  
49 f.

Orientadora: Luciana Rodrigues Silva.  
Coorientadora: Crésio Aragão Dantas Alves.  
Tese (Doutorado - Medicina e Saúde) -- Universidade Federal  
da Bahia, Universidade Federal da Bahia, 2017.

1. Hepatite gordurosa não alcoólica. 2. Obesidade. 3. Fígado  
gorduroso. 4. Crianças. 5. Citocinas. I. Silva, Luciana  
Rodrigues. II. Alves, Crésio Aragão Dantas . III. Título.

**SILVANA NEVES FERRAZ DE ASSUNÇÃO**

**CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS, METABOLISMO  
GLICÍDICO E DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA  
EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES OBESOS.**

Tese de autoria de Silvana Neves Ferraz de Assunção, intitulada Citocinas Pró-Inflamatórias, Metabolismo Glicídico e Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica em Crianças e Adolescentes Obesos, apresentada a Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Medicina e Saúde.

Salvador, 06 de setembro de 2017.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Eduardo Martins Netto  
Doutor em Medicina e Saúde  
Universidade Federal da Bahia

---

Prof. Ângela Peixoto de Mattos  
Doutora em Pediatria e Ciências Aplicadas à Pediatria  
Universidade Federal da Bahia

---

Prof. Antônio Ricardo Cardia Ferraz Andrade  
Doutor em Medicina e Saúde  
Universidade Federal da Bahia

---

Prof<sup>a</sup> Marilda de Souza Gonçalves  
Doutora em Genética e Biologia Molecular  
Fundação Oswaldo Cruz

---

Prof<sup>a</sup>. Ana Marice Teixeira Ladeia  
Doutora em Medicina e Saúde  
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

## RESUMO

**Introdução:** A doença hepática gordurosa não alcoólica se caracteriza pela deposição intra-hepática de gordura. É a doença hepática mais prevalente em todo o mundo, afetando não apenas adultos, mas crianças e adolescentes obesos. Sua fisiopatologia não é totalmente conhecida, embora se relacione frequentemente à resistência insulínica. Esta por sua vez seria decorrente de um estado inflamatório comum à obesidade. Assim, o objetivo desse estudo foi descrever o comportamento das citocinas pró-inflamatórias, em crianças e adolescentes obesos, com e sem doença hepática gordurosa não alcoólica, bem como no metabolismo glicídico.

**Método:** Foi conduzido um estudo transversal com 90 participantes consecutivos, na faixa etária de 8 a 18 anos, de ambos os sexos. Uma amostra de sangue em jejum foi obtida para determinações laboratoriais da glicemia em jejum e insulina basal, do Homeostasis Model Assessment Insulin-Resistance Index e dos marcadores inflamatórios TNF-alfa, interleucinas 2 e 6, interferon-gama e proteína C reativa ultrasensível. A avaliação clínica incluiu peso, altura, circunferência da cintura e pesquisa da dermatose *acanthosis nigricans*. O indicador índice de massa corporal para idade e sexo foi utilizado para avaliar a gravidade da obesidade. Os graus de esteatose foram determinados pela ultrassonografia. As variáveis quantitativas e qualitativas foram expressas respectivamente por medidas de tendência central e dispersão e frequências simples e relativa, usando o Statistical Program for Social Sciences, version 20.0. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

**Resultados:** Foram estudados 90 indivíduos, com média de idade 12,0 (2,72) anos, sendo 48 (53%) do sexo masculino. O índice de massa corporal para idade (IMC/i) e sexo do escore z classificou 38 (42,2%) participantes como obesos e 52 (57,7%) como obesos graves. A esteatose hepática foi identificada em 56 (62,2%) participantes e aproximadamente 90% destes apresentaram esteatose grau I. Os marcadores inflamatórios TNF-alfa e PCR se apresentaram aumentados na amostra estudada e se correlacionaram de forma positiva e estatisticamente significativa com o índice de massa corporal para idade e sexo. A glicemia esteve elevada em nove participantes e em um dos casos esta medida foi de 126mg/dl e a HbA1c estava na faixa de risco para diabetes mellitus tipo 2. A hiperinsulinemia esteve presente em aproximadamente 30% dos participantes.

**Conclusão:** A esteatose hepática foi prevalente no grupo de crianças e adolescentes estudados, mas não se relacionou com os graus de obesidade. Quando comparados, os indivíduos com e sem DHGNA não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros analisados, contudo, os obesos graves tiveram maiores níveis medianos de TNF-alfa e IL-6 (tendência de associação,  $p=0.059$ ), enquanto os obesos tiveram PCR mais elevada, sugerindo a presença de um estado inflamatório subjacente à obesidade. A resistência insulínica se correlacionou de forma positiva e estatisticamente significativa com a proteína C reativa nos portadores de doença hepática gordurosa não alcoólica.

**Palavras-chave:** Hepatite gordurosa não alcoólica. Obesidade. Fígado gorduroso. Crianças. Adolescentes. Citocinas.

## ABSTRACT

**Introduction:** Non-alcoholic fatty liver disease is characterized by the intrahepatic deposition of fat. It is the most prevalent liver disease in the world, affecting not only adults but obese children and adolescents. Its pathophysiology is not fully understood, although it is often related to insulin resistance. This in turn would be due to an inflammatory condition common to obesity. Thus, the objective of this study was to describe the behavior of pro-inflammatory cytokines in obese children and adolescents, with and without non-alcoholic fatty liver disease, as well as in glucose metabolism. **Method:** It was conducted a cross-sectional study with 90 consecutive obese individuals aged 8-18 years, of both sexes. A fasting venous blood sample was obtained for laboratory determinations of glycaemia, basal insulin and Homeostasis Model Assessment Insulin-Resistance Index and the inflammatory markers TNF-alpha, interleukins 2 and 6, interferon-gamma and high sensitive C-reactive protein. The clinical evaluation included weight, height, waist circumference and search of acanthosis nigricans dermatosis. We used the body mass index / age indicator for the severity of overweight assessment. The degrees of steatosis were determined by ultrasonography. Quantitative and qualitative variables were respectively expressed by measures of central tendency / dispersion and simple / relative frequency, using Statistical Program for Social Sciences, version 20.0. A p-value < 0,05 was considered significant. **Results:** A total of 90 individuals were studied, with a mean age of 11.98 (2.72) years, of which 48 (53%) were male. The BMI for age (BMI / i) and sex (z-score) classified 38 (42.2%) participants as obese and 52 (57.7%) as severe obese; Hepatic steatosis was identified in 56 (62.2%) participants and approximately 90% of them presented grade I steatosis. The inflammatory markers TNF-alpha and C-reactive protein were increased in the studied sample and correlated in a positive and statistically significant way with the index of body mass / age and sex. The glycemia was elevated in nine participants and in one case this measure was 126mg / dl and HbA1c was in the risk range for type 2 diabetes mellitus. Hyperinsulinemia was present in approximately 30% of participants. **Conclusion:** Hepatic steatosis was prevalent in the group of children and adolescents studied, but was not related to obesity degrees. When compared, individuals with and without non-alcoholic fatty liver disease didn't present significant differences in the parameters analyzed, however, the obese patients had higher median levels of TNF alpha and IL-6 (association tendency, p= 0,059), whereas the obese had higher CRP, suggesting the presence of an inflammatory state underlying obesity. Insulin resistance correlated positively and statistically with C-reactive protein in patients with non-alcoholic fatty liver disease.

**KEYWORDS:** Non-alcoholic Fatty Liver Disease. Obesity. Fatty Liver. Children. Adolescents. Cytokines.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>8</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Principal</b> .....	<b>8</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Secundários</b> .....	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1</b>	<b>Artigo 1 (Artigo de Revisão)</b> .....	<b>9</b>
	<b>Fisiopatologia da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) em Crianças e Adolescentes Obesos: Atualização</b> .....	<b>9</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>14</b>
<b>4.1</b>	<b>Artigo 2 (Artigo Original)</b> .....	<b>14</b>
	<b>Alterações da Glicose e Resistência Insulínica em Crianças e Adolescentes Obesos</b> .....	<b>14</b>
<b>4.2</b>	<b>Artigo 3 (Artigo Original)</b> .....	<b>24</b>
	<b>Citocinas Inflamatórias e Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica em Crianças e Adolescentes Obesos</b> .....	<b>24</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>40</b>
	<b>REFERÊNCIAS (INTRODUÇÃO)</b> .....	<b>41</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>42</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma importante alteração do estado nutricional que se caracteriza pela deposição anormal ou excessiva de gordura no organismo. Tem sido frequentemente observada em crianças e adolescentes, não só nos países desenvolvidos, mas, também, nos países em desenvolvimento<sup>1</sup>. Suas consequências envolvem efeitos metabólicos adversos na saúde favorecendo o desenvolvimento de comorbidades já bem evidenciadas em adultos e mais recentemente demonstradas em crianças<sup>2</sup>. Alterações metabólicas comuns à obesidade como a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), dislipidemias, hipertensão arterial, resistência à insulina e intolerância à glicose propiciam o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) que por sua vez provoca danos ao sistema circulatório e cardíaco<sup>3</sup>. A resistência à insulina desempenha um importante papel na patogênese da DHGNA, doença de alta prevalência, com potencial de evolução para cirrose e/ou carcinoma hepatocelular<sup>4</sup>. Assim, o conhecimento crescente desta doença crônica contribuirá para redução da morbimortalidade associada.

Estudo envolvendo ratos<sup>5</sup> revelou que a obesidade induz esteatose, aumenta o estresse oxidativo levando a inflamações crônicas no fígado e interrompe o balanço entre lipogênese e lipólise; embora a nível celular, as mudanças nos sensores do metabolismo e reguladores de energia sejam precariamente entendidas. Observa-se, portanto, na literatura citada, a frequente associação da obesidade a comorbidades que podem estar relacionadas à presença de um estado inflamatório caracterizado pela elevação na concentração plasmática de diversos marcadores de inflamação. Logo, citocinas inflamatórias derivadas do tecido adiposo estariam ligadas ao desenvolvimento das comorbidades comuns à obesidade, constituindo biomarcadores. Além dos marcadores inflamatórios, outros sinalizadores do estresse metabólico relacionado à obesidade, tais como hormônios (adiponectina, leptina, etc.), apolipoproteínas e moléculas de adesão endotelial estariam também relacionados. A identificação desse estado inflamatório subjacente à obesidade, em sua fase inicial, teoricamente permitiria a introdução de medidas no sentido de prevenir o desenvolvimento das comorbidades.

A busca pela literatura resultou em poucos estudos publicados e dirigidos a crianças e adolescentes com excesso ponderal. Contudo, essa relação requer investigação, não só porque



a esteatose hepática em cerca de 10% dos casos pode evoluir para cirrose e/ou carcinoma hepatocelular e o surgimento do diabetes ser iminente, mas também, porque o controle de mecanismos que antecedem o desenvolvimento das comorbidades citadas permitirá maior controle e prevenção dos danos dela decorrentes. Logo, o presente estudo verificou a frequência e a gravidade com que as citocinas inflamatórias se associaram ao perfil hepático, glicídico e lipídico de crianças e adolescentes com excesso de peso, com a finalidade de descrever um suposto estado inflamatório subjacente e incipiente ao desenvolvimento da obesidade, relacionado ao desenvolvimento de comorbidades tais como DHGNA e DM2.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Principal**

Estudar o comportamento das citocinas pró-inflamatórias, em crianças e adolescentes obesos, com e sem doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA).

### **2.2 Objetivos Secundários**

1. Investigar a relação das alterações no metabolismo glicídico e lipídico com as citocinas inflamatórias.
2. Verificar se a resistência insulínica está relacionada com a DHGNA e com a gravidade da obesidade.

### **3 REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 Artigo 1 (Artigo de Revisão)**

#### **Fisiopatologia da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) em Crianças e Adolescentes Obesos: Atualização**

Artigo nº 723-3053-1-SM, publicado no periódico *Nutrición Hospitalaria* 2017;34(3): pp.727-730.



## Revisión

### Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) pathophysiology in obese children and adolescents: update

#### *Fisiopatología de la enfermedad del hígado graso no alcohólica (EHGNA) en niños y adolescentes obesos: actualización*

Silvana Neves Ferraz de Assunção<sup>1</sup>, Ney Christian Boa Sorte<sup>2</sup>, Crésio Dantas Alves<sup>3</sup>, Patricia S. Almeida Mendes<sup>2</sup>, Carlos Roberto Brites Alves<sup>4</sup> and Luciana Rodrigues Silva<sup>5</sup>

Departments of <sup>1</sup>Anesthesiology, <sup>2</sup>Pediatry, <sup>3</sup>Endocrinology, <sup>4</sup>Infectious Diseases and <sup>5</sup>Hepatology, Universidade Federal da Bahia, Hospital Universitário Professor Edgar Santos, Salvador de Bahia, Brazil

#### Abstract

**Objective:** Although the nonalcoholic fatty liver disease was first identified in 1980, it presents multifactorial and unclear pathophysiology. In this review, we intend to update the pathophysiological mechanisms of a high morbidity and mortality associated disease that is affecting obese children worldwide.

**Data sources:** The PubMed and the Cochrane Library databases were used in the search strategy for articles related to nonalcoholic fatty liver disease and published in the last three decades.

**Data summary:** This review describes the current knowledge on the different mechanisms related to the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease focused on histological, anatomical and biochemical aspects involved in triggering steatohepatitis and leading to cirrhosis.

**Conclusions:** The clinical research and advanced technological resources demonstrated several determinants pathophysiological mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease trying to assist in their treatment and change its natural course.

#### Key words:

Non-alcoholic fatty liver disease. Fatty liver. Obesity.

#### Resumen

**Objetivo:** aunque la enfermedad de hígado graso no alcohólico se identificó por primera vez en 1980, presenta una fisiopatología multifactorial y mal definida. En esta revisión, tenemos la intención de actualizar los mecanismos fisiopatológicos de esta enfermedad con alta morbilidad y mortalidad asociadas que está afectando a niños obesos en todo el mundo.

**Fuentes de datos:** las bases de datos PubMed y la Biblioteca Cochrane se utilizaron en la estrategia de búsqueda de los artículos relacionados con la enfermedad de hígado graso no alcohólico publicados en las últimas tres décadas.

**Resumen de datos:** esta revisión describe el conocimiento actual acerca de los diferentes mecanismos relacionados con la fisiopatología de la enfermedad de hígado graso no alcohólico, con especial énfasis en aspectos histológicos, anatómicos y bioquímicos implicados en el desencadenamiento de la esteatohepatitis y conducentes a la cirrosis.

**Conclusiones:** la investigación clínica y los recursos tecnológicos avanzados han demostrado diversos mecanismos fisiopatológicos determinantes de la enfermedad de hígado graso no alcohólico, tratando de ayudar en su tratamiento y cambiar su curso.

#### Palabras clave:

Enfermedad del hígado graso no alcohólico. Hígado graso. Obesidad.

Received: 07/11/2016  
Accepted: 08/01/2017

Assunção SNF, Sorte NCB, Alves CD, Mendes PSA, Alves CRB, Silva LR. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) pathophysiology in obese children and adolescents: update. Nutr Hosp 2017;34:727-730  
DOI: <http://dx.doi.org/10.20960/nh.723>

#### Correspondence:

Silvana Neves Ferraz de Assunção. Universidade Federal da Bahia. Hospital Universitário Professor Edgar Santos. Avenida Santa Luzia, 400, Horto Florestal. Brotas, Salvador de Bahia. Brazil.  
CEP: 40.295-050  
e-mail: [Anest.silvana@gmail.com](mailto:Anest.silvana@gmail.com)

Continuous scientific medical advances in the last decades provide new insights on the pathophysiology of some intriguing health problems such as nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). First described in 1980 (1), NAFLD is a disease characterized by the accumulation of fat in the cytoplasm of hepatocytes, not related to alcohol, causing the so called fatty liver (2). The presence of at least 5% of affected hepatocytes in biopsies' fragments provides the histopathologic diagnosis of fatty liver (3). This condition is characterized as a spectrum ranging from liver steatosis to steatohepatitis (characterized by inflammation and fibrosis), and finally cirrhosis. It is, therefore, a serious condition that can cause liver failure in a short period of time (4). NAFLD is now the most common form of chronic liver disease and its prevalence is rapidly growing around the world (5). The real prevalence of NAFLD in the pediatric population is still unknown and variable, with a range of prevalence from 3.0 to 60.3% in obese children and adolescents. Its physiopathological mechanisms are not yet fully understood, although it is recognized to be increasing especially among overweight children and adolescents, with at least 50% of them presenting some degree of NAFLD (6). NAFLD prevalence is variable depending on the region, surveyed population and the mode of NAFLD diagnosis. In Europe, the prevalence of NAFLD is estimated to be 25% (7). In the United States it is estimated to be 34% in adults (8) and 10-20% in children (9). In Asia, rates about 30% are reported, despite the lower body mass index (BMI) (10). The available evidence on NAFLD-associated morbidity and mortality demonstrates that children affected by NAFLD are at increased risk of death or undergoing a liver transplant when compared to children of the same age and sex but without the disease (11). The natural history of NAFLD in children reveals a progressive evolution of the disease, leading to the development of liver cirrhosis in an expressive percentage of this population (12). NAFLD is closely related to obesity, environmental/nutritional factors, and genetic predisposition (3). Obesity, a chronic and prevalent nutritional disorder in the world, is often associated with fatty liver, hypertension, insulin resistance and dyslipidemia (13). It affects several age groups, including children and adolescents. In a murine model, obesity-induced steatosis led to an increased oxidative stress, as well as chronic inflammation of the liver (14). Insulin resistance, a frequent condition in obese patients, has a key role in the pathophysiology of NAFLD (15). Similarly, the high food intake common to obesity can cause changes in the intestinal flora, with lipid metabolism injury causing fatty liver (16). Laboratory findings in obese individuals showed increased levels of inflammatory markers, acute phase inflammation proteins, hormones, free radicals and other endothelial activation factors. This fact demonstrates the existence of an underlying inflammatory condition, determining the onset of NAFLD (17). In this review, current and comprehensive data to explain the pathophysiology of NAFLD, especially in obese children and adolescents, are described. In this population the evolution of NAFLD is more insidious than in adults, probably due to the fact that this age group does not present proper mechanisms of adaptation to metabolic changes caused by obesity. On the other hand, this population is supposedly more susceptible to therapeutic interventions, making

them a candidate to new treatment strategies to prevent evolution to end-stage liver disease.

## METHODS

We reviewed the literature related to the topic of obesity and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) available in the PubMed database, published in Portuguese and English by 2016, using the following descriptors: "non-alcoholic fatty liver disease; "fatty liver"; "obesity". The articles included involved children and adolescents of both sexes, exogenous obesity carriers and some of its comorbidities. Coincident articles and those who did not contribute methodologically to the scope of this research were excluded. The search strategy in SciELO and Medline databases using the same descriptors did not result in articles of interest for review. Thus, the search resulted in 53 articles, and after reading them, 40 were selected because they were closer to the scope of this article, which focused on two important pediatric metabolic disorders, NAFLD and obesity.

## NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE (NAFLD) PATHOPHYSIOLOGICAL ASPECTS RELATED TO OBESITY IN CHILDREN AND ADOLESCENTS

The exact mechanism that determines NAFLD remains unknown, although evidence shows that this disorder develops from primary metabolic abnormalities determined by inflammatory cytokines, insulin resistance and oxidative stress commonly found in obese patients (18). In a broader approach, obesity alters hepatic metabolism triggering one histopathological sequence of events characterized by the death of steatotic liver cells and release of enzymes that culminate in focal and non-specific inflammation (19). Additionally, in NAFLD, an accumulation of lipids in the cytoplasm of hepatocytes in the form of vacuoles which are organized by determining the fatty infiltration of the liver known as steatosis occurs, which in turn progresses to an inflammatory frame (steatohepatitis), with resulting fibrosis and liver cirrhosis (20). In the long run, NAFLD may progress to hepatocellular carcinoma (21).

According to the consensus published by the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition 2012 (22), NAFLD is defined as follows:

- *NAFLD*: the simplest form of steatosis, with moderate levels of inflammation.
- *Nonalcoholic steatohepatitis (NASH)*: accumulation of macrovacuolar intra hepatocyte with periportal inflammation, hepatocellular ballooning and perisinusoidal fibrosis.
- *Cirrhosis*: fibrosis in advanced stage with loss of liver structure.

The natural history of NAFLD shows that different mechanisms contribute in parallel to the development of NAFLD and its evolution to inflammation and fibrosis (23). Basically, the disease is the

result of the imbalance between supply and use of triglycerides and free fatty acids (FFA) in the liver and impairment of beta-oxidation of free fatty acids, which causes lipid deposits in the cytoplasm of hepatocytes (24).

Below, we summarize some of these mechanisms.

### OBESITY

Obesity, especially central obesity, often progresses to hepatic steatosis. In obese individuals we see a chronic, low grade, inflammatory condition mediated by inflammatory cytokines, including interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), as well as leptin and adiponectin, which add a significant contribution (25). Fatty liver impairment disrupts homeostasis by increasing in release of inflammatory and non-inflammatory cytokines (26). This triggers a cascade of hepatocyte injury, with production of more inflammatory mediators that leads to an impairment of liver metabolic capacity.

### INSULIN RESISTANCE

Insulin resistance is a key mechanism for the development of NAFLD in both adults and children. It is observed that in children, insulin resistance is associated with compensatory hyperinsulinemia. The association of hepatic insulin resistance with hyperinsulinemia impairs the mitochondrial oxidation process of free fatty acids and lipid peroxidation, and results in the formation and accumulation of toxic lipid metabolites such as reactive oxygen species (ROS), which causes oxidative stress and hepatocellular injury (27). Dietary factors such as high glycemic index intake and high intake of fatty meals that would jeopardize the metabolism of carbohydrates are theories proposed to explain the complex mechanism by which insulin resistance could cause the appearance of fatty liver in obesity. This diet elicits insulin release, resulting in increased plasma and hepatocellular concentrations of free fatty acids (FFA) (28). NAFLD in children would be aggravated by decreased plasma adiponectin. Adiponectin attenuates insulin action on insulin receptors through its anti-inflammatory action, preventing hepatocellular damage by free fatty acids. On the other hand, the high TNF- $\alpha$  leads to increased insulin resistance and mitochondrial production of reactive oxygen species (ROS), as well as decreased plasma levels of antioxidants such as glutathione peroxidase (29).

### GUT MICROBIOTA (INTESTINAL FLORA)

The normal intestinal flora is made up of a multitude of bacteria living in balance, performing important functions, including the immune defense. Disruption of this balance (*dysbiosis*) would increase the passage of toxins into the portal circulation, causing local inflammation, with release of inflammatory markers (30). The intestinal microbiota also influences the secretion of biliary acids,

which have a regulatory function in the digestion and metabolism of nutrients such as carbohydrates and lipids (31,32). Some available evidence suggests that alterations in the intestinal flora can lead to the development of NAFLD, and that the expression of the disease would be influenced by biliary acids (33). Studies indicate that *dysbiosis* secondary to obesity could act as a determinant of the pathophysiology of NAFLD in children and adults (34-36).

### GENETIC FACTORS

The influence of genetic factors determining NAFLD is not well elucidated, although the role of interaction between genes and environment on the onset of metabolic diseases is recognized. Genetic polymorphisms (PAI-I 6754G/5G and PPAR- $\gamma$ 2 Pro12Ala, among others) indicate a potential association with insulin resistance and obesity in children (37). Genetics plays a key role in Wilson's disease, an inherited disorder of copper metabolism in which children present predominantly hepatic manifestations (38). Ethnic background explains the variable predisposition to the development of NAFLD, which has a clearly greater frequency among Hispanics and Asians while it is lower among children of African origin (39).

### OTHER NAFLD MECHANISMS

Hereditary hemochromatosis, autoimmune hepatitis, and  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency are also implicated in the pathogenesis of NAFLD (40).

### REFERENCES

- Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980;55:434-8.
- Lewis JR, Mohanty SR. Nonalcoholic fatty liver disease: A review and update. *Dig Dis Sci* 2010;55:560-78.
- Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999;30:1356-62.
- Kemmer N, Neff GW, Franco E, Osman-Mohammed H, Leone J, Parkinson E, et al. Nonalcoholic fatty liver disease epidemic and its implications for liver transplantation. *Transplantation* 2013;96(10):860-2.
- Younossi ZM, Stepanova M, Afendy M, Fang Y, Younossi Y, Mir H, et al. Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011;9(6):524-30.
- Padiha PC, Rocha HF, Alves N, Peres WA. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in obese children and adolescents: A systematic review. *Rev Paul Pediatr* 2010;28:387-93.
- Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, Crocè LS, Brandi G, Sasso F, et al. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. *Ann Intern Med* 2000;132:112-7.
- Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, Browning JD, Reingold JS, Grundy S, et al. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: Prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;288:E462-8.
- Patton HM, Yates K, Unalp-Arida A, Behling CA, Huang TT, Rosenthal P, et al. Association between metabolic syndrome and liver histology among children with nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 2010;105:2093-102.

10. Kojima S, Watanabe N, Numata M, Ogawa T, Matsuzaki S. Increase in the prevalence of fatty liver in Japan over the past 12 years: Analysis of clinical background. *J Gastroenterol* 2003;38:954-61.
11. Feldstein AE, Charatcharoenwitthaya P, Treeprasertsuk S, Benson JT, Enders FB, Angulo P. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease in children: A follow-up study for up to 20-years. *Gut* 2009;58:1538-44.
12. Schwimmer JB, Deutsch R, Kahen T, Lavine JE, Stanley C, Behling C. Prevalence of fatty liver in children and adolescents. *Pediatrics* 2006;118:1388-93.
13. Moyer VA, Klein JD, Ockene JK, Teutsch SM, Johnson MS, Allan JD, et al. Screening for overweight in children and adolescents: Where is the evidence? A commentary by the childhood obesity working group of the US Preventive Services Task Force. *Pediatrics* 2005;116:235-8.
14. Elariny HA, Baranova A. Comment on: Diet-induced obesity associated with steatosis, oxidative stress and inflammation in liver. *Surg Obes Relat Dis* 2012;8(1):81-3.
15. Tilg H, Moschen AR. Evolving therapies for non-alcoholic steatohepatitis. *Expert Opin Drug Discov* 2014;9:687-96.
16. Moschen AR, Kaser S, Tilg H. Non-alcoholic steatohepatitis: A microbiota-driven disease. *Trends Endocrinol Metab* 2013;24:537-45.
17. De Almeida IT, Cortez-Pinto H, Fidalgo G, Rodrigues D, Camilo ME. Plasma total and free fatty acids composition in human non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Nutr* 2002;21:219-23.
18. Caprio S. Definitions and pathophysiology of the metabolic syndrome in obese children and adolescents. *Int J Obes (Lond)* 2005;29(Suppl 2):S24-5.
19. Louthan MV, Theriot JA, Zimmerman E, Stutts JT, McClain CJ. Decreased prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in black obese children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;41:426-9.
20. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002;346:1221-31.
21. Zachary D, Goodman. The impact of obesity on liver histology. *Clin Liver Dis* 2014;18:33-40.
22. Vajro P, Lenta S, Socha P, Dhawan A, McKiernan P, Baumann U, et al. Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: Position paper of the ESPGHAN Hepatology Committee. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;54:700-13.
23. Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Sem Liver Dis* 2001;21:17-26.
24. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: Summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003;37:1202-19.
25. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004;114:147-52.
26. Dandona P, Ajlada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: The link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol* 2004;25(1):4-7.
27. Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: The central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology* 2010;52:774-88.
28. Westerbacka J, Lammi K, Hakkinen AM, Rissanen A, Salminen I, Aro A, et al. Dietary fat content modifies liver fat in overweight nondiabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:2804-9.
29. Louthan MV, Barve S, McClain CJ, Joshi-Barve S. Decreased serum adiponectin: An early event in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr* 2005;147:835-8.
30. Molnar D, Decsi T, Koletzko B. Reduced antioxidant status in obese children with multimetabolic syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004;28:1197-2658.
31. Chassaing B, Etienne-Mesmin L, Gewirtz AT. Microbiota-liver axis in hepatic disease. *Hepatology* 2014;59(1):328-39.
32. Dawson PA, Karpen SJ. Intestinal transport and metabolism of bile acids. *J Lipid Res* 2015; 56(6):1085-99.
33. Hylemon PB, Zhou H, Pandak WM, Ren S, Gil G, Dent P. Bile acids as regulatory molecules. *J Lipid Res* 2009;50(8):1509-20.
34. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view. *Cell* 2012;148(6):1258-70.
35. Muzaki M, Comelli EM, Arendt BM, Bonengel J, Fung SK, Fischer SE, et al. Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2013;58(1):120-7.
36. Duncan SH, Lobley GE, Holtrop G, Ince J, Johnstone AM, Louis P, et al. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes (Lond)* 2008;32(11):1720-4.
37. Scaglioni S, Verducci E, Salvioni M, Biondi ML, Radaelli G, Agostoni C, et al. PPAR-γPro12Ala variant, insulin resistance and plasma long chain polyunsaturated fatty acids in childhood obesity. *Pediatr Res* 2006;60:485-9.
38. Ciesck S, Hadem J, Fischer J, Manns MP, Strassburg CP. A rare cause of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Intern Med* 2006;154:5.
39. Schwimmer JB, McGreal N, Deutsch R, Finegold MJ, Lavine JE. Influence of gender, race, and ethnicity on suspected fatty liver in obese adolescents. *Pediatrics* 2005;115:e561-5.
40. Nobili V, Manco M. Therapeutic strategies for pediatric non-alcoholic fatty liver disease: A challenge for health care providers. *World J Gastroenterol* 2007;13(18):2639-41.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Artigo 2 (Artigo Original)**

#### **Alterações da Glicose e Resistência Insulínica em Crianças e Adolescentes Obesos**

Artigo n° Ref:JPED\_2016\_155\_R1, aceito para publicação pelo Jornal de Pediatria.



Title: Glucose Alteration and Insulin Resistance in Asymptomatic Obese Children and Adolescents

Prezada Dra. Assunção,

Informamos que seu artigo, submetido ao Jornal de Pediatria, foi aceito e sua publicação está prevista para a revista vol. 94, n.º 3, May/June 2018. Essa programação ainda pode mudar conforme a disponibilidade da revista. No entanto, ainda faltam alguns ajustes no original. Lembre-se de que esta é sua última oportunidade de fazer correções antes da publicação final do artigo:

- Conferir o nome e a afiliação de todos os autores. Não serão aceitas correções após a publicação do artigo.
- Conferir a formatação das referências: EX: Romanelli RM, Anchieta LM, Mourão MV, Campos FA, Loyola FC, Mourão PH, et al. Risk factors and lethality of laboratory-confirmed bloodstream infection caused by non-skin contaminant pathogens in neonates. J Pediatr (Rio J). 2013;89:189-96. (6 autores, et al. Título. Periódico abreviado. Ano;Volume:páginas)
- Conferir se todas as siglas na Tabela 1 foram explicadas.

O artigo revisado deve ser enviado em um mesmo arquivo em Word (página de rosto, resumo, texto, referências, tabelas e figuras) até 30 dias para [assessoria@jped.com.br](mailto:assessoria@jped.com.br). Se não for possível submeter sua revisão até esse prazo, entre em contato conosco. Juntamente com seu artigo, envie a carta de submissão assinada pelo autor para correspondência em até duas semanas para [assessoria@jped.com.br](mailto:assessoria@jped.com.br). A carta pode ser obtida neste link: [https://drive.google.com/file/d/0B\\_Oqf3XD6kttOEQ2bzRRQjF6NG8/view?usp=sharing](https://drive.google.com/file/d/0B_Oqf3XD6kttOEQ2bzRRQjF6NG8/view?usp=sharing) O artigo ainda passará por diversas revisões de formato, linguagem e tradução. Talvez ainda seja necessário pedir algumas informações aos autores, por isso pedimos manter seu e-mail atualizado, também para o envio das provas em PDF, posteriormente. Agradecemos a submissão de seu artigo ao Jornal de Pediatria. Em caso de dúvidas, ficamos à disposição.

Atenciosamente,

Renato S. Procianoy, Editor-chefe

Jornal de Pediatria [assessoria@jped.com.br](mailto:assessoria@jped.com.br) (51) 3328-9270/3328-9520

**Alterações da Glicose e Resistência Insulínica em Crianças e Adolescentes Obesas**

## RESUMO

**Objetivo.** A obesidade está associada ao metabolismo anormal da glicose que precede o diabetes mellitus tipo 2. Assim, investigações sobre a previsão deste resultado letal devem ser antecipadas. O objetivo desse estudo foi avaliar o perfil glicêmico de crianças e adolescentes obesos assintomáticos em Salvador, Brasil. **Método.** Uma amostra de sangue venoso em jejum foi obtida de 90 indivíduos obesos com idade entre 8 e 18 anos, de ambos os sexos, para determinação laboratorial de glicemia de jejum, hemoglobina glicada, insulina basal e Homeostasis Model Assessment Insulin-Resistance Index. A avaliação clínica incluiu peso, altura, circunferência da cintura, avaliação do desenvolvimento puberal e pesquisa de acantose nigricans. O índice de massa corporal / idade e sexo foi utilizado para avaliação da gravidade da obesidade. As variáveis quantitativas e qualitativas foram expressas por medidas de tendência central / dispersão e frequência simples / relativa, respectivamente, utilizando o *Statistical Program for Social Sciences*, versão 20.0. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo. **Resultados.** Alterações glicêmicas clínicas e bioquímicas foram evidenciadas, embora estes indivíduos não apresentassem queixas ou sintomas relacionados aos níveis de açúcar no sangue. **Conclusão.** Observamos alta prevalência de distúrbios de glicose e insulina em crianças e adolescentes obesos assintomáticos.

Palavras-chave: Obesidade. Diabetes Mellitus. Hiperglicemia. Glicemia.

## INTRODUÇÃO

A obesidade é uma grande alteração do metabolismo nutricional, caracterizada pela deposição excessiva de gordura no corpo, frequentemente observada em crianças e adolescentes em todo o mundo. Como consequência, esta população pode desenvolver efeitos adversos à saúde favorecendo distúrbios metabólicos como dislipidemia, hipertensão, resistência à insulina, intolerância à glicose e diabetes mellitus tipo 2 (DM2)<sup>1</sup>.

Embora as alterações glicêmicas em obesos sejam esperadas, a DM2 é uma comorbidade infrequente em crianças e adolescentes <sup>2</sup>. Esta possibilidade está fortemente associada à ocorrência de eventos prévios como hiperinsulinemia e resistência à insulina <sup>3</sup>, mesmo considerando incomum a resistência à insulina em crianças pré-púberes . Estudos relatam a ocorrência de picos de insulina durante o período puberal, que se tornam normais na idade adulta<sup>4</sup>. De fato, em estudo realizado com crianças e adolescentes brasileiros sem excesso de peso, foi demonstrada a variação dos níveis de insulina e do indicador HOMA-IR com a idade<sup>5</sup>. Além disso, estas situações em determinados pacientes pediátricos obesos requerem terapia medicamentosa antes do diagnóstico de DM2 ser estabelecido, em caso de falha na modificação do estilo de vida.

Neste estudo foram utilizados testes laboratoriais que não fazem parte da rotina de investigação padrão nos cuidados primários de saúde, visando detectar anormalidades que

precedem o diagnóstico de DM2 na obesidade. Assim, este estudo teve como objetivo apresentar a avaliação do perfil glicêmico de crianças e adolescentes obesos assintomáticos.

## CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foi realizado um estudo transversal envolvendo 90 pacientes consecutivos com obesidade, na faixa etária compreendida entre 8 e 18 anos, de ambos os sexos, procedentes de uma triagem semanal realizada no ambulatório do Serviço de Nutrologia Pediátrica da Universidade Federal da Bahia, no período de janeiro a dezembro de 2015. Todos os participantes incluídos apresentavam-se nos estágios de Tanner considerados normais para a sua idade (estádios de Tanner I a IV) <sup>6</sup>. O índice de massa corporal (IMC) foi calculado dividindo o peso (kg) pelo quadrado de altura (m<sup>2</sup>). O indicador índice de massa corporal / idade (IMC/i) e sexo do escore z <sup>7</sup> foi utilizado para classificar o estado antropométrico dos participantes como obesos (escore-z > +2) ou obesos graves (escore z > +3). A dermatose acanthosis nigricans (indicativa de resistência insulínica) foi pesquisada no pescoço, axilas, espaço interfalangeano e superfícies flexoras dos membros<sup>8</sup>. A circunferência da cintura foi obtida com fita métrica macia e inelástica, no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca anterior<sup>9</sup>. Foram excluídos aqueles que estivessem usando drogas que poderiam interferir com o metabolismo da glicose e pacientes com condições que predispuessem à obesidade (síndrome de Cushing, deficiência de hormônio de crescimento, hipotireoidismo, obesidade síndrômica e padrão anormal da puberdade). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal da Bahia. A participação no estudo se deu através do assentimento verbal das crianças bem como do consentimento por escrito de seus representantes legais.

### Análises laboratoriais

Uma amostra de sangue venoso em jejum foi obtida de todos os participantes para determinações laboratoriais, em um único momento. A glicemia de jejum foi determinada pelo método da hexoquinase (Wiener lab.). Os níveis de glicose entre 100-125 mg/dl e  $\geq$  126 mg/dl foram, respectivamente, classificados por intolerância à glicose e DM2. Os níveis de hemoglobina glicada (HbA1C) foram determinados pelo método da turbidimetria (HbA1C TURBITEST AA, Wiener lab.). Os valores de referência normais foram 4,8% -5,9%. Os valores de HbA1c entre 5,7% e 6,4% foram considerados de alto risco para desenvolver diabetes e  $\geq$  6,5% considerados como prováveis para diabetes mellitus (DM). Os critérios de diagnóstico da American Diabetes Association<sup>10</sup> foram utilizados para ambos os parâmetros. Os níveis de

insulina foram avaliados por método imunoenzimático (Enzyme-Linked immunosorbent assay-ELISA). Valores maiores que 15,0 µU/ml foram considerados anormais<sup>11</sup>. O índice HOMA-IR (homeostasis model assessment – insulin resistance) = glicose em jejum (mg/dl) x insulina em jejum (µU/ml) / 405 avaliou a resistência à insulina<sup>12</sup>. Utilizamos os pontos de corte ajustados para idade e sexo de acordo com Almeida *et al.*<sup>5</sup>, somando o valor médio a 2 desvios padrão.

### Análise estatística

O SPSS (Statistical Program for Social Sciences), versão 20.0 foi utilizado. As variáveis quantitativas e qualitativas foram expressas, respectivamente, por medidas de tendência central / dispersão e frequência simples / relativa. O teste do qui-quadrado comparou a frequência de indivíduos em cada categoria. As variáveis contínuas foram testadas quanto à normalidade da distribuição pelo teste Kolmogorov-Smirnov. As diferenças para essas variáveis foram analisadas pelo teste U de Mann-Whitney ou teste t de Student, de acordo com a distribuição. Um valor p <0,05 foi considerado significativo.

## RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta as principais características clínicas e laboratoriais desta amostra. A glicemia em jejum variou de 70,7 a 128,0 mg/dl e foi elevada em 9 (10,0%) participantes. Um paciente apresentou valor de glicose acima de 126 mg/dl. Os níveis de insulina variaram de 2,5 a 52,9 µU/ml e estiveram alterados em 25 (27,8%) participantes. Quanto à HbA1c, os níveis detectados variaram de 4,2 a 6,8% e 24 (26,6%) indivíduos apresentaram valores anormais, sendo seis deles acima de 6,5%. O índice HOMA-IR foi anormal em 47 (52,2%) participantes. Quando comparado o grupo de obesos graves ao de obesos, observou-se maior prevalência de resistência à insulina no primeiro grupo (65,4%, p <0,003).

Tabela 1. Características clínicas e laboratoriais de 90 crianças e adolescentes obesas assintomáticas estudadas.

	OBESOS n= 38 (42,2 %)	OBESOS GRAVES n= 52 (57,7 %)	p
<b>Idade (anos) <sup>1</sup></b>	11.4 (2.3)	12.2 (2.9)	0.28
<b>Gênero</b>			0.23
masculino	17 (64.6%)	31 (35.4%)	
feminino	10 (23.8%)	32 (76.2%)	
<b>Circunferência da cintura (cm) <sup>1</sup></b>	87.7 (9.1)	98.3 (13.8)	< 0.001
<b>Índice de Massa Corpórea</b>	28.25 (3,5)	33.57 (6,5)	< 0.001
<b>Índice de Massa Corpórea (escore z)</b>	2.52 (0,2)	3.60 (0,8)	< 0.001
<b>Acanthosis nigricans</b>			0.04
leve	24 (63,1 %)	13 (25.0 %)	
moderada	12 (31,5 %)	28 (53,8 %)	
grave	02 (5.2 %)	11 (21,1 %)	
<b>Glicemia (mg/dl) <sup>1</sup></b>	87.3(8.4)	91.1 (10.1)	0.15
<b>Insulina (μUI/ml) <sup>1</sup></b>	12.0 (7.3)	14.1 (9.5)	0.51
<b>HbA1C</b>			0.25
valor normal	18 (47,3 %)	39 (75,0 %)	
alto risco para DM	09 (23.6 %)	18 (34,6 %)	
provável DM	-	06 (11.5 %)	
<b>HOMA-IR<sup>1</sup></b>	2.6 (1.6)	3.1 (2.1)	0.44

<sup>1</sup> valores expressos em média (desvios padrão). IMC, índice de massa corpórea. HbA1C, hemoglobina glicada; DM, diabetes mellitus; HOMA-IR, Homeostasis Model Assessment for Insulin Resistance.

## DISCUSSÃO

Nossos resultados revelam uma alta prevalência de anormalidades no metabolismo da glicose e da insulina neste grupo de crianças e adolescentes obesos, de forma similar aos achados descritos por D'Adamo e Caprio<sup>13</sup>. Observamos também que quase 80% das crianças e adolescentes com obesidade grave apresentaram níveis alterados de glicose e insulina. Além disso, este grupo também apresentou as maiores medidas de circunferência da cintura, a despeito da idade e do sexo. De acordo com Martins & Marinho<sup>14</sup>, a obesidade visceral é a principal causa de distúrbios da homeostase da glicose / insulina. Neste estudo foi detectada associação entre a dermatose acanthose nigricans grave ou moderada, a obesidade grave e o

aumento da circunferência da cintura. Assim, esses achados reforçam o papel da circunferência da cintura como marcador de resistência à insulina e preditor precoce do DM2<sup>15</sup>.

Verificamos também a glicemia em jejum acima do valor de referência em nove casos. Surpreendentemente, em um caso observado em indivíduos obeso (escore  $z = +2,77$ ), esta medida foi de 126 mg/dl e a HbA1c estava na faixa de risco para DM2. Os valores de HbA1c foram superiores a 6,5% em outros seis (9,5%) participantes com obesidade grave. Estes sete pacientes, portanto, apresentam parâmetros diagnósticos de diabetes mellitus (prevalência de 7,8%). Estes testes não foram repetidos para confirmação. A hemoglobina glicada reflete o grau de exposição individual a níveis elevados de glicose nos últimos 120 dias. Embora os valores propostos de HbA1c em crianças e adolescentes ainda não estejam definidos, valores acima de 6,5% devem ser confirmados em outra amostra e dispensados no caso de sintomas ou níveis aleatórios de glicose no sangue acima de 200 mg/dl. Valores entre 5,7% e 6,4% são indicativos de alto risco de desenvolver diabetes, de acordo com o American Diabetes Association<sup>16</sup>.

Observamos hiperinsulinemia em quase 30% das crianças e adolescentes estudados. Esses valores poderiam ter sido ainda maiores se fossem utilizados pontos de corte mais baixos, como o parâmetro europeu estimado em 12,6  $\mu\text{U/ml}$ . No entanto, este achado não foi seguido por aumento anormal na glicemia de jejum. Estes dados são compatíveis com o processo fisiológico compensatório onde níveis elevados de glicose no sangue levam ao aumento da produção de insulina, secundária à resistência à ação da insulina em órgãos-alvo. Isso é detectado por um aumento significativo do HOMA-IR, indicador dessa condição. No entanto, após um determinado período, este aumento compensatório na insulina é perdido, resultando em hiperglicemia, intolerância à glicose e, eventualmente, DM2<sup>17</sup>. Um tratamento atual com metformina para adolescentes com resistência à insulina documentada, sem a necessidade de diagnóstico laboratorial de DM é recomendada<sup>18, 19, 20</sup>. No entanto, esta recomendação não é um consenso na literatura, utilizando-se experimentalmente em pacientes selecionados<sup>21</sup>.

Não há consenso sobre o ponto de corte para definir a resistência insulínica. Alguns autores<sup>5,22,23</sup> tentaram identificar esse gatilho através de medidas antropométricas e indicadores metabólicos, entre outros, ajustados por idade e sexo. Valores de corte de aproximadamente 3 são recomendados para identificar RI em crianças e adolescentes<sup>24- 28</sup>. Do mesmo modo, o método utilizado para determinar a resistência à insulina é também controverso. Neste estudo o HOMA-IR foi utilizado como método validado para uso em crianças e adolescentes por ser fácil de calcular quando comparado com o QUICKI e por apresentar valores de medidas semelhantes aos obtidos com o teste de tolerância oral à glicose (TTOG) e à braçadeira hiperinsulinêmica euglicêmica<sup>5</sup>. Estes últimos, embora considerados padrão-ouro, apresentam

limitações como o alto custo e a dificuldade de execução, tornando inviável a sua utilização rotineira, sendo utilizados apenas em estudos clínicos<sup>29</sup>.

A resistência à insulina pode se tornar um importante preditor do desenvolvimento de diabetes mellitus (DM) no futuro. Dois indivíduos obesos apresentaram níveis anormais de glicose e HOMA-IR, com níveis normais de HbA1c e insulina. As outras alterações detectadas foram mais prevalentes entre indivíduos gravemente obesos. Estes resultados demonstram uma alta prevalência de glicose sanguínea anormal, insulina basal, HOMA-IR e HbA1c em crianças e adolescentes obesos. Quase 8% dos pacientes reuniram critérios estabelecidos para diabetes mellitus. No entanto, o achado mais importante refere-se à alta prevalência de alterações que precedem o DM, em indivíduos assintomáticos com obesidade grave.

Uma limitação importante deste estudo refere-se à concepção transversal do estudo. Assim, não podemos estabelecer uma relação de causa e efeito entre a obesidade e o metabolismo anormal da glicose, apesar de termos observado uma correlação positiva e estatisticamente significativa (0,456; 0,034) entre obesidade grave e resistência à insulina.

Nossos resultados, portanto, fornecem evidências sobre a necessidade de ampliar a investigação laboratorial desses pacientes, com a inclusão das medidas da insulina sérica, hemoglobina glicada e determinação do HOMA-IR, além da glicemia. Finalmente, esses achados reforçam a necessidade de desenvolver programas de prevenção e intervenção eficazes na obesidade infantil, considerando a diabetes uma doença crônica e letal que pode ser detectada pelo perfil glicêmico / insulinêmico adequado de indivíduos obesos assintomáticos, como parte da rotina investigativa.

## REFERÊNCIAS

1. Codoner-Franch P, Valls-Belles V, Arilla-Codoner A, Alonso-Iglesias E. Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. *Transl Res* 2011;158(6):369-84.
2. Características clínicas e laboratoriais de crianças e adolescentes obesos. *Rev Paul Pediatr* 2007;25(1):27-32.
3. Kurtoglu S, Hatipoglu N, Mazicioglu M, Kendirici M, Keskin M, Kondolot M. Insulin resistance in obese children and adolescents: HOMA-IR cut-off levels in the prepubertal and pubertal periods. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2010;2:100-6.
4. Grant DB. Fasting serum insulin levels in childhood. *Arch Dis Child* 1967;42:375-78.
5. Almeida CA, Pinho AP, Ricco RG, Pepato MT, Brunetti IL. Determination of glycemia and insulinemia and the homeostasis model assessment (HOMA) in schoolchildren and adolescents with normal body mass index. *J Pediatr (Rio J)* 2008;84:136-40.

6. Almeida C, Del Campo I, Ricco R, Crott G. Crescimento físico. Puericultura: princípios e práticas. São Paulo: Atheneu; 2001;9-19.
7. Onis M, Onyango AW, Borghi E, Siyam A, Nishida C, Siekmann J. Development of a WHO growth reference of schoolaged children and adolescents. *Bulletin of the WHO* 2007;85:660-7.
8. Higgins ST, Fremark M, Prose NS. AcanthosisNigricans: a practical approach to evaluation and management. *Dermatol Online J* 2008;14:2.
9. Organização Mundial da Saúde. Preventing and managing the global epidemic. 2000.
10. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2014;37(S)1:S81-90.
11. Obesidade na infância e na adolescência – Manual de Orientação / Sociedade Brasileira de Pediatria. Departamento Científico de Nutrologia. 2ª Ed. – São Paulo: SBP. 2012;142 p.
12. Geloneze B, Tambascia MA. Avaliação Laboratorial e Diagnóstico da Resistência Insulínica. *Arq Bras Endocrinol & Metab* 2006;50(2):208-15.
13. D'Adamo E, Caprio S. Type 2 diabetes in youth: epidemiology and pathophysiology. *Diabetes Care* 2011;34(S)2:161-5.
14. Martins IS, Marinho SP. O potencial diagnóstico dos indicadores da obesidade centralizada. *Rev. Saúde Públ* 2003;37(6):760-67.
15. Kobaissi HA, Weigensberg MJ, Ball GDC, Cruz ML, Shaibi GQ, Goran MI, et al. Relation Between Acanthosis Nigricans and Insulin Sensitivity in Overweight Hispanic Children at Risk for Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2004;27:1412-16.
16. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 2016;39,S(1):86-93.
17. Guimarães ICB, Guimarães A. Síndrome Metabólica Na Infância e Adolescência. Um Fator Maior De Risco Cardiovascular. *Rev Baiana de Saúde Pública* 2006;30(2):349-62.
18. Marques P, Limbert C, Oliveira L, Santos MI, Lopes L. Metformin effectiveness and safety in the management of overweight/obese non diabetic children and adolescents: metabolic benefits of the continuous exposure to metformin at 12 and 24 months. *Int J Adolesc Med Health* 2016.
19. Bouza C, López-Cuadrado T, Gutierrez-Torres LF, Amate J. Efficacy and safety of metformin for treatment of overweight and obesity in adolescents: an updated systematic review and meta-analysis. *Obes Facts* 2012;5(5):753-65.
20. Park MH<sup>1</sup>, Kinra S, Ward KJ, White B, Viner RM. Metformin for obesity in children and adolescents: a systematic review. *Diabetes Care* 2009;32(9):1743-5.



21. Mead E, Atkinson G, Richter B, Metzendorf MI, Baur L, Finer N, et al. Drug interventions for the treatment of obesity in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* 2016;11:CD012436.
22. Schwimmer JB, Deutsch R, Rauch JB, Behling R, Newbury R, Lavine JE, et al. Obesity, insulin resistance and other clinic pathological correlates of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr (Rio J)* 2003;143:500-5.
23. Ascaso JF, Pardo S, Real JT. Diagnosing insulin resistance by simple quantitative methods in subjects with normal glucose metabolism. *Diabetes Care* 2003;26:3320-5.
24. Reinehr T, de Sousa G, Andler W. Longitudinal analyses among overweight, insulin resistance, and cardiovascular risk factors in children. *Obes Res* 2005;13:1824-33.
25. Chandrasekhar T, Suchitra MM, Sachan A, Bitla AR, Srinivasa Rao PV. Indices of insulin resistance in paediatric obesity. *J Clin Sci Res* 2014;3:7-13.
26. Madeira IR, Carvalho CN, Gazolla FM, de Matos HJ, Borges MA, Bordallo MA. Cut-off point for homeostatic model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) index established from receiver operating characteristic (ROC) curve in the detection of metabolic syndrome in overweight pre-pubertal children. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2008;52:1466-73.
27. Aradillas-García C, Rodríguez-Morán M, Garay-Sevilla ME, Malacara JM, Rascon-Pacheco RA, Guerrero-Romero F, et al. Distribution of the homeostasis model assessment of insulin resistance in Mexican children and adolescents. *Eur J Endocrinol* 2012;166:301-6.
28. García Cuartero B, García Lacalle C, Jiménez Lobo C, González Vergaz A, Calvo Rey C, Alcázar Villar MJ, et al. The HOMA and QUICKI indexes, and insulin and C-peptide levels in healthy children. Cut off points to identify metabolic syndrome in healthy children. *An Pediatr (Barc)* 2007;66:481-90.
29. American College of Endocrinology: Insulin resistance syndrome (position, statement). *Endocr Pract* 2003;9:9-21.

**4.2 Artigo 3 (Artigo Original)**  
**Citocinas Inflamatórias e Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica em Crianças e Adolescentes Obesos.**

Artigo nº 1317 aceito no periódico Nutrición Hospitalaria.

---

Dear silvana silvana:

The Editorial Committee of the *Nutrición Hospitalaria* journal has decided that your article "Inflammatory Cytokines and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in Obese Children and Adolescents", has been accepted for publication in our journal.

The Financial Department will contact you for the payment of the article in a few days ([nutricion@grupoaran.com](mailto:nutricion@grupoaran.com)).

Yours faithfully,

Dr José Manuel Moreno Villares  
[josemanuel.moreno@salud.madrid.org](mailto:josemanuel.moreno@salud.madrid.org)  
Director revista *Nutrición Hospitalaria*

---

## RESUMO

**Introdução:** A doença hepática gordurosa não alcoólica se caracteriza pela deposição intra-hepática de gordura. É a doença hepática mais prevalente em todo o mundo, afetando crianças e adolescentes obesos. Sua fisiopatologia não é totalmente conhecida, embora se relacione frequentemente à resistência insulínica. Esta por sua vez seria decorrente de um estado inflamatório comum à obesidade. Assim, o objetivo desse estudo foi descrever o comportamento das citocinas pró-inflamatórias, em crianças e adolescentes obesos, com e sem doença hepática gordurosa não alcoólica. **Método:** Uma amostra de sangue em jejum foi obtida de 90 participantes consecutivos, na faixa etária de 8 a 18 anos, de ambos os sexos, para determinações laboratoriais da glicemia, insulina basal, do Homeostasis Model Assessment Insulin-Resistance Index e dos marcadores inflamatórios TNF-alfa, interleucinas 2 e 6, interferon-gama e proteína C reativa ultrasensível. A avaliação clínica incluiu peso, altura, circunferência da cintura. O indicador índice de massa corporal para idade e sexo foi utilizado para avaliar a gravidade da obesidade. Os graus de esteatose foram determinados pela ultrassonografia. As variáveis quantitativas e qualitativas foram expressas respectivamente por medidas de tendência central e dispersão e frequências simples e relativas, usando o Statistical Program for Social Sciences, version 20.0. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes. **Resultado:** Foram estudados 90 indivíduos, com média de idade 12,0 (2,7) anos, sendo 48 (53%) do sexo masculino. O IMC para idade (IMC/i) e sexo (escore z) classificou 38 (42,2%) participantes como obesos e 52 (57,7%) como obesos graves. A esteatose hepática foi identificada em 56 (62,2%) participantes e aproximadamente 90% destes apresentaram esteatose grau I. Os marcadores inflamatórios TNF-alfa e PCR se apresentaram aumentados na amostra estudada e se correlacionaram de forma positiva e estatisticamente significativa com o índice de massa corporal para idade e sexo. **Conclusão:** A esteatose hepática foi prevalente no grupo de crianças e adolescentes estudados, mas não se relacionou com os graus de obesidade. A resistência insulínica se correlacionou de forma positiva e estatisticamente significativa com a proteína C reativa nos portadores de doença hepática gordurosa não alcoólica.

**Palavras-chave:** Hepatite gordurosa não alcoólica. Obesidade. Fígado gorduroso. Crianças. Adolescentes. Citocinas.

## INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica que acomete a população em todo o mundo, sendo mais prevalente que a desnutrição e as doenças infecciosas<sup>1</sup>. Estudos revelam que a obesidade atinge não apenas adultos sendo também verificada em crianças e adolescentes<sup>2, 3</sup>, quando as alterações metabólicas relacionadas podem ter seu início<sup>4</sup>. O tecido adiposo é caracterizado, sobretudo por sua complexidade. Originariamente estaria relacionado à fonte energética e à termogênese, conforme sua diferenciação em tecido adiposo branco (TAB) ou tecido adiposo marrom (TAM), respectivamente. Entretanto, outras funções têm sido atribuídas ao tecido adiposo, decorrentes do seu envolvimento ativo em processos imunes, hormonais e metabólicos através da síntese e liberação de substâncias denominadas adipocinas<sup>5</sup>. O tecido adiposo é reconhecido como um órgão endócrino, pela sua função sintetizadora e secretora de leptina, estrógenos, angiotensinogênio e adiponectina; pela capacidade de estabelecer conexões com o

sistema nervoso central, além da liberação de proteínas de fase aguda e citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), a interleucina-6 (IL-6) e o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGf-1)<sup>6</sup>. As citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6 estão relacionadas à obesidade e à redução da sensibilidade à insulina<sup>7</sup>. A resistência à insulina levaria ao aumento da síntese e armazenamento das triglicérides nos hepatócitos e assim desempenharia um importante papel na patogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), doença com alto potencial de evolução para cirrose e/ou carcinoma hepatocelular<sup>8</sup>. Além disso, esta população poderia desenvolver outras alterações metabólicas como dislipidemias, hipertensão e diabetes mellitus tipo 2, secundárias a um suposto estado inflamatório intrínseco à obesidade que responderia pela expressão dessas comorbidades, segundo estudos descritos em adultos<sup>9</sup>. Considerando esses aspectos, o propósito deste estudo foi descrever o comportamento das citocinas pró-inflamatórias em crianças e adolescentes obesos, com e sem doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA).

## CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foi realizado um estudo transversal envolvendo 90 crianças e adolescentes obesos, de ambos os sexos, com idade entre oito e 18 anos, avaliados consecutivamente no ambulatório do Serviço de Nutrologia Pediátrica do Hospital Universitário da Universidade Federal da Bahia, no período de janeiro a dezembro de 2015, caracterizando uma amostra de conveniência. Foram excluídos os portadores de condições que predispuessem ao excesso de peso como síndrome de Cushing, deficiência de hormônio do crescimento, hipotireoidismo e obesidade sindrômica. Não houve relato de consumo de bebidas com teor alcoólico entre os participantes. O índice de massa corpórea (IMC) foi calculado dividindo o peso (kg) pelo quadrado da altura (m) ( $\text{Kg}/\text{m}^2$ ). O escore z do indicador IMC/idade e sexo foi utilizado para classificar o estado antropométrico dos participantes como obesos (IMC/i > +2) e obesos graves (IMC/i > +3)<sup>10</sup>. A circunferência da cintura foi obtida com fita métrica maleável e inelástica, no ponto médio entre o último arco costal e a crista ilíaca anterossuperior<sup>11</sup>. O ultrassom (US) GE LOGIC P6 com transdutor convexo de 2 a 5 MHz foi usado para diagnóstico e classificação da esteatose nos graus I, II e III, conforme alteração de ecogenicidade e identificação dos vasos intra-hepáticos e diafragma, segundo Hamaguchi *et al*<sup>12</sup>. Os exames de imagem foram realizados na instituição da pesquisa e pelo mesmo profissional. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal da Bahia. Houve um assentimento verbal dos participantes e um consentimento escrito foi obtido dos seus representantes legais.

### **Análise laboratorial**

Uma amostra de sangue após jejum de doze horas foi obtida de todos os participantes para determinações laboratoriais. As enzimas ALT (alanina transaminase), AST (aspartato transaminase) e Gama-GT (Gama-glutamyl transpeptidase), foram dosadas através do método cinético colorimétrico e expressas em U/L. A glicemia em jejum foi avaliada pelo método enzimático da hexoquinase pelo equipamento de automação 60i (Wiener) e foi considerada normal para valores de referência (VR) entre 70 e 99 mg/dL<sup>13</sup>. O hiperinsulinismo foi avaliado pelo equipamento de automação Immulite, pelo método quimioluminescência e foi considerado alterado quando os valores eram maiores que 15,0 µUI/mL<sup>14</sup>. O índice HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment Insulin-Resistance* = glicemia [mg/dL] x insulina [uUI/mL] /405) foi utilizado para identificar resistência insulínica, sendo utilizado os pontos de corte estratificados por sexo e idade propostos Almeida et al.<sup>15</sup>, somando o valor da média a 2 desvios padrão<sup>16</sup>. A proteína C reativa ultrasensível (PCR) foi determinada pelo método da imunoturbidimetria. As Interleucina-2 (IL-2), Interleucina-6 (IL-6), Interferon-gama (IFN-γ) e tumor necrosis factor-α (TNF-α) foram determinado pelo ELISA DuoSet R&D Systems.

### **Análise Estatística**

O SPSS (Statistical Program for Social Sciences), version 20.0 foi usado para as análises estatísticas. As variáveis quantitativas e qualitativas foram respectivamente expressas por medidas de tendência central e dispersão e frequência simples e relativa. As variáveis contínuas foram testadas para normalidade de distribuição pelo *Kolmogorov-Smirnov test*. As diferenças entre as variáveis foram analisadas usando o *Mann-Whitney U-test* ou *Student's t-test*, de acordo com a distribuição. O *chi-square test* comparou a frequência dos indivíduos em cada categoria. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

### **RESULTADOS**

Foram estudados 90 indivíduos, com média de idade 12,0 (2,7) anos, sendo 48 (53%) do sexo masculino. O IMC para idade (IMC/i) e sexo (score z) classificou 38 (42,2%) participantes como obesos e 52 (57,7%) como obesos graves; sendo 3,14 (0,86) anos a média (DP) e 2,02 e 8,52 os valores mínimo e máximo de IMC/i, respectivamente. A esteatose hepática foi identificada em 56 (62,2%) participantes, sendo mais frequente nos meninos que nas meninas (58,9 *versus* 41,1%,  $p > 0,05$ ). Entre esses, 50 (89,2%) apresentaram esteatose grau I, 5 (8,92%) grau II e apenas 1 (1,78%) apresentou esteatose grau III. Nenhum caso de esteato-hepatite foi identificado, considerando que os níveis de enzimas hepáticas encontravam-se dentro dos valores de referência. Os níveis pressóricos foram aferidos e encontraram-se dentro

dos limites de normalidade. A Tabela 1 apresenta os parâmetros bioquímicos e os marcadores inflamatórios analisados considerando a presença de DHGNA.

Tabela 1. Características clínicas e laboratoriais de 90 crianças e adolescentes estudados de acordo com a presença de doença hepática gordurosa não alcoólica.

	DHGNA		Valor de P
	Sim (n=56)	Não (n=34)	
Idade (anos)**	12,00 (10-14)	11,00 (10-14)	0,687
Gênero (%)	58,9	44,1	0,172
IMC/idade (escore z)*	3,15 (0,61)	3,13 (1,18)	0,884
Obeso Grave	20 (35,7%)	18(52,9%)	0,109
Circunferência da cintura (cm)*	96,56 (12,67)	92,82 (14,54)	0,203
ALT (UI)*	26,09 (10,97)	22,50 (6,17)	0,084
AST (UI)**	23,00 (15,00-28,00)	20,00 (12,00-28,00)	0,237
G-GT (UI)**	25,00 (20,00-35,00)	22,00 (17,00-28,00)	0,106
Colesterol (mg/dl)*	166,82 (34,79)	163,01 (34,58)	0,617
LDL (mg/dl)*	97,50 (31,61)	93,30 (33,80)	0,563
HDL (mg/dl)*	42,32 (7,17)	43,63 (9,69)	0,468
Triglicerídeos (mg/dl)**	117 (82-144)	95,35 (72,50-172,25)	0,659
Glicemia (mg/dl)*	91,39 (9,96)	87,64 (9,06)	0,077
HOMA-IR**	2,54 (1,55-3,26)	2,18 (1,36-3,89)	0,600
Insulina (mUI)**	11,63(7,37-15,22)	10,12(6,94-17,84)	0,623
PCR-US (mg/L)**	4,05 (1,97-7,28)	3,88 (1,88-13,67)	0,519
Interleucina-2 (pg/mL)**	0,240 (0,097-0,425)	0,192 (0,069-0,351)	0,265
Interleucina-6 (pg/mL)**	0,287 (0,121-0,770)	0,206 (0,058-0,658)	0,222
TNF- $\alpha$ (pg/mL)**	0,269 (0,119-0,642)	0,235 (0,101-0,453)	0,268
IFN $\gamma$ (pg/mL)**	0,352 (0,103-0,721)	0,213 (0,075-0,535)	0,144

IMC: Índice de Massa Corpórea, ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase, G-GT: gama-glutamil transpeptidase, HDL: high-density lipoprotein, LDL: low-density lipoprotein, HOMA-IR: homeostasis model assessment-insulin resistance, PCR-US: proteína C reativa-ultra sensível, TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor- $\alpha$ . IFN  $\gamma$ : interferon gama. \*Valores expressos como média (SD) \*\* Valores expressos como mediana e intervalos interquartílicos.

O perfil inflamatório de todos os participantes do estudo considerando os graus de obesidade está demonstrado na tabela 2.

Tabela 2. Comportamento dos marcadores inflamatórios de 90 crianças e adolescentes estudados, segundo os graus de obesidade.

	Obesos graves	Obesos	P
PCR-US (mg/L)*	2,52 (1,16-5,37)	5,16 (2,94-9,07)	<b>0,009</b>
Interleucina 2 (pg/mL)*	0,222 (0,104-0,456)	0,208 (0,085-0,400)	0,520
Interleucina 6 (pg/mL)*	0,515 (0,116-0,865)	0,212 (0,091-0,559)	0,088
TNF- $\alpha$ (pg/mL)*	0,315 (0,190-0,667)	0,204 (0,084-0,428)	<b>0,024</b>
IFN $\gamma$ (pg/mL)*	0,230 (0,072-0,693)	0,281 (0,084-0,609)	0,750

TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor- $\alpha$ , PCR-US: proteína C reativa-ultra sensível, IFN  $\gamma$ : Interferon gama. \*Valores expressos como mediana e intervalos interquartílicos.

Na tabela 3 estão indicadas as características clínicas e laboratoriais dos obesos e obesos graves, considerando a presença de DHGNA.

Tabela 3. Características clínicas e laboratoriais de 56 crianças e adolescentes portadoras de doença hepática gordurosa não alcoólica, segundo o grau de obesidade.

	OBESOS GRAVES (n= 20)	OBESOS (n= 36)	Valor de p
Idade (anos)*	13,30 (2,55)	11,36 (2,58)	<b>0,009</b>
Gênero masculino (%)	58,9%	41,1%	0,909
IMC/i (escore z)*	3,60 (0,87)	2,52 (0,25)	<b>0,007</b>
Graus de esteatose:			0,597
- grau I	18 (90,0%)	32 (88,9%)	
- grau II	2 (10,0%)	3 (8,3%)	
- grau III	0	1 (2,8%)	
Circunferência da cintura (cm)*	98,01 (13,63)	93,67 (10,04)	<b>0,049</b>
ALT (UI)*	26,60 (12,17)	25,80 (10,40)	0,800
AST (UI)**	21,00 (16,00-33,00)	18,50 (12,00-28,00)	0,782
GGT (UI)**	26,00 (22,00-38,00)	20,00 (17,00-28,00)	<b>0,002</b>
Colesterol total (mg/dl)*	173,42 (32,50)	155,80 (36,47)	0,069
LDL (mg/dl)*	103,55 (31,96)	87,20 (33,96)	0,066
HDL (mg/dl)*	47,97 (10,48)	40,84 (9,67)	0,220
Triglicérides (mg/dl)*	147,56 (86,75)	129,99 (78,18)	0,464
Glicemia (mg/dl)*	97,90 (9,45)	88,09 (10,51)	0,450
HOMA-IR**	2,56 (1,69-5,11)	2,03 (1,20-2,87)	<b>0,009</b>
Insulina (mUI)**	14,01 (8,89-21,90)	8,66 (6,22-11,72)	<b>0,001</b>
PCR-US (mg/L)**	1,94 (0,80-2,28)	1,30 (0,71-2,00)	0,484
Interleucina 2 (pg/mL)**	0,279 (0,101-0,345)	0,231 (0,094-0,365)	0,430
Interleucina 6 (pg/mL)**	0,490 (0,109-0,754)	0,320 (0,085-0,487)	0,059
TNF- $\alpha$ (pg/mL)**	0,390 (0,187-0,695)	0,301 (0,074-0,328)	<b>0,032</b>
IFN $\gamma$ (pg/mL)**	0,340 (0,091-0,609)	0,233 (0,098-0,687)	0,670

IMC: Índice de Massa Corpórea, ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase, G-GT: gama-glutamil transpeptidase, HDL: high-density lipoprotein, LDL: low-density lipoprotein, HOMA-IR: homeostasis model assessment-insulin resistance, PCR-US: proteína C reativa-ultra sensível, TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor- $\alpha$ . IFN  $\gamma$ : interferon gama. \*Valores expressos como média (DP) \*\* Valores expressos como mediana e intervalos interquartílicos.

A Tabela 4 mostra que houve uma correlação positiva e estatisticamente significativa entre o HOMA-IR, a insulina e a PCR, diferente do que se verificou com o IFN- $\gamma$ , a IL-6, e a IL-2. O IMC/i também influenciou o comportamento do TNF- $\alpha$  e da PCR.



Tabela 4. Análise de correlação dos marcadores inflamatórios e parâmetros clínicos e laboratoriais de 56 crianças e adolescentes com doença hepática gordurosa não alcoólica.

	IL2	IL6	TNF- $\alpha$	IFN $\gamma$	PCR ultrasensível
Idade (anos)**	0,066; 0,631	- 0,127; 0,072	- 0,095; 0,485	- 0,112; 0,410	- 0,182; 0,457
Circunferênciacintura(cm)*	0,061; 0,656	- 0,124; 0,362	0,073; 0,595	- 0,072; 0,600	- 0,134; 0,584
BMI	- 0,119; 0,264	- 0,078; 0,465	0,122; 0,251	0,011; 0,921	0,183; 0,084
BMI/age	- 0,131; 0,219	- 0,111; 0,297	0,272; <b>0,009</b>	0,062; 0,562	0,285; <b>0,006</b>
ALT (UI)*	- 0,029; 0,834	- 0,058; 0,674	0,126; 0,359	0,012; 0,929	0,076; 0,756
AST (UI)**	- 0,029; 0,832	0,016; 0,905	0,016; 0,905	0,235; 0,084	- 0,183; 0,454
GGT (UI)**	-0,029; 0,832	- 0,181; 0,186	- 0,094; 0,510	0,156; 0,273	0,090; 0,613
Glicemia (mg/dl)*	- 0,237; 0,079	- 0,090; 0,512	- 0,134; 0,325	0,251; 0,062	- 0,275; 0,254
HOMA-IR**	0,005; 0,969	0,045; 0,741	- 0,055; 0,685	0,109; 0,424	0,407; <b>0,034</b>
Insulina (mUI)**	- 0,083; 0,542	0,020; 0,886	- 0,036; 0,795	0,086; 0,527	0,484; <b>0,036</b>
PCR-US (mg/L)**	0,078; 0,750	- 0,452; 0,050	0,356; 0,135	- 0,257; 0,295	1
Interleucina 2 (pg/mL)**	1	- 0,305; 0,022	- 0,163; 0,230	- 0,377; <b>0,004</b>	0,078; 0,750
Interleucina 6 (pg/mL)**	- 0,305; <b>0,022</b>	1	- 0,113; 0,407	0,128; 0,349	- 0,452; 0,052
TNF- $\alpha$ (pg/mL)**	- 0,163; 0,230	- 0,113; 0,407	1	- 0,260; <b>0,053</b>	0,356; 0,135
IFN $\gamma$ (pg/mL)**	- 0,377; <b>0,004</b>	0,128; 0,349	- 0,260; <b>0,053</b>	1	- 0,254; 0,295

IMC: Índice de Massa Corpórea, ALT: alanine aminotransferase, AST: aspartate aminotransferase, G-GT: gama-glutamil transpeptidase, HDL: high-density lipoprotein, LDL: low-density lipoprotein, HOMA-IR: homeostasis model assessment-insulin resistance, PCR-US: proteína C reativa-ultra sensível, TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor- $\alpha$ , IFN  $\gamma$ : Interferon gama.

## DISCUSSÃO

A relevância desse estudo deve-se ao fato dos achados considerados alterados serem provenientes de uma amostra de 90 indivíduos obesos clinicamente assintomáticos. A esteatose hepática foi prevalente, confirmando dados da literatura que indicam a DHGNA como uma das consequências adversas da obesidade, além da hiperlipidemia, hipertensão e diabetes mellitus tipo 2<sup>17</sup>. A esteatose de grau I foi identificada em aproximadamente 90% das 56 crianças e adolescentes diagnosticadas com DHGNA, refletindo um processo de instalação precoce e incipiente do espectro que envolve a doença.

Na tabela 1 os grupos com e sem doença hepática são comparados. Observamos que os indivíduos com DHGNA não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros analisados. Entretanto, na tabela 2, marcadores inflamatórios como a adipocina TNF- $\alpha$  se apresentou elevada nos obesos graves, enquanto a PCR, uma proteína de fase aguda da inflamação secretada pelo fígado quando estimulado pela IL-6 esteve mais aumentada nos obesos, sugerindo a presença de um estado inflamatório subjacente à obesidade.

Adicionalmente, na tabela 3, os 56 indivíduos diagnosticados com esteatose hepática foram analisados considerando o grau de obesidade e alterações estatisticamente significativas

foram encontradas. Nos obesos graves, a circunferência da cintura foi mais elevada, provavelmente devido ao padrão de distribuição central da adiposidade secundária à resistência insulínica. De igual modo, os obesos graves apresentaram as maiores taxas de G-GT. Em seu estudo, Fishbein *et al.* analisaram a relação das transaminases com a gravidade da esteatose e concluíram que as maiores alterações são esperadas em casos graves de fígado gorduroso<sup>18</sup>, em oposição aos nossos achados, tendo em vista a prevalência de esteatose em estágio inicial ter sido similar entre obesos e obesos graves. Entretanto, não observamos associação do perfil inflamatório com os valores séricos da G-GT.

Conforme citado anteriormente, a resistência insulínica (RI) é a principal determinante da fisiopatologia da DHGNA<sup>8</sup>. Observamos que os indicadores de RI (HOMA-IR e insulina sérica) estiveram mais elevados nos obesos graves com DHGNA, mas não diferiram entre os pacientes com e sem doença hepática. Paralelamente, a TNF- $\alpha$ , uma citocina inflamatória associada à obesidade e à resistência insulínica, apresentou comportamento semelhante. O TNF- $\alpha$  apresenta um papel crucial na determinação da resistência insulínica<sup>19</sup>, estimula a síntese de outras citocinas e tem ação direta no fígado pelo incremento da lipogênese através do aumento das enzimas catalizadoras<sup>20</sup>. Além disso, suprime a expressão de genes envolvidos na captação de glicose e metabolismo dos ácidos graxos favorecendo seu acúmulo<sup>21</sup>. Finalmente, a cascata inflamatória desencadeada pelo TNF- $\alpha$  estaria relacionada à progressão da DHGNA a esteato-hepatite<sup>22</sup>. Desta forma, pode-se aventar que essas crianças e adolescentes com DHGNA e obesidade grave devem ser monitorados com maior frequência no futuro, uma vez que, no momento desse estudo, do ponto de vista laboratorial, não havia indícios de hepatite.

Jovinge *et al.*<sup>23</sup> relatam um aumento de TNF- $\alpha$  em indivíduos do sexo masculino relacionada com doença aterosclerótica, embora o mesmo não tenha sido verificado em relação à resistência insulínica. Entretanto, outros estudos<sup>24, 25</sup> realizados em adultos, descrevem uma correlação significativa entre o TNF- $\alpha$ , a insulina sérica e o índice de massa corporal. A esse propósito, avaliamos o comportamento do TNF- $\alpha$  tendo em vista os casos em que o HOMA-IR e a insulina sérica estiveram normais ou alterados e não detectamos diferenças estatisticamente significativas, embora este comportamento tenha se confirmado quando o IMC/i foi considerado. Adicionalmente, uma análise de correlação envolvendo as 56 crianças e adolescentes diagnosticadas com DHGNA foi realizada. Encontramos uma correlação positiva e estatisticamente significativa entre o HOMA-IR e a insulina sérica e a PCR, uma proteína de fase aguda da inflamação, que tem seus níveis séricos diretamente proporcionais ao índice de massa corpórea e, portanto, associados com a obesidade<sup>26</sup>. Inversamente, a IL-6, uma citocina

inflamatória associada à obesidade e à resistência insulínica, secretada pelos linfócitos T e B, endotélio, fibroblastos e macrófagos; mostrou uma correlação negativa e significativa com a IL2, citocina que participa da resposta imune, secretada pelos linfócitos T; sugerindo um efeito modulador entre as citocinas<sup>27</sup>. Logo, no nosso estudo podemos sugerir que as alterações dos marcadores inflamatórios podem ter influenciado os indicadores do metabolismo glicídico no que diz respeito à resistência insulínica e a DHGNA nos indivíduos com obesidade grave.

Prováveis limitações do estudo referem-se ao seu desenho de corte transversal, que por suas características não possibilita estabelecer uma relação de causa e efeito. De igual modo, as variações imunes individuais, a complexidade que envolve a caracterização do *status* inflamatório e a verificação das dosagens das citocinas em um só momento, provavelmente podem ter comprometido a verificação do quadro inflamatório intrínseco à obesidade. Destacamos, ainda, limitações envolvendo o método de imagem (ultrassom) utilizado para o diagnóstico da DHGNA, que não permite determinar a gravidade da inflamação no que diz respeito à presença de esteato-hepatite ou fibrose, o que só seria permitido através da biópsia hepática, considerado padrão-ouro.

Estudos são realizados na tentativa de elucidar um suposto processo inflamatório de baixo grau, subjacente à obesidade, que responderia pela expressão das comorbidades associadas, tais como diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemias e fígado gorduroso<sup>28, 29</sup>. Entretanto, o entendimento não é completo nem suficiente para definir se a obesidade levará a um quadro inflamatório ou se a inflamação levará à obesidade. Em nosso estudo, não observamos diferenças no perfil de citocinas inflamatórias entre os pacientes com e sem DHGNA. Contudo, os obesos graves tiveram maiores níveis médios de TNF-alfa e IL-6, embora esta última não tenha sido significativa ( $p=0.059$ ), mostrando, entretanto, uma tendência de associação. Mesmo não sendo significativa, do ponto de vista estatístico, a proporção de obesos graves entre as crianças e adolescentes sem DHGNA foi bem superior àqueles com essa alteração (52.9 vs 35.7%), sugerindo ser a gravidade da obesidade um confundidor desta relação. De fato, encontramos que, apenas entre os doentes, o perfil de TNF-alfa foi mais elevado e significativo entre os obesos graves quando comparados aos obesos. Uma possível explicação para este achado corresponde a maior massa de adipócitos entre os obesos graves, confirmada pelas maiores circunferências de cintura apresentadas por este grupo. De fato, a adiposidade abdominal é associada a maior resistência à insulina e hiperinsulinismo. Assim, esses pacientes produziriam uma maior quantidade de citocinas pró-inflamatórias. Ademais, considerando apenas os obesos graves, observamos que esta condição esteve associada ao parâmetro mais sugestivo da DHGNA que é a resistência insulínica, variável

relacionada a todo o espectro da doença, desde a esteatose emergente até a progressão da doença para cirrose e hepatocarcinoma<sup>30</sup>.

Assim, nosso estudo sugere que a obesidade é uma condição inflamatória isoladamente. Em alguns casos comorbidades como a DHGNA poderão se expressar. Desta forma, sugerimos a ampliação investigativa dessa população tendo em vista o pressuposto da existência de um quadro inflamatório incipiente, desde a instalação da obesidade. Finalmente, este estudo pretende estabelecer referencial teórico, considerando que a busca na literatura resultou em um maior número de artigos de revisão quando comparado aos artigos originais.

## REFERÊNCIAS

1. WHO. Obesity preventing and managing the global epidemic. Report of WHO Consultation on Obesity. World Health Organization. Geneva,1998.
2. Ogden CL, Flegal KM, Carroll MID, Johnson CL. Prevalence and trends in obesity among US children and adolescents 1999-2000. JAMA 2002;288:1728-32.3.
3. Costa RF, Cintra IP, Fisberg M. Prevalence of overweight and obesity in school children of Santos city, Brazil. Arq Bras Endocrinol Metab 2006;50(1):60-7.
4. Harrell JS, Jessup A, Greene N. Changing our future: obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. J Cardiovasc Nurs 2006;21:322-30.
5. Kershaw EE, Flier JS. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89(6):2548-56.
6. Wajchenberg B L; Tecido Adiposo como Glândula Endócrina; Arq Bras Endocrinol Metab 2000; 44/1:1320.
7. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. Arq Bras Endocrinol Metab 2006;50:216-29.
8. Carvalheira JBC, Saad MJA. Insulin resistance/hyperinsulinemia associated diseases not included in the metabolic syndrome. Arq Bras Endocrinol Metab 2006;50(2):360-67.
9. Codoner-Franch P, Valls-Belles V, Arilla-Codoner A, Alonso-Iglesias E. Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. Transl Res 2011;158(6):369-84.
10. Onis M, Onyango AW, Borghi E, Siyam A, Nishida C, Siekmann J. Development of a WHO growth reference of schoolaged children and adolescents. Bulletin of the WHO 2007; 660-7.
11. WHO. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. 2000.

12. Hamaguchi M, Kojima T, Itoh Y, Harano Y, Fujii K, Nakajima T, et al. The Severity of Ultrasonographic Findings in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Reflects the Metabolic Syndrome and Visceral Fat Accumulation. *Am J Gastroenterol* 2007;102(2):2708-15.
13. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2014;37(1):S81-90.
14. Obesidade na infância e na adolescência – Manual de Orientação / Sociedade Brasileira de Pediatria. Departamento Científico de Nutrologia. 2ª Ed. – São Paulo: SBP. 2012. 142 p.
15. Geloneze B, Tambascia MA. Laboratorial evaluation and diagnosis of insulin resistance. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006;50(2):208-15.
16. Almeida CAN, Pinho AP, Ricco RG, Pepato MT, Brunetti IL. Determination of glycemia and insulinemia and the homeostasis model assessment (HOMA) in schoolchildren and adolescents with normal body index. *J Pediatr (Rio J)* 2008;84:136-40.
17. Roberts EA. Pediatric nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): A “growing” Problem? *J Hepatol* 2007;46:1133-42.
18. Fishbein MH, Miner M, Mogren C, Chalekson J. The spectrum of fatty liver in obese children and the relationship of serum aminotransferases to severity of steatosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;36(1):54-61.
19. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinol* 2004;145:2273-82.
20. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Weltman M, George J. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002;35:373-79.
21. Ruan H, Miles PDG, Ladd CM, Ross K, Golub TR, Olefsky JM, et al. Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor- $\alpha$  implications for insulin resistance. *Diabetes* 2002;51:3176-88.
22. Peverill W, Powell LW, Skoien R. Evolving concepts in the pathogenesis of NASH: beyond steatosis and inflammation. *Int J Mol Sci* 2014;15:8591-8638.
23. Jovinge S, Hamsten A, Tornvall P, Proudler A, Bävénhoim P, Ericsson C-G, et al. Evidence for a role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in disturbance of triglyceride and glucose metabolism predisposing to coronary heart disease. *Metabolism* 1998;47:113-8.
24. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995;95:2409-15.

25. Kern PA, Sagnizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB, The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *Clin Invest* 1995;95:2111-29.
26. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004;92(3):347-55.
27. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 Pathogenic T-Cell Population Induces Autoimmune Inflammation. *J Exp Med* 2005;201(2):233-40.
28. Caballero B. The Global Epidemic of Obesity: an overview. *Epidemiol Rev* 2007;29:1-5.7
29. Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 2001;104:531-43.
30. Duvnjak M, Lerotic I, Barsic N, Tomasic V, Jukie LV, Velagie V, et al. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2007;13:4539-50.

## 5 DISCUSSÃO

A obesidade é uma doença crônica, de etiologia multifatorial, crescente e epidêmica no mundo, atingindo não apenas adultos, mas crianças e adolescentes <sup>1</sup>. Os indivíduos obesos apresentarão comorbidades, provavelmente determinadas por algum fator relacionado ao ganho de peso<sup>2</sup>. Esta premissa motiva pesquisadores pelo entendimento de um mecanismo subjacente à obesidade que determinaria estas comorbidades, tendo em vista sua gravidade. Este estudo considerou os relatos de literatura acerca do estresse metabólico deflagrado inicialmente pela ingestão de alta carga calórica que caracteriza o hábito alimentar do indivíduo obeso levando ao acúmulo de gordura corporal <sup>3</sup>. Este mecanismo reproduzido continuamente desencadearia uma cascata inflamatória caracterizada como de baixo grau, que cronicamente levaria às comorbidades comuns à obesidade, como diabetes mellitus tipo 2, fígado gorduroso, dislipidemias e doenças cardiovasculares <sup>2</sup>.

Assim, um grupo de 90 crianças e adolescentes obesos, sendo aproximadamente 58% obesos graves foi avaliado clínica e laboratorialmente, tendo em vista a caracterização do *status* glicídico e hepático, confrontado aos marcadores inflamatórios. Observamos uma alta prevalência de alterações na glicose sanguínea, insulina basal, HOMA-IR e HbA1c e encontramos que aproximadamente 8% dos pacientes reuniram critérios para o diagnóstico de diabetes mellitus. Esses achados similares aos achados descritos por D'Adamo e Caprio <sup>4</sup> foram relevantes, considerando que esses pacientes eram clinicamente assintomáticos e que na investigação de rotina, a qual incluiria apenas a glicemia em jejum como parâmetro bioquímico do metabolismo glicídico, estas alterações não teriam sido encontradas.

Verificamos ainda, que a severidade da obesidade determinou a frequência das alterações, de forma que a hiperinsulinemia e a resistência insulínica foram mais observadas nos obesos graves e nestes a TNF- $\alpha$  e a PCR se apresentaram elevadas. A TNF- $\alpha$  é uma citocina inflamatória associada à obesidade e apresenta um papel crucial na determinação da resistência insulínica <sup>5</sup>. Os obesos graves também apresentaram uma maior circunferência da cintura provavelmente devido ao padrão de distribuição central da adiposidade secundária à resistência insulínica. Teoricamente, esse acúmulo de tecido adiposo produziria, conseqüentemente, uma maior quantidade de citocinas pró-inflamatórias, estabelecendo-se assim um mecanismo inflamatório cíclico e contínuo.

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), outra comorbidade prevalente no grupo estudado, foi verificada em 63% dos casos, sendo que em quase 90% destes a esteatose foi de grau I. A esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) foi questionada considerando o valor normal das enzimas hepáticas e pelo fato desse diagnóstico ser histológico, e assim sendo, enzimas normais não afastariam o diagnóstico. Embora os obesos graves tenham apresentado as maiores taxas de Gama-GT, em seu estudo, Fishbein *et al.*<sup>6</sup> analisaram a relação das transaminases com a gravidade da esteatose e concluíram que as maiores alterações são esperadas em casos graves de fígado gorduroso, em oposição aos nossos achados, tendo em vista a prevalência de esteatose em estágio inicial ter sido similar entre obesos e obesos graves.

Não observamos associação do perfil inflamatório com os valores séricos da Gama-GT, assim como a biópsia hepática considerada padrão ouro para o diagnóstico da esteato-hepatite não foi realizada, tendo em vista obstáculos éticos. Ainda em relação à DHGNA, os indivíduos obesos graves embora mais numerosos não foram os mais acometidos. Nestes, a circunferência da cintura foi maior, as citocinas TNF- $\alpha$  e PCR se apresentaram elevadas e a IL-6 apresentou uma tendência de associação. Como esperado verificamos neste grupo relevante associação à resistência insulínica ( $p < 0,009$ ), principal determinante da DHGNA.

Sumariamente, neste estudo, alterações glicêmicas determinando resistência insulínica poderiam ter contribuído de forma determinante para a DHGNA e estiveram associados a um processo inflamatório secundário à obesidade. Segundo estudo de Almeida *et al.*<sup>7</sup>, achados laboratoriais em indivíduos portadores de obesidade mostraram níveis aumentados de marcadores inflamatórios, proteínas de inflamação de fase aguda, hormônios, radicais livres e outros fatores de ativação endotelial, sugerindo a existência de uma condição inflamatória subjacente, determinando o início da DHGNA. Finalmente, o presente estudo envolvendo crianças e adolescentes obesos cuja principal queixa era o ganho de peso descreve a presença de um processo inflamatório subjacente à obesidade e diretamente proporcional à sua gravidade, que estaria associado ao desenvolvimento de pelo menos duas comorbidades crônicas, de difícil controle e de evolução letal que são o DM2 e a DHGNA, cujas semelhanças nos respectivos mecanismos fisiopatológicos se apoiam mutuamente levando ao seu desenvolvimento.



## REFERÊNCIAS

1. WHO. Obesity preventing and managing the global epidemic. Report of WHO Consultation on Obesity. World Health Organization, Geneva, 1998.
2. Codoner-Franch P, Valls-Belles V, Arilla-Codoner A, Alonso-Iglesias E. Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. *Transl Res* 2011;158(6): 369-84.
3. Gómez FI, Ortega MG, Alonso AA, Soler IO, Tafalla MSA, Paredes MP, Almela MLL. Obesity, endothelial function and inflammation: the effects of weight loss after bariatric surgery. *Nutr Hosp* 2016;33(6):1340-46.
4. D'Adamo E, Caprio S. Type 2 diabetes in youth: epidemiology and pathophysiology. *Diabetes Care* 2011;34(S)2:161-5.
5. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinol* 2004;145:2273-82.
6. Fishbein MH, Miner M, Mogren C, Chalekson J. The spectrum of fatty liver in obese children and the relationship of serum aminotransferases to severity of steatosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;36(1):54-61.
7. de Almeida IT, Cortez-Pinto H, Fidalgo G, Rodreigues D, Camilo ME. Plasma total and free fatty acids composition in human non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Nutr* 2002;21:219-223.

## 6 CONCLUSÕES

O estudo conduzido em crianças e adolescentes obesos assintomáticos encontrou uma grande prevalência de DHGNA entre os participantes, embora este quadro não estivesse associado a níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como ocorreu quando a variável obesidade e sua gravidade foram avaliadas. Mesmo não sendo significativo do ponto de vista estatístico, a proporção de obesos graves entre as crianças e adolescentes sem DHGNA foi bem superior àqueles com essa alteração (52.9 vs 35.7%), sugerindo ser a gravidade da obesidade um confundidor desta relação.

Outro achado relevante refere-se à elevada prevalência de alterações glicêmicas laboratorias na glicose sanguínea, insulina basal, HbA1c e por conseguinte no HOMA-IR, resultando no diagnóstico de diabetes mellitus em aproximadamente 8% dos participantes.

A interpretação para este fato sugere que o processo inflamatório existente e inerente à obesidade é incipiente, e por tratar-se de indivíduos muito jovens ainda não tenha se manifestado em sua plenitude, impedindo a expressão clínica. Assim, este estudo recomenda peremptoriamente, em pacientes pediátricos obesos, a ampliação da investigação de rotina através da inclusão das medidas dos marcadores inflamatórios, tendo em vista o pressuposto da existência de um quadro inflamatório incipiente, além de outros relacionados à inspeção da função hepática e glicêmica, de forma a permitir ações preventivas de controle de doenças com alta morbimortalidade associadas.

Finalmente, este estudo pretende estabelecer referencial teórico, considerando que a busca na literatura resultou em um maior número de artigos de revisão quando comparado aos artigos originais. Adicionalmente, sugere que a obesidade é uma condição inflamatória isoladamente e que em alguns casos, comorbidades como a DHGNA e DM2 poderão se expressar.

## REFERÊNCIAS (INTRODUÇÃO)

1. Madeira et al. Ponto de Corte do Índice Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance (HOMA-IR) Avaliado pela Curva Receiver Operating Characteristic (ROC) na Detecção de Síndrome Metabólica em Crianças Pré-Púberes com Excesso de Peso. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2008; 52 / 9: 1466-73.
2. Codoner-Franch P, Valls-Belles V, Arilla-Codoner A, Alonso-Iglesias E. Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. *Transl Res* 2011, December; 158(6): 369-84.
3. Características clínicas e laboratoriais de crianças e adolescentes obesos. *Revista Paulista Pediatria* 2007; 25(1): 27-32.
4. McCullough, 2006). McCullough AJ. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40:17-29.
5. Elariny HA, Baranova A. Comment on: Diet-induced obesity associated with steatosis, oxidative stress and inflammation in liver. *Surg Obes Relat Dis* 2012, Jan; 8(1): 81-3.

## ANEXOS

### ANEXO 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

#### Título da Pesquisa – **Contribuição das Citocinas Pró-Inflamatórias na Doença Hepática em Crianças e Adolescentes com Excesso Ponderal.**

Nome do Pesquisador – Dr<sup>a</sup>. Silvana Neves Ferraz de Assunção

Nome do Orientador – Dr<sup>a</sup>. Luciana Rodrigues Silva

Nome dos Co-Orientadores – Dr. Crésio Alves, Dr. Ney Boa Sorte

Prezado Senhor (a),

Seu filho (a) está sendo convidado (a) a participar desta pesquisa que tem como finalidade investigar a influência das citocinas pró-inflamatórias na doença hepática de crianças com idade entre oito e 18 anos, com obesidade não relacionada a outra doença conhecida. Ao participar deste estudo, você permitirá que a pesquisadora Silvana Assunção o examine, solicite exames, bem como tenha acesso a esses resultados e faça anotações. Você tem liberdade de se recusar a participar agora ou em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para você e para seu filho. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone da pesquisadora do projeto e se necessário através do telefone do Comitê de Ética e Pesquisa. A participação nesta pesquisa não traz complicações legais e os riscos e desconfortos são mínimos. Será obtido de 10-15 mL de sangue (quantidade menor ou igual a que cabe em uma colher das de sopa) em uma veia do braço, através de seringa e agulha esterilizadas, e que depois do uso serão jogadas no lixo em caixas de papelão. O sangue poderá ser obtido de uma única vez ou mais e os riscos associados a esse procedimento são mínimos. Entretanto, esteja ciente que poderá ocorrer dor e/ou manchas roxas (equimoses) no local da punção quando for feita a coleta de sangue. A sensação de dor durante o ato de colher sangue na veia do braço varia de pessoa para pessoa, e crianças pequenas podem chorar devido à dor. Tenha certeza que a coleta será feita por uma pessoa treinada e habilitada para que o desconforto seja o menor possível. Uma parte do sangue obtido será testada imediatamente para os exames bioquímicos e a outra parte será armazenada a uma temperatura de -80°C no Laboratório de Imunologia do Hospital das Clínicas até a realização das dosagens das citocinas. As amostras de sangue não utilizadas nesse estudo serão descartadas seguindo as normas de descarte hospitalar. A Dr<sup>a</sup>. Silvana ou alguém da sua equipe irá lhe informar sobre os resultados dos exames laboratoriais assim que a pesquisa esteja concluída. Seu filho (a) também será submetido(a) a um exame de

ultrassom do abdome, o qual não lhe traz nenhum risco, a não ser uma sensação de frio passageira quando da aplicação do gel em sua pele.

Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos critérios do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos, conforme Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade. Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais e você terá acesso aos resultados através de uma cópia que será anexada ao seu prontuário. Ao participar desta pesquisa, você não terá nenhum benefício direto. Entretanto, esperamos que este estudo forneça informações importantes, de forma que o conhecimento que será constituído a partir desta pesquisa possa ajudar na prevenção e tratamento dessas alterações, onde o pesquisador se compromete a divulgar os resultados obtidos. Você não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem.

### **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, confirmo que recebi cópia deste termo de consentimento, e autorizo a execução do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo.

---

Nome / Assinatura do responsável pelo participante da pesquisa

---

Nome/Assinatura do pesquisador

## ANEXO 2 - Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa nº. 326.132

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
PROF. EDGARD SANTOS-  
UFBA - HUPES



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** INFLUÊNCIA DAS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NA DETERMINAÇÃO DA DOENÇA HEPÁTICA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM EXCESSO PONDÉRAL.

**Pesquisador:** Silvana Neves Ferraz de Assunção

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 15741813.3.0000.0049

**Instituição Proponente:** Hospital Universitário Prof. Edgard Santos-UFBA

**Patrocinador Principal:** Hospital Universitário Prof. Edgard Santos-UFBA

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 326.132

**Data da Relatoria:** 19/06/2013

#### Apresentação do Projeto:

**Resumo:**

O presente projeto de pesquisa pretende selecionar indivíduos entre 5 e 18 anos, de ambos os sexos, portadores de obesidade exógena e medir os marcadores de estresse inflamatório (citocina, radicais livres, TNF-alfa, ETC.) e verificar a existência de influências sobre os perfis laboratoriais hepáticos, glicídicos e lipídicos.

**Introdução:**

A obesidade é uma doença crônica e epidêmica no mundo. Possui características inflamatórias que determinam o aparecimento de comorbidades como diabetes melitus, hepatopatias, dislipidemias, entre outras. O conhecimento desse estado inflamatório crônico, bem como a maneira como ele atuaria na determinação dessas comorbidades, ainda não são bem conhecidas.

**Hipótese:**

A pesquisa da presença e a quantificação de determinados marcadores desse estado inflamatório quando projetados sobre os perfis hepático, glicídico e lipídico; podem revelar a influência desses marcadores sobre as desordens comuns em indivíduos obesos.

**Metodologia Proposta:**

**Endereço:** Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar

**Bairro:** Canela

**CEP:** 40.110-060

**UF:** BA

**Município:** SALVADOR

**Telefone:** (71)3283-8043

**Fax:** (71)3283-8140

**E-mail:** cep.hupes@gmail.com



HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
PROF. EDGARD SANTOS-  
UFBA - HUPES



Continuação do Parecer: 326.132

4- METODOLOGIA 4.1 Desenho do estudo- Estudo de Prevalência. 4.2 População de referência- Indivíduos com excesso ponderal, atendidos no ambulatório de obesidade da Unidade Metabólica Fima Lifshitz, localizado no Centro Pediátrico Professor Hosannah Oliveira (CPPHO), que integra o Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (COM-HUPES). 4.3 Característica do local do estudo- O referido ambulatório atende pacientes do SUS provenientes de Salvador e de outras cidades do interior da Bahia, em um turno de atendimento semanal, onde são atendidos em média 20 pacientes. A equipe responsável pelo atendimento é composta por um pediatra especializado em nutrologia pediátrica, duas nutricionistas especializadas em nutrição infantil, uma psicóloga e uma enfermeira. O serviço é composto também pelo Laboratório de Análises Clínicas e pelo Serviço de Diagnóstico por imagem do Complexo do Hospital Universitário Professor Edgar Santos (COM-HUPES). Essa rede laboratorial realiza exames laboratoriais bioquímicos, hormonais e de ultra-sonografia. Atualmente, o ambulatório conta com cerca de 180 pacientes atendidos, dos quais cerca de 80% mantém acompanhamento regular (pelo menos duas consultas por ano). 4.4 Critérios de Inclusão:  $\zeta$  Indivíduos com obesidade exógena;  $\zeta$  Faixa etária compreendida entre 5 a 18 anos;  $\zeta$  Ambos os sexos;  $\zeta$  Provenientes da cidade de Salvador e região metropolitana. 4.5 Critérios de Exclusão: Uso de medicamentos que interfiram no metabolismo hepático e glicídico, tais como corticoides, sulfas, antipsicóticos, anfetaminas, etc; Antecedentes médicos de doença autoimune e transfusão de sangue; Vigência de processo infeccioso sistêmico crônico e/ou agudo, nos últimos dez dias que antecedem os exames de laboratório; Sorologia positiva para Hepatites A, B e C; Relato de ingestão de álcool e exposição a toxinas ambientais. 4.6 Definição da Amostra: Amostra de conveniência. Serão convidados a participar do estudo, os pacientes que compareceram ao ambulatório semanal de obesidade no período de 1 (um) ano. 4.7 Técnica e Instrumentos utilizados: Todos os pacientes que preencherem os critérios de inclusão, e assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido serão avaliados como segue: Preenchimento de questionário com dados do paciente: nome, endereço, telefone, idade, gênero, ocupação, antecedentes médicos, ingestão de álcool, uso de medicamentos (quais), exposição à toxinas ambientais. Exame clínico: palpação e percussão do abdômen, medida do peso, altura, IMC, circunferência da cintura e pressão arterial (PA). Exames laboratoriais: 1- Perfil hepático: TGO, TGP, Gama-GT, proteínas totais e frações, tempo de protrombina, tromboelastograma. 2- Perfil glicídico: glicemia em jejum e insulina sérica, hemoglobina glicada. 3- Perfil lipídico: colesterol total e frações e triglicérides. 4- Ultrassonografia abdominal. 5- Atividade inflamatória: VHS, PCR ultrasensível, alfa-1 glicoproteína ácida, citocinas e TNF- alfa. 6- Outros: marcadores virais para vírus A, B e C da hepatite. O peso será medido usando balança portátil Filizola, com

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar  
Bairro: Canela CEP: 40.110-060  
UF: BA Município: SALVADOR  
Telefone: (71)3283-8043 Fax: (71)3283-8140 E-mail: cep.hupes@gmail.com



HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
PROF. EDGARD SANTOS-  
UFBA - HUPES



Continuação do Parecer: 326.132

sensibilidade de 100g, com o indivíduo portando apenas roupas íntimas. Um estadiômetro de base plana, com escala graduada em centímetros (cm), com intervalos de 0,1 cm será usado para mensurar a altura. O IMC será calculado dividindo o peso (kg) pelo quadrado da altura (m) (Kg/m<sup>2</sup>), e o indicador IMC/idade e sexo do escore z será utilizado para classificar o estado antropométrico dos participantes nas categorias sobrepeso, obeso e obeso grave se, respectivamente, acima de 1,2 ou 3 desvios padrão (DP) da população de referência, baseado na curva da Organização Mundial de Saúde (OMS) (9). A circunferência da cintura será medida com fita métrica maleável e inelástica, no ponto médio entre o último arco costal e a crista ilíaca anterossuperior (10). Serão realizadas duas medidas e a média entre as duas será adotada e avaliada segundo os valores.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Descrever a influência das citocinas pró-inflamatórias na determinação da doença hepática em crianças e adolescentes com excesso ponderal.

Objetivo Secundário:

1- Investigar as alterações no metabolismo glicídico. 2- Estudar as alterações lipídicas relacionadas às citocinas inflamatórias.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Apenas os resultantes de punção venosa, descrito em detalhes no TCLE.

Benefícios:

Não será assegurado nenhum benefício pecuniário ou outro de qualquer natureza, que não sejam aqueles resultantes da ampliação do conhecimento proposto pela pesquisa e aumento das possibilidades diagnósticas e de tratamento para os pacientes.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Vide detalhamento das conclusões.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Vide detalhamento das conclusões.

**Recomendações:**

Vide detalhamento das conclusões.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

A pesquisadora cumpriu as recomendações do CEP.

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar

Bairro: Canela

CEP: 40.110-060

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-8043

Fax: (71)3283-8140

E-mail: cep.hupes@gmail.com



HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
PROF. EDGARD SANTOS-  
UFBA - HUPES



Continuação do Parecer: 326.132

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Resolução 466/12 que substitui a 196/96 do Conselho Nacional de Saúde) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ e ao término do estudo.

Situação: Projeto Aprovado.

**Endereço:** Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar

**Bairro:** Canela

**CEP:** 40.110-060

**UF:** BA

**Município:** SALVADOR

**Telefone:** (71)3283-8043

**Fax:** (71)3283-8140

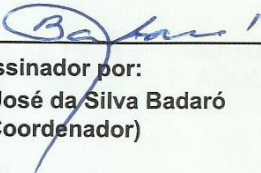
**E-mail:** cep.hupes@gmail.com

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
PROF. EDGARD SANTOS-  
UFBA - HUPES



Continuação do Parecer: 326.132

SALVADOR, 04 de Julho de 2013

  
Assinador por:  
Roberto José da Silva Badaró  
(Coordenador)

**Endereço:** Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar

**Bairro:** Canela

**CEP:** 40.110-060

**UF:** BA

**Município:** SALVADOR

**Telefone:** (71)3283-8043

**Fax:** (71)3283-8140

**E-mail:** cep.hupes@gmail.com

### ANEXO 3 - Questionário de coleta de dados

COMPLEXO UNIVERSITÁRIO PROF. EDGARD SANTOS  
Centro Pediátrico Prof. Hosannah de Oliveira-Unidade Metabólica

Coleta de dados nº \_\_\_\_\_, em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

#### IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO

Nome-  
Data de nascimento- Idade- Sexo- Número do prontuário-  
Nome da mãe ou responsável- Cor –  
Endereço-  
Telefone-  
Peso ao nascer-  
Quando ocorreu a percepção de que seu filho era gordo?  
Uso de leite materno exclusivo: sim ( ) não ( ) quanto tempo? \_\_\_\_\_  
Uso de leite materno com outros alimentos: S ( ) N ( )  
Pais obesos? S ( ) N ( ) \_\_\_\_\_  
Peso e altura? Pai \_\_\_\_\_ Mãe \_\_\_\_\_  
Doença hepática / DM na família: S ( ) N ( ) ambos ( )  
Nível de instrução dos pais-  
Frequenta escola? S ( ) N ( )

#### DADOS CLÍNICOS

Altura (cm)- Peso (Kg)- IMC (Kg/m<sup>2</sup>)- Circunferência da cintura (cm)-  
Pressão arterial- (mmHg) IMC/i (escore z)-  
Obesidade exógena: S ( ) N ( )  
Presença de doenças concomitantes (HAS, DM, Hepatites): S ( ) N ( ) \_\_\_\_\_  
Exame do abdômen: Hepatomegalia? Esplenomegalia?  
Uso de medicamentos: S ( ) N ( ) \_\_\_\_\_  
Queixas abdominais: S ( ) N ( ) \_\_\_\_\_  
Refere etilismo: S ( ) N ( )  
Padrão de atividade física = Frequente ( ): leve ( ) moderada ( ) intensa ( )  
Eventual ( )

#### DADOS LABORATORIAIS

**Hemograma**= Hg (g/dl)- Ht (%) - Leuco (mil/mm<sup>3</sup>)- Plaquetas (mil/mm<sup>3</sup>)-  
**Perfil Glicídico**= Glicemia- Insulina sérica- Hg glicada- HOMA-IR-  
**Perfil lipídico**= CT- LDL- HDL- VLDL- TG-  
**Perfil hepático**= TGO (UL)- TGP (UL)- Gama-GT (UL)-  
F. Alcalina- Proteínas totais- Albumina/globulina-  
AntiVHA IgG- Anti-VHB- Anti-VHC- AgHBs-  
**Atividade inflamatória**= VHS- PCR - Alfa-1 glicoproteína ácida-  
Citocinas:

**US abdominal** –

Assinatura do responsável pelo atendimento \_\_\_\_\_